

**Modulación de los efectos de la interleuquina 4 en
macrófagos y células dendríticas por un particulado
de la capa laminar de *Echinococcus granulosus***

Lic. Paula Seoane

Tutor: Dr. Álvaro Díaz

Co-tutor: Dra. Cecilia Casaravilla

PEDECIBA Biología, Biología celular y molecular

Agosto 2015

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis tutores, Álvaro Díaz y Cecilia Casaravilla, que me guiaron durante este proceso. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, y por enseñarme en cada paso del camino. También, y muy importante, gracias por permitirme cometer errores, y por darme un lugar para crecer como estudiante y persona.

En segundo lugar quisiera agradecer a todos los integrantes del laboratorio de inmunología, y en particular a los de “la casita del medio”. Creo firmemente que no existe el logro individual en esta área, y por eso les agradezco de corazón por toda la ayuda y apoyo que recibí de ustedes, ya sea en forma de consuelo cuando las cosas no salían tan bien o con el “préstamo” de unos mililitros de PBS. En especial quiero agradecerle a Álvaro Pittini, mi “compañero de dendríticas” y un gran amigo. Gracias por las incontables horas de compañía en el cuarto de cultivo, por las charlas semi-filosóficas sobre pLL y por hacer el ambiente de trabajo tan especial.

También quisiera agradecer a Judith Allen (Universidad de Edimburgo) y a los integrantes de su laboratorio, donde hice una pasantía. En particular a Dominik Ruckerl, que se preocupó por todos los detalles, desde la organización de una cena de bienvenida hasta la coordinación de experimentos.

No puedo dejar de agradecer a las agencias financiadoras que hicieron posible la realización de este trabajo: ANII (Beca de Maestría), Wellcome Trust (Proyecto global en el cual se engloba mi trabajo) y CAP (Beca de Finalización de Maestría).

Un agradecimiento muy especial a mi familia y amigos, que me acompañan siempre. Gracias por escucharme hablar de cosas que pueden parecer en otro idioma a veces, y por entender los horarios extraños que implica trabajar en un laboratorio. Gracias a mi familia por vivir este proceso junto a mí, por siempre encontrar una manera de alegrarme el día sin importar lo que haya pasado antes, y por siempre alentarme a seguir!

Resumen

Este trabajo se centró en el estudio de la interacción de células dendríticas y macrófagos con la capa laminar, estructura acelular basada en mucinas que protege al estadio larvario de *Echinococcus granulosus*. Se utilizó una preparación particulada de la capa laminar (pLL, del inglés *particulate Laminated Layer*) como modelo de las partículas liberadas al medio interno del hospedador durante el curso de una infección natural, y se la enfrentó a células dendríticas o macrófagos en contextos de estimulación con interleuquina (IL-) 4 o con los factores de crecimiento GM-CSF y M-CSF. Se analizó en particular la activación de la quinasa Akt, efector central de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), involucrada en los efectos celulares de los tres agonistas nombrados.

La IL-4 induce, sobre células dendríticas y macrófagos, un programa de activación alternativa caracterizado por la expresión de las moléculas de secreción Relm α y Ym1, y por la inducción de actividad arginasa intracelular, entre otros marcadores. Se encontró que la exposición a pLL inhibió los aumentos en expresión de Relm α y en menor medida actividad arginasa inducidos por IL-4 en células dendríticas *in vitro*, sin afectar la expresión de otros marcadores, incluyendo Ym1.

Los eventos de señalización intracelular a partir de estimulación con IL-4 incluyen la activación, además de STAT6, de la vía de PI3K/Akt ya mencionada. Se conoce que la expresión de algunos marcadores de activación alternativa (Relm α notablemente) depende fuertemente de la activación de PI3K/Akt, mientras que ésta es prescindible para la expresión de otros. La vía se activa también por estimulación con factores de crecimiento o por agonistas de receptores tipo toll (TLR, del inglés *toll-like receptors*), entre otros. Resultados del grupo, surgidos en paralelo a esta Tesis mostraron que, en células dendríticas, la exposición a pLL inhibe la fosforilación (activadora) de Akt inducida por estimulación con lipopolisacárido (LPS), agonista de TLR4. En coincidencia con la inhibición preferencial de Relm α dentro de los marcadores de activación alternativa, se encontró que la exposición a pLL inhibió también la fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 en células dendríticas. Se observó inhibición similar en respuesta a GM-CSF en las mismas células, así como

también en respuesta a M-CSF en macrófagos. En células dendríticas se observó además inhibición de la proliferación inducida por GM-CSF en presencia de pLL.

In vivo, la IL-4 induce, además de activación alternativa, proliferación de macrófagos, por un mecanismo probablemente indirecto, que depende de PI3K/Akt. Utilizando un modelo de inyección intraperitoneal de IL-4 (como complejo con un anticuerpo específico para lograr actividad biológica más sostenida), se encontró que la co-administración de pLL inhibió fuertemente y en forma dependiente de dosis la proliferación de macrófagos residentes, y a un menor grado la de células dendríticas, macrófagos reclutados y monocitos inducida por la citoquina. La administración de pLL también inhibió, de forma leve, la expresión de Relm α inducida por IL-4, mientras que potenció la de Ym1. La diferencia con lo observado *in vitro* en marcadores de activación alternativa sugiere la participación de otros tipos celulares, que puedan potencialmente responder a pLL produciendo IL-4 y/o IL-13. La inhibición de la proliferación de macrófagos se observó también utilizando M-CSF exógeno como estímulo en el mismo modelo. Se encontraron también efectos de pLL en ausencia de estímulos exógenos: inhibición de la proliferación de macrófagos en condiciones basales, desaparición de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, e inducción de expresión de Ym1 en células dendríticas y macrófagos. Todos los efectos de pLL observados fueron locales, ya que no se observaron sobre células de la cavidad pleural, que sí respondieron a la IL-4 o al M-CSF administrados.

Se intentó además comparar los efectos de exposición a pLL con los de preparaciones particuladas sintéticas también ricas en carbohidratos. Los materiales sintéticos no imitaron los efectos de pLL en su totalidad, y globalmente los resultados mostraron que el sistema de estudio es muy complejo, y que los efectos celulares observados no se pueden explicar simplemente por los efectos sobre la fosforilación de Akt.

Un resultado importante de la Tesis fue que la exposición a pLL inhibió la fosforilación de Akt luego de estimulación por diversos agonistas. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de inhibición independiente de los receptores específicos para los distintos agonistas. Dentro del abanico de posibles modos de inhibición de la fosforilación de Akt, aquel que resulta más probable ante los datos obtenidos es la potenciación del asa de retroalimentación negativa a partir

de mTORC1. Este complejo es activado (en forma indirecta) por Akt pero integra señales de otras vías. Se conoce que en condiciones de sobre-activación, mTORC1 inhibe el reclutamiento de PI3K a receptores, inhibiendo la activación de Akt. Está reportado que este mecanismo puede actuar en macrófagos, estimulados tanto con LPS como con IL-4, inhibiendo en el segundo caso la inducción de los marcadores de activación alternativa que dependen de PI3K. También se conoce que el mecanismo puede inhibir la proliferación celular durante la diferenciación de células dendríticas.

En suma, el trabajo expuesto en esta Tesis aportó al conocimiento sobre los efectos de exposición a materiales de la capa laminar de *E. granulosus* en células dendríticas y macrófagos en el contexto fisiopatológicamente relevante de estimulación con IL-4, en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Además, comprobó que algunos efectos de exposición a este material particulado se trasladaban al contexto de estimulación con factores de crecimiento. Estos resultados sugieren un mecanismo de acción a través de una retroalimentación negativa a partir de mTORC1, hipótesis que abre promisorias líneas de trabajo para el grupo.

Lista de Abreviaturas

- 3AC: 3 α -aminocolestano
- 4E-BP1: regulador de la traducción (del inglés, *4E Binding Protein 1*)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNasa: desoxirribonucleasa
- APC: alofococianina (del inglés, *AlloPhycoCyanin*)
- APCCy7: conjugado en tándem de APC y la cianina Cy7
- AF488: Alexa Fluor 488
- AF647: Alexa Fluor 647
- BMDC: células dendríticas derivadas de médula ósea (del inglés, *Bone Marrow-derived Dendritic Cells*)
- BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina
- BRP39: proteína de tipo quitina (del inglés, *Breast Regression Protein 39*)
- BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)
- BV421: del inglés, Brilliant Violet 421
- CD: cúmulo de diferenciación (del inglés *Cluster of Differentiation*)
- CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República
- CLP: proteína de tipo quitina (del inglés, *Chitin-like protein*)
- DILAVE: Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
- DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- EDTA: ácido etilendiamino tetraacético (del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- ELISA: enzimoimmunoensayo (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- ERK: proteínas quinasas (del inglés, *Extracellular-signal-Regulated Kinases*)
- Fc ϵ RI: receptor Fc de alta afinidad para IgE (del inglés, *Fc ϵ receptor I*)
- Fc-M-CSF: M-CSF fusionado a la porción Fc de un anticuerpo de cerdo isotipo IgG1A
- FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *Fluorescein IsoThioCyanate*)
- FoxO3: factor de transcripción (del inglés, *Forkhead Box O3*)
- FoxP3: factor de transcripción (del inglés, *Forkhead box P3*)
- FSC: dispersión de luz hacia delante (del inglés, *Forward SScattered light*)
- GL: capa germinativa (del inglés, *Germinal Layer*)
- GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor*)
- Grb2: proteína adaptadora (del inglés, *Growth factor Receptor-Bound protein 2*)
- GTP: guanosín trifosfato

HEPES: ácido 4-(2-hydroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico

HRP: peroxidasa de rábano (del inglés, *horseradish peroxidase*)

IFN- γ : interferon- γ

IgE: inmunoglobulina de clase E

IgG: inmunoglobulina de clase G

IgM: inmunoglobulina de clase M

IL: interleuquina

IL-12p40: subunidad de 40 kDa de la IL-12 y la IL-23

IL-4c: complejo compuesto por IL-4 recombinante y el anticuerpo anti-IL-4 (11B11)

IL-4R: receptor de interleuquina 4

ILC: célula linfoide innata (del inglés, *Innate Lymphoid Cell*)

iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible (del inglés, *inducible Nitric Oxide Synthase*)

InsP₆: *myo*-Inositol hexakisfosfato

IRS: quinasa asociada al receptor de IL-4 (del inglés, *Insuline Receptor Substrate-2*)

ISPF: isonitropropiofenona

JAK: familia de quinasas Janus (del inglés, *Janus Kinase*)

kDa: kilodalton

KLF4: factor de transcripción (del inglés, *Kruppel-like factor 4*)

LAL: test de determinación del nivel de endotoxinas en muestras (*Limulus Amebocyte Lysate test*)

LL: capa laminar (del inglés, *Laminated Layer*)

LPS: lipopolisacárido (de *Escherichia coli*)

Ly6G: marcador fenotípico (del inglés, *Lymphocyte antigen 6 complex, locus G*)

MAPK: proteínas quinasas (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*)

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MEK: proteína quinasa de MAPK/ERK (del inglés, *MAPK/ERK Kinase*)

MHCII: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (del inglés, *Major Histocompatibility Complex II*)

MR: receptor de manosa (del inglés, *mannose receptor*)

mTORC1: complejo con actividad quinasa regulado positivamente por Akt (del inglés, *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*)

mTORC2: complejo con actividad quinasa que actúa sobre Akt (del inglés, *mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*)

MyD88: proteína adaptadora asociada a TLRs (del inglés, *myeloid differentiation primary-response protein 88*)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (del inglés, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NK: célula asesina natural (del inglés, *Natural Killer cell*)

NO: óxido nítrico (del inglés, *nitric oxide*)

NOX: NADPH oxidasa

NFκB: factor de transcripción (del inglés, *Nuclear Factor kappa B*)

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

PE: ficoeritrina (del inglés, *PhycoErythrin*)

PE-Cy7: conjugado en tándem de PE y la cianina Cy7

PerCP: proteínas peridínina clorofila (del inglés, *Peridinin-Chlorophyll Proteins*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PDK-1: quinasa que actúa sobre Akt (del inglés, *3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1*)

PD-L2: ligando 2 de los receptores de muerte programada (del inglés, *Programmed Death Ligand-2*)

PHLPP: fosfatasa que actúa sobre Akt (del inglés, *PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases*)

PI3K: fosfoinositol 3-quinasas (del inglés, *Phosphatidylinositol-3-Kinases*)

PI(3,4)P2: fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 3,4 biPhosphate*)

PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 4,5 biPhosphate*)

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 3,4,5 trisPhosphate*)

pLL: preparación particulada de la LL (del inglés, *particulate Laminated Layer*)

PRAS-40: regula la actividad de mTORC1 (del inglés, *Proline-Rich AKT1 Substrate of 40 kDa*)

PTB: dominio de interacción proteína:proteína (del inglés, *PhosphoTyrosine-Binding domain*)

PTEN: fosfatasa que actúa sobre PIP3 (del inglés, *Phosphatase and TENsin homolog*)

PVDF: fluoruro de polivinilideno (del inglés, *PolyVinylidene Fluoride*)

Relm: moléculas tipo resistina (del inglés, *Resistin-like molecules*)

Rheb: GTPasa que regula mTORC1 por debajo de AKT (del inglés, *Ras Homolog Enriched in Brain*)

rIL-4: IL-4 recombinante

RPMI: medio del Instituto Roswell Park (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute Medium*)

RTK: quinasa de tirosinas (del inglés, *Receptor-associated Tyrosine Kinase*)
S6K1/2: quinasas sustrato de mTORC1
SBF: suero bovino fetal
SDS: dodecil sulfato de sodio (del inglés, *Sodium DodecylSulphate*)
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS (del inglés, *SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
SH2: dominio de interacción proteína:proteína (del inglés, *Src Homology 2 domain*)
SHIP1/2: fosfatasa que actúan sobre PIP3 (del inglés, *SH2-domain containing Inositol-5-Phosphatase*)
SHP2: fosfatasa de tirosinas (del inglés, *Src Homology Phosphatase 2*)
SOCS-1: supresor de la señalización de citoquinas 1 (del inglés, *Suppressor Of Cytokine Signaling 1*)
SOS: factor de intercambio de nucleótidos (del inglés, *Son Of Sevenless*)
SSC: dispersión de la luz hacia los costados (del inglés, *Side SCattered light*)
STAT-6: factor de transcripción (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription-6*)
Strep: estreptavidina (del inglés, *streptavidin*)
TCR: receptor del linfocito T (del inglés, *T Cell Receptor*)
ThioMΦ: macrófago(s) reclutados por tioglicolato (del inglés, *Thioglycollate-elicited macrophages*)
TRIF: proteína adaptadora asociada TLRs (del inglés, *TIR-domain-containing adapter protein inducing interferon-β*)
TSC1/2: complejo que regula mTORC1, por debajo de Akt (del inglés, *Tuberous SClerosis proteins 1/2*)
Th: linfocito T colaborador (del inglés, *T helper lymphocyte*)
TLR: receptor de tipo Toll (del inglés, *Toll-like Receptor*)
TMB: tetrametilbencidina
TNF-α: factor de necrosis tumoral-α (del inglés, *Tumour Necrosis Factor-α*)
UoE: Universidad de Edimburgo (del inglés, *University of Edinburgh*)

Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Lista de abreviaturas	v
1. Introducción	1
1.1 <i>Echinococcus granulosus</i>	1
1.2 Estructura de la hidátide	2
1.3 Capa Laminar	3
1.4 Respuesta inmune frente a infección con helmintos	5
1.5 Activación alternativa de macrófagos y células dendríticas	7
1.6 Macrófagos residentes y derivados de monocitos	9
1.7 Señalización en respuesta a IL-4.....	10
1.8 Señalización a través de PI3K.....	12
1.9 Señalización por factores de crecimiento y proliferación celular, en general y en células dendríticas y macrófagos	15
2. Hipótesis y Objetivos	19
3. Materiales y Métodos	21
3.1 Preparación de herramientas de trabajo.....	21
3.1.1 Material parasitario	21
3.1.2 Generación de una preparación particulada de la capa laminar de <i>Echinococcus granulosus</i> para trabajo con células	21
3.1.3 Otras preparaciones particuladas para trabajo con células.....	22
3.1.4 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea	22
3.1.5 Obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato	24
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	24
3.2.1 Ensayos de evaluación de los efectos de pLL sobre la respuesta de células a IL-4.....	24
3.2.1.1 Efectos sobre la activación alternativa de BMDC inducida por IL-4	24
3.2.1.2 Efectos sobre la fosforilación de Akt inducida por IL-4	25
3.2.2 Ensayos de evaluación de los efectos de pLL sobre la respuesta de células a factores de crecimiento.....	25

3.2.2.1 Efectos sobre la proliferación.....	25
3.2.2.2 Efectos sobre la fosforilación de Akt inducida por factores de crecimiento	26
3.3 Experimentos <i>in vivo</i>	26
3.4 Técnicas de análisis.....	27
3.4.1 SDS-PAGE	27
3.4.2 Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).....	28
3.4.3 <i>Western blot</i>	28
3.4.4 Citometría de flujo	29
3.4.4.1 Marcado de componentes de superficie.....	29
3.4.4.2 Tinción con la sonda de viabilidad To-Pro3	30
3.4.4.3 Marcado de componentes intracelulares.....	30
3.4.4.4 Marcado de componentes nucleares	31
3.4.5 Cuantificación de citoquinas y otras proteínas en solución mediante ELISA (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	31
3.4.6 Ensayo de actividad arginasa	32
3.4.7 Ensayo de Griess	32
3.5 Análisis estadístico de los datos	32
4. Resultados	35
4.1 Efectos de pLL sobre la activación alternativa en BMDC <i>in vitro</i>	35
4.2 Efectos de pLL sobre la activación de Akt en BMDC y ThioM ϕ <i>in vitro</i>	38
4.3 Efectos de pLL sobre proliferación celular <i>in vitro</i>	42
4.4 Efectos de pLL sobre la activación de ERK <i>in vitro</i>	44
4.5 Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a IL-4	46
4.6 Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a M-CSF	68
4.7 Evaluación <i>in vivo</i> de la influencia de SHIP1 en los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a IL-4.....	71
4.8 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre la activación de Akt <i>in vitro</i>	77
4.9 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre activación de ERK <i>in vitro</i>	80

4.10 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre la respuesta a IL-4 <i>in vivo</i>	83
4.11 Implicancia funcional de los efectos de pLL observados.....	88
5. Discusión	97
5.1 Efectos de pLL	97
5.1.1 Inhibición de la fosforilación de Akt y su posible relación con la inhibición de la activación alternativa.....	97
5.1.2 Relación entre inhibición de la fosforilación de Akt e inhibición de la proliferación celular	101
5.1.3 Sistema experimental empleando IL-4c	103
5.1.4 Inhibición de la proliferación celular	104
5.1.5 Diferencias entre efectos sobre la activación alternativa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	104
5.2 Comparación entre pLL y materiales particulados sintéticos.....	106
5.2.1 Inhibición de la proliferación celular	106
5.2.2 Reclutamiento de células a la cavidad peritoneal.....	107
5.2.3 Desaparición de macrófagos residentes	108
5.3 Experimento de infección con <i>H. polygyrus</i>	108
5.4 Conclusiones y perspectivas	110
6. Referencias	113

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.1 Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i>	2
Figura 1.2 Estructura del estadio larvario de <i>E. granulosus</i>	3
Figura 1.3 Esquema de señalización por IL-4	11
Figura 1.4 Esquema de señalización a través de PI3K/Akt iniciada por RTK	13
Figura 1.5 Esquema de señalización a través de MAP Quinasas	16
Tabla 3.1 Herramientas utilizadas en citometría de flujo	33
Tabla 3.2 Reactivos utilizados en ensayos ELISA.....	34
Figura 4.1 Curso temporal para marcadores de activación alternativa en BMDC incubadas con IL-4, en presencia o ausencia de pLL.....	36
Figura 4.2 Curso temporal de producción de Relm α por BMDC incubadas con IL-4 en presencia o ausencia de pLL.....	37
Figura 4.3 Curso temporal de actividad arginasa en BMDC incubadas con IL-4, en presencia o ausencia de pLL.....	38
Figura 4.4 Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 en BMDC, en presencia o ausencia de pLL.....	39
Figura 4.5 Fosforilación de Akt en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de pLL.....	40
Figura 4.6 Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 o M-CSF en ThioM ϕ	41
Figura 4.7 Fosforilación de Akt en respuesta a M-CSF en ThioM ϕ , en presencia o ausencia de pLL.....	41
Figura 4.8 Curso temporal de incorporación de BrdU en BMDC, en presencia o ausencia de pLL.....	42
Figura 4.9 Inhibición de la incorporación de BrdU en presencia de pLL, en BMDC <i>knock out</i> para MyD88/Trif y de tipo silvestre.....	43
Figura 4.10 Fosforilación de ERK en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de pLL	44
Figura 4.11 Fosforilación de ERK inducida por M-CSF en ThioM ϕ , en presencia o ausencia de pLL.....	45
Figura 4.12 Estrategia de <i>gating</i> para experimentos <i>in vivo</i>	47
Figura 4.13 Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidad peritoneal en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	49
Figura 4.14 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	50

Figura 4.15	Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	52
Figura 4.16	Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	53
Figura 4.17	Expresión de CD86 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	54
Figura 4.18	Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidad peritoneal en ensayo con pLL "bloqueado"	57
Figura 4.19	Expresión de Ki67 en macrófagos residentes en ensayo con "pLL bloqueado"	58
Figura 4.20	Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"	58
Figura 4.21	Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"	59
Figura 4.22	Expresión de CD86 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"	60
Figura 4.23	Niveles de Relm α y Ym1 en el lavado peritoneal en ensayo con pLL "bloqueado"	61
Figura 4.24	Expresión de marcadores de activación alternativa a nivel de ARNm en células peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"	61
Figura 4.25	Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidades peritoneal y pleural en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	63
Figura 4.26	Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales o pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	64
Figura 4.27	Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	65
Figura 4.28	Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	66
Figura 4.29	Niveles de Relm α , Ym1 y actividad arginasa en lavados peritoneales y pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL	67

Figura 4.30	Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de Fc-M-CSF en presencia o ausencia de pLL.....	69
Figura 4.31	Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de Fc-M-CSF en presencia o ausencia de pLL	70
Figura 4.32	Números de células peritoneales recuperadas en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano.....	72
Figura 4.33	Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano	73
Figura 4.34	Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano	74
Figura 4.35	Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo <i>in vivo</i> luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano	75
Figura 4.36	Proporción de neutrófilos en sangre en ratones tratados con 3 α -aminocolestano o vehículo	76
Figura 4.37	Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados	78
Figura 4.38	Fosforilación de Akt en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados.....	79
Figura 4.39	Fosforilación de Akt en respuesta a M-CSF en ThioM ϕ , en presencia o ausencia de materiales particulados	80
Figura 4.40	Fosforilación de ERK en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados.....	81
Figura 4.41	Fosforilación de ERK en respuesta a M-CSF en ThioM ϕ , en presencia o ausencia de materiales particulados.....	82
Figura 4.42	Estrategia de <i>gating</i> para experimentos <i>in vivo</i>	84
Figura 4.43	Números de células peritoneales recuperadas luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados.....	85
Figura 4.44	Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados	86

Figura 4.45 Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados	87
Figura 4.46 Números de células peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con <i>H. polygyrus</i> o <i>naïve</i>	90
Figura 4.47 Incorporación de BrdU en macrófagos residentes peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con <i>H. polygyrus</i> o <i>naïve</i>	92
Figura 4.48 Expresión de Relm α o Ym1 en macrófagos residentes peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con <i>H. polygyrus</i> o <i>naïve</i>	92
Figura 4.49 Expresión de citoquinas por linfocitos T CD4+ de los ganglios mesentéricos provenientes de animales infectados con <i>H. polygyrus</i> o <i>naïve</i> , inyectados con pLL o PBS	93
Figura 4.50 Re-estimulación <i>ex vivo</i> de linfocitos provenientes de animales infectados con <i>H. polygyrus</i> o <i>naïve</i> , inyectados con pLL o PBS.....	94
Figura 4.51 Número de huevos y gusanos de <i>H. polygyrus</i> luego de inyección de pLL o control	95
Figura 5.1 Mecanismo de retroalimentación negativa de PI3K/Akt a través de mTORC1	98
Tabla 5.1 Comparación de los efectos de exposición a pLL, Superosa 12 y Sephadex G100	112

1. Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus*, perteneciente a la familia *taeniidae*, actualmente se compone de nueve especies: *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthra*, *E. granulosus*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* y *E. felidis*. La presente clasificación se basa en análisis taxonómicos moleculares, que comparan secuencias de ADN mitocondrial y nuclear. En una clasificación anterior *E. granulosus (sensu lato)* se componía de ocho genotipos, G1-G8, que reflejaban diferencias en el hospedador intermediario o definitivo infectado por el parásito. Los genotipos G1-G3 (llamados cepas de oveja o búfalo), corresponden a lo ahora clasificado como *E. granulosus (sensu stricto)*. De la misma manera, los genotipos G4, G5 y G6-G8 corresponden en la clasificación actual a *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis*, respectivamente [1].

Dentro del género *Echinococcus*, las especies agrupadas como *E. granulosus (sensu lato)* son los agentes causales de la hidatidosis. Esta enfermedad zoonótica es relevante en países con fuerte actividad ganadera como el nuestro, donde afecta tanto al ganado como a los trabajadores rurales [2].

E. granulosus cuenta con un ciclo de vida complejo, que involucra la infección de hospedadores intermediarios con el estadio larvario y de hospedadores definitivos con el estadio adulto (Figura 1.1). Resumidamente, el estadio adulto se aloja en el intestino delgado de cánidos, principalmente perros, se reproduce y libera huevos embrionados al ambiente a través de las heces. Los hospedadores intermediarios (omnívoros o herbívoros, principalmente bovinos y ovinos) ingieren estos huevos que, una vez en el intestino delgado, eclosionan liberando oncosferas. Las oncosferas penetran la pared intestinal y son llevadas por el sistema circulatorio al parénquima de órganos internos, principalmente hígado y pulmón. Una vez allí se desarrollan a larvas de forma subsférica llenas de líquido llamadas hidátides. Las hidátides crecen gradualmente y producen protoscólices, que constituyen la etapa infectiva para el hospedador definitivo. Éste se infecta al ingerir protoscólices presentes en las vísceras de hospedadores intermediarios infectados. Luego de ser ingeridos, los protoscólices evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, donde se desarrollan al estadio adulto en cuestión de 32 – 80 días. El ser humano, que se ve infectado al ingerir vegetales

o aguas contaminadas, es un hospedador intermediario accidental, no contribuyendo al ciclo del parásito [3, 4].

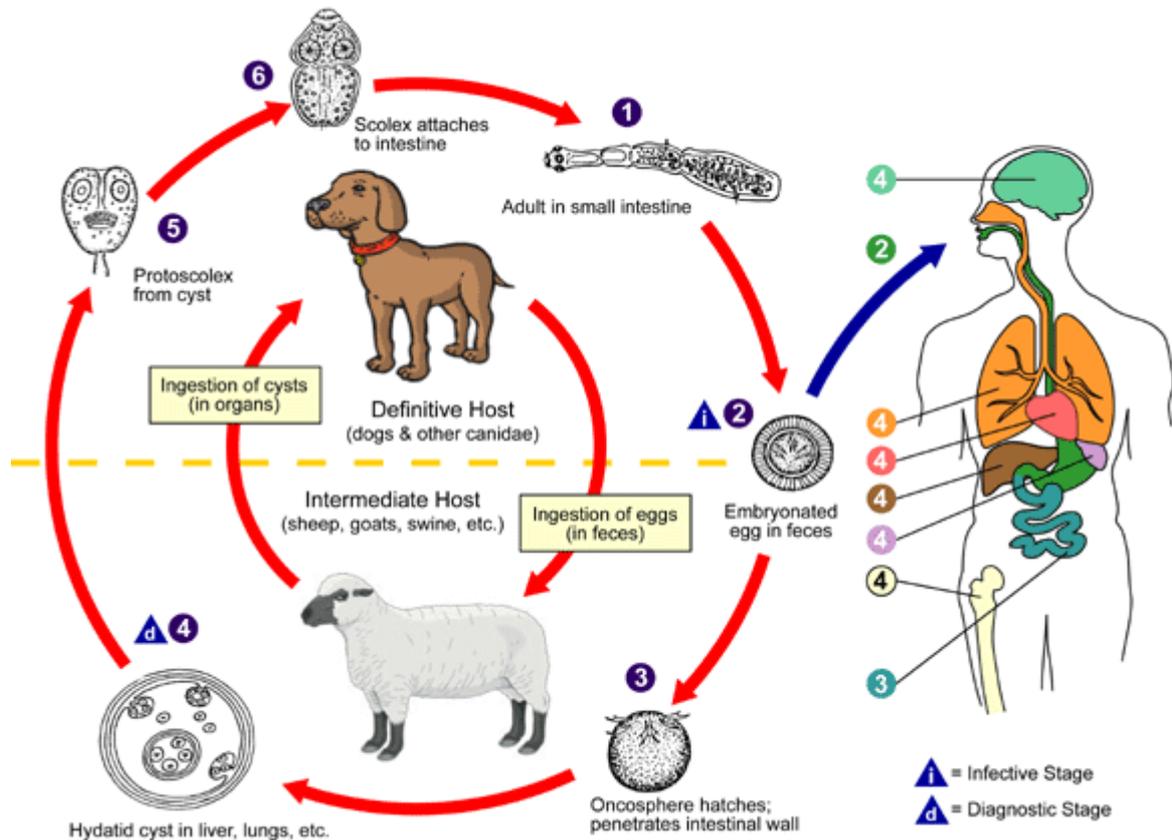


Figura 1.1 Ciclo de vida de *E. granulosus*

El detalle de cada etapa se encuentra en el texto principal. Imagen modificada de [4].

La infección con *E. granulosus* larvario es crónica y muchas veces asintomática, lo que hace difícil su diagnóstico. Esta aparente paradoja entre la falta de síntomas y la acogida de macroparásitos en el organismo es común a muchas infecciones con helmintos y evidencia la gran capacidad de evasión del sistema inmune de estos organismos [5].

1.2 Estructura de la hidátide

Como se mencionó anteriormente, las hidátides son estructuras parasitarias uniloculares llenas de líquido (líquido hidático), delimitadas por una pared (Figura 1.2). Ésta a su vez se compone por una capa celular, la capa germinativa (GL, del inglés *Germinal Layer*), y externa a ella, una capa de material extracelular, la

capa laminar (LL, del inglés *Laminated Layer*). Por fuera de la LL se encuentra una cápsula de colágeno producida por el hospedador (capa adventicia) o una zona de reacción inflamatoria local activa con infiltración de leucocitos, dándose también situaciones intermedias. El predominio de uno u otro tipo de reacción se relaciona con el grado de adaptación del parásito al hospedador en cuestión, siendo la formación de una cápsula de colágeno un signo de buena adaptación parásito-hospedador, situación en la cual además, por lo general, se desarrollan hidátides fértiles [6, 7]. En conjunto, la hidátide y la capa adventicia y/o reacción inflamatoria local conforman el quiste hidático.

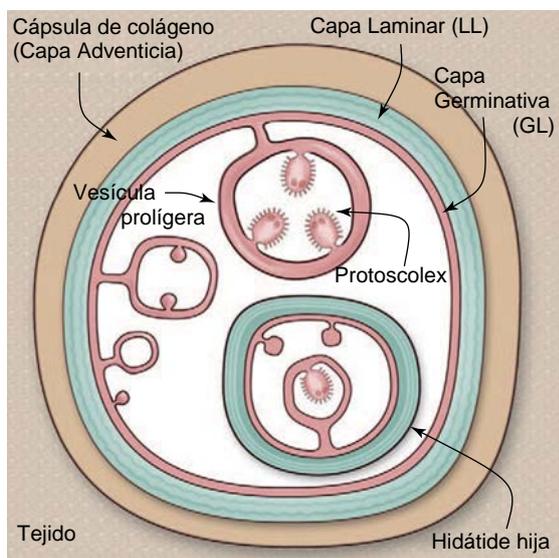


Figura 1.2 Estructura del estadio larvario de *E. granulosus*

El estadio larvario de *E. granulosus*, hidátide, es una estructura subsférica delimitada por una pared. La pared se compone de la capa germinativa (GL) y la capa laminar (LL). Por fuera de ella suele haber una cápsula de colágeno (capa adventicia) y en conjunto forman el quiste hidático. El interior de la hidátide contiene el líquido hidático, que baña a las células de la GL. Éstas generan brotes hacia el interior de la hidátide, que se vesicularizan y forman protoscolex. Ocasionalmente, pueden encontrarse vesículas hijas, con su propia LL, en el interior de hidátides mayores. Tomado de [9].

1.3 Capa Laminar

La formación de la LL es un proceso importante en la biología de *E. granulosus* en lo que respecta a la interacción con el sistema inmune del hospedador. Esta estructura acelular, que en *E. granulosus* puede alcanzar los 3 mm de espesor, es sintetizada por las células de la GL subyacente y las protege del contacto directo con las células del sistema inmune del hospedador. Molecularmente está compuesta por una red de mucinas, con nano-depósitos granulares de *myo*-inositol hexakisfosfato cálcico ($InsP_6$) intercalados. Los depósitos de $InsP_6$ son exclusivos de *E. granulosus* (y potencialmente *E. equinus* [8]), mientras que las mucinas son el componente principal de la LL de todas las especies del género [9]. Sin embargo, trabajos de elucidación de la porción glucídica de la LL recientes revelan que existen diferencias entre los glicanos que decoran las apomucinas en *E. granulosus* y *E. multilocularis*, principalmente en lo que

respecta al largo de las cadenas glucídicas encontradas [8]. Estas diferencias parecen correlacionar con el espesor de la LL en las distintas especies, encontrándose cadenas glucídicas más largas en la LL de *E. granulosus* que en la de *E. multilocularis* [8]. El tamaño de poro de la red mucínica en *E. granulosus* permite el pasaje de macromoléculas de hasta 150 kDa al menos, proporcionando una gran superficie de interacción con los sistemas complemento, quininas y coagulación del hospedador [9, 10].

Un dato especialmente interesante sobre la LL es que su producción coincide temporalmente, y es necesaria para, la resolución de la inflamación inicial en infecciones experimentales con *Echinococcus* larvario [7, 11]. Esto sugiere que la LL está asociada a la regulación de la respuesta inflamatoria del hospedador hacia el parásito, lo cual vuelve a este material parasitario particularmente atractivo para su uso en estudios inmunológicos.

Atendiendo estas singularidades de la LL, el grupo trabaja con una preparación particulada de la capa laminar que denominamos pLL (del inglés, *particulate Laminated Layer*). Este material es un modelo de partículas de la LL liberadas *in vivo* dentro del hospedador. Si bien no se cuenta con evidencia formal de la presencia de partículas de LL en infecciones naturales con *E. granulosus* al momento, sí se ha reportado la presencia de estas partículas distales a la hidátide en infección con el parásito relacionado *E. multilocularis* [12]. Además, se han visto partículas de LL dentro de macrófagos circundantes en infección experimental con *E. granulosus* [13]. Dado el tamaño que alcanzan las hidátides (hasta decenas de centímetros de diámetro [9]), y que el material para la laminar es sintetizado por la GL subyacente, es razonable suponer que ocurran procesos de fisura y descascaramiento de la LL durante curso de la infección que permitan el crecimiento de la hidátide. Resultados previos del grupo muestran que pLL efectivamente es capaz de modular la respuesta de células dendríticas a lipopolisacárido (LPS) *in vitro* e *in vivo*. Específicamente, utilizando el modelo de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, del inglés *bone marrow-derived dendritic cells*), se vio que en presencia de pLL la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 y la secreción de IL-12 en respuesta a agonistas de TLR están inhibidas, mientras que la expresión de CD86 y la secreción de IL-10 están aumentadas. El fenotipo resultante coincide con el de una célula dendrítica “semi-madura” [14]. Cambios similares se observan luego de

inyección intraperitoneal de pLL en ratones, con o sin co-inyección de LPS. En este mismo trabajo se muestra que los efectos de pLL dependen del contacto con la célula y de la correcta polimerización de los filamentos de actina (no se observa efecto de pLL en presencia de citocalasina D). Además, se muestra que pLL por sí solo no induce citoquinas dependientes de NF- κ B (no presenta agonistas de TLR ni otros agonistas que activen NF- κ B). Cabe destacar que la preparación está libre de endotoxinas según el ensayo de lisados de amebocitos de *Limulus* (LAL), y que se comprobó que pLL no genera muerte celular apreciable a las dosis empleadas, pero sí lo hace a dosis mayores. También se determinó que las actividades sobre las células eran independientes de la presencia de los depósitos de InsP_6 cálcico, y la mayoría de las observaciones se realizaron sobre partículas enriquecidas en las mucinas, por eliminación del InsP_6 cálcico empleando EDTA. La oxidación con periodato de los monosacáridos expuestos de los glicanos de las mucinas no alteró las actividades observadas, y el tratamiento con una proteasa general las afectó solo marginalmente. Se especula entonces que las actividades sobre las células dependen de propiedades a nivel de material, es decir supra-molecular. La preparación "pLL" contiene partículas de rango de tamaño fagocitable así como no fagocitable, y no se ha determinado si es necesaria la fagocitosis para las actividades observadas. Independientemente del método empleado para pulverizar la LL, las partículas tienen forma aplanada y generan cualitativamente los mismos efectos sobre las células dendríticas.

Además de los efectos en sistemas de estimulación con agonistas de TLR, en otros experimentos del grupo se obtuvo evidencia inicial de inhibición de la expresión de parámetros de activación alternativa (ver sección 1.5) en respuesta a IL-4, en macrófagos derivados de médula ósea así como en BMDC (C. Casaravilla, resultados no publicados).

1.4 Respuesta inmune frente a infección con helmintos

Se conoce como helmintos a los parásitos multicelulares con relevancia médica y/o veterinaria. Este término entonces engloba a organismos filogenéticamente diversos, incluyendo a los platelmintos (trematodos y cestodos) y a los nematodos ("gusanos redondos"). A pesar de ello, la infección con helmintos induce una respuesta inmune común, denominada respuesta Th2 [15].

La respuesta Th2 está caracterizada por la expansión de linfocitos T productores de interleuquina (IL) 4, IL-5 e IL-13, así como por la producción de inmunoglobulina (Ig) E por parte de los linfocitos B. Las células de la inmunidad innata asociadas a este tipo de respuesta incluyen eosinófilos, mastocitos, basófilos y células linfoides innatas tipo 2 (ILC2), así como células dendríticas y macrófagos polarizados a fenotipos de activación alternativa (ver adelante) [16].

Los mecanismos efectores inducidos por las citoquinas Th2 son muy variados, dependiendo no solo del tipo celular sobre el que actúan sino también del sitio de acción en el organismo. En el intestino, por ejemplo, células epiteliales responden a la IL-4 promoviendo la diferenciación a células caliciformes y la potenciación de la secreción de mucus. Además, la estimulación con IL-4 genera hipercontractilidad muscular y acelera el ritmo de recambio de las células epiteliales en el mismo órgano. Estos efectos actúan de manera conjunta para desalojar parásitos presentes en el intestino [17]. Las ILC2, mencionadas anteriormente, se ubican preferencialmente en la interfaz entre hospedador y ambiente (piel, intestino, pulmones), donde responden a citoquinas “de alarma” (típicamente IL-25 e IL-33) secretadas por las células epiteliales ante eventos de disrupción de barrera con la secreción de citoquinas Th2, especialmente IL-13. De esta manera, las ILC2 contribuyen a la regulación local de la respuesta [17, 18].

En los tejidos no mucosos, los mecanismos efectores de la respuesta Th2 se valen de muchos, sino todos, los elementos del sistema inmune innato, potenciados por la presencia de anticuerpos específicos (IgE principalmente e IgM en sangre). Eosinófilos, basófilos y mastocitos son los tipos celulares pertenecientes a la inmunidad innata que típicamente se asocian con la respuesta Th2. Ante una infección con helmintos, estas tres poblaciones aumentan en número y, en el caso de eosinófilos y basófilos, son reclutados al sitio de infección. Las tres presentan el receptor Fc de alta afinidad para IgE (FcεRI), que potenciará su rápida degranulación ante estimulación con la IgE. Finalmente, los macrófagos también cumplen un rol importante en las respuestas Th2. Se ha observado que aumentan en número durante infecciones con helmintos y que responden a citoquinas Th2, específicamente a IL-4 y IL-13, con un fenotipo de activación alternativo. Los macrófagos con este fenotipo de activación, que se describirá en detalle en la siguiente sección, además de

contribuir directamente en la eliminación de macroparásitos mediante la secreción de diversas moléculas efectoras, desempeñan funciones de reparación de tejidos [19]. La correcta remodelación y reparación de tejidos es esencial en este tipo de infecciones, donde por lo general hay eventos de migración a través de distintos tejidos durante el transcurso de las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito [17].

Es importante destacar que debido al gran tamaño de estos patógenos, cualquier actividad dirigida a su eliminación debe contemplar el potencial daño a los tejidos circundantes. La respuesta Th2 entonces pretende alcanzar un balance entre una actividad anti-parasitaria, inflamatoria, y una de reparación y remodelación de tejidos, fundamentalmente no-inflamatoria [15, 16, 20].

1.5 Activación alternativa de macrófagos y células dendríticas

Los macrófagos son un tipo celular particularmente plástico. Inicialmente se reportó su gran actividad microbicida en modelos de infección bacteriana. En este contexto los macrófagos activados son grandes productores de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 o TNF α , así como también de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno a través del ensamblaje de las enzimas NADPH oxidasa (NOX) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). De hecho, son el tipo celular efector por excelencia para la correcta resolución de enfermedades causadas por patógenos intracelulares [21]. Más adelante Siamon Gordon reportó un programa de activación alternativo inducido por IL-4 [22, 23]. Esta activación plantea un perfil menos inflamatorio para el macrófago, caracterizado por la expresión de receptor de manosa (MR, del inglés *mannose receptor*) y de la molécula co-inhibidora PDL2 (del inglés, *programmed-death ligand 2*) en la superficie, una fuerte actividad arginasa y la secreción de las proteínas Ym1 y Relm α .

Relm α (antes llamada FIZZ1), junto con Relm β y Relm γ , forman la familia de moléculas similares a la resistina (del inglés *resistin-like molecules*). De ellas, Relm β es la única a la que se le ha atribuido una función directa en la eliminación de parásitos, encontrándose que se une a los órganos quimiosensoriales de parásitos intestinales interfiriendo con su quimiotaxis, lo cual conduce a su desnutrición y muerte [15]. La función de Relm α permanece aún poco clara, si bien se ha encontrado que puede actuar como un

quimioatrayente de eosinófilos en ciertas patologías [15, 24]. A diferencia de Relm β , que es secretada únicamente por células epiteliales intestinales, Relm α presenta un patrón de expresión más generalizado que incluye a eosinófilos, neutrófilos y células epiteliales, además de macrófagos y células dendríticas [15, 24].

A Ym1, Ym2 y BRP39 se las conoce como proteínas similares a la quitinasa (CLPs, del inglés *chitin-like proteins*). Las CLPs presentan mutaciones respecto a otros miembros de su familia que las vuelven incapaces de degradar quitina [25]. Respecto a la función de Ym1, recientemente se ha reportado que induce el reclutamiento de neutrófilos a través de una potenciación de linfocitos T $\gamma\delta$ productores de IL-17. Esta neutrofilia es importante para la eliminación del parásito *Nippostrongylus brasiliensis* [26]. Asimismo, gracias a su capacidad de unir componentes de la matriz extracelular como heparán sulfato, no se descarta un posible rol adicional en procesos de remodelación de tejidos [15]. Por otro lado, por ser una proteína expresada en grandes cantidades por macrófagos y neutrófilos en situaciones patológicas, que además es propensa a generar cristales, se especula que podría actuar como activador del inflammasoma y estimular la producción de IL-1 β [15, 26].

Como se mencionó anteriormente, la activación alternativa de macrófagos está asociada a una fuerte actividad arginasa. Existen dos isoformas de esta enzima, pero solo la arginasa 1, de expresión citosólica, es sensible a estimulación con IL-4 [24]. La inducción de arginasa 1 por IL-4 ejemplifica la dicotomía Th1/Th2 en el macrófago. Esta enzima compite con la iNOS por su sustrato, la arginina. De esta manera, inhibe la generación de especies reactivas del nitrógeno a la vez que genera mediadores para la eliminación de parásitos. Se ha postulado que la arginasa desempeña su papel en la eliminación de parásitos al causar una depleción de arginina en el ambiente circundante, que es detrimental para el crecimiento del patógeno [15]. Si bien esta hipótesis no se ha descartado, trabajos más recientes muestran que productos de la acción de arginasa 1 son también importantes para el control de parásitos. Se ha visto que poliaminas producidas por la acción de arginasa 1 inhiben la capacidad migratoria de parásitos *in vitro* [27]. Más aún, prolina e hidroxiprolina, que son productos de la acción de arginasa 1, son constituyentes del colágeno y éste un componente importante de la matriz extracelular y de granulomas. Por ello, se cree que la

arginasa tiene un papel en el control de parásitos y en la remodelación de tejidos [15].

Las células dendríticas también adoptan un perfil de activación alternativa al ser estimuladas por IL-4 [24, 28-30]. Éste es similar al observado en macrófagos, aunque se encuentra menos documentado y parece ser un efecto menos robusto que en macrófagos. Aun así, existen reportes de células dendríticas alternativamente activadas *in vitro* e *in vivo*, en contextos patológicos [28] como homeostáticos [30]. Respecto al papel de las células dendríticas alternativamente activadas, se postula que podrían actuar en la inducción de ciertos aspectos de las respuestas de tipo Th2, más que tener un papel efector como el de los macrófagos [28]. Dentro de este papel inductor se resalta la importancia de Relm α y, más recientemente, del ácido retinoico para la óptima generación de linfocitos T CD4+ productores de IL-10 e IL-13 [28, 29].

1.6 Macrófagos residentes y derivados de monocitos

Hasta ahora se ha hablado de macrófagos en general, pero es importante hacer la distinción entre macrófagos residentes de tejido y derivados de monocitos, es decir, reclutados. Esta aclaración viene a lugar desde que estudios recientes demostraron que estas dos poblaciones celulares tienen en realidad precursores completamente diferentes. Los macrófagos residentes provienen de precursores sembrados en los tejidos durante la etapa embrionaria y mantienen sus números por proliferación local, en lugar de reclutamiento y diferenciación de monocitos del torrente sanguíneo como se creía hasta el momento [31] (paradigma presentado por Van Furth en 1968 [32]). La excepción a esta regla son los macrófagos de la piel y del tracto intestinal, que sí se mantienen por reclutamiento y diferenciación de monocitos [31]. Para ambos tipos de macrófagos, residentes de tejido o reclutados desde monocitos, el factor de crecimiento homeostático es el M-CSF (del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*) y su receptor, CD115, es expresado por ambos [33, 34].

Interesantemente, la IL-4 causa la proliferación de macrófagos residentes en lo que se conoce como "inflamación Th2". Este fenómeno ocurre tanto en los sistemas con administración de IL-4 exógena [35, 36], como en infecciones con helmintos, que suscitan la producción de IL-4 [15, 35, 36]. Vale destacar que la capacidad proliferativa de la IL-4 no está restringida a macrófagos residentes,

siendo capaz de inducir la proliferación de macrófagos derivados de monocitos en sistemas de inyección de medio tioglicolato en combinación con IL-4 [35, 37] Asimismo, no depende de señalización a través del receptor de M-CSF [36].

Tanto macrófagos reclutados como residentes responden a la estimulación con IL-4 con el programa de activación alternativa ya mencionado. Esto se ve en infecciones con *Litomosoides sigmodontis* para macrófagos residentes [35, 37] y con *Schistosoma mansoni* para macrófagos derivados de monocitos [38, 39]. Sin embargo, un estudio transcriptómico sobre ambas poblaciones estimuladas con IL-4 demostró que macrófagos residentes o derivados de monocitos alternativamente activados no son fenotípicamente equivalentes [37]. Incluso encontró que algunos marcadores asociados a activación alternativa sólo estaban presentes en la población de macrófagos derivados de monocitos, como MR y PDL2 [37]. Más aun, encontró diferencias en la capacidad de ambas poblaciones de polarizar un cultivo de linfocitos T hacia T_{reg} FoxP3+, reflejando también una no equivalencia funcional entre las dos poblaciones [37].

1.7 Señalización en respuesta a IL-4

Existen dos variantes para el receptor de IL-4, denominadas receptor tipo I y tipo II (Figura 1.3). El primero está formado por la cadena alfa, IL-4R α , que es común a ambos, y la cadena común gama, γ C, así llamada porque también forma parte de los receptores para las citoquinas IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 [40]. El receptor de tipo II está formado por IL-4R α y la cadena alfa del receptor para IL-13, IL-13R α . Este receptor también responde a IL-13 [41]. No es de extrañar entonces que ambas citoquinas, IL-4 e IL-13, medien efectos similares, aunque debe destacarse que no son equivalentes. La no equivalencia se debe en parte a la expresión diferencial de ambos receptores en distintos tipos celulares (IL-13R α no se encuentra en linfocitos T, células NK, basófilos o mastocitos [42]) y a diferencias en la señalización inducida por cada uno de ellos (ver más adelante).

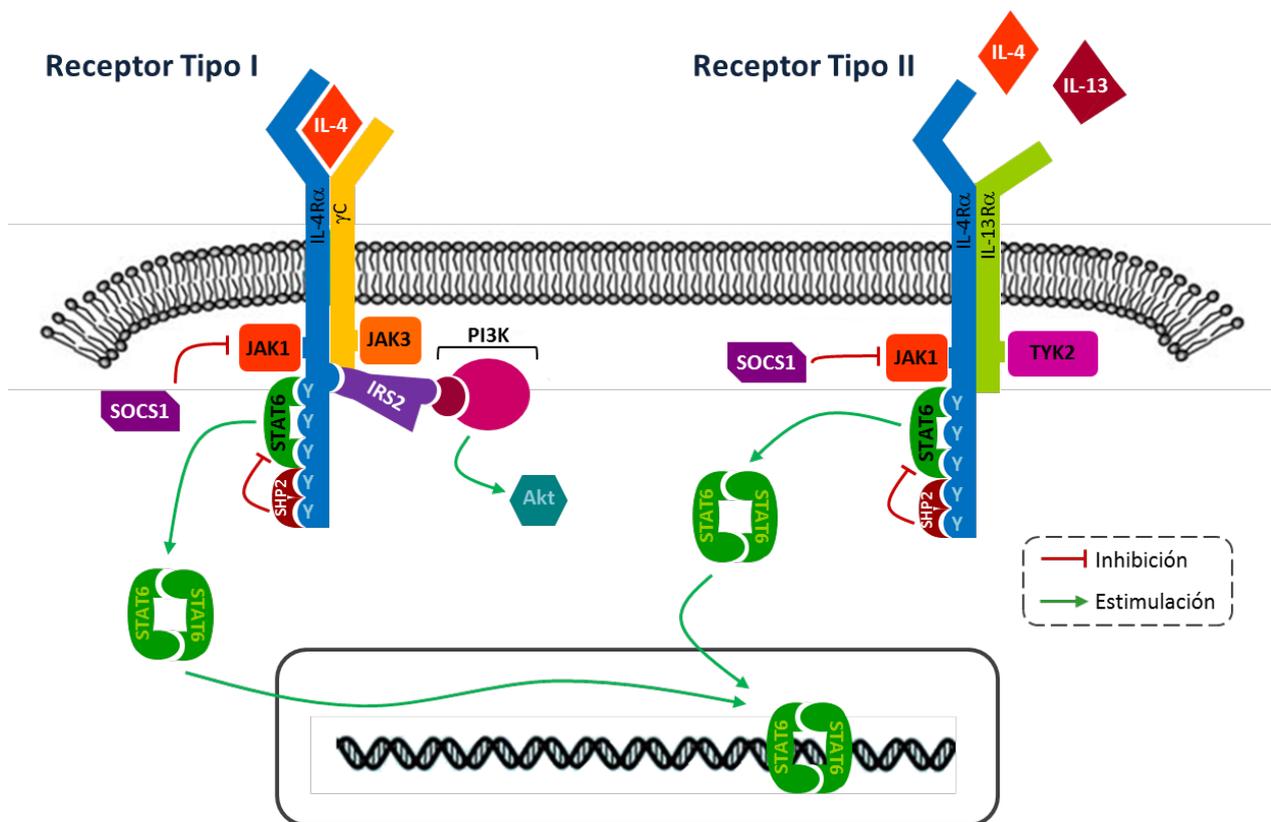


Figura 1.3 Esquema de señalización por IL-4

Existen dos tipos de receptores para IL-4, de tipo I (izquierda) y de tipo II (derecha). El receptor de tipo II también responde a IL-13. La estimulación de cualquiera de ellos con IL-4 causa la fosforilación de la porción citoplasmática de la cadena IL-4R α por las enzimas JAK asociadas al receptor. STAT6 se une al receptor fosforilado y es activado también por fosforilación. Una vez activado, forma un dímero que es capaz de translocar al núcleo y actuar como factor de transcripción para genes sensibles a la IL-4. Uno de esos genes corresponde a SOCS1, que actúa como regulador negativo de la señalización por IL-4 al inhibir la acción de las quinasas JAK1. La fosfatasa SHP2 también es reclutada a la cadena IL-4R α e inhibe la activación de STAT6. El receptor de tipo I, además, es capaz de unir la molécula adaptadora IRS2. Esta molécula une a la subunidad p85 de la enzima PI3K, activando así la vía de PI3K/Akt. Modificado de [42].

La unión de IL-4 a cualquiera de estos dos receptores causa la activación de las enzimas JAK asociadas a la porción citoplasmática de los mismos. Éstas fosforilan residuos de tirosina en la IL-4R α , que subsecuentemente actúan como sitios de anclaje para diversas moléculas de señalización. Una de estas moléculas es STAT6 (del inglés *signal transducer and activator of transcription*), que se une a las tirosinas fosforiladas de IL-4R α a través de su dominio SH2. Una vez allí,

STAT6 es activado por fosforilación y dimeriza. En su forma dimérica, STAT6 trasloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción para genes sensibles a IL-4 como MHCII, Ym1, Relm α , arginasa 1, PDL2 y CD23, entre otros [43].

Si bien la estimulación de ambos receptores causa la activación de STAT6, únicamente el receptor de tipo I es capaz de unir a la molécula IRS-2 [44]. El reclutamiento de IRS-2 se da a través del dominio PTB de esta molécula y la primera tirosina fosforilada de IL-4R α . Se especula que JAK3, enzima asociada al receptor de tipo I únicamente, interviene en la interacción [42, 45]. IRS-2 fosforilado une directamente a la subunidad p85 de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). De esta manera, la estimulación con IL-4 a través del receptor tipo I únicamente causa la activación de la vía de PI3K además de la de STAT6.

1.8 Señalización a través de PI3K

Las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K) catalizan la fosforilación de fosfoinosítidos en la posición 3 del anillo de inositol. Tanto los sustratos como productos de estas enzimas se encuentran en la membrana, por tanto, la activación de PI3Ks requiere su reclutamiento a membrana y resulta en la generación de moléculas mediadoras específicas también en este compartimiento [46]. Existen ocho PI3Ks distintas en células de mamífero, que se clasifican en tres familias según el sustrato específico que utilizan. Las de clase I, que son las más ampliamente estudiadas, fosforilan fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) para dar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃, más conocido como PIP₃). PIP₃ es formado en la membrana plasmática, así como también en la membrana de endosomas/fagosomas tempranos en formación, donde regula la localización y actividad de diversas proteínas efectoras. PIP₃ puede ser desfosforilado en la posición 3 por la fosfatasa PTEN, para volver a formar el sustrato de PI3K de clase I. Asimismo, puede ser desfosforilado en la posición 5 por las fosfatasas SHIP1/2, dando lugar a PI(3,4)P₂. Tanto PTEN como SHIP2 son fosfatasas de expresión ubicua, pero SHIP1 se encuentra preferencialmente expresada en células de linaje hematopoyético [46, 47].

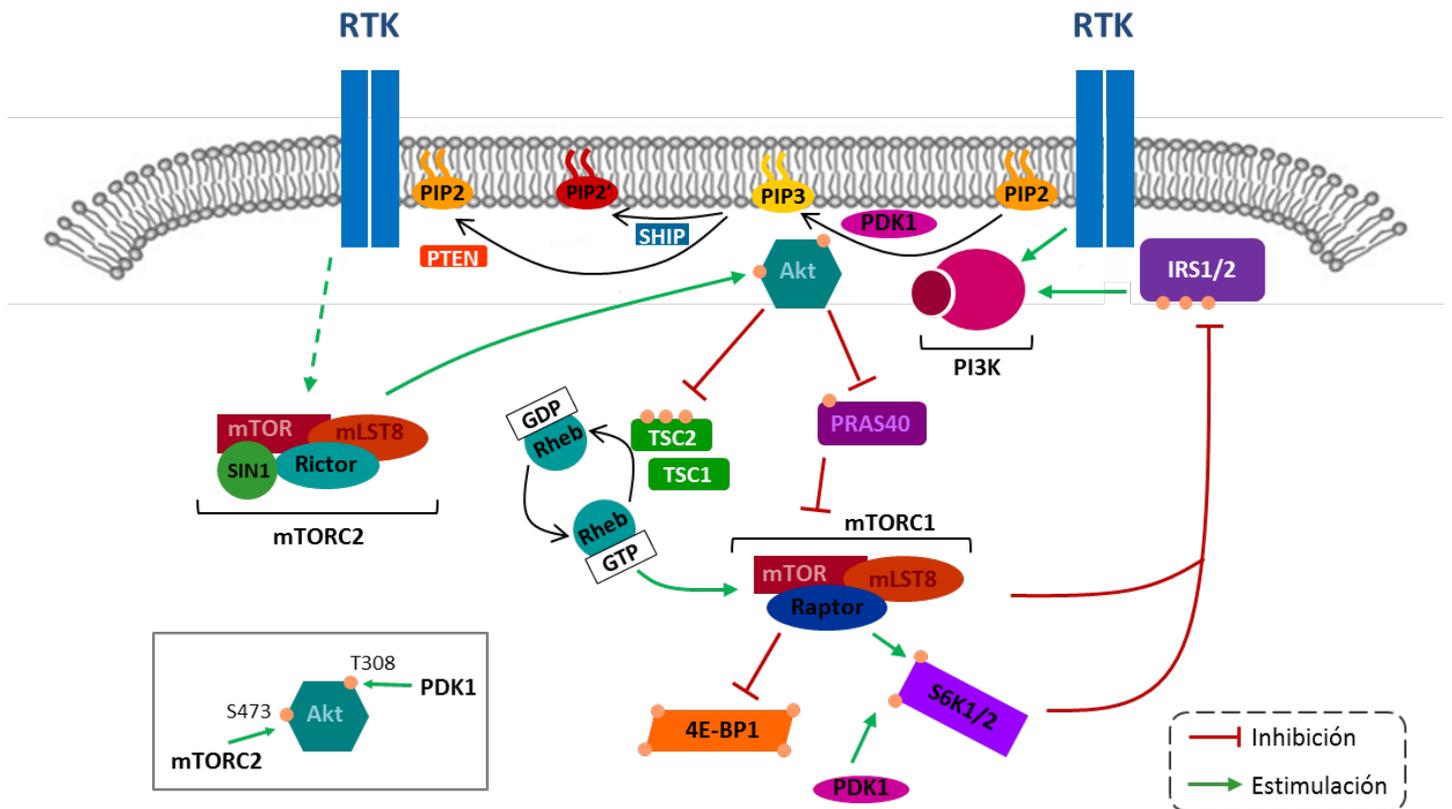


Figura 1.4 Esquema de señalización a través de PI3K/Akt iniciada por RTK

PI3K es activada directamente por quinasas de tirosina asociadas a receptor (RTK), o indirectamente a través de moléculas adaptadoras como IRS1/2. Una vez activa, cataliza la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) en la membrana. PIP3 recluta Akt a membrana, donde es fosforilado por la quinasa PDK1 en la posición T308 y por el complejo mTORC2 en la posición S473. Akt completamente fosforilado activa al complejo mTORC1 por dos vías: inactiva al complejo TSC1-TSC2, lo cual lleva a una acumulación de Rheb-GTP que activa mTORC1, y además inactiva al inhibidor PRAS40. mTORC1 activado fosforila diversos blancos como la quinasa S6K1/2 o el regulador de la traducción 4E-BP1. Como parte de un mecanismo de regulación negativa, mTORC1 y S6K1/2 fosforilan la molécula adaptadora IRS1/2, marcándola así para degradación.

PIP3 es desfosforilado en la posición 3 por la fosfatasa PTEN, para dar nuevamente PIP2. Alternativamente, PIP3 puede ser desfosforilado en la posición 5 por la fosfatasa SHIP, dando lugar a fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2'). Modificado de [50].

Las PI3K de clase I se componen, cada una, de una subunidad catalítica y una reguladora. Existen cuatro isoformas de la subunidad catalítica, llamadas p110 α , β , γ y δ , que dan origen respectivamente a PI3K α , PI3K β , PI3K γ y PI3K δ . Las PI3K α , β y δ se agrupan como PI3K de clase IA, y son activadas en respuesta a señales provenientes de quinasas de tirosina asociadas a receptores (RTK, del inglés *receptor-associated tyrosine kinase*, Figura 1.4). Las PI3K δ se llaman de

clase IB, y son activadas por señales provenientes de receptores acoplados a proteínas G [46, 48, 49].

Las PI3K IA, que son las que nos interesan en el presente contexto, se forman por una de cinco subunidades reguladoras homólogas, conocidas colectivamente como p85, en combinación con una de las tres subunidades catalíticas p110 α , p110 β , p110 δ , pudiendo dar lugar a 15 heterodímeros distintos. Las isoformas PI3K α y PI3K β presentan una expresión generalizada, mientras que PI3K δ se expresa principalmente en células de origen mielóide o linfóide [46, 48].

Como se dijo anteriormente, la generación de PIP3 en la membrana actúa como sitio de reclutamiento para moléculas efectoras de la vía de PI3K. La molécula efectora más importante y más ampliamente estudiada de esta vía es la quinasa Akt, antes conocida como PKB. Esta quinasa es reclutada a la membrana por PIP3 y es activada por fosforilación en T308 y S473 por PDK1 y mTORC2, respectivamente. Una vez activada, Akt es capaz de fosforilar diversos blancos, lo cual en última instancia la involucra en procesos muy variados y a la vez centrales para la biología de la célula como lo son supervivencia, crecimiento, proliferación y metabolismo celular [50]. Específicamente en macrófagos y células dendríticas, se ha implicado a la señalización por PI3K/Akt en la supervivencia y proliferación celular, la secreción de citoquinas y en procesos de activación [51].

Tal como se explicó anteriormente, la estimulación de receptores de IL-4 tipo I genera la fosforilación de IRS-2 y la activación de PI3K de clase IA (subunidad reguladora p85). Varios trabajos han reportado la necesidad de señalización a través de PI3K/Akt para la inducción de marcadores de activación alternativa. Específicamente, sobre macrófagos derivados de médula ósea, *Weisser et al.* [52] muestran que la activación alternativa inducida por IL-4 en este modelo requiere de la degradación de la fosfatasa SHIP1, que como se mencionó es un regulador negativo de la señalización por PI3K/Akt. También observan una dependencia de la inducción de arginasa 1 y Ym1 con una correcta señalización por PI3K. En el mismo sistema, *Heller et al.* [44] muestran que la inducción de Relm α depende de la señalización por esta vía. Más recientemente, *Rückerl et al.* [53] muestran que la inducción de arginasa 1, Ym1 y Relm α por IL-4 en macrófagos generados por inyección de medio tioglicolato también dependen de

la activación de Akt. En este caso, se puede observar que $Relm\alpha$ es el parámetro que depende más fuertemente de la activación de Akt. La necesidad de la vía de PI3K/Akt para la activación alternativa de macrófagos también fue demostrada empleando macrófagos deficientes en TSC1, que tienen inhibida la vía de PI3K/Akt a consecuencia de la exacerbación de un mecanismo de retroalimentación negativa a partir de mTORC1 [54]. A similares conclusiones llegan *Barret et al.* [45] empleando un inhibidor específico de JAK3, que inhibe la señal de PI3K/Akt pero no la de STAT6 en respuesta a IL-4. En estos dos últimos trabajos se observa que la inducción del MR en respuesta a IL-4 no requiere de la vía de PI3K/Akt.

1.9 Señalización por factores de crecimiento y proliferación celular, en general y en células dendríticas y macrófagos

La proliferación de las células eucariotas está controlada por proteínas extracelulares llamadas factores de crecimiento. Esta definición amplia engloba moléculas que inducen (i) división celular (mitógenos), (ii) aumento en la masa celular (factores de crecimiento en el sentido estricto) y (iii) supervivencia, es decir inhibición de la apoptosis (factores de supervivencia). Como suele ser experimentalmente difícil separar las tres actividades mencionadas, y muchas moléculas suelen tener dos o las tres al mismo tiempo, se suele designar como factores de crecimiento a moléculas que presenten alguna(s) de estas actividades [55].

Las dos vías principales en respuesta a factores de crecimiento en general son la de ERK y la de PI3K [56]. La vía de ERK es una de las vías de las MAP quinasas (MAPKs, del inglés *mitogen-activated protein kinases*). De forma general, las vías de las MAPKs están compuestas por una quinasa inicial dependiente de GTP (MAPKKK), que fosforila y activa a una quinasa intermedia (MAPKK), que a su vez fosforila y activa a una quinasa efectora (MAPK) [55]. La activación de la vía de ERK en respuesta a factores de crecimiento comienza por la GTPasa Ras. Ras-GTP activa a la MAPKKK Raf, que fosforila a la quinasa intermedia MEK, que a su vez activa a ERK, la quinasa efectora (Figura 1.5). ERK fosforila diversos blancos, que culminan promoviendo la supervivencia, proliferación y motilidad celular [55]. De particular importancia para la promoción de la proliferación, ERK induce la transcripción del regulador transcripcional Myc, que a su vez induce la síntesis

de las ciclinas G1, aumentando así la actividad de las quinasas dependientes de ciclina G1 [55]. Por otro lado, la sobre-activación de ERK induce expresión de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, deteniendo el ciclo celular [56].

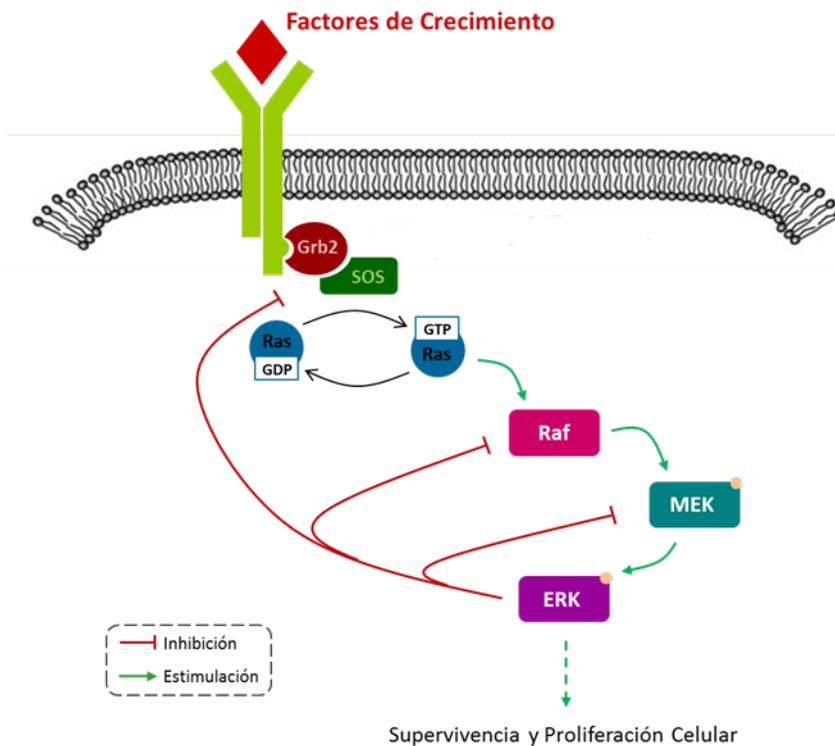


Figura 1.5 Esquema de señalización a través de MAP Quinasas

La unión del factor de crecimiento a su receptor causa la fosforilación de la porción citoplasmática del mismo. Ésta actúa como sitio de anclaje para la proteína adaptadora Grb2, que a su vez recluta a la proteína SOS. SOS es un factor de intercambio de nucleótidos que activa a Ras-GTP. Éste activa a la quinasa inicial, Raf, que desencadena la cascada de fosforilación y activación de las quinasas MEK y ERK. ERK promueve la supervivencia y proliferación celular. Como mecanismo de regulación negativa, ERK inhibe pasos anteriores a su activación. Modificado de [56].

La vía de PI3K, cuya quinasa efectora más importante es Akt, ya se describió en una sección anterior (sección 1.8 y Figura 1.4). De todos modos, aquí expandiremos sobre su papel en las señales inducidas por factores de crecimiento, en sentido amplio. El papel mejor establecido de PI3K/Akt en este contexto es la promoción de la supervivencia celular, para la cual es crítica la fosforilación (e inactivación funcional) por Akt de las proteínas de las familias BH3 (como BAD) y Foxo [50]. Akt también es un controlador crítico del crecimiento celular, a través del complejo mTORC1, el cual controla positivamente la iniciación de la síntesis proteica y la biogénesis de ribosomas [50]. A través de estos efectos anabólicos, Akt controla indirectamente la proliferación celular. De hecho, la rapamicina, inhibidor de mTORC1, causa detención en la fase G1 del ciclo. Por otro lado, Akt tiene efectos directos sobre el ciclo celular, aunque éstos no están tan bien establecidos. Akt fosforila el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, p21^{C1p/WAF}, haciendo que se localice en el citosol y atenuando sus efectos inhibitorios del ciclo. Akt tiene una

acción similar sobre otro inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, p27^{kip1}, pero ésta no estaría conservada en roedores [50]. Además, Akt fosforila en forma inhibitoria a GSK3, disminuyendo su capacidad de fosforilar y promover la degradación de factores necesarios para la transición de fase G1 a S, incluyendo ciclinas y Myc [50].

Siendo vías de señalización tan importantes para la célula, que además intervienen en los mismos procesos celulares, es natural que exista un diálogo entre las vías MAPK y PI3K/Akt. De hecho, se dan eventos de inter-activación, inter-inhibición, así como también de convergencia sobre sustratos como FOXO3, c-Myc y BAD. El resultado neto dependerá del balance de señales sobre los distintos blancos [56].

Como ya se mencionó, el factor de crecimiento homeostático para los macrófagos tisulares es el M-CSF [33, 34]. Para las células dendríticas, en estado estacionario, este papel lo juega el Flt3L [57]. EL GM-CSF, usado junto al M-CSF en este trabajo, también actúa como factor de crecimiento *in vitro* para macrófagos y células dendríticas. *In vivo*, parece tener un papel importante no tanto en homeostasis sino en contextos inflamatorios, generando células dendríticas inflamatorias a partir de monocitos [33, 58, 59].

Los receptores tanto de M-CSF como de GM-CSF señalizan por las vías de ERK y PI3K, además de otras vías [34, 58, 60]. Se propone que, en macrófagos en particular, la vía de ERK es necesaria para proliferación en sí, y la de PI3K para supervivencia [61]. De todos modos, el panorama completo probablemente es complejo, por el diálogo mencionado entre las dos vías (incluyendo la posibilidad que parte de la activación de ERK dependa de PI3K [34]).

La IL-4 induce la proliferación de macrófagos *in vivo* pero no *in vitro* [35, 36]. Se cree que la IL-4 debe inducir la proliferación *in vivo* por sensibilización a un factor de crecimiento (constitutivo) no identificado, que como se mencionó no es M-CSF [36]. La inhibición farmacológica de Akt inhibe la proliferación inducida por esta citoquina, mostrando que en la misma interviene la señalización por PI3K/Akt [53]. Por lo tanto, hasta donde se sabe la IL-4 no calificaría como factor de crecimiento para macrófagos o células dendríticas. Sí es factor de crecimiento para linfocitos B o T activados [21].

2. Hipótesis y Objetivos

Como se explicó a lo largo de la introducción, durante las infecciones con parásitos helmintos, como *E. granulosus*, se desarrolla principalmente una respuesta Th2. En este tipo de respuesta, la IL-4 juega un rol central. Sobre macrófagos y células dendríticas, esta citoquina induce el programa de activación alternativa. Se ha visto *in vivo*, en contextos de administración exógena de la citoquina como de infección con parásitos, que la IL-4 causa además la proliferación de macrófagos. Considerando lo anterior, junto con el hecho que normalmente no se observa acumulación de macrófagos alrededor de la hidátide de *E. granulosus*, nos resulta atractivo estudiar la interacción de las partículas de la LL (pLL) con macrófagos y células dendríticas, en el contexto fisiopatológicamente relevante de estimulación con IL-4.

Tanto la activación alternativa como la proliferación en respuesta a IL-4 requieren de la señalización a través de PI3K/Akt. Resultados del grupo muestran que la exposición a pLL es capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por LPS en células dendríticas. Otros resultados, previos, sugieren que la exposición a pLL inhibe aspectos de la activación alternativa inducida por IL-4 en macrófagos y células dendríticas. En conjunto, estos datos sugieren que pLL podría interferir con la señalización a través de PI3K/Akt en respuesta a IL-4. En este contexto, no se pueden descartar potenciales efectos de pLL frente a otros estímulos que también activen PI3K/Akt en su señalización, en particular los factores de crecimiento.

Hipótesis

La exposición de macrófagos y células dendríticas a pLL inhibe la activación de Akt en respuesta a IL-4 o factores de crecimiento. De esta manera, inhibe la activación alternativa inducida por IL-4 y otros efectos que requieren la activación de Akt, incluyendo la proliferación celular.

Objetivo general

Estudiar el impacto de la exposición a partículas de la capa laminar sobre la señalización y efectos de la IL-4 o de factores de crecimiento en macrófagos y células dendríticas.

Objetivos específicos

1. Confirmar, y ampliar la descripción de, la inhibición por exposición a pLL de la activación alternativa de células dendríticas en respuesta a IL-4 *in vitro*.
2. Estudiar el efecto de la exposición a pLL sobre la activación de Akt en respuesta a IL-4 o factores de crecimiento, en células dendríticas y macrófagos.
3. Estudiar el impacto de la exposición a pLL sobre la proliferación de macrófagos y células dendríticas *in vitro* inducida por los factores de crecimiento M-CSF y GM-CSF, respectivamente.
4. Analizar posibles efectos de la exposición a pLL sobre la activación de ERK, quinasa importante en la proliferación celular, incluyendo interferencias sobre la señalización por M-CSF o GM-CSF en macrófagos y células dendríticas.
5. Explorar el efecto de pLL *in vivo* sobre la proliferación de macrófagos inducida por IL-4 o M-CSF, y sobre la activación alternativa de macrófagos inducida por IL-4.
6. Comparar los efectos de pLL con los de materiales particulados sintéticos seleccionados, en términos de impactos sobre la activación de Akt y de ERK *in vitro* y activación alternativa y proliferación *in vivo*.

3. Materiales y Métodos

3.1 Preparación de herramientas de trabajo

3.1.1 Material parasitario

Se trabajó con quistes hidáticos provenientes de muestras de pulmón bovino naturalmente infectado con *Echinococcus granulosus*. Los quistes hidáticos en dichas muestras (cedidas gentilmente por *Urexpert*, Montevideo), se limpiaron superficialmente con alcohol al 70% (v/v), se abrieron con bisturí y se retiró el líquido hidático. Se extrajeron las paredes de las hidátides colapsadas y se lavaron con solución salina fisiológica (PBS, *phosphate buffered saline*). Se congelaron en PBS a -20°C hasta ser utilizadas.

3.1.2 Generación de una preparación particulada de la capa laminar de *Echinococcus granulosus* para trabajo con células

Se descongelaron las paredes de las hidátides descritas en la sección anterior y se realizaron varios lavados rápidos con PBS. Se escurrieron sobre papel de filtro y se determinó su masa húmeda. Se realizaron dos lavados más con PBS a razón de 10 mL / g de masa húmeda con PBS durante 3 horas y 24 horas a 4°C, respectivamente. Posteriormente se lavó con NaCl 2M en las mismas condiciones, a fin de minimizar la presencia de proteínas no estructurales en la muestra. Se realizaron varios lavados rápidos con agua destilada para remover las sales introducidas en el paso anterior y se mantuvo en un volumen pequeño. Las muestras así procesadas se congelaron a -80°C y liofilizaron. El material deshidratado se molió con mortero y pulverizó entre dos vidrios esmerilados (porfirinización).

Los pasos subsiguientes se realizaron en cámara de flujo laminar. Se resuspendió el pulverizado en PBS 30 mM EDTA pH 7,2 apirógeno a razón de 2 mg de masa húmeda / mL, utilizando un homogenizador Potter (previamente lavado con NaOH 0,1 M durante 18 horas para limpiar de LPS contaminante y posterior autoclavado). Se tuvo especial cuidado en hidratar todo el material lentamente sin generar grumos o apelmazados. La suspensión obtenida se filtró por mallas de serigrafía de tamaño de corte aproximado 85, 45 y 23 μm . La preparación se lavó 10 veces con PBS apirógeno (con cociente de volúmenes 1/10), centrifugando 5 minutos a 3000 g cada vez, y se llevó a un volumen conocido. Se tomaron alícuotas de esta suspensión madre, prestando atención de homogenizar bien antes de cada toma, en tubos previamente masados. Las alícuotas se lavaron con agua destilada varias veces, congelaron a -80°C y liofilizaron. Se determinó entonces la masa seca de material parasitario en cada alícuota y con ella la concentración de la suspensión madre en mg masa seca / mL. La suspensión madre se llevó a una concentración de 10 mg masa seca / mL en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomizina) y antimicótico (0,25 $\mu\text{g/mL}$ de

anfoterina B), y se conservó a 4°C hasta su utilización. A la suspensión así obtenida la denominamos **pLL**, del inglés *particulate Laminated Layer*. La preparación de este material se puso a punto en *Casaravilla et al.* [14].

3.1.3 Otras preparaciones particuladas para trabajo con células

Se utilizaron distintas preparaciones particuladas en paralelo a pLL para estudiar si los efectos observados son exclusivos del particulado de material parasitario o pueden ser inherentes al enfrentamiento de las células a partículas, de diversos tamaños. Los materiales particulados empleados fueron los medios de cromatografía de exclusión molecular Superosa 12 (GE Healthcare # GE17-5173-01) y Sephadex G100 (GE #17-0060-01). El tamaño medio de partícula en estas preparaciones es 11 y 200 µm respectivamente, por lo que son ejemplos de particulados fagocitables y no fagocitables. La Superosa 12 es un material monodisperso, con rango de tamaños 9 – 13 µm, mientras que el rango de las partículas de Sephadex G100 es 100 – 300 µm.

Las partículas de Superosa 12 fueron lavadas dos veces con NaOH 0,5 M según las recomendaciones del fabricante para limpieza de columnas que contienen este medio cromatográfico. Los lavados se hicieron con un cociente de volúmenes 5:1 y centrifugando a 3500 g durante 5 minutos cada vez. Luego, se realizaron 10 lavados con PBS apirógeno y se llevó a un volumen conocido. Se tomaron 3 alícuotas de la suspensión madre para liofilizar y determinar su masa seca. Finalmente, la suspensión se llevó a una concentración de 10 mg de masa seca / mL de PBS apirógeno suplementado con antibiótico/antimicótico, igual al usado para pLL. La suspensión se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

Las partículas de Sephadex G-100 se hidrataron con PBS apirógeno y se lavaron 10 veces con la misma solución, centrifugando a 5000 g durante 5 minutos cada vez. A diferencia de lo que ocurre con pLL o Superosa 12, las partículas de Sephadex G100 decantan rápidamente y se forma un pellet fácilmente. Por esta razón, se asumió que no hubo pérdida de masa durante los lavados y se llevó a una concentración de 10 mg masa seca / mL PBS apirógeno suplementado con antibiótico/antimicótico. La suspensión se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

La exposición de células dendríticas a cualquiera de los dos materiales particulados así tratados, o a pLL, no generó la producción de IL-12p40 ni IL-10 por parte de estas células. Este resultado evidencia la ausencia de agonistas de TLR en cualquiera de las preparaciones.

3.1.4 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Para la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, del inglés *bone marrow-derived dendritic cells*) se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 – 12 semanas de edad, provenientes del bioterio del Instituto Pasteur Montevideo. El protocolo descrito a continuación fue reportado por *Lutz*

et al. [62] y fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), N° 101900-000180-15.

Se sacrificó al animal por inhalado del anestésico isofluorano (Abbott #B506). Se realizó una disección para exponer las patas traseras y extraer fémures y tibias. Los huesos obtenidos se limpiaron de tejido circundante, se sumergieron en alcohol al 70 % (v/v) durante 5 minutos y luego se lavaron con PBS apirógeno frío. Los pasos siguientes se realizaron en cámara de flujo con material estéril. Se cortaron las epífisis de cada hueso, exponiendo la médula. Con una jeringa de 5 mL y aguja 24G, se perfundieron los huesos con PBS apirógeno, arrastrando la médula ósea hacia una placa de Petri. La perfusión se realizó con 1 mL PBS apirógeno por cada par de huesos. Una vez obtenida la médula de cada hueso, se disgregaron los cúmulos de células por repetidos pasajes por la aguja (aspirado y liberación). Se tomó una alícuota y se calculó el número de células presentes en la suspensión utilizando una Cámara de Neubauer. Se llevó la suspensión a una concentración de 3×10^6 células / 200 μ L PBS apirógeno, centrifugando a 1200 rpm durante 5 minutos cuando fue necesario. Se dispensaron 3×10^6 células por placa de Petri conteniendo 10 mL medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma #R6504) suplementado con 10 mM HEPES (Sigma #H4034), antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 0,25 μ g/mL de anfoterina B, Sigma #P3539), 10% v/v Suero Fetal Bovino (SFB, ProBioMont) y 20 ng/mL del factor de diferenciación de células dendríticas GM-CSF (Peprotech #315-03). A la solución así preparada la denominamos "medio completo". Se tuvo especial cuidado al dispensar la suspensión celular en cada placa de Petri, haciéndolo por goteo, formando una "nube" de células compacta en el centro de la placa. Las placas se mantuvieron en incubador a 37°C con atmósfera 5% v/v CO₂ durante el cultivo (de ahora en más, se asumirá estas condiciones de incubación a menos que se especifique lo contrario). Al día 3 se agregaron 10 mL de medio completo. En los días 6 y 8 se extrajeron 9 mL de medio de cada placa y se agregaron 10 mL de medio completo fresco. La manipulación se realizó de forma delicada, cuidando de no mover la nube de células. El aspirado y dispensado de líquido se hizo lentamente. Al día 10 se descartaron 8 mL de líquido de cada placa y se recolectaron las células en los 12 mL de líquido restante.

Con este método de preparación de BMDC se obtuvieron 7 – 10 millones de BMDC por placa, lo que correspondió a 56 – 140 millones de BMDC por ratón. El cultivo al día 10 se evaluó por citometría de flujo (sección 3.4.4), obteniéndose 70 – 90% eventos CD11c+ (marcador de células dendríticas), 10 – 30% CD86 alto (molécula co-estimuladora que refleja el estado de activación de las células) y 2 – 5% eventos correspondientes a células muertas.

3.1.5 Obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato

Para la obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato (ThioM ϕ , del inglés *Thioglycollate-elicited macrophages*) se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de al menos 8 semanas de edad, provenientes del bioterio la División de Laboratorios Veterinarios del MGAP (DILAVE). El protocolo descrito a continuación fue aprobado por la CHEA, N° 101900-001384-14.

Se preparó medio tioglicolato 4% p/v (Sigma-Aldrich, #B-2551) y se autoclavó. Se mantuvo en oscuridad durante al menos 3 meses antes de usar. Se inyectaron intraperitonealmente 450 μ L del medio así preparado por ratón. Al día 3 post-inyección se sacrificó al animal por inhalación del anestésico isoflurano y se realizó un lavado peritoneal con 10 mL medio RPMI 0,2% SFB total (dos lavados de 3 mL cada uno y uno final de 4 mL). Las células recuperadas se contaron con Cámara de Neubauer y resuspendieron en el medio correspondiente a cada ensayo. Se dispensaron en placas de 96 pocillos y se mantuvieron en incubador toda la noche antes de seguir con la manipulación.

Este método permitió obtener aproximadamente 8 – 15 millones de células peritoneales por ratón, de las cuales 75 – 90% correspondían a macrófagos (según expresión de los marcadores CD11b y F4/80 evaluados por citometría de flujo, sección 3.4.4).

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Ensayos de evaluación de los efectos de pLL sobre la respuesta de células a IL-4

3.2.1.1 Efectos sobre la activación alternativa de BMDC inducida por IL-4

Para la evaluación de los efectos de pLL sobre la expresión de marcadores de activación alternativa, a excepción de la actividad arginasa, se sembraron $0,4 \times 10^6$ BMDC en RPMI 1640 suplementado con 10 mM HEPES, antibiótico/antimicótico y 10% v/v SFB ("medio de trabajo"), en placas de 48 pocillos de fondo plano (volumen final 500 μ L). Los estímulos, 20 ng/mL IL-4 (PeproTech #214-14 o BD #550067) y 10 μ g pLL / pocillo (cantidad que equivale a los 25 μ g pLL/ 10^6 BMDC utilizada en [14]), se agregaron en forma de mezcla en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante el tiempo especificado en cada ensayo. A tiempo cumplido, se retiró la placa del incubador y se pasó a hielo. Se analizó la expresión de marcadores de activación alternativa en las células por citometría de flujo (sección 3.4.4) y el nivel de Relm α en el sobrenadante mediante ELISA (sección 3.4.5).

En los ensayos de evaluación de la actividad arginasa, se sembraron $0,4 \times 10^6$ BMDC en placas de 96 pocillos de fondo plano, utilizando el mismo medio de trabajo descrito para la evaluación de los demás marcadores de activación alternativa. Nuevamente, los estímulos (20 ng/mL IL-4 y 10 μ g pLL / pocillo) se agregaron en forma de mezcla en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante el tiempo especificado. A tiempo cumplido, se retiró el sobrenadante y las células se lisaron con 55 μ L agua destilada 0,1% m/v Tritón X-100 por pocillo. Las muestras así procesadas se mantuvieron a 4°C hasta la realización de un ensayo de actividad arginasa (sección 3.4.6).

3.2.1.2 Efectos sobre la fosforilación de Akt inducida por IL-4

Para el análisis de la fosforilación de Akt inducida por IL-4 se sembraron $0,4 \times 10^6$ BMDC o ThioM ϕ en placas de 96 pocillos, utilizando el medio de trabajo correspondiente a cada tipo celular, en ausencia de SFB (RPMI 1640 suplementado con 10 mM HEPES y antibiótico/antimicótico para BMDC y DMEM *low glucose*, Sigma-Aldrich #D5523, suplementado de la misma manera para ThioM ϕ). El cultivo se mantuvo en incubador al menos 4 horas antes de seguir con la manipulación. Luego, se agregaron los estímulos (10 μ g pLL / pocillo y/o 20 ng/mL IL-4) en forma de mezcla en solución salina y se mantuvo en incubador. Finalizada la estimulación, la placa se pasó a hielo y se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 30 μ L PBS 1% m/v Tritón X-100 conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (Santa Cruz Biotechnology #SC-29130 y #SC-45045, respectivamente) por pocillo. Las muestras lisadas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de realizar SDS-PAGE y Western blot, como se describe en las secciones 3.4.1 y 3.4.3, respectivamente.

3.2.2 Ensayos de evaluación de los efectos de pLL sobre la respuesta de células a factores de crecimiento

3.2.2.1 Efectos sobre la proliferación

En estos ensayos se sembraron $0,4 \times 10^6$ BMDC en medio de trabajo en placas de 48 pocillos de fondo plano. Los estímulos, 10 μ g de pLL / pocillo y 20 ng/mL GM-CSF, se agregaron en forma de mezcla en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante el tiempo especificado. Se realizó un pulso de 4 horas con 10 μ M 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, SIGMA #B92285) inmediatamente previo al tiempo final. La BrdU es un derivado de la desoxiuridina que se incorporará al ADN de células que se encuentren en fase S, haciendo posible su identificación posterior. A tiempo cumplido, se pasó la placa a hielo y se siguió con el marcado de los componentes de superficie para citometría de flujo, sección 3.4.4.

3.2.2.2 Efectos sobre la fosforilación de Akt inducida por factores de crecimiento

Estos ensayos se realizaron de manera análoga a la descrita en 3.2.1.2, utilizando 20 ng/mL GM-CSF o 20 ng/mL M-CSF (PeproTech #315-02) como estímulo para BMDC o ThioM ϕ , respectivamente, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL / pocillo. Además, en el caso de ThioM ϕ , los macrófagos provenientes del lavado peritoneal (sección 3.1.5) se purificaron por adherencia a la placa previo a su estimulación. Específicamente, se sembraron $0,4 \times 10^6$ células por pocillo en 200 μ L medio de trabajo suplementado con 10% v/v SFB y se mantuvieron en incubador toda la noche. Al día siguiente se realizó un lavado con PBS (a 37°C) con el fin de enriquecer el cultivo en las células adherentes. Se agregó medio de trabajo sin SFB y se mantuvo en incubador al menos 4 horas antes de seguir con la manipulación descrita en la sección 3.2.1.2.

3.3 Experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* se realizaron en parte en la UdelaR y en parte en la Universidad de Edimburgo (Reino Unido). Se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad, provenientes del bioterio de DILAVE (Montevideo) o del bioterio *Anne Walker* (Edimburgo). Los animales se mantuvieron en bioterios especialmente equipados para tales efectos, en cajas con viruta autoclavada y tapas con filtro. Durante los experimentos no se impusieron restricciones en la cantidad de comida o agua accesible para los animales.

El protocolo descrito a continuación corresponde al protocolo general de ensayos *in vivo* para estudiar el efecto de materiales particulados sobre la proliferación y activación alternativa inducidas por IL-4. El mismo fue aprobado por la CHEA (N° 101900-000316-15) y por los veterinarios responsables del bioterio *Anne Walker* en el caso de los ensayos realizados en la Universidad de Edimburgo. Un protocolo similar está reportado en [35].

Como estímulo inductor de la proliferación y activación alternativa se utilizó un complejo de IL-4 (IL-4c), para lograr una actividad biológica de la citoquina más sostenida [63]. Este complejo se compone de IL-4 recombinante (rIL-4, Peprotech #214-14) y un anticuerpo anti-IL-4 (11B11 BioXCell #BE0045), en proporción 1:5. El complejo se formó previo a cada experimento por mezcla de los dos componentes en el mínimo volumen posible a temperatura ambiente durante 10 minutos, previo a su dilución con PBS apirógeno. Se inyectó IL-4c (formado por 1 μ g rIL-4 + 5 μ g anti-IL-4) o vehículo, en 100 μ L de PBS apirógeno/ratón, por vía intraperitoneal (ip). A continuación se inyectaron 200 μ L de vehículo o de una suspensión particulada (pLL, Superosa 12 o Sephadex G100; 30 μ g o 10 μ g de masa seca / ratón), también por vía ip en el mismo flanco. Se utilizaron grupos de 5 ratones por tratamiento.

A las 21 horas post-inyección, se administró en forma subcutánea, 1 mg de BrdU disuelta en 100 μ L de PBS apirógeno por ratón, a todos los animales. Veinticuatro horas post-inyección, y 3 horas luego de la administración de BrdU, se sacrificaron los animales en cámara de CO₂ (Edimburgo) o por inhalación del anestésico isofluorano (Montevideo) y se realizó un lavado peritoneal con 9 mL de RPMI 1640 con 0,2% v/v SFB.

Las células recuperadas en el lavado se analizaron mediante citometría de flujo (ver sección 3.4.4) y se realizaron diversas cuantificaciones en el líquido recuperado (ver secciones 3.4.5, 3.4.6 y 3.4.7).

Variantes del protocolo general

En el experimento piloto para definir la dosis de material particulado a inyectar y el tiempo final al cual observar potenciales efectos, se utilizaron 3 ratones por grupo en lugar de 5. Se estudiaron las células recuperadas en un curso temporal de 24, 48 y 96 horas post-inyección de los estímulos. En todos los casos se realizó un pulso de 3 horas con BrdU inmediatamente previo al tiempo final.

Se realizó además un ensayo utilizando pLL "bloqueado". Este experimento también contó con 3 animales por grupo. En el tratamiento correspondiente a pLL "bloqueado" la suspensión a inyectar se incubó con una dilución de suero normal de ratón durante las 24 horas previas.

Se realizaron también ensayos para evaluar los efectos de pLL sobre la proliferación inducida por M-CSF. En estos casos se utilizó Fc·M-CSF como estímulo, que corresponde a M-CSF fusionado a la porción Fc de un anticuerpo IgG1A de cerdo. Este reactivo fue generado en el laboratorio de D. Hume (UK patent application GB1303537.1). La dosis utilizada fue de 5 μ g Fc·M-CSF en 200 μ L de PBS apirógeno por ratón. Este reactivo fue utilizado en un protocolo similar en [36].

También se utilizó una variante del protocolo general en el experimento que utiliza el inhibidor de SHIP, 3 α -aminocolestano (3AC, Echelon Biosciences #B-0341). En este caso, los ratones recibieron una inyección de 200 μ L 3AC 60 μ M en PBS apirógeno con 0,4% v/v etanol, o el vehículo solamente, una hora previo a la inyección de IL-4c y/o pLL.

3.4 Técnicas de análisis

3.4.1 SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, del inglés *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) se realizó de acuerdo a lo descrito en *Laemmli et al.* [64]. Se emplearon geles concentradores al 3% m/v y geles separadores de porcentajes de acrilamida variables (8 a 10% m/v) según el ensayo, todos de

1,5 mm de espesor. Previo a la corrida, las muestras se mezclaron con *buffer* de muestra 6X (Tris/HCl 0,35M pH 6,8 con 10% m/v SDS, 30% m/v glicerol y 0,12 mg/mL azul de bromofenol) y con una solución de ditiotreitól (concentración final 20 mM), y se sometieron a desnaturalización mediante incubación en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Junto a las muestras se corrió un marcador de peso molecular de rango 6,5 a 200 kDa (*SigmaMarker Wide Range*, Sigma #S8445) y/o marcador de peso molecular preteñido de rango 27 a 180 kDa (*Prestained Molecular Marker*, Sigma #SDS7B2). Las corridas electroforéticas se realizaron en el sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad, a intensidad de corriente constante (20 mA / gel) y temperatura ambiente.

3.4.2 Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las membranas de PVDF (Millipore #IPVH00010) se humectaron con metanol durante al menos 5 minutos. Luego, los geles de poliacrilamida a transferir y las membranas de PVDF se equilibraron con solución de transferencia (0,025 M Tris base, 0,2 M glicina y metanol 20% v/v en agua) y se dispusieron en el *cassette* de transferencia junto a papeles de filtro y esponjas también embebidos en la misma solución (en el orden: ánodo/esponja/papel de filtro/gel/membrana de PVDF/papel de filtro/esponja/cátodo). Las transferencias se realizaron a 56 V constante, a 4°C durante 16 horas.

3.4.3 Western blot

Finalizada la transferencia, las membranas de PVDF se lavaron con PBS 0,05% m/v Tween-20 (solución de lavado) durante 5 minutos. Luego, se tiñeron con Rojo Ponceau (tinción reversible de proteínas) para verificar una transferencia exitosa. La tinción se lavó con solución de lavado y las membranas limpias se incubaron en solución de bloqueo (PBS 0,1% m/v Tween-20 0,2% m/v seroalbúmina bovina) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las membranas se incubaron con una dilución apropiada del primer anticuerpo en PBS 0,1% m/v Tween-20 0,5% m/v seroalbúmina bovina 0,1% m/v azida de sodio (*buffer* de incubación), a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Se incubó con una dilución apropiada del anticuerpo de detección conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) en *buffer* de incubación sin azida de sodio, durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron 3 lavados de 5, 10 y 15 minutos respectivamente. El marcado se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo #34080). El tiempo de exposición se detalla en cada figura. Los blots se visualizaron en el transiluminador asociado al *software Quantity One* (versión 4.6.2) dentro del equipo *Universal Hood II* de Bio-Rad. Se realizó la cuantificación integral de intensidad sobre área de las bandas obtenidas con el *software Image Studio Lite* (versión 5.0), definiendo el área de la membrana correspondiente a cada banda

y utilizando el método de *local background subtraction*. Éste toma como intensidad de fondo la correspondiente al borde del área definida como "banda" y se lo resta al valor de intensidad medido en cada caso.

En los *western blots* para Akt fosforilado, se utilizó el anticuerpo anti-pAkt S473 (Cell Signaling Technologies #4060P), en una dilución 1/1000. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Calbiochem #401353), en una dilución 1/5000.

En los *western blots* para ERK fosforilado, se utilizó el anticuerpo anti-pERK T202/Y204 (Cell Signaling Technologies #4370P), en una dilución 1/2000. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Calbiochem #401353), en una dilución 1/5000.

Como control de carga se utilizó la banda correspondiente a actina teñida con Rojo Ponceau. La identidad de la banda se corroboró por espectrometría de masa de la banda (distinguible en tinción de *Coomassie*) en el gel de poliacrilamida.

3.4.4 Citometría de flujo

3.4.4.1 Marcado de componentes de superficie

Para tinción de citometría las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo en V, a razón de $0,5 \times 10^6$ células / pocillo. Una vez en la placa de tinción, las células se lavaron dos veces con 100 μ L de PBS 0,1% m/v seroalbúmina bovina, 2 mM EDTA, pH 7,1 (solución FACS) por pocillo, centrifugando 350 g durante 5 minutos a 4°C cada vez. Luego de cada centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión de la placa y se disgregaron las células por pasaje de la placa por un agitador tipo vórtice.

Luego, las células se incubaron con 25 μ L de FACS 10% v/v suero normal de rata, durante 15 minutos sobre hielo. Este paso, si bien es un bloqueo general, es necesario para bloquear los receptores Fc presentes en las células y así impedir que los anticuerpos de la incubación siguiente se unan a las células a través de ellos en lugar de hacerlo a través de su epítotope específico. Seguidamente, las células se incubaron con 25 μ L de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para antígenos de interés, diluidos en solución FACS como se especifica en la Tabla 3.1, durante 30 – 45 minutos sobre hielo y protegidas de la luz. En paralelo se realizaron los marcados con los controles isotípicos (mismo isotipo, especie de origen y fluorocromo que los anticuerpos de interés, pero específico para un antígeno irrelevante) y los marcados simples (incubación con un único anticuerpo, necesario para la compensación de colores en el citómetro).

Finalmente, se realizaron 2 lavados con 100 μ L solución FACS por pocillo, centrifugando a 350 g durante 5 minutos a 4°C cada vez. Las células se

mantuvieron en 100 μL FACS por pocillo sobre hielo hasta medir en el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

3.4.4.2 Tinción con la sonda de viabilidad To-Pro3

La sonda To-Pro3 (Invitrogen #T3605) es una sonda incapaz de penetrar la membrana celular, que fluoresce al unirse a ADN de doble cadena. De esta manera, marca las células cuya integridad de membrana se encuentra comprometida, como es el caso de las células muertas.

Antes de medir en el citómetro, se incubaron las células con FACS 24 nM To-Pro3 durante 5 minutos. Esta sonda fluoresce en el canal correspondiente al fluoróforo aloficocianina (APC, del inglés *allophycocyanine*). Las células positivas se consideran células muertas.

3.4.4.3 Marcado de componentes intracelulares

Para medir componentes intracelulares por citometría de flujo, primero se debe marcar los componentes de superficie de las células que se desee, siguiendo los pasos de la sección 3.4.4.1 con mínimas diferencias.

Para medir viabilidad, se requiere de una sonda capaz de resistir el proceso de fijado y permeabilización al cual se someterá a las células posteriormente. Por ello, en lugar de To-Pro3 se utilizó la sonda *Live/Dead* (Life Technologies #L34957 o #L10120). Esta sonda tiene afinidad por las poliaminas. En las células muertas, cuya integridad de membrana se encuentra comprometida, la sonda se unirá a las poliaminas intracelulares además de a las de superficie, por lo que les conferirá una intensidad de fluorescencia mucho mayor. La unión sonda-poliamina es de carácter covalente y no se ve afectada por el proceso de fijado y permeabilización posterior. Luego de transferir las células a la placa de tinción de citometría y antes de agregar la solución de bloqueo, se incubaron las células con 10 μL de una dilución 1/500 en PBS de la sonda, durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se incubó luego con 15 μL de solución de bloqueo en lugar de 25 μL y se prosiguió tal cual se describe en la sección 3.4.4.1.

Luego del segundo lavado posterior al marcado de los componentes de superficie, se fijaron las células. El fijado se realizó por incubación con 100 μL de FACS 2% m/v paraformaldehído durante 20 minutos a 4°C y protegido de la luz.

A tiempo cumplido, se descartó el agente fijador y se realizaron dos lavados con 100 μL solución de Permeabilización/Lavado (eBioscience #00-8333-56).

Seguidamente, las células se incubaron durante 30 minutos con 20 μL de una mezcla de anticuerpos específicos para antígenos de interés, conjugados a fluorocromos o a biotina, diluidos en solución de Permeabilización/Lavado como se especifica en la Tabla 3.1. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. A tiempo cumplido, se realizó un lavado con solución de

Permeabilización/Lavado y se incubó con 50 μ L de estreptavidina conjugada a un fluoróforo durante 45 minutos sobre hielo. En caso de no haber utilizado anticuerpos conjugados a biotina en el paso anterior, se procedió directamente a los dos lavados finales con solución de Permeabilización/Lavado. Las células se dejaron en 100 μ L de la misma solución, sobre hielo y protegidas de la luz, hasta el momento de medir.

3.4.4.4 Marcado de componentes nucleares

Para medir componentes nucleares, como es el caso de la BrdU incorporada en los experimentos de proliferación, para el fijado se utilizaron 100 μ L del fijador del *kit FoxP3 Staining Buffer Set* (eBioscience #00-5523-00), durante toda la noche a 4°C y protegido de la luz. Se realizaron dos lavados con solución de Permeabilización/Lavado, y se incubó con 100 μ L de solución ADNasa (SIGMA #D5025) 765 KU/mL en PBS, durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad.

A tiempo cumplido, se lavó la ADNasa con solución de Permeabilización/Lavado y se continuó con el protocolo descrito en la sección anterior.

Los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron utilizando el *software* FlowJo versión 7.6.

3.4.5 Cuantificación de citoquinas y otras proteínas en solución mediante ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Los sobrenadantes de los ensayos *in vitro*, así como el primer mL de lavado peritoneal de los ensayos *in vivo*, se mantuvieron a -20°C hasta realizar el ELISA para detectar citoquinas u otras proteínas secretadas. Para estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos *Maxisorp* (Thermo, #442404). En forma general, se incubó la placa con una dilución apropiada del anticuerpo de captura en el *buffer* correspondiente, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó con una solución de PBS 10% v/v SFB durante al menos 1 hora a temperatura ambiente, para cubrir los sitios de unión en la placa no ocupados por el anticuerpo de captura. Seguidamente, se incubó con la muestra o con una dilución seriada de estándar. Luego, se incubó con una dilución apropiada del anticuerpo de detección conjugado a biotina en el *buffer* correspondiente, y posteriormente con estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Después de cada incubación se realizaron lavados con PBS 0,05% m/v Tween-20. Finalmente, se reveló agregando 100 μ L de una solución de tetrametilbencidina (TMB, Applichem #A3840). El desarrollo de color se detuvo por agregado de 50 μ L de H₂SO₄ 1M. Se midió absorbancia a 450 nm.

Las concentraciones de anticuerpos y estándares utilizados, así como los *buffers* correspondientes para cada incubación, se detallan en la Tabla 3.2.

3.4.6 Ensayo de actividad arginasa

Este ensayo utiliza la generación de urea a partir de L-arginina exógena como medida de la actividad arginasa a tiempo final en la muestra. Se empleó tanto sobre muestras de lavado peritoneal provenientes de experimentos *in vivo* como sobre lisados celulares totales de experimentos *in vitro*, en ambos casos en el contexto de estimulación con IL-4.

Se mezcló, manteniendo en hielo, 50 μ L de muestra con 50 μ L Tris-HCl 25 mM pH 7,2 y 10 μ L $MnCl_2$ 10 mM. Luego, la mezcla se incubó a 56°C durante 10 minutos y se volvió a hielo. Se agregaron 100 μ L de L-arginina 0,5 M y se incubaron a 37°C durante 1 – 2 horas. Entre tanto, se preparó un nuevo grupo de tubos con 160 μ L de solución de detención ($H_2SO_4:H_3PO_4:dH_2O$ 1:3:7 v/v/v) y 8 μ L de isonitrosopropiofenona (ISPF) al 9% p/v en etanol absoluto, y se mantuvieron en hielo. Además, se preparó una dilución seriada de urea que se utilizó como estándar. Finalizada la incubación a 37°C, se transfirieron 40 μ L de cada muestra (muestra o estándar) a los tubos que contenían la mezcla solución de detención/ISPF. Éstos se incubaron a 95°C durante 30 minutos. Luego, se transfirió un volumen adecuado a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm. Es importante que las soluciones de L-arginina e ISPF sean preparadas en el momento.

3.4.7 Ensayo de Griess

Este ensayo mide la presencia de nitritos en la muestra mediante la formación de un compuesto azo coloreado. El nivel de nitrito en la muestra, uno de los metabolitos del óxido nítrico (NO), se relaciona con la producción de NO.

El ensayo de Griess se basa en la reacción entre nitrito y ácido sulfanílico en condiciones ácidas, con el acople del ion diazonio resultante a α -naftilamina para dar un producto coloreado. Se preparó el reactivo de Griess (1,45 mL H_3PO_4 al 85% v/v, 0,25 g sulfanilamida, 0,025 naftileno en 25 mL total) y una solución de nitrito para utilizar como estándar. Se mezclaron volúmenes iguales del reactivo de Griess con la muestra o estándar en una placa de 96 pocillos. La placa se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 540 nm.

3.5 Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó con el *software* GraphPad Prism versión 5. En los experimentos que incluyeron cursos temporales se realizó el test Two-Way ANOVA con post test de Bonferroni. En los demás casos se realizó el test One-Way ANOVA con post test de Tukey. Los niveles de significancia se indican en cada figura.

Marcado	Antígeno	Fluorocromo	Dilución	Marca #catálogo
Superficie	CD4	PerCP	1/330	BioLegend #100432
	CD8	PECy7	1/500	BioLegend #100722
	CD11b	PECy7	1/200	BioLegend #101216
	CD11c	APCCy7	1/200	BioLegend #117324
	CD11c	PECy7	1/200	eBioscience #25-0114-82
	CD19	APCCy7	1/200	BD #557655
	CD19	BV421	1/180	BioLegend #115538
	CD40	FitC	1/200	BioLegend #124608
	CD86	PE	1/200	BD #553692
	CD86	PE	1/200	eBioscience #12-0862-81
	CD115	APC	1/200	BioLegend #135510
	F4/80	PECy7	1/300	eBioscience #25-4801-82
	F4/80	AF488 (FitC)	1/200	eBioscience #53-4801-82
	Ly6G	BV421	1/180	BioLegend #127627
	MHCII	Pacific Blue	1/160	BioLegend #107620
	MHCII	PerCP	1/600	BioLegend #107624
	SiglecF	BV421	1/180	BD #562681
	TCR β	Pacific Blue	1/180	BioLegend #109226
Intracelular	BrdU	PE	1,5 μ L/muestra	BioLegend #339812
	IFN γ	FitC	1/200	BD #554411
	IL-4	APC	1/200	BioLegend #504106
	IL-5	PE	1/200	BioLegend #504304
	IL-10	APC	1/200	BioLegend #505010
	IL-13	PE	1/200	eBioscience #12-7133-82
	IL-17	AF488 (FitC)	1/200	BioLegend #506909
	Ki67	FitC	5 μ L/muestra	BD #556026
	MR	AF647 (APC)	1/240	BioLegend #141712
	PDL2	PE	1/240	eBioscience #12-5986
	Relm α	FitC o PE *	1/100	Peprotech #500-P214
Ym1	biotina / Strep-PerCP	1/40	RD #BAF2446	
Viabilidad	Live/Dead	AmCyan	1/500	Life Technologies #L34957
	Live/Dead	Far Red	1/500	Life Technologies #L10120
	ToPro3	APC	1/1000	Invitrogen #T3605

Tabla 3.1 Herramientas utilizadas en citometría de flujo

Se detallan los anticuerpos y reactivos especiales utilizados en citometría de flujo, junto con su dilución de trabajo (final), marca y número de catálogo.

* Se utilizaron kits de marcado de IgG de conejo con AF488 (FitC) o PE (Invitrogen #25302 o #25355, respectivamente).

AF488 = Alexa Fluor 488; AF647 = Alexa Fluor 647; APC = alofocianina; BV421 = Brilliant Violet 421; Cy7 = cianina 7; FitC = isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; PerCP = *Perinidin Chlorophyll Protein*; Strep = estreptavidina.

Anticuerpo de captura					
Citoquina	Conc. inicial (µg/mL)	Conc. final (µg/mL)	Dilución	Buffer	Marca #catálogo
IFN γ	-	-	1/315	0,1M NaHCO $_3$ pH 9,6	Producción propia UoE
IL-4	9060	1,2	1/7550	PBS	Producción propia UoE
IL-5	800	1,6	1/500	PBS	Producción propia UoE
IL-6	500	1	1/500	0,1 M Na $_2$ HPO $_4$ pH 12	BD #554400
IL-10	500	4	1/125	0,2 M NaHPO $_4$ pH 6,5	eBioscience #14-7101-85
IL-12p40	1000	2	1/500	0,2 M Na $_2$ HPO $_4$ pH 6,5	BD #551219
IL-12p70	-	-	1/250	0,2 M Na $_2$ HPO $_4$ pH 6,5	BD #555256
IL-13	500	4	1/125	PBS	eBioscience #14-7133-85
IL-17	360	2	1/180	PBS	RD #DY421
Relm α	100	1	1/100	0,1M NaHCO $_3$ pH 9,6	Peprotech #500-P214
TNF α	144	0,8	1/180	PBS	RD #DY410
Ym1	720	1	1/720	PBS	RD #2446

Estándar					
Citoquina	Conc. inicial (µg/mL)	Conc. final (ng/mL)	Dilución	Buffer	Marca #catálogo
IFN γ	10	50 µg/mL	1/200	PBS 10% SFB	Peprotech #315-05
IL-4	2	8	1/250	PBS 10% SFB	Peprotech #214-14
IL-5	5	10	1/500	PBS 10% SFB	Peprotech #215-15
IL-6	5	25	1/200	PBS 10% SFB	Peprotech #216-16
IL-10	5	50	1/100	PBS 10% SFB	Peprotech #210-10
IL-12p40	5	50	1/100	PBS 10% SFB	Peprotech #210-12
IL-12p70	140 ng/mL	7	1/20	PBS 1% BSA	RD #DY419
IL-13	5	16	1/312	PBS 1% BSA	Peprotech #210-13
IL-17	160 ng/mL	1	1/160	PBS 1% BSA	RD #DY421
Relm α	25	100	1/250	PBS 10% SFB	Peprotech #450-26
TNF α	20 ng/mL	2	1/100	PBS 1% BSA	RD #DY410
Ym1	620 ng/mL	29	1/31	PBS 1% BSA	Producción propia UoE

Anticuerpo de detección					
Citoquina	Conc. inicial (µg/mL)	Conc. final (µg/mL)	Dilución	Buffer	Marca #catálogo
IFN γ	500	1	1/500	PBS 10% SFB	BioLegend #505804
IL-4	500	0,25	1/2000	PBS 10% SFB	BioLegend #504202
IL-5	500	0,17	1/3000	PBS 10% SFB	BioLegend #504402
IL-6	500	0,5	1/1000	PBS 10% SFB	BD #554402
IL-10	500	0,25	1/2000	PBS 10% SFB	eBioscience #13-7102-85
IL-12p40	500	0,5	1/1000	PBS 10% SFB	BioLegend #505302
IL-12p70	-	-	1/250	PBS 10% SFB	BD #555256
IL-13	500	1	1/500	PBS 1% BSA	eBioscience #13-7135-85
IL-17	72	0,4	1/180	PBS 1% BSA	RD #DY421
Relm α	50	0,25	1/200	PBS 10% SFB	Peprotech #500-P214Bt
TNF α	36	0,2	1/180	PBS 1% BSA	RD #DY410
Ym1	50	0,1	1/500	PBS 1% BSA	RD #BAF2446

Tabla 3.2 Reactivos utilizados en ensayos ELISA

Se detallan los anticuerpos de captura y detección, así como el estándar, utilizados en ensayos ELISA, junto con sus diluciones de trabajo, *buffer* de dilución, marca y número de catálogo. UoE = *University of Edinburgh*.

4. Resultados

4.1 Efectos de pLL sobre la activación alternativa en BMDC *in vitro*

Como se mencionó en la introducción, la IL-4 juega un rol central en la respuesta montada durante infecciones por helmintos. Dentro de la inmunidad innata, específicamente sobre células dendríticas y macrófagos, esta citoquina induce un fenotipo de activación alternativa, caracterizado por un aumento en la expresión de receptor de manosa y PDL2 en la superficie, inducción de la enzima arginasa 1 y expresión de las proteínas de secreción Relm α y Ym1, entre otros.

Como se introdujo en la sección 1.3, el grupo trabaja con un material particulado de la capa laminar de *Echinococcus granulosus* que denominamos pLL [14]. Resultados previos, no publicados, muestran que pLL es capaz de inhibir ciertos marcadores de activación alternativa en células dendríticas, en ensayos de 18 horas de incubación (C. Casaravilla, no publicados). El trabajo de *Weisser et al.* [52] muestra que la inducción de activación alternativa en macrófagos sigue una cinética de varios días. Específicamente, los autores observan que la expresión de Ym1 y arginasa 1 aumentan progresivamente durante un curso temporal de cinco días de incubación con IL-4. Nos pareció entonces interesante evaluar el efecto de pLL sobre la activación alternativa de células dendríticas en estas cinéticas más largas. Se trabajó con BMDC estimuladas con IL-4 recombinante durante uno, dos o tres días (Figura 4.1).

Al tratarse de ensayos de varios días, donde no se le agrega medio fresco al cultivo, una preocupación era la viabilidad del cultivo a tiempos largos. Por esta razón, en cada tiempo final se determinó la viabilidad del cultivo con la sonda Live/Dead, encontrándose alrededor del 80% células vivas en todos los casos, sin diferencias significativas asociadas al tiempo de incubación o a los tratamientos ensayados (datos no mostrados).

De acuerdo a lo esperado, la IL-4 indujo aumentos significativos en la expresión de MR, PDL2, Relm α y Ym1, si bien el aumento en expresión de MR fue débil. Similar a lo reportado por *Weisser et al.* para niveles de Ym1 y arginasa 1 en lisados totales de macrófagos, se observa que la expresión de los marcadores tendió a continuar aumentando luego de las 24 horas de incubación con IL-4 en células dendríticas. Sin embargo, el aumento no fue tan marcado como el reportado por estos autores. Respecto a la actividad de pLL, se observó que tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de Relm α inducida por IL-4, que persiste con el tiempo de incubación. Sin embargo, no presentó efectos significativos sobre la expresión de los demás marcadores estudiados (Figura 4.1).

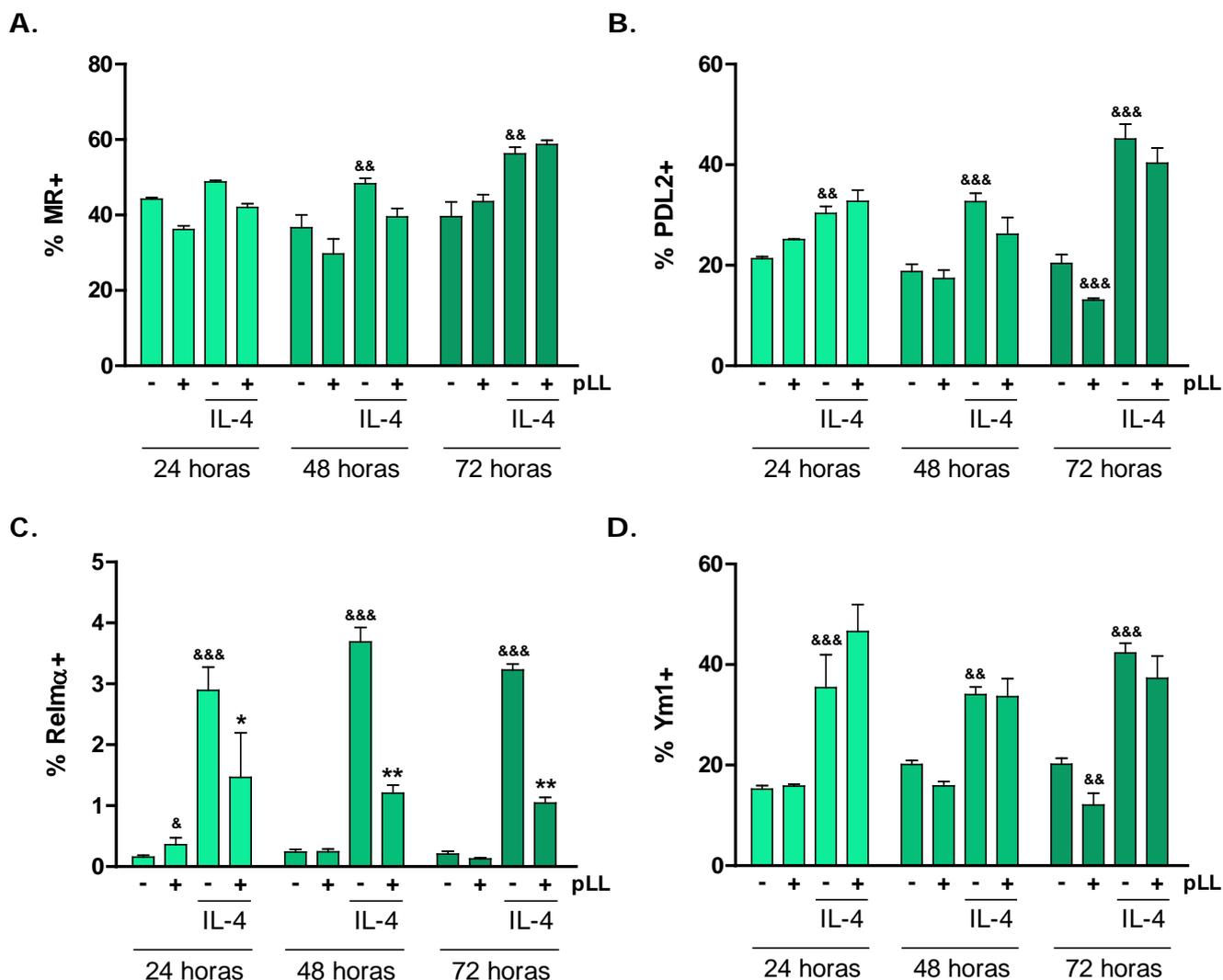


Figura 4.1 Curso temporal para marcadores de activación alternativa en BMDC incubadas con IL-4 en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con IL-4 20 ng/mL, en presencia o ausencia de pLL, durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron diversos marcadores de activación alternativa mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Receptor de Manosa (MR, A), PDL2 (B), Relm α (C) o Ym1 (D). Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA, con post-test de Bonferroni, luego de transformación logarítmica de los datos. Los símbolos & y * indican diferencias con la condición basal o estimulada con IL-4, respectivamente; uno, dos o tres símbolos corresponden a $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente. Resultado representativo de al menos dos experimentos independientes por tiempo estudiado.

Se investigó el efecto de pLL sobre Relm α secretada, también en un curso temporal (Figura 4.2). Curiosamente, no se observó una acumulación de Relm α con el tiempo, lo que indica que la misma se degrada en el cultivo con una cinética similar o incluso más rápida que la de su producción. La presencia de

pLL generó una inhibición del nivel de Relm α en el sobrenadante de cultivo. El efecto se acentuó con el tiempo, a diferencia de lo que se observa para la expresión intracelular. Esto muestra que la inhibición de Relm α por pLL se refleja tanto a nivel de expresión intracelular como de proteína secretada.

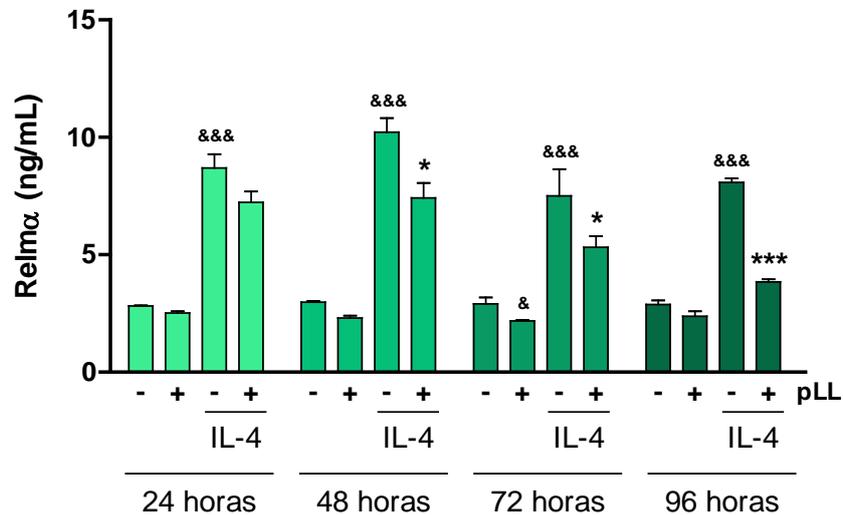


Figura 4.2 Curso temporal de producción de Relm α por BMDC incubadas con IL-4 en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con IL-4 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, durante los tiempos especificados. La gráfica muestra promedio + SEM del nivel de Relm α en el sobrenadante de cultivo. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA, con post-test de Bonferroni, luego de transformación logarítmica de los datos. & y * indican diferencias con la condición basal o estimulada con IL-4, respectivamente. Uno o tres símbolos corresponden a $p < 0,05$ o $p < 0,001$, respectivamente. Resultado representativo de al menos dos experimentos independientes por tiempo estudiado.

También se estudió la actividad arginasa presente en lisados celulares del cultivo (Figura 4.3). Como se espera, la IL-4 indujo actividad arginasa en BMDC. La presencia de pLL tendió a inhibir este parámetro, sin alcanzar significancia estadística. Vale destacar que este experimento se realizó una única vez, por lo que para sacar conclusiones estadísticamente válidas debería repetirse.

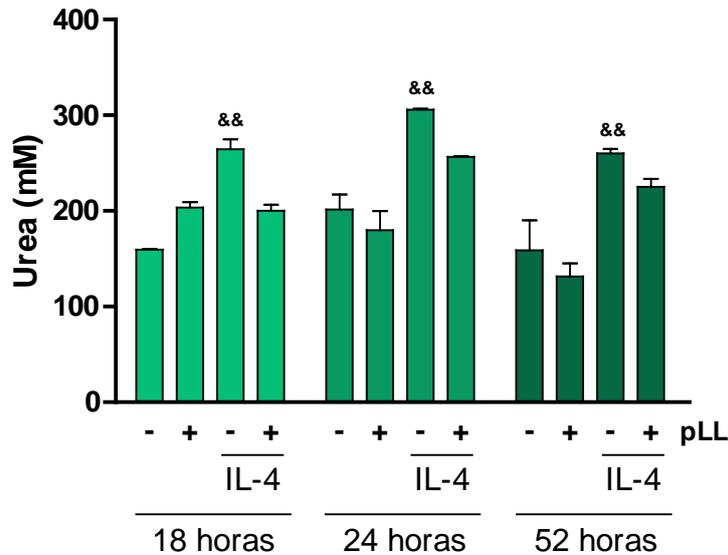


Figura 4.3 Curso temporal de actividad arginasa en BMDC incubadas con IL-4 en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con IL-4 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midió la actividad arginasa en lisados celulares. La gráfica muestra promedio + SEM de concentración de urea, producto de la enzima arginasa. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA, con post-test de Bonferroni, luego de transformación logarítmica de los datos. && indica diferencia con la condición basal, con $p < 0,01$.

En conclusión, la presencia de pLL inhibió la expresión de Relm α inducida por IL-4, y tuvo efectos débilmente inhibitorios o nulos sobre la inducción de los otros marcadores de activación alternativa ensayados (MR, PDL2, Ym1, actividad arginasa).

4.2 Efectos de pLL sobre la activación de Akt en BMDC y ThioM ϕ *in vitro*

Como se mencionó en la introducción, en macrófagos y células dendríticas están presentes ambas formas del receptor de la IL-4, de tipo I y de tipo II, por lo que se activan las vías de JAK/STAT6 y de PI3K/Akt (ver Figura 1.3 *Esquema de señalización por IL-4*). El estudio de potenciales efectos de pLL sobre la vía de JAK/STAT6 se vio impedido por la imposibilidad de detectar STAT6 fosforilado luego de estimulación con IL-4, a las dosis de 20 – 200 ng/mL (resultados no mostrados). Por otro lado, datos previos del grupo mostraban que la exposición a pLL inhibía la fosforilación de Akt en respuesta a estimulación con LPS en BMDC. Además, como ya se mencionó, entre los marcadores de activación

alternativa estudiados, Relm α es el que tiene una dependencia más fuerte con la vía de PI3K/Akt, al menos en macrófagos [44, 52-54]. Interesantemente, los resultados observados en esos artículos en presencia de inhibidores de PI3K o de Akt están de acuerdo con los que obtenemos al incubar células dendríticas con IL-4 en presencia de pLL: una inhibición de la producción y secreción de Relm α muy fuerte y efectos menores sobre los otros parámetros. Es así que decidimos investigar el efecto de pLL sobre la señalización por PI3K/Akt inducida por IL-4 (Figura 4.4).

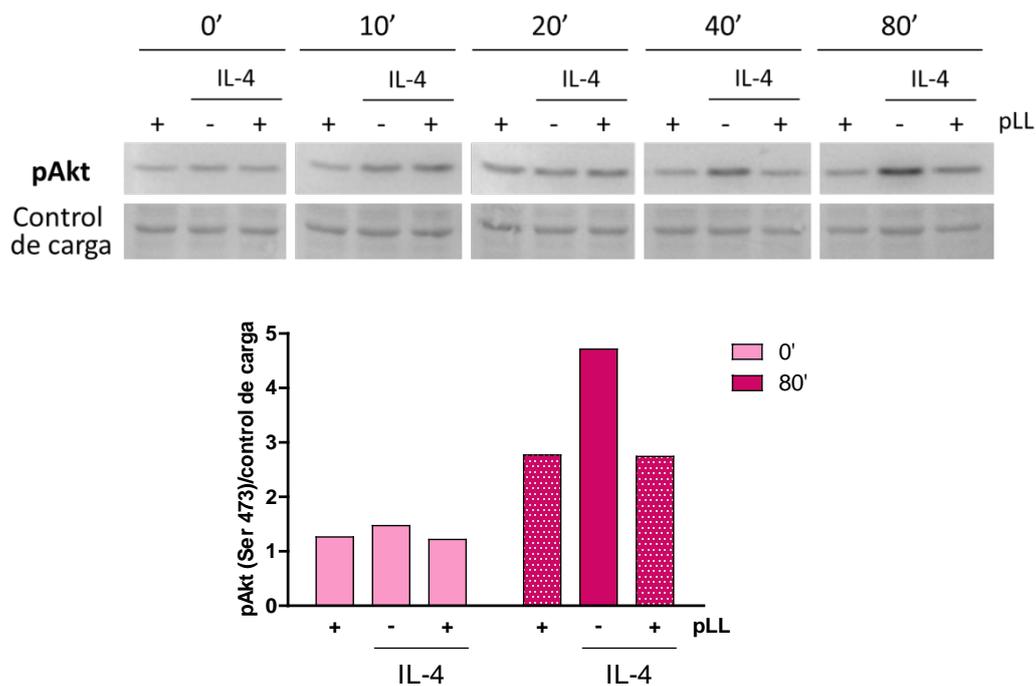


Figura 4.4 Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 en BMDC, en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con IL-4 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra la densitometría para 0 y 80 minutos de estimulación. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

Se observó que pLL inhibe fuertemente la fosforilación de Akt inducida por IL-4 en células dendríticas. Cabe destacar que la fosforilación de Akt inducida por IL-4 es débil en comparación con la inducida por otros estímulos, como LPS por ejemplo (datos no mostrados). Por esta razón, estos ensayos se realizaron sobre células "hambreadas" durante 24 horas y luego estimuladas con IL-4 en solución salina. Se determinó la viabilidad del cultivo luego del "hambre" y se

constató que se trataba de alrededor de 90% células vivas. Estas condiciones de “hambreado” y estimulación se mantuvieron para ensayos posteriores de detección de proteínas fosforiladas en lisados celulares totales.

Tal como se comentó anteriormente, la vía PI3K/Akt es una vía de señalización central para la célula, utilizada por diversos factores, no solo por la IL-4. En particular, los factores de crecimiento señalizan a través de ella, logrando así su efecto proliferativo y de supervivencia celular [43]. Nos propusimos investigar si el efecto observado sobre Akt se extendía a la señalización inducida por factores de crecimiento (Figura 4.5).

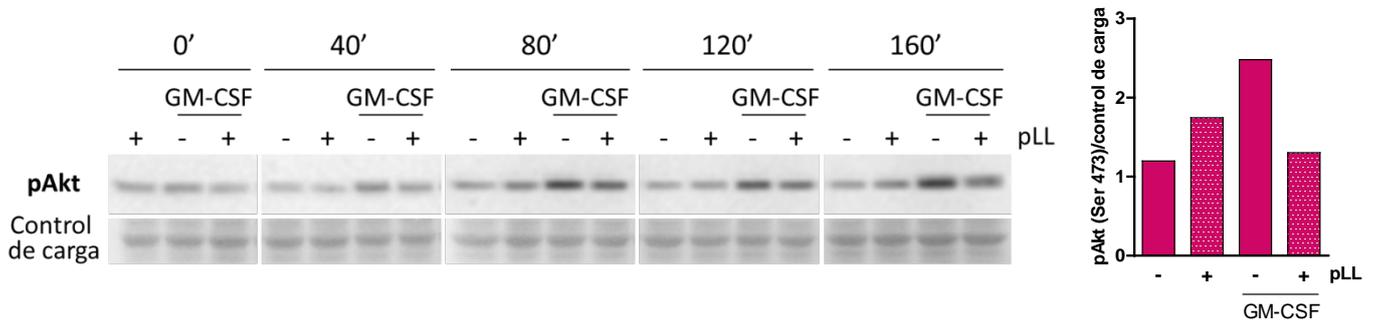


Figura 4.5 Fosforilación de Akt en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL durante el tiempo especificado. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra la densitometría para 80 minutos de estimulación, que corresponde al pico de fosforilación suscitada por GM-CSF. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Se observó que pLL también es capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por GM-CSF en células dendríticas. Esta observación descarta de alguna manera que el efecto de pLL sobre la fosforilación inducida por IL-4 se deba a una interferencia con el receptor para la citoquina, aunque esta hipótesis no fue evaluada directamente.

Nos pareció interesante ampliar las observaciones a macrófagos. Para ello utilizamos el modelo de macrófagos generados por inyección con medio tioglicolato (ThioM ϕ) que permite recuperar macrófagos no activados *ex vivo* en números suficientes (aproximadamente 8 – 15 x 10⁶ por ratón) para el trabajo *in vitro*.

Se quiso comprobar en ThioM ϕ entonces, si pLL tenía el efecto sobre la activación de Akt inducida por IL-4 o por el factor de crecimiento M-CSF, similar a lo observado previamente en BMDC (Figuras 4.6 y 4.7).

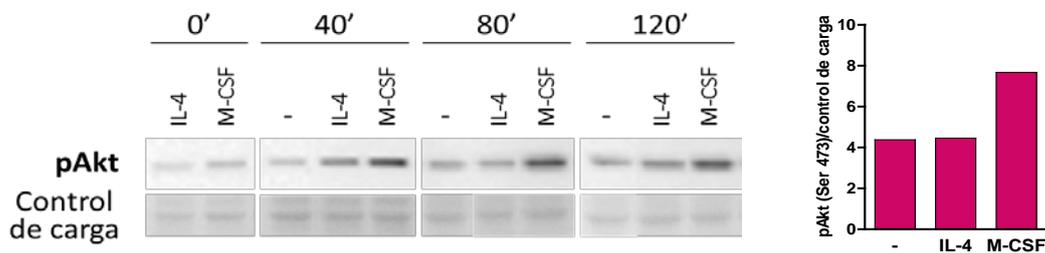


Figura 4.6 Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 o M-CSF en ThioM ϕ

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ ThioM ϕ con IL-4 20 ng/mL o M-CSF 20 ng/mL durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra la densitometría correspondiente a 120 minutos de estimulación. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Se observó que IL-4 no induce fosforilación de Akt reproduciblemente detectable en este tipo celular, lo cual es coincidente con lo reportado anteriormente [43]. Esto imposibilitó determinar un posible efecto inhibitorio de pLL sobre la activación de Akt en este sistema. En cambio, se pudo observar fosforilación de Akt significativa y reproducible inducida por el factor de crecimiento M-CSF (Figura 4.6). Es así que se utilizó este estímulo para un ensayo análogo al realizado con GM-CSF en BMDC (Figura 4.7).

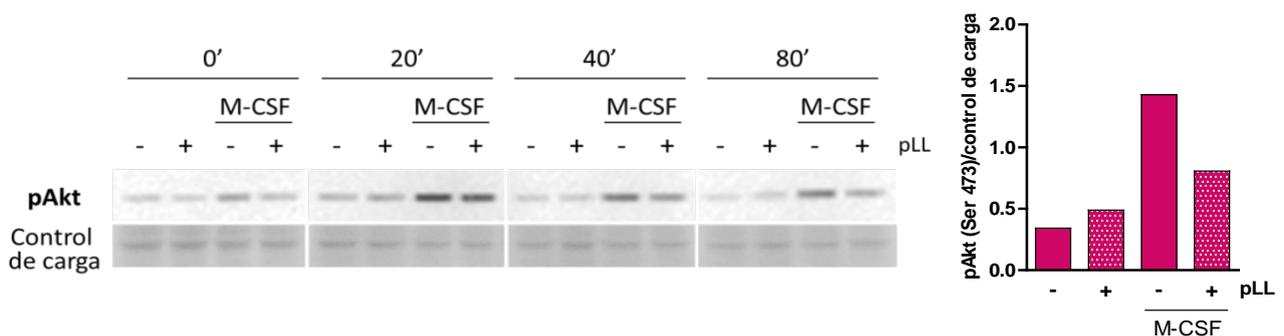


Figura 4.7 Fosforilación de Akt en respuesta a M-CSF en ThioM ϕ , en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ ThioM ϕ con M-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra la densitometría para 80 minutos de estimulación. Resultado representativo de cuatro experimentos independientes.

En este caso se pudo observar un efecto inhibitorio de pLL sobre la fosforilación de Akt inducida por M-CSF en ThioMφ.

En suma, la incubación con pLL inhibe la fosforilación de Akt inducida por diversos estímulos (IL-4, GM-CSF, M-CSF, LPS) en distintos tipos celulares (BMDC o ThioMφ).

4.3 Efectos de pLL sobre proliferación celular *in vitro*

Uno de los muchos procesos en los que está involucrada la vía PI3K/Akt es la proliferación celular. Teniendo en cuenta que pLL interfiere con la señalización a través de Akt en respuesta a cuatro estímulos diferentes (LPS, IL-4, M-CSF y GM-CSF), decidimos estudiar si pLL tiene un efecto sobre la proliferación celular. Para ello se estimularon BMDC con GM-CSF y se administró un pulso de 4 horas de BrdU inmediatamente previo al tiempo final. La BrdU es un análogo de la desoxiuridina que se incorporará al ADN sintetizado dentro del pulso, marcando de esta manera a las células en fase S, proceso imprescindible para la proliferación. Esto permite determinar el porcentaje de células en el cultivo que entran en ciclo, una medida indirecta de proliferación celular, aún a tiempos finales a los cuales no llega a haber aumento de número celular (parámetro que por otra parte es afectado además por la velocidad de muerte celular, Figura 4.8).

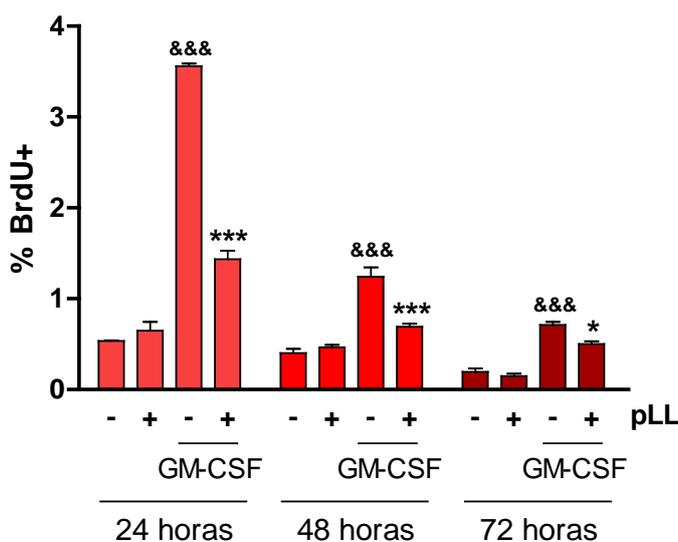


Figura 4.8 Curso temporal de incorporación de BrdU en BMDC, en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, durante los tiempos especificados. Se administró un pulso de BrdU 10 μ M 4 horas antes de cada tiempo final. A tiempo cumplido, se midió la incorporación de BrdU mediante citometría de flujo. La gráfica muestra promedio + SEM del porcentaje de células dendríticas positivas para BrdU. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA, con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con células no estimuladas o estimuladas con GM-CSF, respectivamente. Uno o tres símbolos corresponden a $p < 0,05$ o $p < 0,001$, respectivamente. El resultado a las 24 horas se repitió en un segundo experimento independiente.

Como se esperaba, GM-CSF indujo un aumento del porcentaje de células positivas para BrdU (%BrdU+), significativo para todos los tiempos estudiados. Tal como se indica en la figura, la incubación con pLL inhibió significativamente el %BrdU+ para los tres tiempos analizados. Vale destacar que las BMDC provienen de 10 días de intensa proliferación y diferenciación previo a la realización del experimento. Por lo tanto, no sorprende que los niveles de incorporación de BrdU alcanzados sean bajos, si bien son significativos.

Está reportado para macrófagos que la activación clásica (producto de estimulación con LPS o IFN γ) inhibe la proliferación de estas células [65]. Resultados previos del grupo muestran que pLL no presenta niveles detectables de pirógenos por el test LAL, y que la exposición al material no induce activación clásica de BMDC [14]. Aun así, se quiso verificar que el efecto observado sobre la proliferación de BMDC no se debiese a la presencia de trazas de agonistas de TLR en la preparación. Por ello, se realizó el mismo experimento utilizando BMDC provenientes de ratones doble *knock out* para MyD88 y Trif, moléculas imprescindibles en la señalización a través de agonistas de TLR (Figura 4.9).

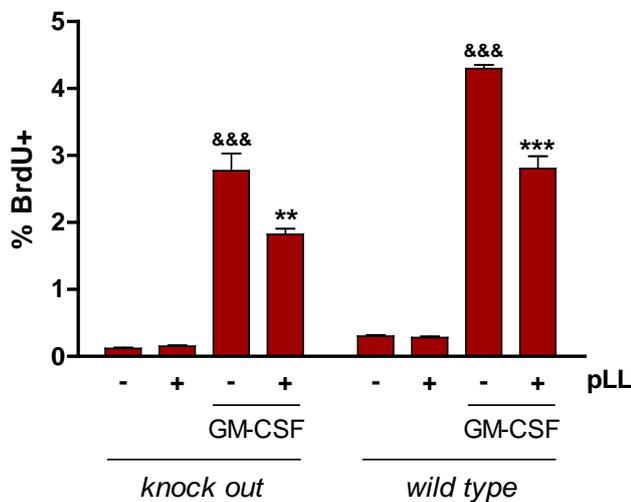


Figura 4.9 Inhibición de la incorporación de BrdU en presencia de pLL, en BMDC *knock out* para MyD88/Trif y de tipo silvestre

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC KO o de tipo silvestre con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, durante 24 horas. Se administró un pulso de BrdU 10 μ M 4 horas antes del tiempo final. A tiempo cumplido, se midió la incorporación de BrdU mediante citometría de flujo. La gráfica muestra promedio + SEM del porcentaje de células dendríticas positivas para BrdU. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA, con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con células no estimuladas o estimuladas con GM-CSF, respectivamente. Dos o tres símbolos corresponde a $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

Se observó que si bien el aumento en %BrdU+ inducido por GM-CSF fue menor que para las células de tipo silvestre, el mismo fue nuevamente inhibido en presencia de pLL de manera significativa. Se puede decir entonces que el efecto de inhibición de la proliferación no se debe a trazas de agonistas de TLR potencialmente presentes en la preparación.

En suma, la incubación con pLL inhibe la proliferación inducida por GM-CSF en BMDC. Este efecto es independiente de la señalización por agonistas de TLR.

4.4 Efectos de pLL sobre la activación de ERK *in vitro*

Como se indicó en la introducción, junto con la vía de PI3K/Akt, la otra vía principal en la regulación de la proliferación celular es la de la MAP quinasa ERK. Para comprender mejor la inhibición de la proliferación observada en la sección anterior, se investigó si la exposición a pLL tenía algún efecto sobre la activación de ERK (Figura 4.10).

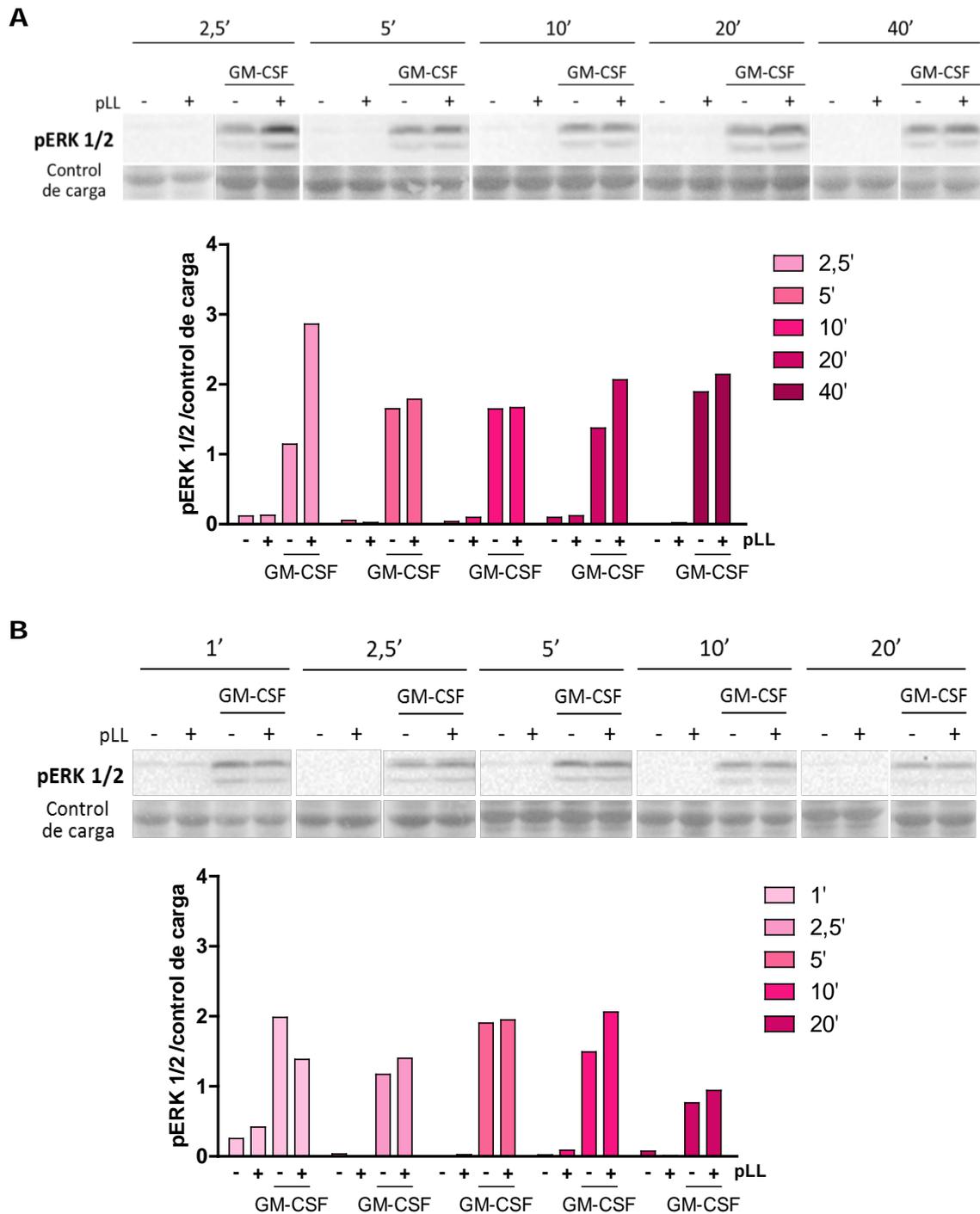


Figura 4.10 Fosforilación de ERK en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL durante el tiempo especificado. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de ERK fosforilado en las posiciones T202 Y204 (pERK) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestran dos réplicas (A y B), con sus correspondientes densitometrías.

En BMDC, en un primer experimento, se observó una potenciación de la fosforilación de ERK inducida por GM-CSF en presencia de pLL a tiempos cortos (Figura 4.10A). Sin embargo, este resultado no se reprodujo en un segundo experimento, en el cual la presencia de pLL no afectó la fosforilación de ERK inducida por GM-CSF a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 4.10B). Para tener un resultado concluyente habría que repetir el ensayo. De importancia, la exposición a pLL en ausencia de GM-CSF no dio lugar a fosforilación de ERK a ninguno de los tiempos estudiados, en ninguno de los experimentos realizados.

Se realizó en ThioM ϕ el ensayo análogo al realizado con BMDC previamente, utilizando M-CSF como estímulo (Figura 4.11).

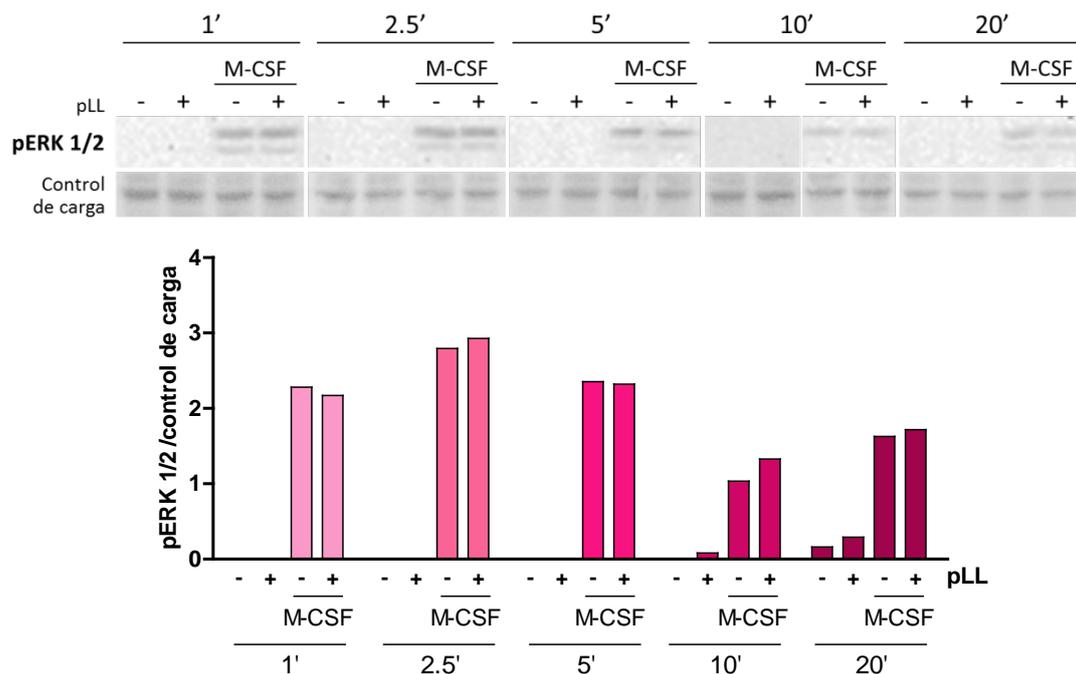


Figura 4.11 Fosforilación de ERK inducida por M-CSF en ThioM ϕ , en presencia y ausencia de pLL

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ ThioM ϕ con M-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de ERK fosforilado en las posiciones T202 y Y204 (pERK 1/2) en lisados totales mediante *Western Blot*. Se muestra la densitometría para todos los tiempos estudiados. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

La exposición a pLL no tuvo efecto sobre la fosforilación de ERK inducida por M-CSF al menos a los tiempos estudiados. Nuevamente, pLL como único estímulo no indujo fosforilación detectable de ERK.

Estos resultados sugieren que la inhibición de proliferación observada probablemente no involucre alteraciones en la vía de ERK.

4.5 Evaluación *in vivo* de los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a IL-4

Hasta ahora se han descrito experimentos realizados sobre BMDC o ThioM ϕ como modelos de células dendríticas o macrófagos, respectivamente. Se realizaron también experimentos *in vivo*, para evaluar los efectos de pLL sobre estos tipos celulares en un contexto más parecido al que ocurre en una infección. Naturalmente, todos los modelos tienen sus limitaciones y no pueden imitar de forma completa lo que sucede en una infección natural.

El laboratorio de la Prof. Judith Allen se especializa en el estudio de macrófagos en infecciones por helmintos. En una publicación reciente, *Jenkins et al.* [35], el grupo describe la capacidad de la IL-4 de inducir proliferación en macrófagos residentes en un modelo murino. Esta publicación establece una relación entre proliferación e IL-4 en macrófagos importante para nuestro trabajo. En el mismo artículo se puede apreciar el efecto inductor de activación alternativa de la IL-4, ya conocido, también sobre macrófagos.

Como ya se expuso, los resultados del trabajo *in vitro* antes descrito, junto con resultados previos del grupo, indican que pLL inhibe la inducción de ciertos marcadores de activación alternativa por IL-4 en células dendríticas y macrófagos. Además se obtuvo evidencias de inhibición de la fosforilación de Akt en respuesta a distintos agonistas en ambos tipos celulares, así como también de inhibición de la proliferación de células dendríticas inducida por GM-CSF. Esto llevó a la idea que pLL podría tener efectos inhibitorios generales sobre la activación de Akt y sus consecuencias celulares tanto en células dendríticas como en macrófagos. Por ello, se decidió investigar los posibles efectos de pLL sobre la activación alternativa y proliferación, en principio de macrófagos pero también de células dendríticas, inducidas por IL-4 *in vivo*. Para ello se empleó el modelo ya establecido por el grupo de Allen. Este modelo emplea un complejo entre IL-4 recombinante y un anticuerpo anti-IL-4 (complejo IL-4, IL-4c), el cual aumenta la biodisponibilidad de la citoquina [63]. Luego se emplea inyección

subcutánea de BrdU tres horas previa al punto final, para marcar las células en fase S, como medida indirecta de proliferación.

En primera instancia se realizó un curso temporal piloto para determinar la dosis de pLL a utilizar, así como también el tiempo final a estudiar. Se analizaron las células recuperadas en el lavado peritoneal 24, 48 o 96 horas post inyección de IL-4 y/o pLL. Las mismas se estudiaron siguiendo la estrategia de *gating* que se muestra a continuación (Figura 4.12).

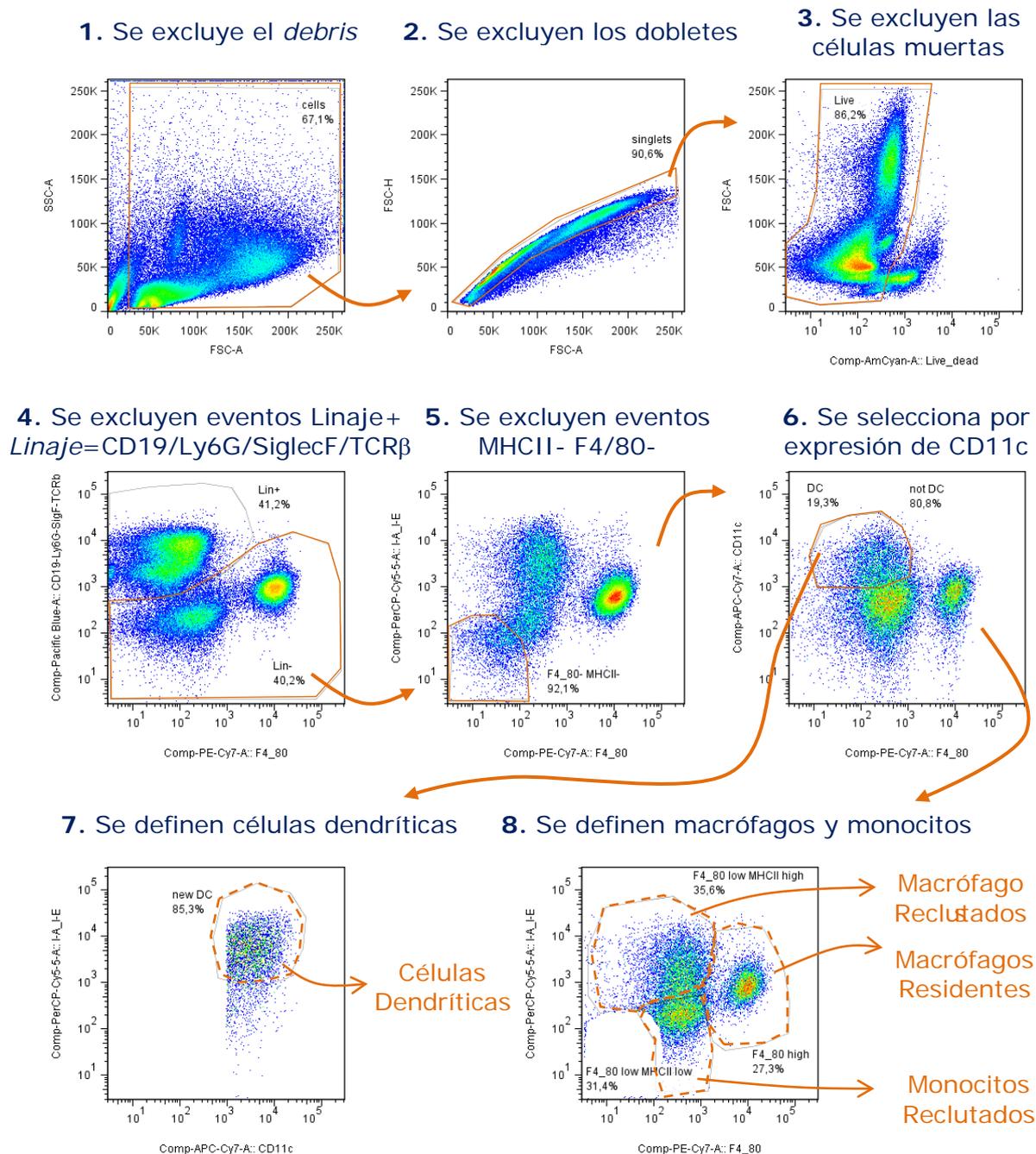


Figura 4.12 Estrategia de *gating* para experimentos *in vivo*

Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir las poblaciones celulares de interés. Se siguió la misma estrategia para células provenientes de lavados peritoneales y pleurales.

Se utilizó la misma estrategia en todos los experimentos *in vivo* de las secciones 4.5 – 4.7 y 4.11. Las poblaciones celulares estudiadas fueron células dendríticas ([CD19- TCR β - SiglecF- Ly6G-] F4/80- CD11c+ MHCII alto), macrófagos residentes ([CD19- TCR β - SiglecF- Ly6G-] F4/80 alto), macrófagos reclutados ([CD19- TCR β - SiglecF- Ly6G-] F4/80 medio MHCII alto) y monocitos reclutados ([CD19- TCR β - SiglecF- Ly6G-] F4/80 medio MHCII bajo). Esta estrategia y definición de las poblaciones está basada en [35, 36] y en datos no publicados de Stephen Jenkins (*Centre for Inflammation Research*, Universidad de Edimburgo, UK). Los parámetros evaluados fueron: número de células recuperadas (Figura 4.13), incorporación de BrdU (Figura 4.14), expresión de marcadores de activación alternativa (Figuras 4.15 y 4.16) y nivel de expresión de la molécula coestimuladora CD86 (Figura 4.17) en las cuatro poblaciones celulares mencionadas.

En primer lugar, se observó que ninguna de las preparaciones suscitó un aumento significativo en el número de células totales recuperadas en el lavado peritoneal, a excepción de la dosis más alta de pLL a las 96 horas post inyección (Figura 4.13A). Si bien la significancia estadística en este experimento piloto se ve dificultada por el bajo número de animales por grupo, esto argumenta a favor del poco potencial inflamatorio de estas dosis de pLL. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los números de poblaciones celulares específicas de interés en la cavidad peritoneal (Figura 4.13B). Por un lado, el IL-4c dio lugar a un aumento en macrófagos residentes, más fuerte a las 48 horas. Por otro lado, y como la diferencia más evidente, la presencia de pLL causó una disminución importante en el número de macrófagos residentes desde el primer tiempo estudiado, tanto en ausencia como presencia de IL-4c. Además, pLL como único estímulo causó un aumento en el número de monocitos reclutados y células dendríticas.

Se observó que a la dosis empleada de IL-4c (1 μ g rIL-4) suscitó un aumento significativo en la incorporación de BrdU en tres de las cuatro poblaciones estudiadas a las 24 horas post-inyección (células dendríticas, macrófagos residentes y monocitos reclutados). Como se esperaba, el aumento fue mayor para macrófagos residentes. Este efecto decayó rápidamente, siendo observable a las 48 horas únicamente en células dendríticas. A ese primer tiempo además se observó un claro efecto inhibitorio en la incorporación de BrdU por pLL. Dicho efecto fue significativo para las cuatro poblaciones celulares estudiadas.

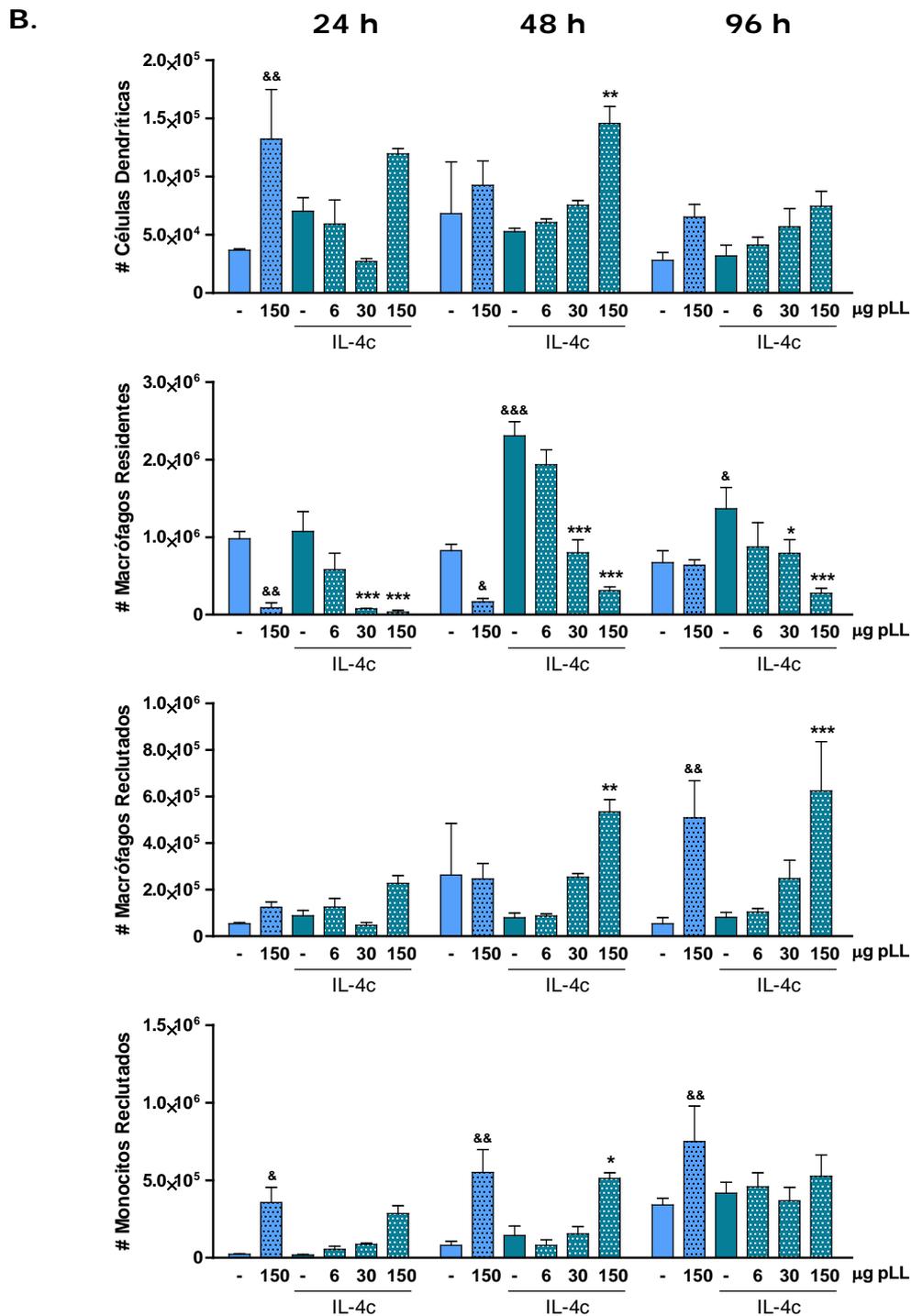
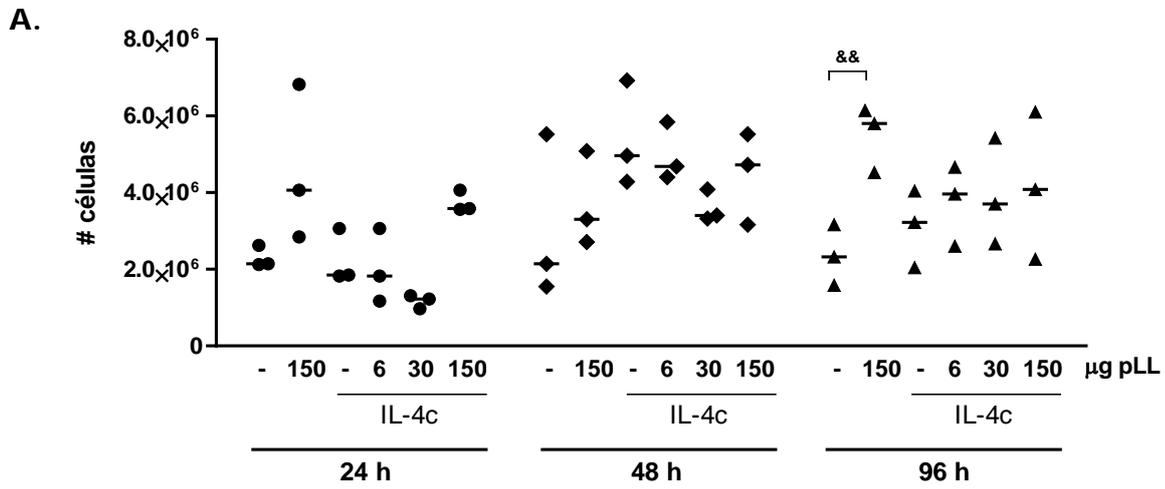


Figura 4.13
(Ver leyenda en página 50)

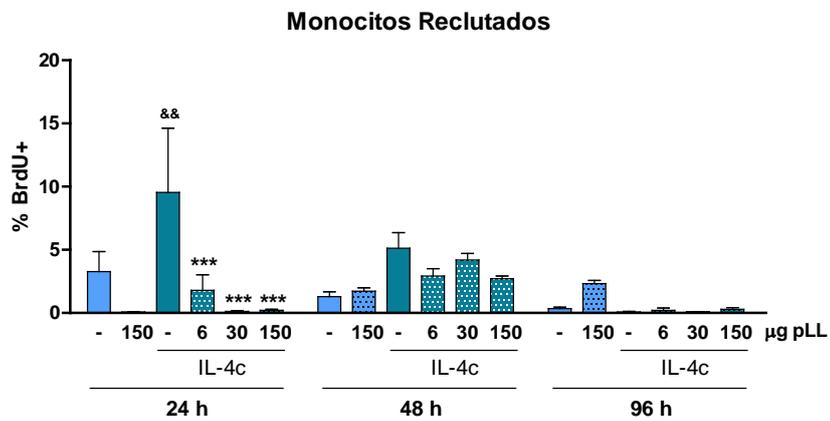
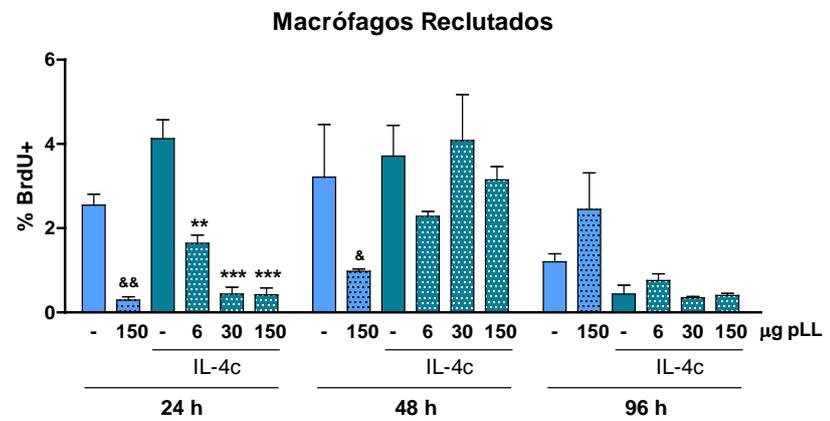
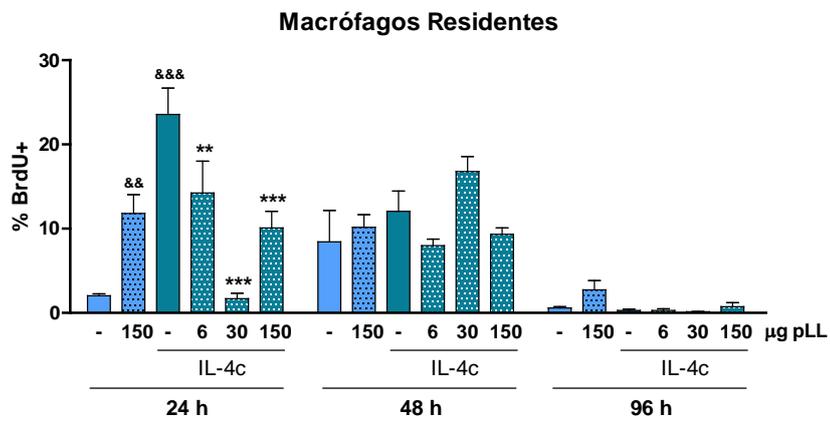
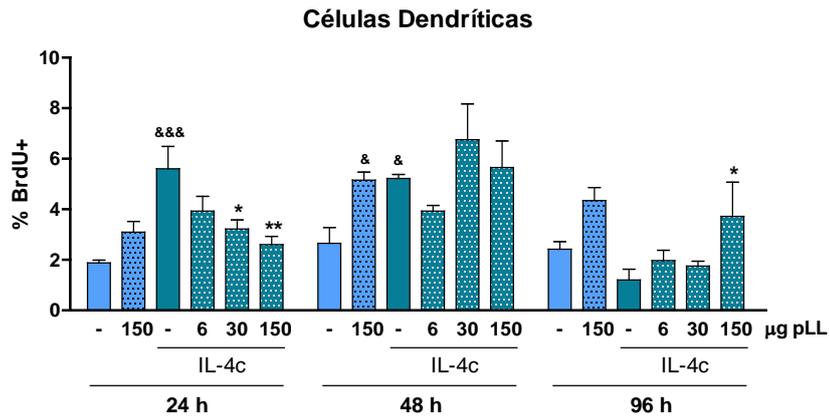


Figura 4.14
(Ver leyenda en página 50)

Figura 4.13 Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidad peritoneal en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL. Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24, 48 o 96 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra el número total de células recuperado (A) y el mismo desglosado según la población celular de interés (B). En la parte A se muestra promedio y datos de animales individuales (n=3 por grupo). En la parte B las gráficas muestran promedio + SEM del número de células de cada población. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

Figura 4.14 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL. Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24, 48 o 96 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. 3 horas previo a cada tiempo final se administró 1 mg BrdU subcutáneo a todos los animales. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de células positivas para BrdU de cada tipo celular estudiado. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

Con respecto a los marcadores de activación alternativa, se pudo apreciar un aumento en los mismos en presencia de IL-4c en todas las poblaciones estudiadas, principalmente a las 24 y 48 horas post inyección. El efecto de pLL fue distinto para los dos marcadores estudiados: tendió a inhibir la expresión de Relm α (Figura 4.15) mientras que tendió a potenciar la de Ym1 (Figura 4.16). En el caso de macrófagos residentes, la dosis más alta de pLL pareció tener un efecto de inducción de ambos marcadores *per se*, detectable a las 24 horas post inyección.

Se analizó también la expresión de la molécula coestimuladora CD86 (Figura 4.17). CD86 es una molécula coestimuladora presente en la superficie celular en condiciones basales y su nivel de expresión varía según el grado de activación de la célula. La razón detrás del interés por esta molécula es que resultados previos del grupo mostraban que pLL induce, *per se*, un aumento en la expresión de CD86 tanto en BMDC como en células dendríticas presentes en la cavidad peritoneal 24 horas post-inyección con pLL [14]. Por ello, se quiso explorar si pLL tenía el mismo efecto en las diferentes poblaciones de macrófagos, y además si el efecto se mantenía en el contexto de co-estimulación con IL-4c. Como se esperaba, la inyección de pLL causó un aumento en la expresión de CD86 en células dendríticas *in vivo*. Además, causó un efecto similar, pero más tardío, sobre macrófagos residentes y reclutados. En general los aumentos en expresión de CD86 causados por pLL fueron similares en ausencia o presencia de IL-4c.

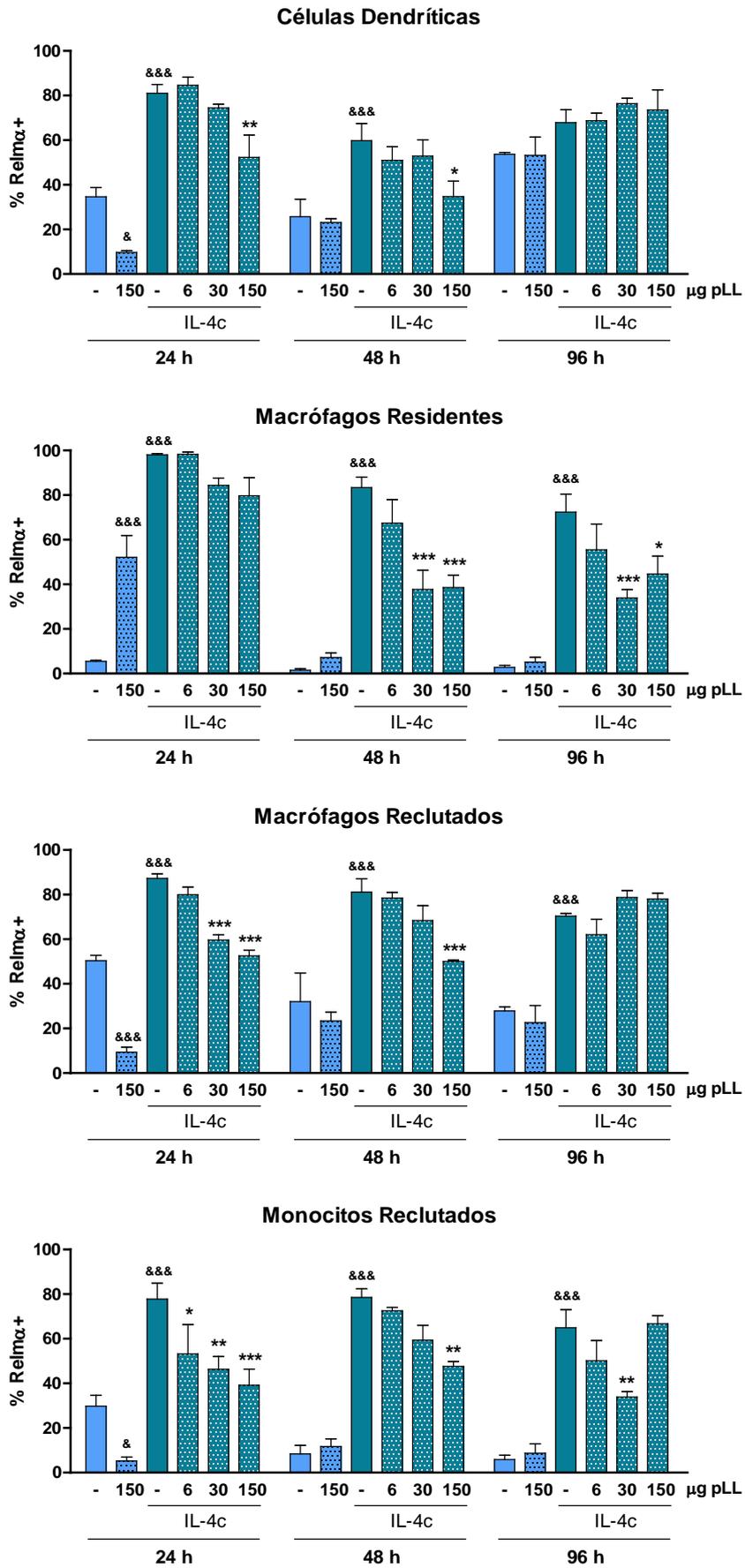


Figura 4.15
(Ver leyenda en página 54)

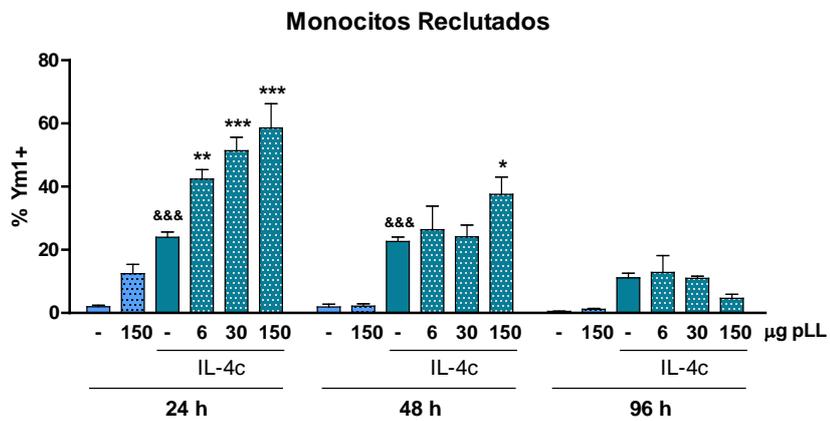
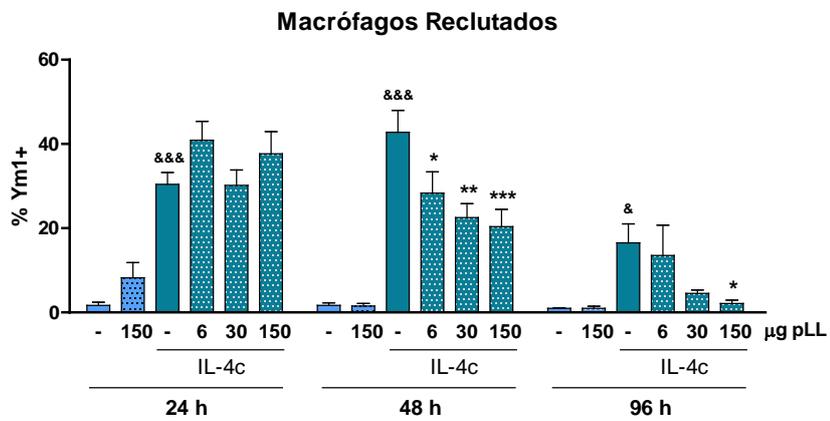
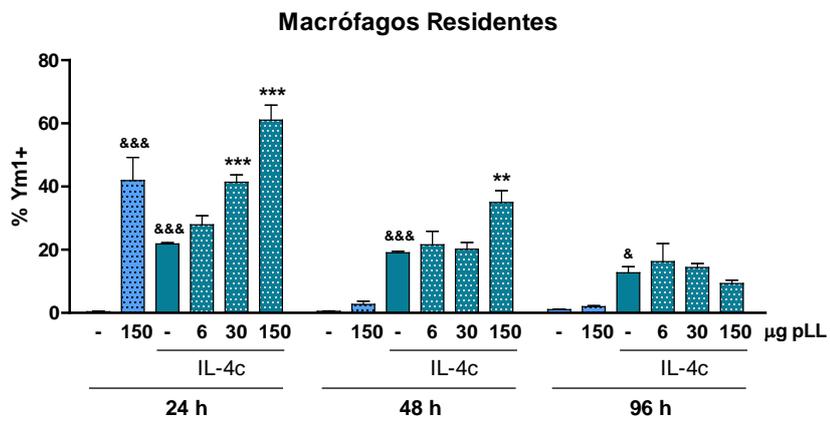
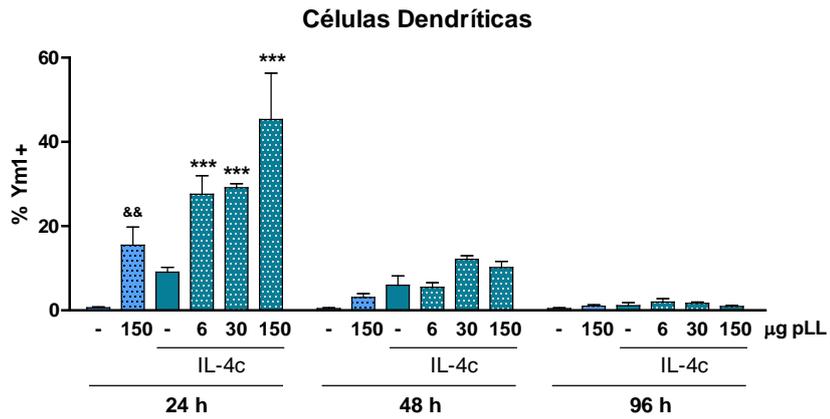


Figura 4.16
(Ver leyenda en página 54)

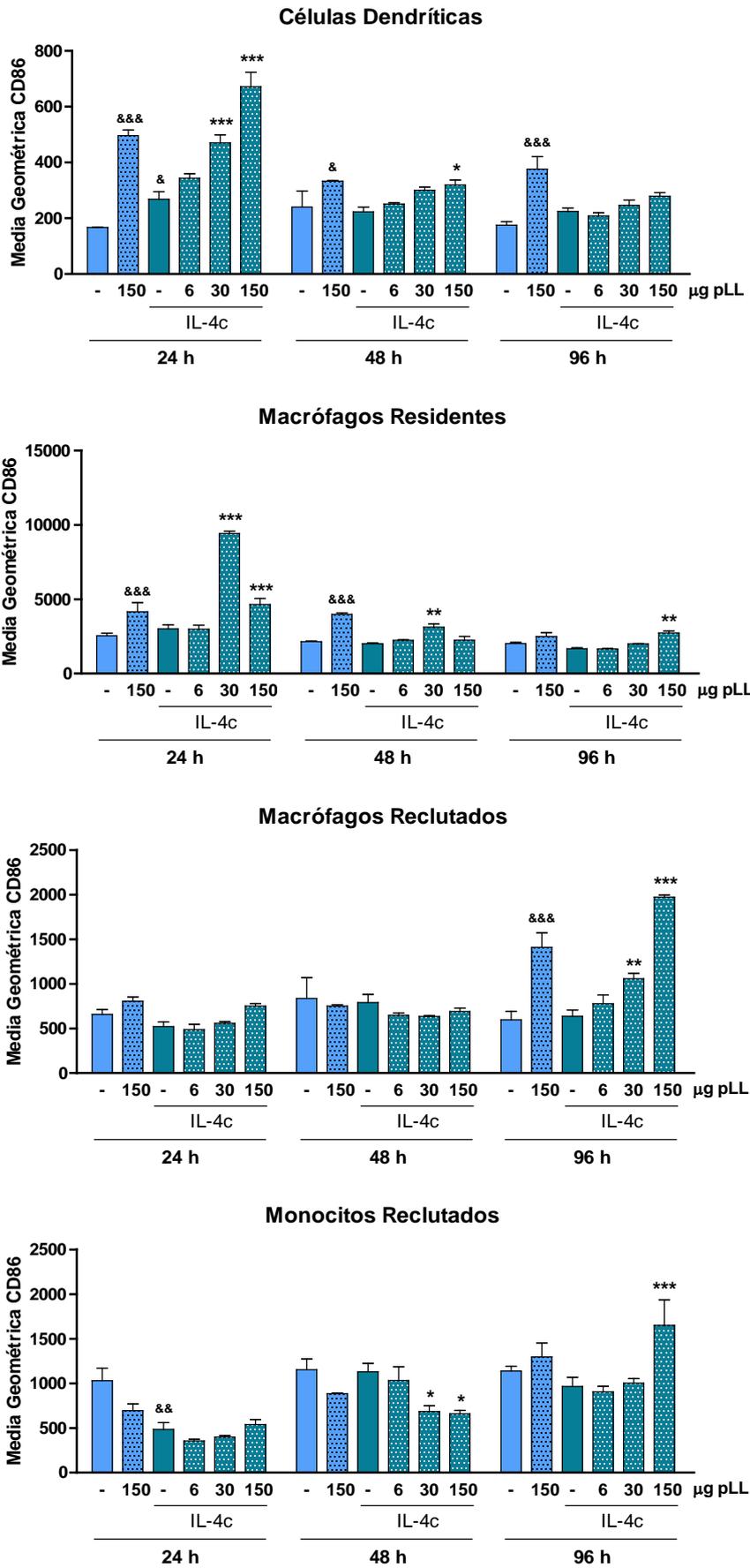


Figura 4.17
(Ver leyenda en página 54)

Figura 4.15 Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24, 48 o 96 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Relm α de cada tipo celular estudiado. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

Figura 4.16 Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24, 48 o 96 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Ym1 de cada tipo celular estudiado. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

Figura 4.17 Expresión de CD86 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24, 48 o 96 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM de la media geométrica de la expresión de CD86 en cada tipo celular estudiado. Se aplicó el test estadístico Two-Way ANOVA con post-test de Bonferroni. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

Este experimento piloto mostró que la dosis de IL-4c utilizada genera cambios en las poblaciones celulares de interés principalmente a las 24 horas post inyección. A este tiempo además, se pueden apreciar efectos significativos de pLL sobre los parámetros estudiados, principalmente a las dosis de 30 y 150 μg del material. Por ello, se decidió continuar el trabajo empleando 24 horas post inyección como tiempo final. Respecto a las dosis de pLL, se resolvió continuar con la dosis de 30 μg e incorporar una dosis de 10 μg , considerando que la dosis de 150 μg no siguió la misma tendencia que las otras en algunos parámetros (número de células dendríticas, macrófagos reclutados y monocitos reclutados recuperados 24 horas post inyección, Figura 4.13), y la dosis de 6 μg no causó efectos significativos.

Debido a que la mayoría de los efectos de pLL eran inhibitorios respecto a los inducidos por IL-4c, se quiso descartar que los mismos se debieran a un secuestro, por adsorción, de IL-4c por pLL. Para ello se realizó un segundo experimento piloto utilizando únicamente la dosis de 150 μ g de pLL, considerando que si había un efecto de secuestro, sería más evidente a esta alta dosis. Se trabajó con pLL "normal" y pLL "bloqueado", que consistió en pLL incubado con suero de ratón durante 24 horas. De esta manera, los sitios dentro de la preparación con potencial para secuestrar a la IL-4 estarían ya ocupados por proteínas del suero. Se tuvo la precaución de incubar pLL con una dilución de suero de ratón cuya concentración proteica fuese 10 veces mayor a la concentración proteica en el complejo de IL-4 utilizado en estos experimentos.

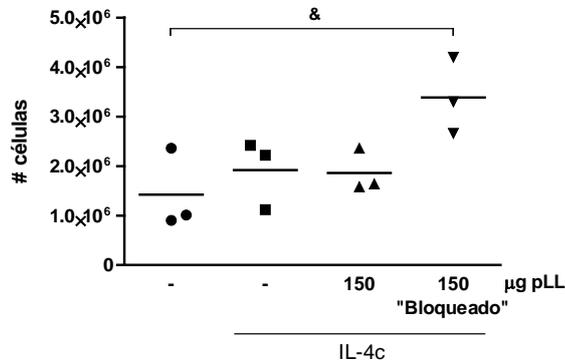
Se recuperaron las células por lavado peritoneal 24 horas post inyección y se analizó el número de células recuperadas (Figura 4.18), el nivel de expresión del marcador de proliferación Ki67 (Figura 4.19), de los marcadores de activación alternativa Relm α y Ym1 (Figuras 4.20 y 4.21) y también de la molécula coestimuladora CD86 (Figura 4.22). El marcador Ki67 es una proteína nuclear presente en todas las fases celulares excepto en G0, que alcanza su máxima expresión durante mitosis, por lo que se la asocia con proliferación [66].

Los números de células recuperadas en el lavado peritoneal no presentaron diferencias significativas con los obtenidos en el experimento anterior. Sin embargo, el tratamiento con pLL "bloqueado" en combinación con IL-4c dio lugar a un aumento significativo en el número de células totales recuperadas respecto al grupo control, no observado para pLL sin tratar (Figura 4.18A). Este aumento se vio reflejado en el número de células dendríticas, macrófagos reclutados y monocitos reclutados presentes en la cavidad, pero no en el número de macrófagos residentes (Figura 4.18B), sugiriendo que se debe a un influjo de células a la cavidad y no a proliferación local.

En este experimento se realizó también un pulso de 3 horas con BrdU inmediatamente previo al tiempo final. Lamentablemente se tuvo problemas técnicos con la tinción para BrdU, por lo que no se pudieron obtener valores confiables para este parámetro. Como alternativa, se estudió la expresión de Ki67 como marcador de células proliferantes. En macrófagos reclutados y monocitos, la expresión de Ki67 es muy alta, ya que provienen de precursores altamente proliferantes. Por esta razón, los valores de Ki67 son útiles principalmente para la población de macrófagos residentes, en los que la IL-4c causa un aumento en su nivel de expresión [36]. Para esta población entonces, la inyección de pLL generó una inhibición en la expresión de Ki67, si bien dicha

inhibición alcanzó significancia solo para el caso de pLL "bloqueado" (Figura 4.19).

A.



B.

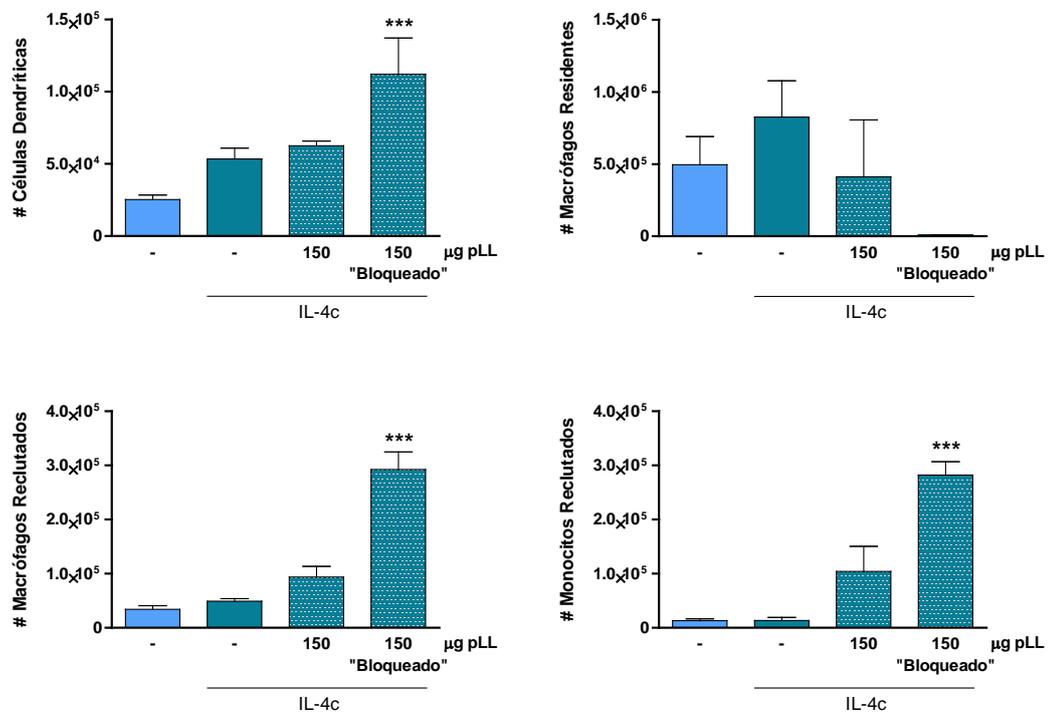


Figura 4.18 Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidad peritoneal en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra el número total de células recuperado (A) y el mismo desglosado según la población celular de interés (B). En la parte A se muestra promedio y datos de animales individuales (n=3 por grupo). En la parte B las gráficas muestran promedio + SEM del número de células de cada población. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

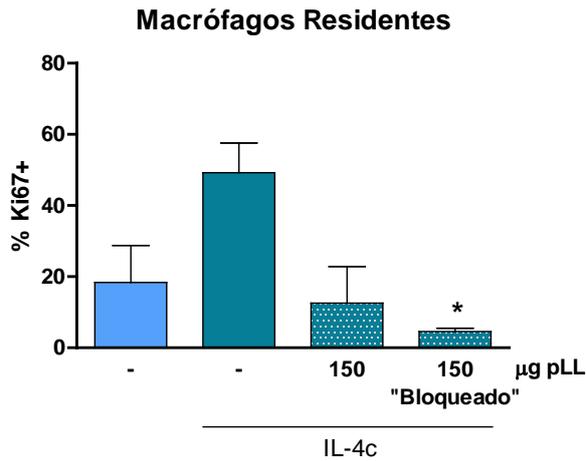


Figura 4.19 Expresión de Ki67 en macrófagos residentes en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra el promedio + SEM de macrófagos residentes positivos para Ki67. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. * indica una diferencia con el grupo IL-4c, con grado de significancia $p < 0,05$.

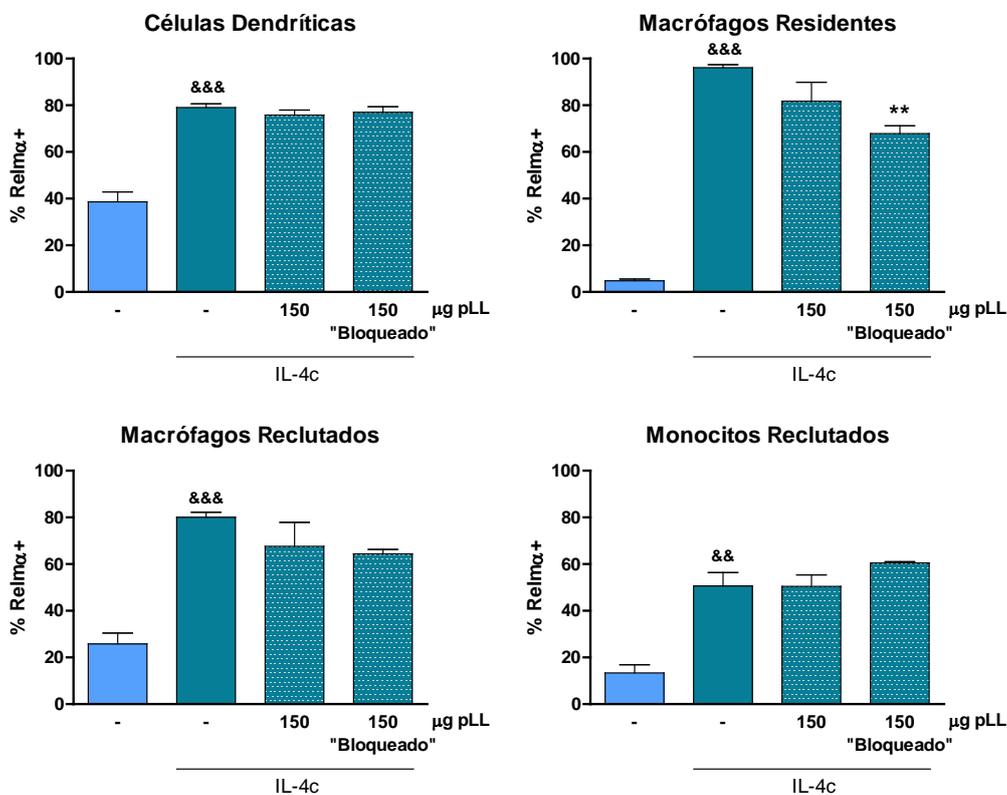


Figura 4.20 Expresión de Relmα en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Relmα. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,01$ o $p < 0,001$ para número creciente de símbolos.

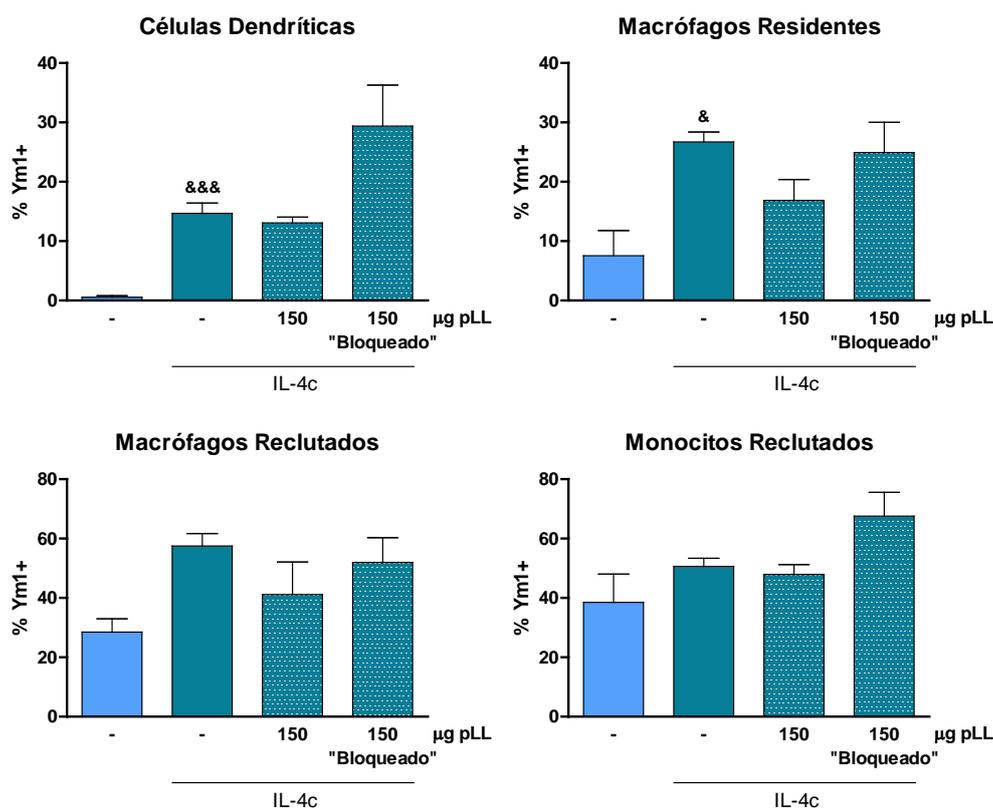


Figura 4.21 Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Ym1 en cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. & indica una diferencia con el grupo control, con grado de significancia $p < 0,05$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos.

En lo que respecta a la expresión de marcadores de activación alternativa, la inyección de IL-4c indujo un aumento significativo en la expresión de $Relm\alpha$ en las cuatro poblaciones estudiadas, pero logró aumentar la expresión de Ym1 de forma significativa únicamente en células dendríticas y macrófagos residentes (Figuras 4.20 y 4.21). A diferencia de lo ocurrido en el experimento anterior, no se observaron efectos significativos de pLL sobre estos parámetros para ninguna de las poblaciones celulares de interés. Lo mismo ocurrió con pLL "bloqueado" excepto para la expresión de $Relm\alpha$ en macrófagos residentes, donde hubo una inhibición significativa.

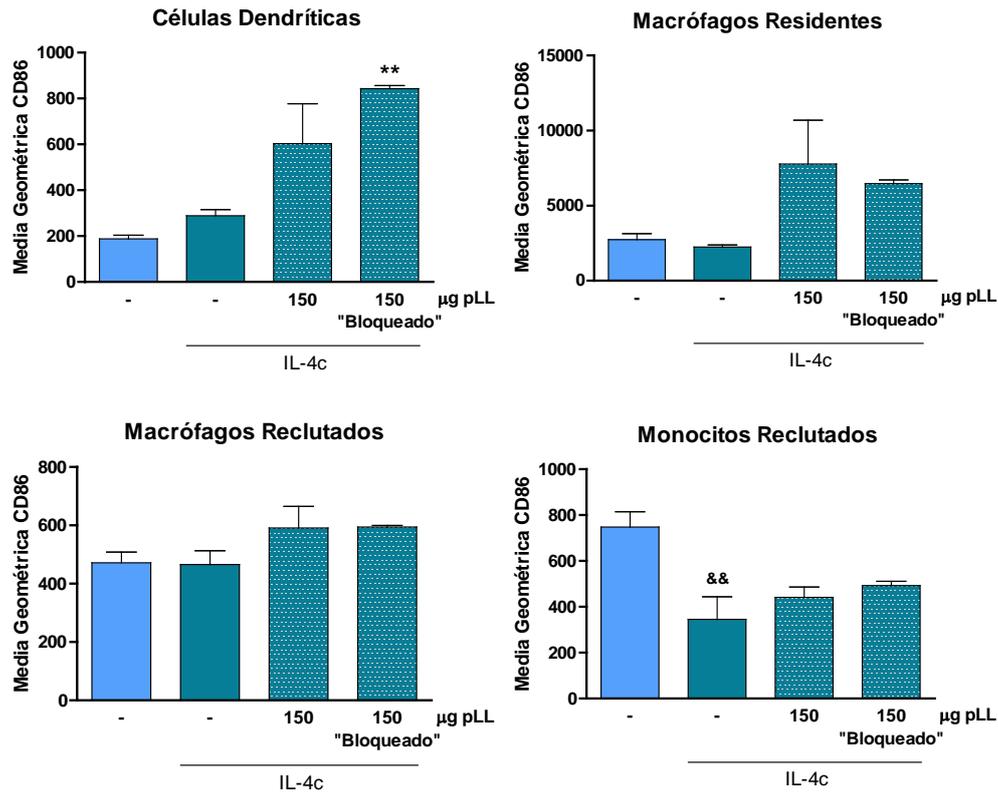


Figura 4.22 Expresión de CD86 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM de la media geométrica en CD86 para cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,01$.

En este experimento se estudió también la expresión de la molécula coestimuladora CD86 (Figura 4.22). Se observaron niveles y efectos en los niveles similares a los obtenidos en el experimento anterior para la misma dosis de pLL. Nuevamente, la administración de pLL causó un aumento en el nivel de expresión de CD86 (a las 24 horas) particularmente en células dendríticas, de entre las poblaciones estudiadas. Este aumento alcanzó significancia para pLL "bloqueado", pero no para pLL sin tratar.

Se analizaron además los niveles de Relm α y Ym1 solubles en los lavados peritoneales (Figura 4.23). Como se espera, la administración de IL-4c dio lugar a aumentos en los niveles de ambas proteínas. Se observó que pLL, sin tratar o "bloqueado", no tuvo efecto sobre la cantidad de Relm α presente en el lavado peritoneal. En el caso de Ym1, ambas preparaciones llevaron a una potenciación del inducido por IL-4c, aunque ésta solo fue significativa para pLL "bloqueado".

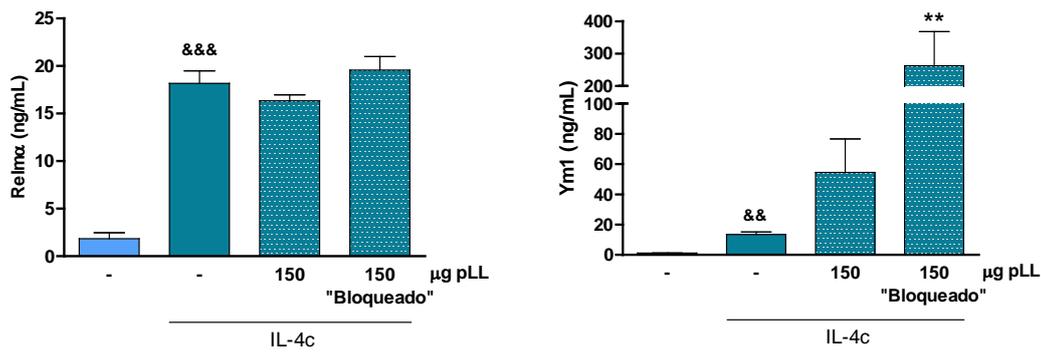


Figura 4.23 Niveles de Relm α y Ym1 en el lavado peritoneal en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o con pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra promedio + SEM del nivel de Relm α o Ym1 en el lavado peritoneal. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia 0,05 o 0,001 según número creciente de símbolos.

Asimismo, sobre aproximadamente 1×10^6 de células de cada tratamiento se analizó la expresión de algunos marcadores de activación alternativa mediante PCR cuantitativa (Figura 4.24).

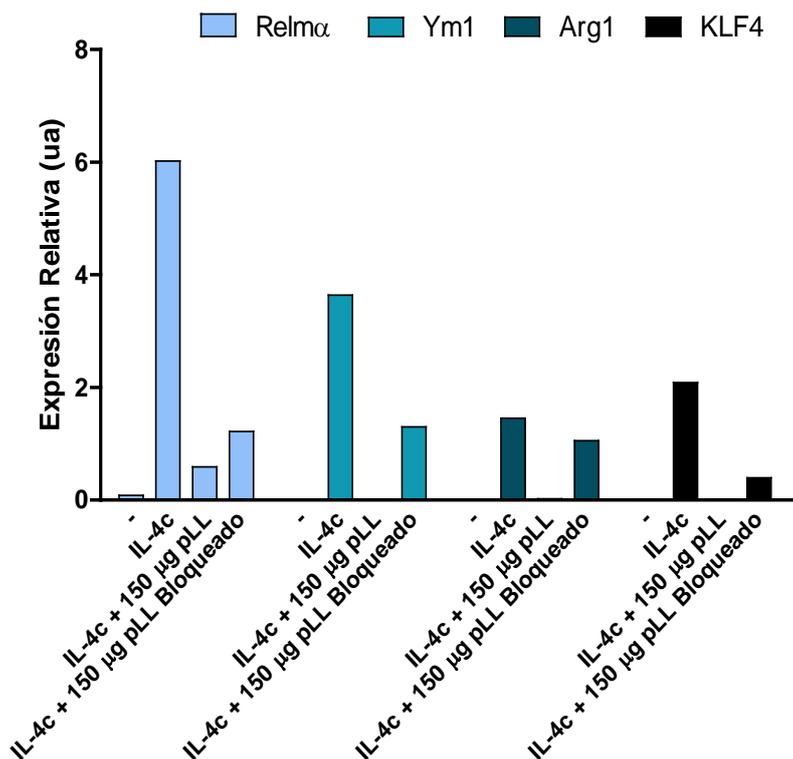


Figura 4.24 Expresión de marcadores de activación alternativa a nivel de ARNm en células peritoneales en ensayo con pLL "bloqueado"

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con pLL o con pLL previamente incubado con suero normal murino ("pLL Bloqueado"). 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se evaluó la expresión de marcadores de activación alternativa sobre un *pool* de células provenientes de varios ratones correspondientes a cada tratamiento. Se muestra la expresión de ARNm para Relm α , Ym1, Arg1 y KLF4, relativa a la expresión del ARN ribosomal 18S.

Se debe tener presente que estos datos provienen de un *pool* de células de varios ratones de cada grupo, sin una purificación de un tipo celular específico previa. A pesar de ello, pudo verse claramente que la expresión de Relm α , Ym1 y KLF4 (factor de transcripción inducido por IL-4 [67]) fue inducida por IL-4c, e inhibida en presencia de pLL o pLL “bloqueado”. En cuanto a la expresión de arginasa 1, el efecto inhibitorio de pLL “bloqueado” fue menor o nulo.

En suma, si bien los efectos de pLL y pLL “bloqueado” no fueron idénticos en magnitud en todos los parámetros estudiados, ambos siguen la misma tendencia. De hecho, los datos obtenidos para el grupo de IL-4c en combinación con pLL “bloqueado” no difirieron significativamente de los provenientes del grupo con pLL “normal” en ninguno de los parámetros estudiados, excepto en el número de macrófagos reclutados y monocitos presentes en la cavidad peritoneal 24 horas post inyección, que fueron mayores para pLL “bloqueado”. Centralmente para el objetivo inicial del ensayo, los efectos inhibitorios sobre la acción de IL-4c (en parámetros de proliferación y expresión de Relm α) tendieron a ser más fuertes para pLL “bloqueado” que para pLL sin tratar. Esto descarta la posibilidad de una acción por secuestro de IL-4c. Por ello, para los experimentos posteriores se continuó utilizando pLL sin tratar.

A continuación se realizaron experimentos utilizando las dos dosis de pLL antes mencionadas como elegidas (30 y 10 μ g) en combinación con IL-4c, analizando las células recuperadas 24 horas post inyección. En este caso se trabajó con 5 ratones por grupo. Además, se quiso determinar si los efectos de pLL observados tienen un carácter sistémico o localizado. Para ello, se aprovechó la capacidad de la IL-4c de actuar sobre células distales a su punto de inyección, gracias a su pequeño tamaño [35]. Las partículas de pLL, en cambio, serían demasiado grandes para escapar de la cavidad peritoneal. Se trabajó bajo la hipótesis de que si los efectos observados dependen del contacto directo con pLL, las células de la cavidad pleural presentarían los efectos inducidos por IL-4c pero no por pLL. Por ello, se analizaron células provenientes de lavado peritoneal y pleural. Nuevamente se estudió el número de células recuperadas (Figura 4.25), la incorporación de BrdU (Figura 4.26) y la expresión de marcadores de activación alternativa (Figuras 4.27 y 4.28) en las cuatro poblaciones celulares de interés. Es importante remarcar que este ensayo se realizó dos veces de forma idéntica, obteniéndose los mismos resultados en ambas oportunidades. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a una de estas repeticiones.

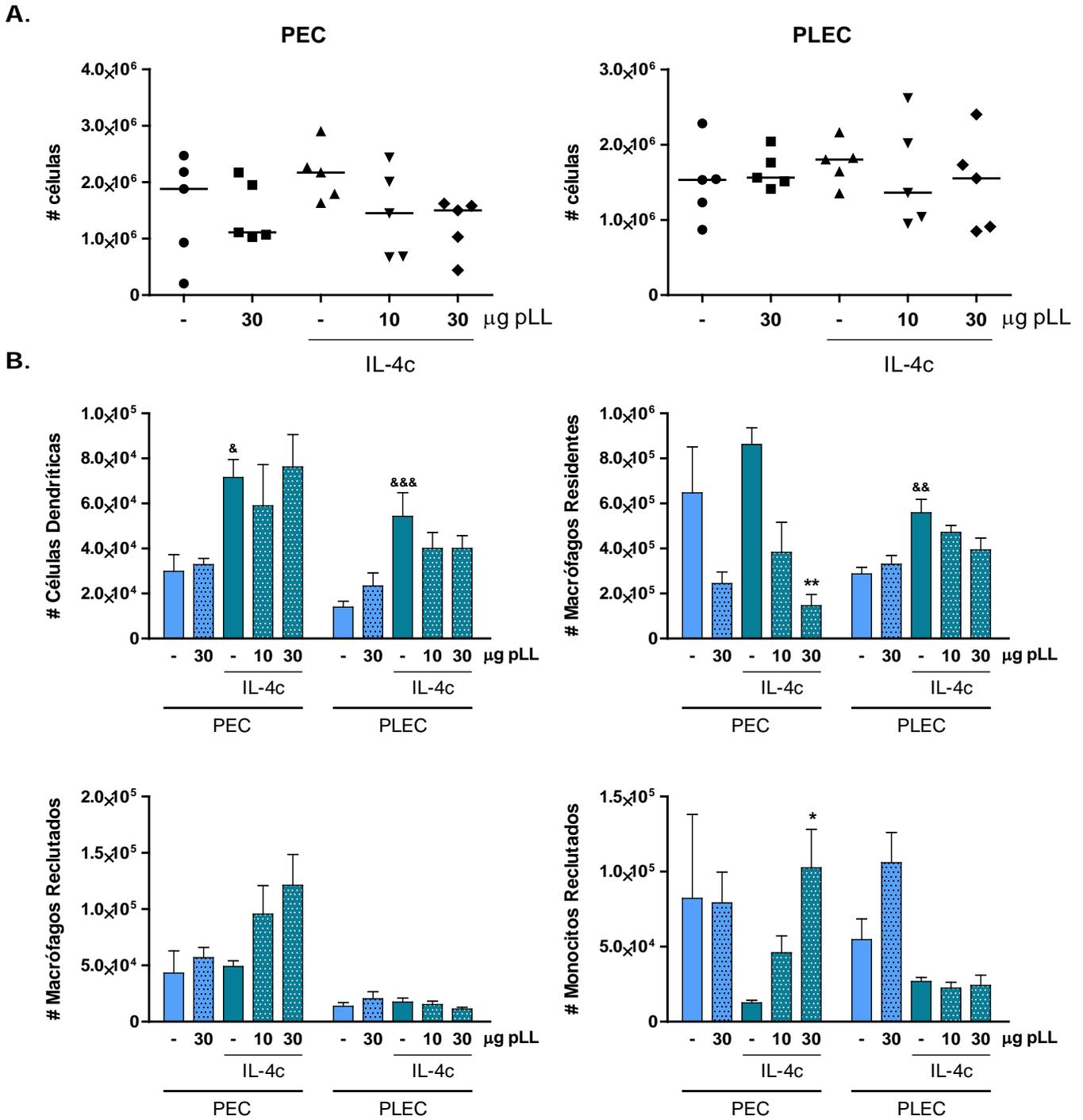


Figura 4.25 Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas en cavidades peritoneal y pleural en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC). Se muestra el número total de células recuperadas de cada cavidad (A) y el mismo desglosado según las poblaciones celulares de interés (B). En la parte A se muestra promedio y datos de animales individuales (n=5 por grupo). En la parte B las gráficas muestran promedio + SEM del número de células de cada población. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Se observó que el número total de células recuperadas no varió significativamente entre los distintos grupos experimentales, tanto para células peritoneales como pleurales. Sin embargo, los números absolutos de las distintas poblaciones de interés dentro de las células peritoneales sí mostraron cambios. En particular, la dosis de 30 μg de pLL causó una fuerte disminución en número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal, pero no en la cavidad pleural (Figura 4.25).

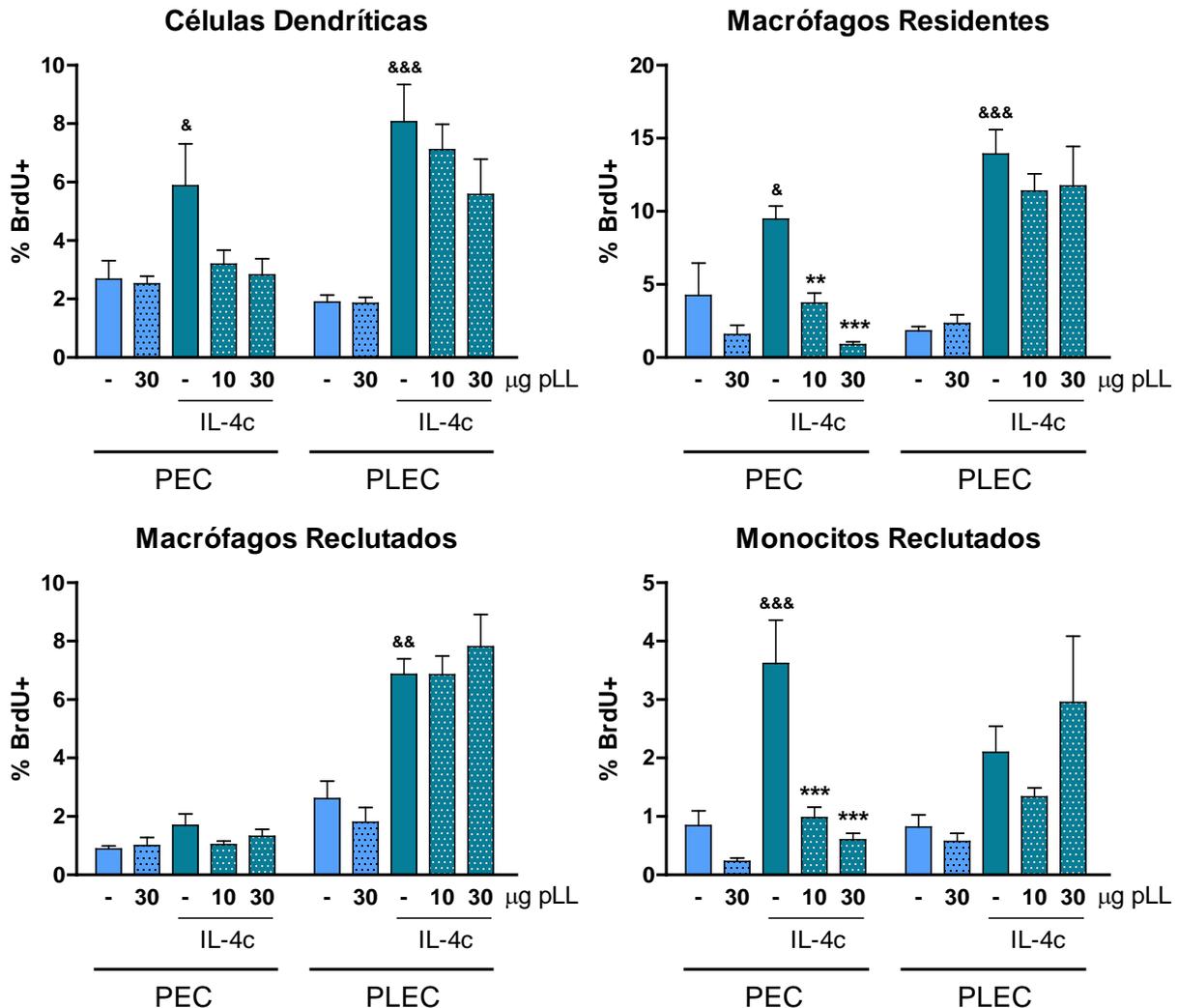


Figura 4.26 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC), habiendo inyectado 1 mg BrdU a cada animal 3 horas previo al tiempo final. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de células positivas para BrdU en PEC y PLEC, para cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

En cuanto a la incorporación de BrdU, el IL-4c indujo un claro aumento en el %BrdU+ en tres de las poblaciones estudiadas (células dendríticas, macrófagos residentes y monocitos reclutados). En el caso de los macrófagos reclutados, este aumento se pudo ver sólo en uno de los dos experimentos realizados. En aquellas poblaciones celulares donde se vio un efecto de la IL-4c, se vio asimismo una inhibición en respuesta a la co-inyección de pLL, para el caso de las células peritoneales. Esta inhibición fue además dependiente de la dosis. En el caso de las células pleurales, existió un claro efecto de la IL-4c y ningún efecto significativo de pLL (Figura 4.26).

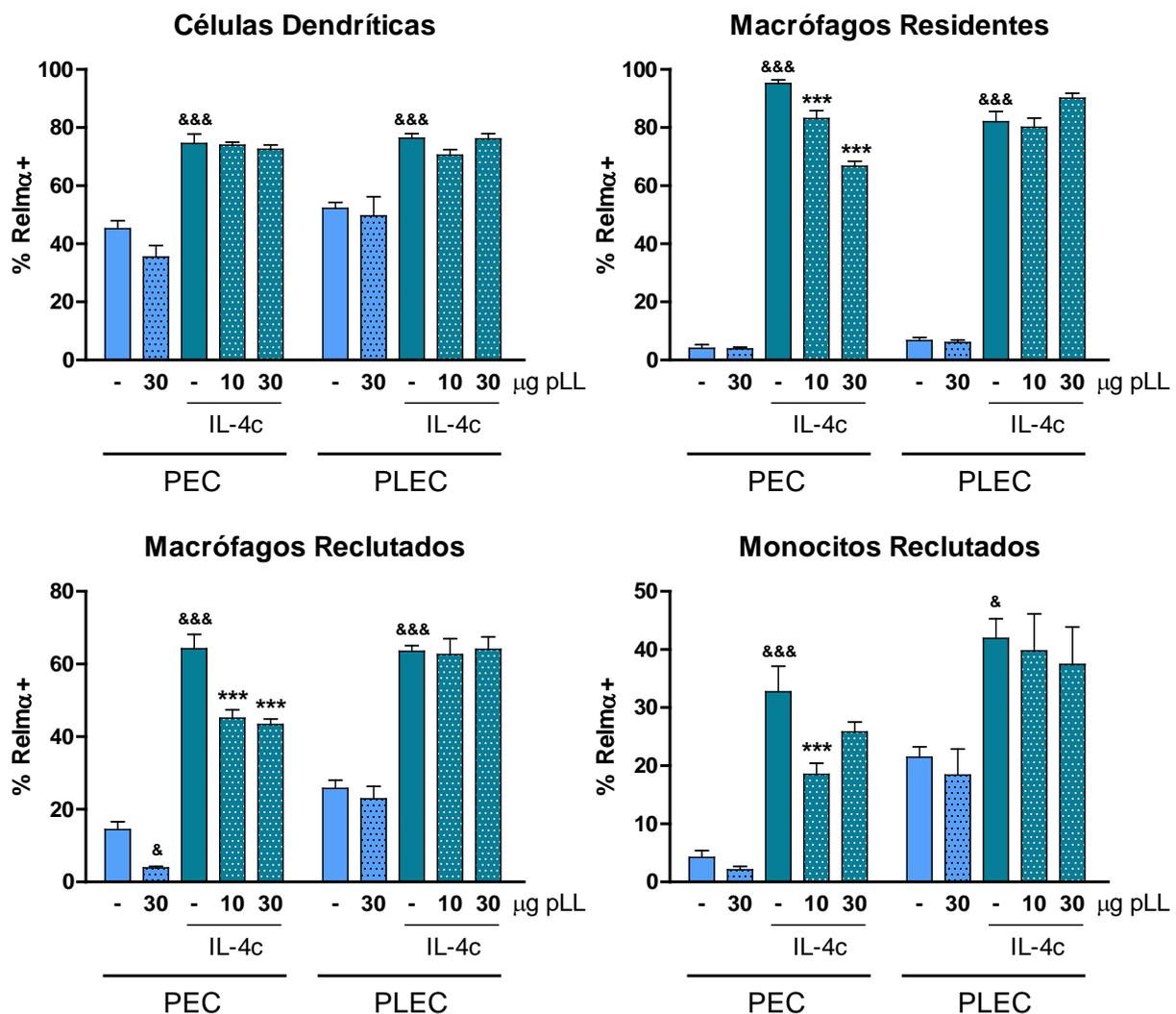


Figura 4.27 Expresión de Relmα en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC). Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Relmα en PEC y PLEC, para cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia p < 0,05, p < 0,01 o p < 0,001 según número creciente de símbolos.

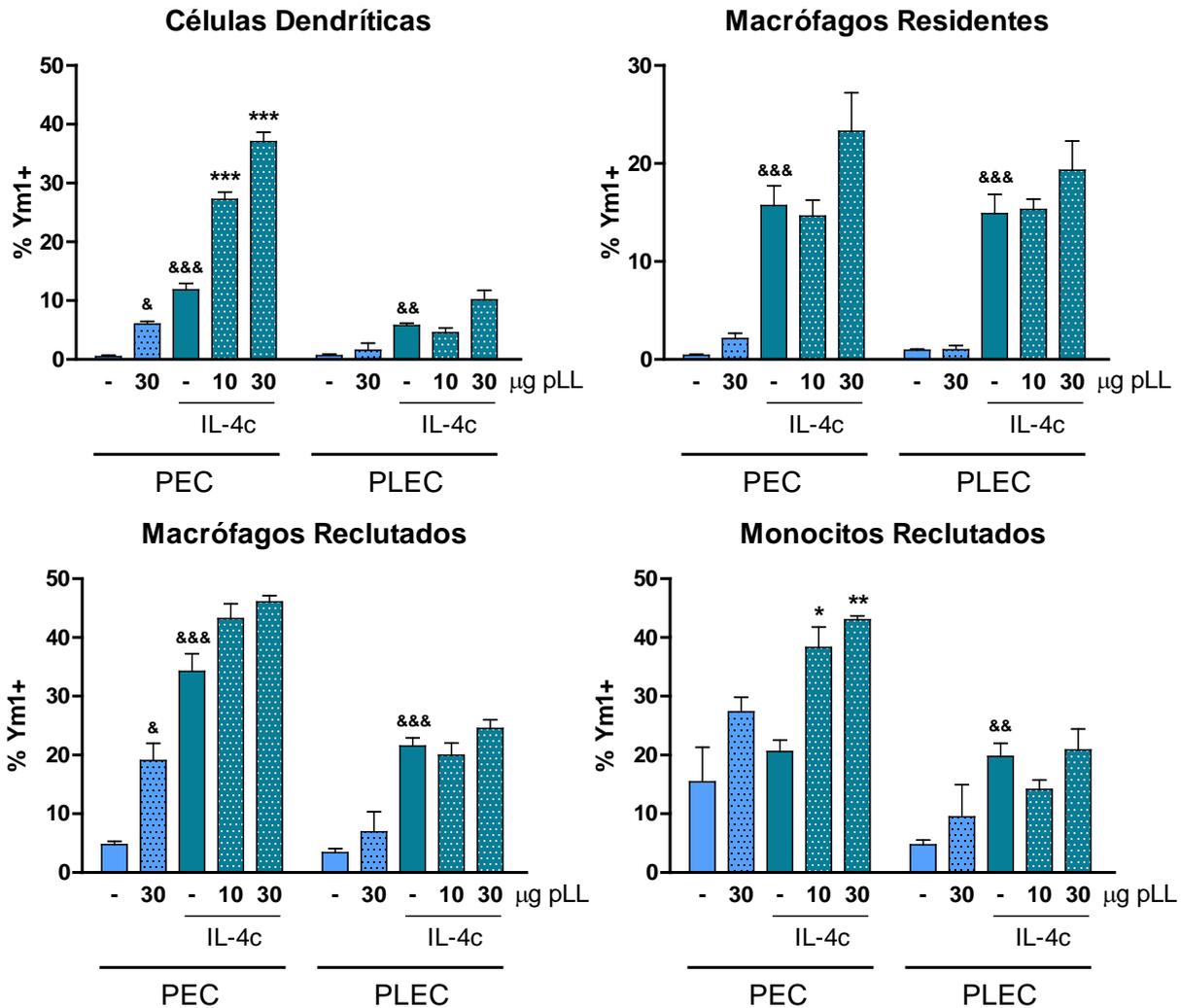


Figura 4.28 Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC). Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de células positivas para Ym1 en PEC y PLEC, para cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

La expresión de marcadores de activación alternativa aumentó significativamente en todas las poblaciones estudiadas en presencia de IL-4c, tanto en células peritoneales como pleurales. La inyección de pLL dio lugar a una inhibición significativa en la expresión de Relm α en macrófagos residentes y reclutados, así como también una potenciación de la expresión de Ym1 en

células dendríticas. Nuevamente, todos los efectos de pLL se restringieron a células peritoneales (Figuras 4.27 y 4.28).

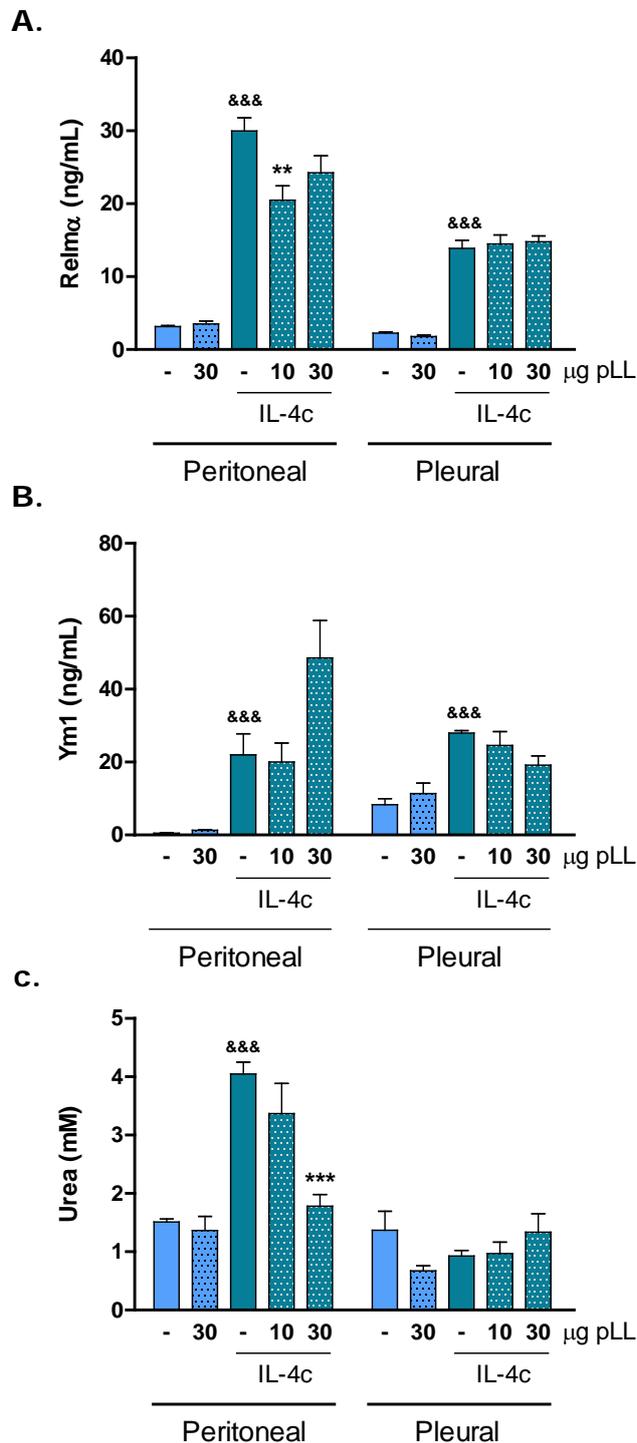


Figura 4.29 Niveles de Relm α , Ym1 y actividad arginasa en lavados peritoneales y pleurales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c en combinación con distintas dosis de pLL. 24 horas post inyección se realizó un lavado peritoneal y pleural. Las gráficas muestran promedio + SEM del nivel de Relm α (A), Ym1 (B) o Urea (C) en los lavados. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Se analizaron además los niveles de Relm α y Ym1 en los lavados peritoneales y pleurales (Figura 4.29). Se observó que los niveles de Relm α fueron inhibidos en

presencia de pLL y los de Ym1 potenciados en dichas condiciones, en el lavado peritoneal. No se observaron efectos significativos de pLL en el lavado pleural.

Sobre el lavado peritoneal y pleural se realizaron también ensayos de actividad arginasa (Figura 4.29). Se pudo detectar aumento de actividad arginasa inducido por IL-4c en el lavado peritoneal, el cual fue inhibido en presencia de pLL. No se observaron efectos en el lavado pleural. Además se realizó un ensayo de Griess para determinar nitritos en las muestras, y ensayos de ELISA para la detección de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12p40, TNF α e IL-6, no detectándose ninguno de ellos en las muestras (datos no mostrados).

En suma, se verificaron los resultados de los experimentos piloto de que la inyección de pLL (i) inhibe la proliferación inducida por IL-4c, en particular en macrófagos residentes y (ii) tiende a inhibir la inducción de Relm α causada por IL-4c mientras que tiende a potenciar la inducción de Ym1. Además, se observó que pLL no tuvo ningún efecto sobre las células de la cavidad pleural en ninguno de los parámetros estudiados. Esto argumenta a favor de que los efectos observados sobre células en la cavidad peritoneal sean dependientes de contacto con el material parasitario y/o mediados por señales locales.

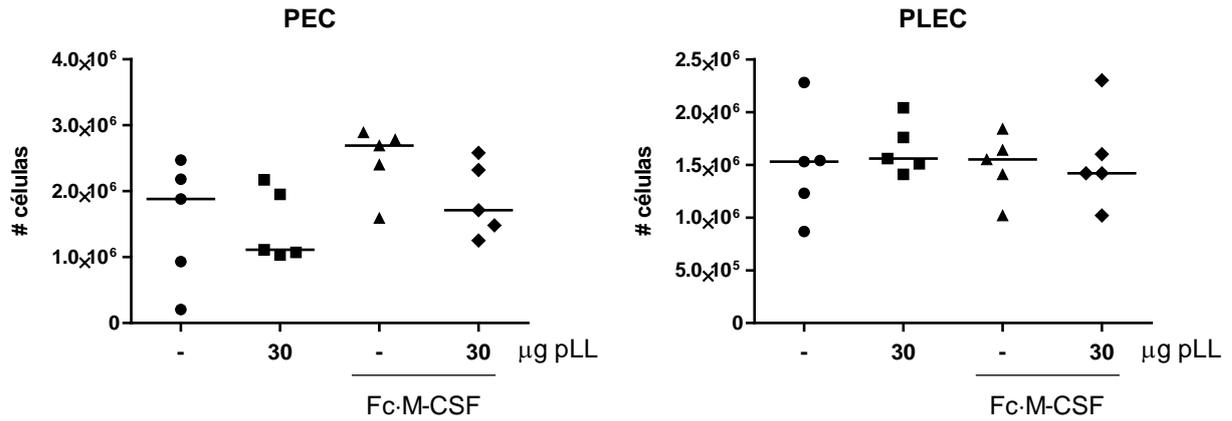
4.6 Evaluación *in vivo* de los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a M-CSF

Similar a lo que se realizó *in vitro*, se quiso comprobar si la inhibición de la proliferación observada era específica para IL-4c o se extendía a factores de crecimiento. Por ello, dentro del experimento expuesto previamente se incluyeron grupos con M-CSF, en presencia o ausencia de 30 μ g pLL. De forma similar a IL-4c, se empleó M-CSF fusionado a la porción Fc de un anticuerpo para lograr una actividad biológica sostenida, Fc-M-CSF [63]. El tamaño molecular de esta construcción también le permite traspasar la barrera peritoneal y tener efectos proliferativos sobre células distantes [36].

Se evaluó el número de células recuperadas en el lavado peritoneal y pleural (Figura 4.30) y la incorporación de BrdU en las cuatro poblaciones de interés (Figura 4.31).

Al igual que lo sucedido con IL-4c, el número total de células recuperadas en los lavados peritoneal o pleural no varió significativamente entre las distintas condiciones experimentales. Sin embargo, el número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal disminuyó significativamente en presencia de pLL (Figura 4.30).

A.



B.

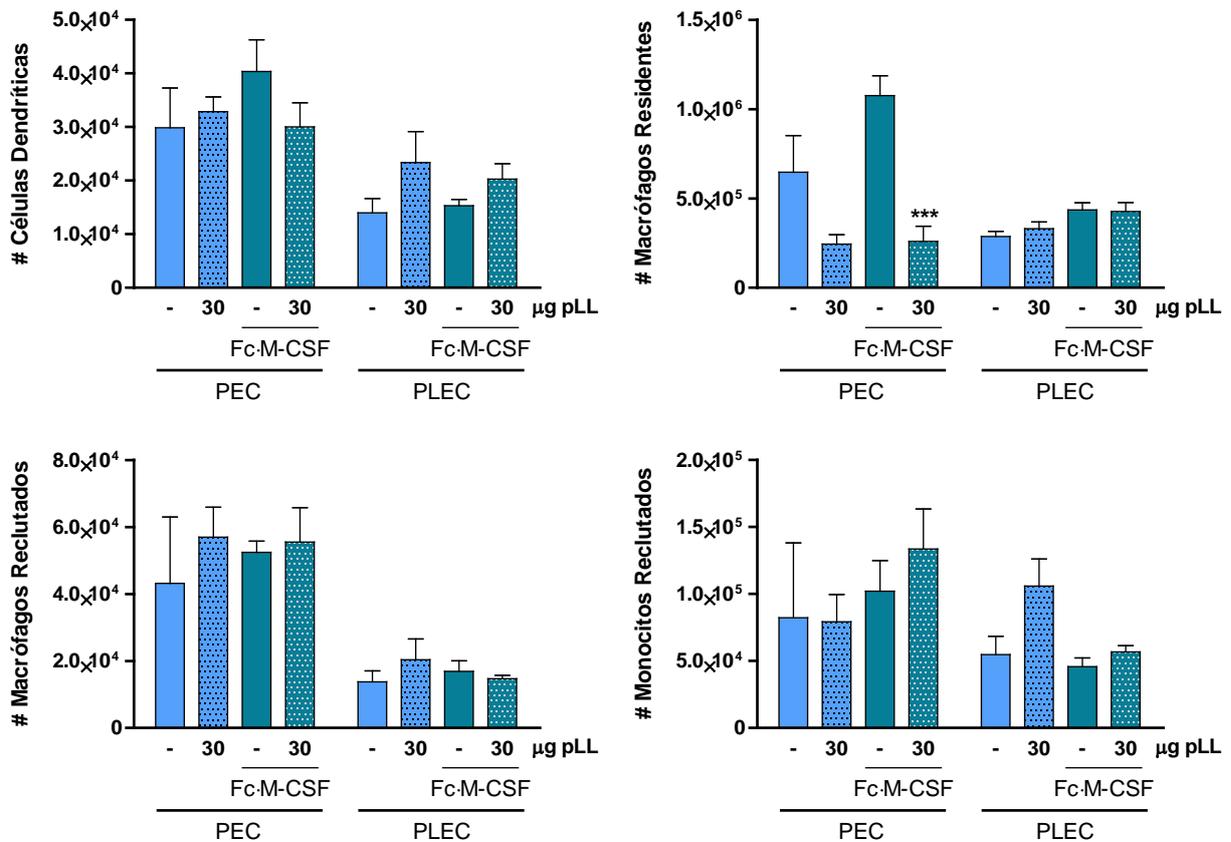


Figura 4.30 Números de macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo *in vivo* luego de inyección de Fc·M-CSF en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con Fc·M-CSF en combinación con 30 µg de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC). Se muestra el número total de células recuperadas de cada cavidad (A) y el mismo desglosado según la población celular de interés (B). En la parte A se muestran promedios y datos de animales individuales (n=5 por grupo). En la parte B las gráficas muestran promedio + SEM del número de células de cada población. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *** indica una diferencia con el grupo estimulado con Fc·M-CSF, con grado de significancia $p < 0,001$. Los datos para las condiciones control y pLL como único estímulo son los mismos a los mostrados en Figura 4.25. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

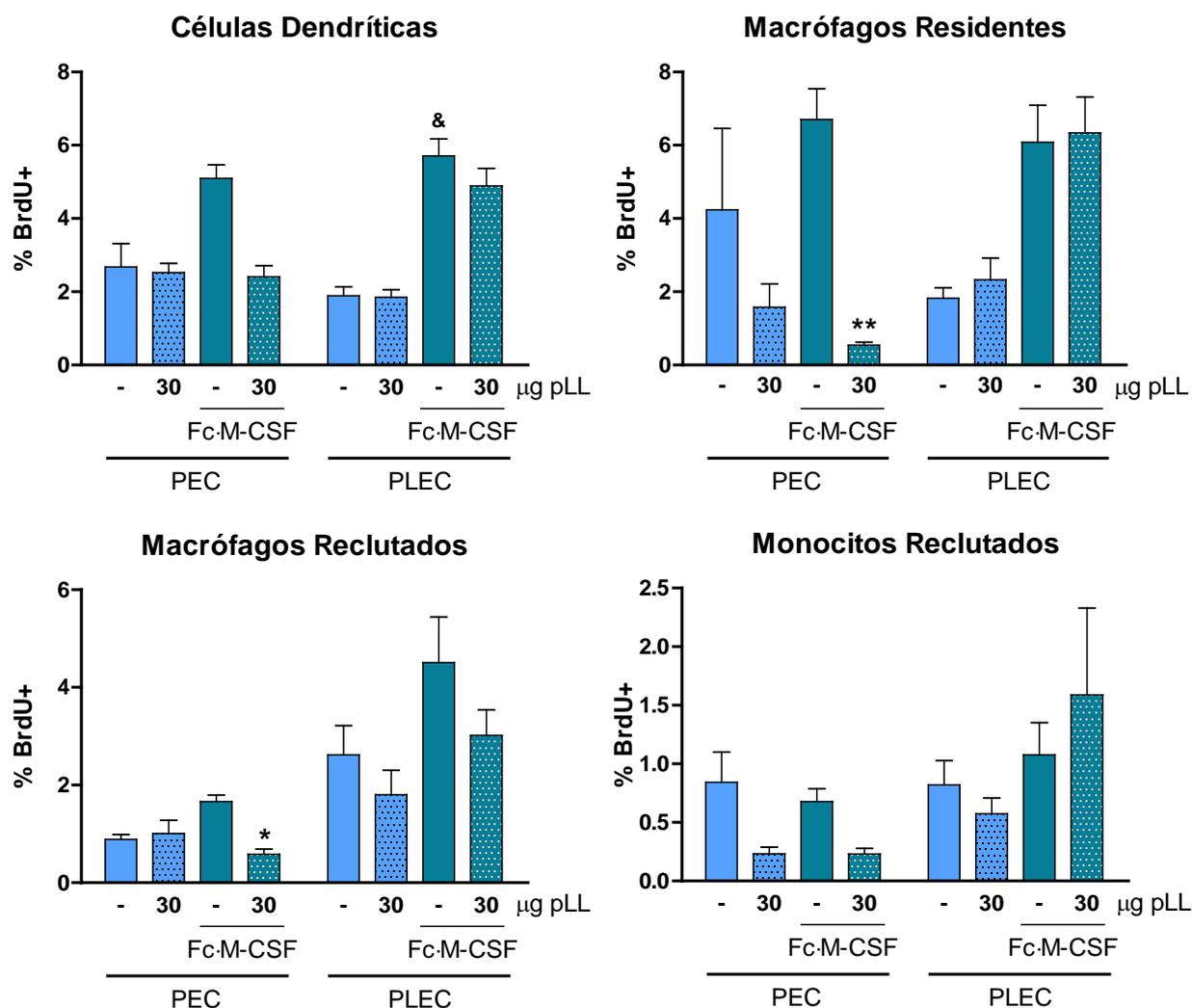


Figura 4.31 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales y pleurales en ensayo *in vivo* luego de inyección de Fc·M-CSF en presencia o ausencia de pLL

Se inyectaron ratones C57BL/6 con Fc·M-CSF en combinación con 30 µg de pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal (PEC) o pleural (PLEC), habiendo inyectado 1 mg BrdU a cada animal 3 horas previo al tiempo final. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de células positivas para BrdU en PEC y PLEC, para cada población celular de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o Fc·M-CSF, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$ o $p < 0,01$ según número creciente de símbolos. Los datos para las condiciones control y pLL como único estímulo son los mismos a los mostrados en Figura 26. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Respecto a la incorporación de BrdU, los porcentajes de células que incorporaron la marca fueron menores a los alcanzados con IL-4c. De todas maneras, pudo apreciarse una inhibición en este parámetro en presencia de pLL para

macrófagos residentes y reclutados. En las otras poblaciones las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Nuevamente, los efectos de pLL estuvieron restringidos a células de la cavidad peritoneal (Figura 4.31).

En suma, los efectos observados en cuanto a inhibición de la proliferación y disminución de número de los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal no son exclusivos a la estimulación por IL-4c sino que también se observaron al utilizar Fc·M-CSF como estímulo. También cabe señalar que la inyección de pLL en ausencia de IL-4c o Fc·M-CSF dio lugar a una tendencia a niveles de %BrdU+ inferiores a los basales en macrófagos residentes. Puesto que la proliferación homeostática de estas células depende de M-CSF, es lógico proponer que esta tendencia también refleja inhibición de la inducción de proliferación por M-CSF endógeno.

4.7 Evaluación *in vivo* de la influencia de SHIP1 en los efectos de pLL sobre la respuesta de células peritoneales a IL-4

A continuación se realizó un experimento utilizando el compuesto 3 α -aminocolestano (3AC). Este compuesto es un inhibidor comercial de la fosfatasa SHIP1, que a su vez es un regulador negativo de la vía de PI3K/Akt [47].

Resultados del grupo realizados en paralelo a este trabajo, no publicados, apuntaban a SHIP1 como un posible mediador necesario para la actividad de pLL. Se encontró que algunos de los efectos de pLL sobre la respuesta a agonistas de TLR observados en BMDC eran eliminados al utilizar el inhibidor de SHIP1, 3AC. Más aún, dichos efectos no se apreciaban en BMDC provenientes de ratones *knock out* para SHIP1 (Álvaro Pittini, resultados no publicados). Por ello, se quiso investigar si los efectos de pLL sobre la proliferación y activación inducida por IL-4c eran observables aún en presencia de 3AC.

Se inyectó entonces IL-4c en presencia o ausencia de 30 μ g pLL, con la administración de 60 μ M 3AC [68] o vehículo, por vía intraperitoneal, una hora antes. Se evaluó el número y tipo de células recuperadas en el lavado peritoneal (Figura 4.32), el porcentaje de incorporación de BrdU (Figura 4.33) y la expresión de marcadores de activación alternativa (Figura 4.34).

Como en experimentos anteriores, el número total de células recuperadas en el lavado peritoneal no varió significativamente con los distintos tratamientos, incluyendo presencia o ausencia del inhibidor. Los números de células de las cuatro poblaciones de interés tampoco se vieron afectados por la presencia del inhibidor 3AC (Figura 4.32).

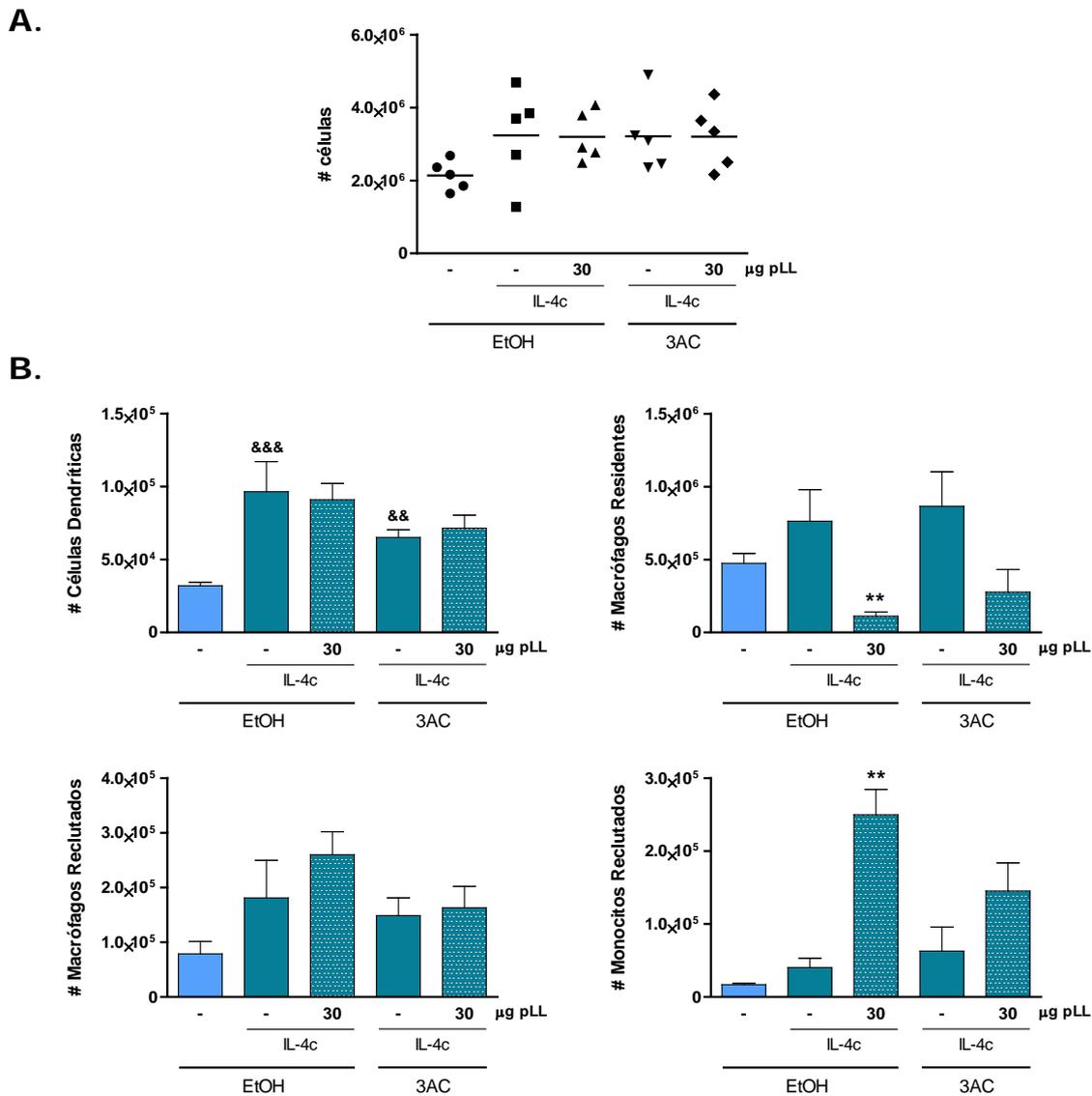


Figura 4.32 Números de células peritoneales recuperadas en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano

Se administró a ratones C57BL/6 una dosis de 3 α -aminocolestano (3AC) 60 μ M o vehículo (PBS 0,4% v/v etanol (EtOH)) por inyección intraperitoneal. Al cabo de una hora, se los inyectó con IL-4c únicamente, o en combinación con 30 μ g pLL. 24 horas después se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra el número total de células recuperadas (A) y el mismo desglosado según la población celular de interés (B). En la parte A se muestran promedios y datos de animales individuales (n=5 por grupo). En la parte B las gráficas muestran promedio + SEM del número de células de cada población. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o IL-4c, respectivamente, con grado de significancia p<0,01 o p<0,001 según número creciente de símbolos.

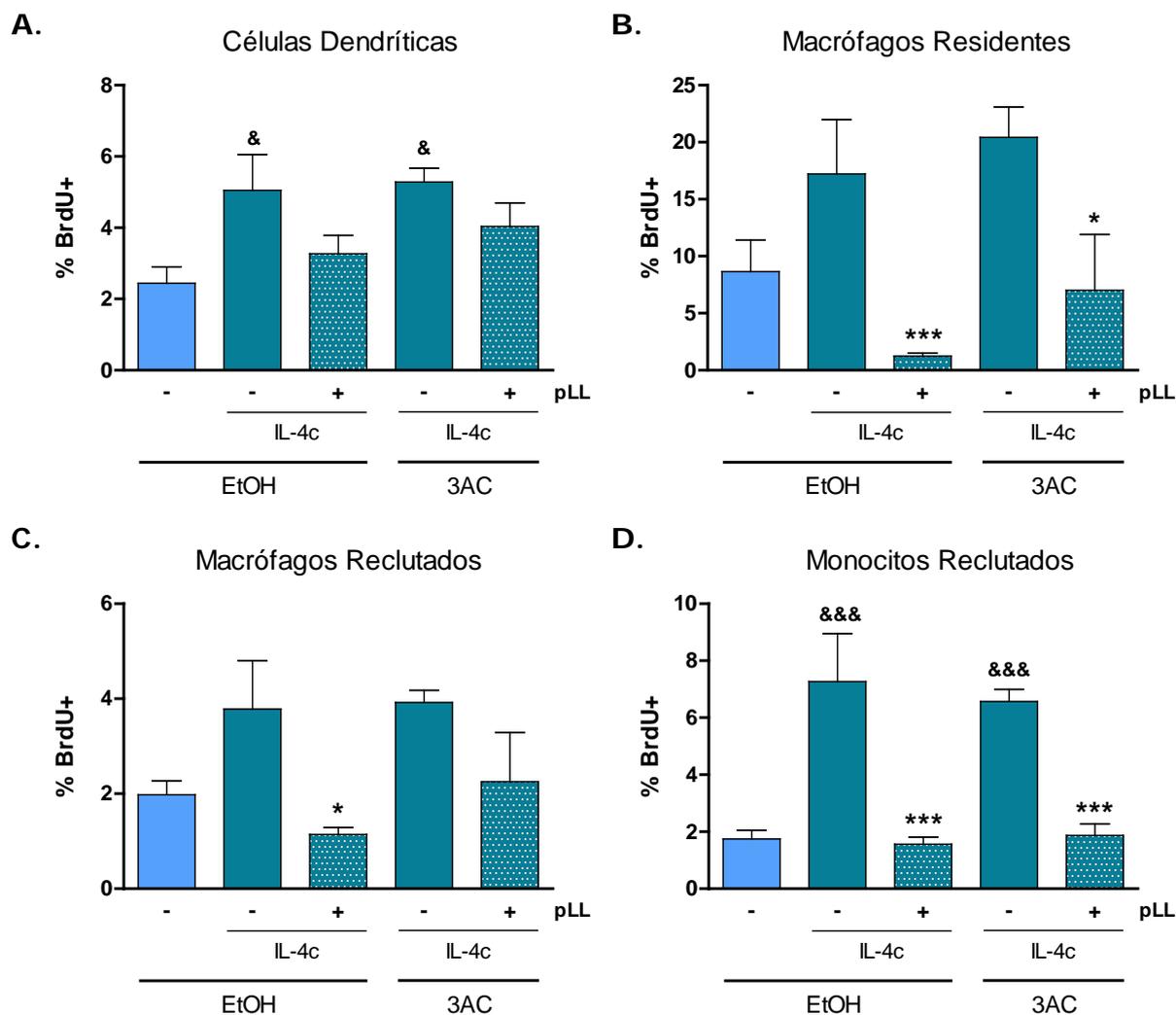


Figura 4.33 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano

Se administró a ratones C57BL/6 una dosis de 3 α -aminocolestano (3AC) 60 μ M o vehículo (0,4% v/v etanol (EtOH)) por inyección intraperitoneal. Una hora después, se los inyectó con IL-4c únicamente, o en combinación con 30 μ g pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal y se analizaron mediante citometría de flujo. Se administró un pulso de BrdU a todos los ratones de 3 horas antes del punto final. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de Células Dendríticas (A), Macrófagos Residentes (B), Macrófagos Reclutados (C) o Monocitos Reclutados (D) positivos para BrdU. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA, con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. & y * indican diferencias con el grupo control o estimulado con IL-4c en presencia del inhibidor o vehículo según corresponda, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos.

En cuanto a la incorporación de BrdU y la expresión de marcadores de activación alternativa inducida por IL-4c, los niveles alcanzados fueron menores a los

obtenidos en experimentos anteriores. Esto puede deberse a la presencia de etanol, que se administró a todos los grupos como control de vehículo para el inhibidor 3AC. De todas maneras, se pudo observar un efecto de pLL sobre la proliferación inducida por IL-4c, aunque no siempre significativo estadísticamente. La presencia del inhibidor no dio lugar a cambios significativos sobre los efectos de pLL.

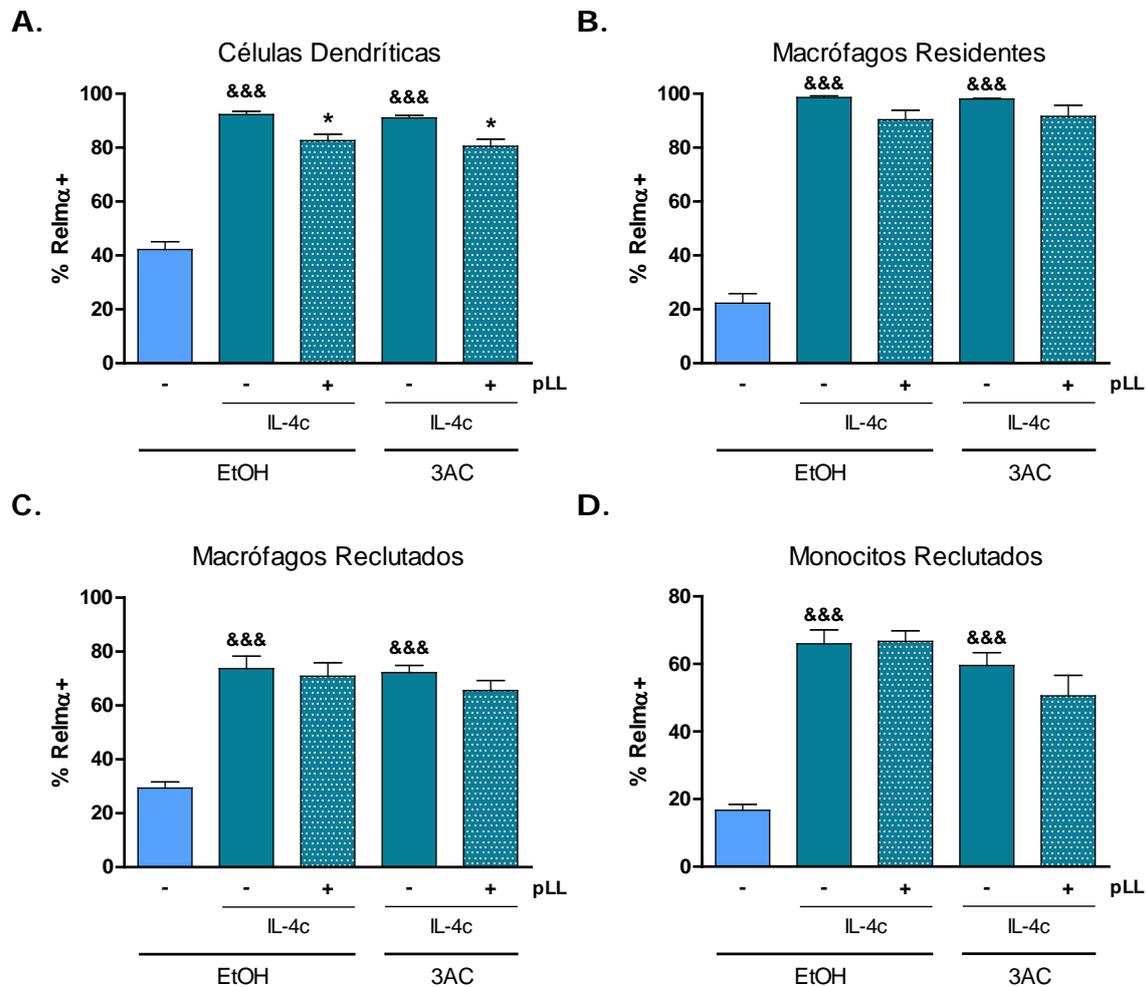


Figura 4.34 Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano

Se administró a ratones C57BL/6 una dosis de 3 α -aminocolestano (3AC) 60 μ M o vehículo (PBS 0,4% v/v etanol (EtOH)) por inyección intraperitoneal. Una hora después, se los inyectó con IL-4c únicamente, o en combinación con 30 μ g pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal y se analizaron mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de Células Dendríticas (A), Macrófagos Residentes (B), Macrófagos Reclutados (C) o Monocitos Reclutados (D) positivos para Relm α . Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA, con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o estimulado con IL-4c en presencia del inhibidor o vehículo según corresponda, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos.

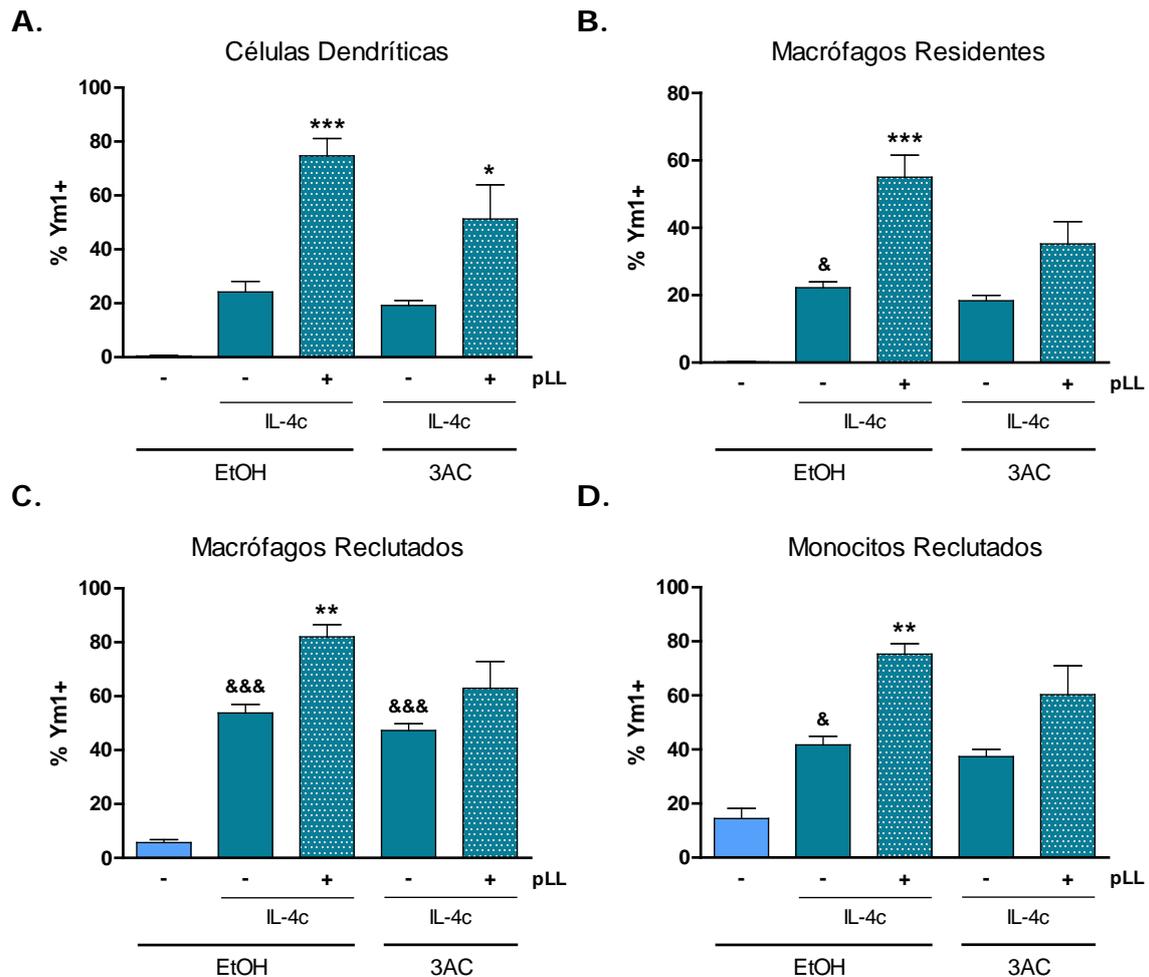


Figura 4.35 Expresión de Ym1 en macrófagos/monocitos y células dendríticas peritoneales en ensayo *in vivo* luego de inyección de IL-4c en presencia y ausencia de pLL, incorporando el inhibidor 3 α -aminocolestano

Se administró a ratones C57BL/6 una dosis de 3 α -aminocolestano (3AC) 60 μ M o vehículo (PBS 0,4% v/v etanol (EtOH)) por inyección intraperitoneal. Una hora después, se los inyectó con IL-4c únicamente, o en combinación con 30 μ g pLL. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal y se analizaron mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran promedio + SEM del porcentaje de Células Dendríticas (A), Macrófagos Residentes (B), Macrófagos Reclutados (C) o Monocitos Reclutados (D) positivos para Ym1. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA, con post-test de Tukey. & y * indican diferencias con el grupo control o estimulado con IL-4c en presencia del inhibidor o vehículo según corresponda, respectivamente, con grado de significancia $p < 0,05$ o $p < 0,001$ según número creciente de símbolos.

La potenciación en presencia de pLL de la expresión de Ym1 inducida por IL-4c, y en menor grado la inhibición de la expresión de Relm α , volvieron a verificarse aunque no tan claramente como en experimentos anteriores. No existieron diferencias significativas en presencia o ausencia del inhibidor. De todos modos,

la presencia de 3AC pareció, a nivel de tendencia, debilitar la potenciación de la expresión de Ym1 inducida por pLL.

El inhibidor 3AC ha sido utilizado en experimentos *in vivo* anteriormente [68], encontrándose que induce un aumento en el número de granulocitos en sangre (principalmente neutrófilos). Por esta razón, se analizaron muestras de sangre para comprobar si el resultado reportado se repetía en nuestro sistema experimental (Figura 4.36).

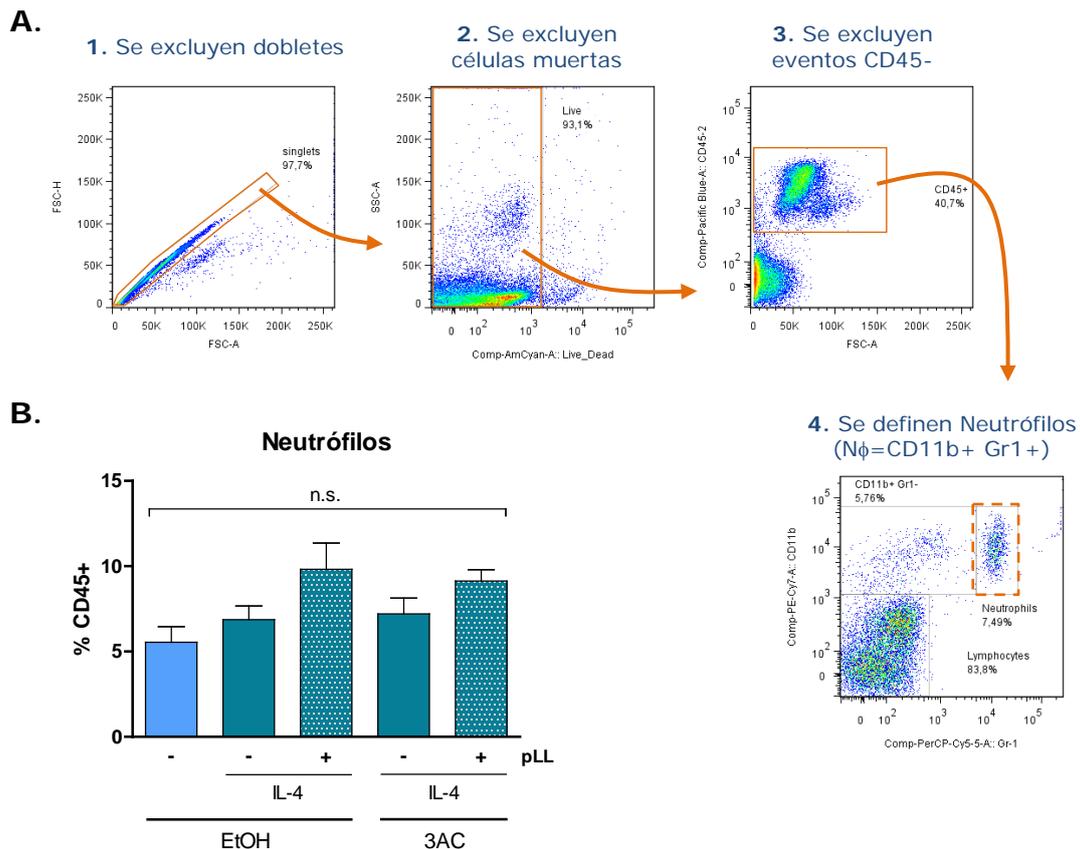


Figura 4.36 Proporción de neutrófilos en sangre en ratones tratados con 3 α -aminocolestano o vehículo

Se administró a ratones C57BL/6 una dosis de 3 α -aminocolestano (3AC) 60 μ M o vehículo (PBS 0,4% v/v etanol (EtOH)) por inyección intraperitoneal (ip). Una hora después, se los inyectó con IL-4c únicamente, o en combinación con 30 μ g pLL, también ip. 24 horas post inyección se realizó un sangrado y la muestra se analizó mediante citometría de flujo. Se muestra la estrategia de selección utilizada para la definición de neutrófilos (N ϕ , A) y su proporción en sangre (B). La gráfica en la parte B muestra promedio + SEM del porcentaje de eventos CD45+ que corresponden a neutrófilos. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA, con post-test de Tukey.

La presencia del inhibidor 3AC no causó ningún efecto significativo sobre la proporción de granulocitos en sangre. Esto puede deberse a diferencias entre el sistema experimental empleado y el reportado en la publicación. La más evidente es la exposición al inhibidor, ya que el sistema reportado consistía en inyecciones diarias con 3AC 60 μ M durante una semana previo a la toma de muestras. En nuestro caso, se administró el inhibidor una única vez a la máxima dosis admitida por los veterinarios del bioterio *Anne Walker* de la Universidad de Edimburgo. Probablemente la utilización de otro vehículo (0,3% KlucelTM/H₂O), que no se encontraba a nuestra disposición en el momento, permitiera la administración diaria de dosis más altas del inhibidor *in vivo*.

La falta de efecto del inhibidor sobre el número de neutrófilos en sangre pone en duda los resultados obtenidos para los demás parámetros estudiados. El experimento debe repetirse utilizando una dosis del inhibidor capaz de imitar los efectos ya reportados para 3AC (quizás incorporando dosis repetidas en días consecutivos al diseño experimental) para poder sacar conclusiones válidas sobre la influencia de SHIP1 sobre los efectos de pLL en el contexto de interés.

4.8 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre la activación de Akt *in vitro*

Se quiso investigar si los efectos observados sobre células dendríticas y macrófagos eran inherentes a pLL, o si por el contrario eran compartidos por otras preparaciones particuladas con características similares. Como se ha reportado, diversos tratamientos dirigidos a eliminar determinados motivos moleculares presentes en pLL no lograron anular completamente sus efectos sobre células dendríticas en otros sistemas estudiados [14] (C. Casaravilla y Á. Pittini, resultados no publicados). La búsqueda de un material "control" se vuelve entonces muy difícil, siendo que pLL posee propiedades únicas no imitables en su totalidad por materiales particulados sintéticos y difícilmente eliminables por tratamientos químicos.

Las preparaciones particuladas elegidas para ensayar junto con pLL fueron Superosa 12 y Sephadex G100. Ambas preparaciones, desarrolladas como medios para cromatografía de exclusión molecular, están compuestas por geles de carbohidratos, agarosa y dextranos respectivamente, respetando así el carácter de gel hidrofílico de las partículas de pLL. Se trata además de geles con poros en los que pueden ingresar macromoléculas, como ocurre con la capa laminar [9]. Al tratarse de preparaciones sintéticas, difieren con pLL en que tienen rangos acotados de tamaño de partícula, mientras que pLL incluye

partículas desde unos pocos micrómetros hasta centenares de micrómetros de longitud. Por esta misma razón, se eligió utilizar una preparación de partículas fagocitables (Superosa 12; tamaño medio de partícula 11 μm) y otra de partículas no fagocitables (Sephadex G100; tamaño medio de partícula 200 μm), anticipando que esta característica podría ser importante al momento de mediar efectos en las células.

Se realizaron entonces experimentos sobre BMDC estimuladas con IL-4, en presencia de las preparaciones particuladas sintéticas o pLL (Figura 4.37).

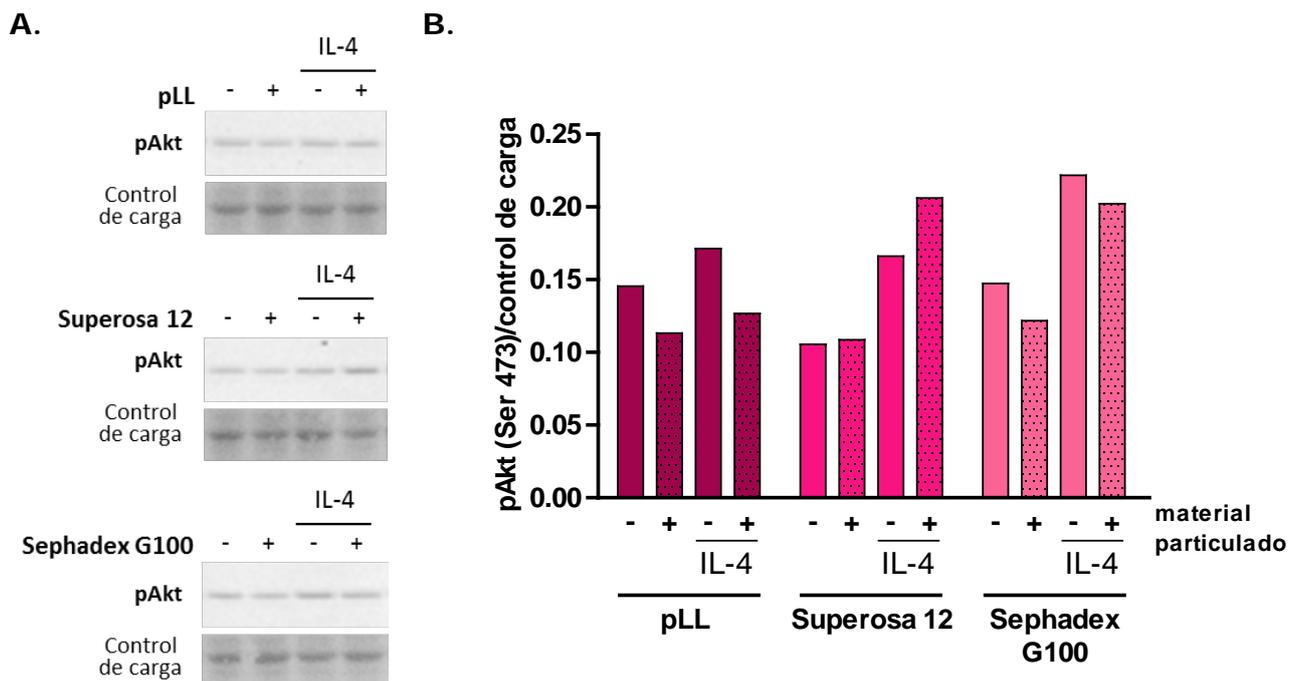


Figura 4.37 Fosforilación de Akt en respuesta a IL-4 en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con IL-4 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μg pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 durante 80 minutos. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra el *blot* (A) y la densitometría correspondiente (B).

En un primer experimento (mostrado en la figura) se observó que mientras que pLL inhibía la fosforilación de Akt inducida por IL-4, ninguno de los materiales particulados sintéticos lograba el mismo efecto de forma clara (la leve inhibición en presencia de Sephadex G100 no se constató en los siguientes experimentos). Si bien el resultado de no inhibición de la fosforilación de Akt en presencia de los materiales particulados sintéticos se repitió dos veces más, en estos últimos experimentos no se alcanzó ver una inhibición de la fosforilación de Akt para las muestras tratadas con IL-4 en combinación con pLL. Esto hace cuestionar el

resultado de estos ensayos, necesitándose realizar más réplicas para lograr un resultado estadísticamente válido.

En lo que respecta a los efectos de los materiales sintéticos sobre la activación de Akt inducida por GM-CSF en BMDC, se realizó un único experimento que se muestra a continuación (Figura 4.38).

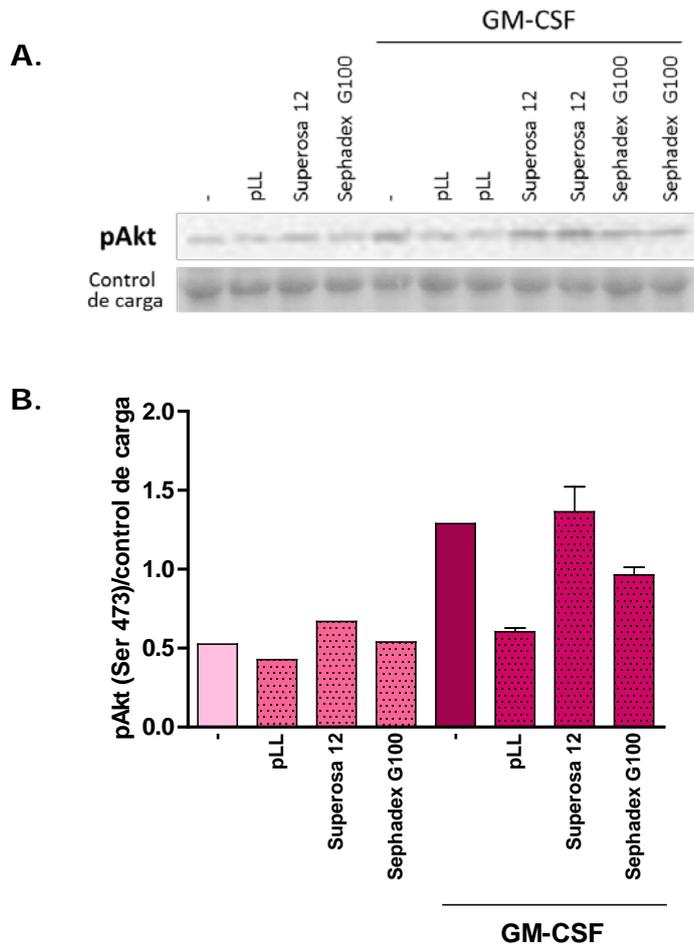


Figura 4.38 Fosforilación de Akt en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 durante 80 minutos. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición Ser 473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra el *blot* (A) y la densitometría correspondiente (B). Para las condiciones de incubación con GM-CSF en presencia de materiales particulados, en la parte B se muestra promedio + SEM.

Se observó que pLL inhibió la fosforilación inducida por GM-CSF de forma clara, mientras que Superosa 12 no la alteró. En el caso de Sephadex G100, se vio un efecto menor al de pLL, que requeriría la repetición del experimento para determinar si se trata de un efecto consistente.

En cuanto a los efectos sobre ThioM ϕ , se realizaron ensayos empleando solamente M-CSF como agonista de PI3K, ya que, como se explicó antes, la IL-4 no generó fosforilación de Akt detectable en este tipo celular en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.39).

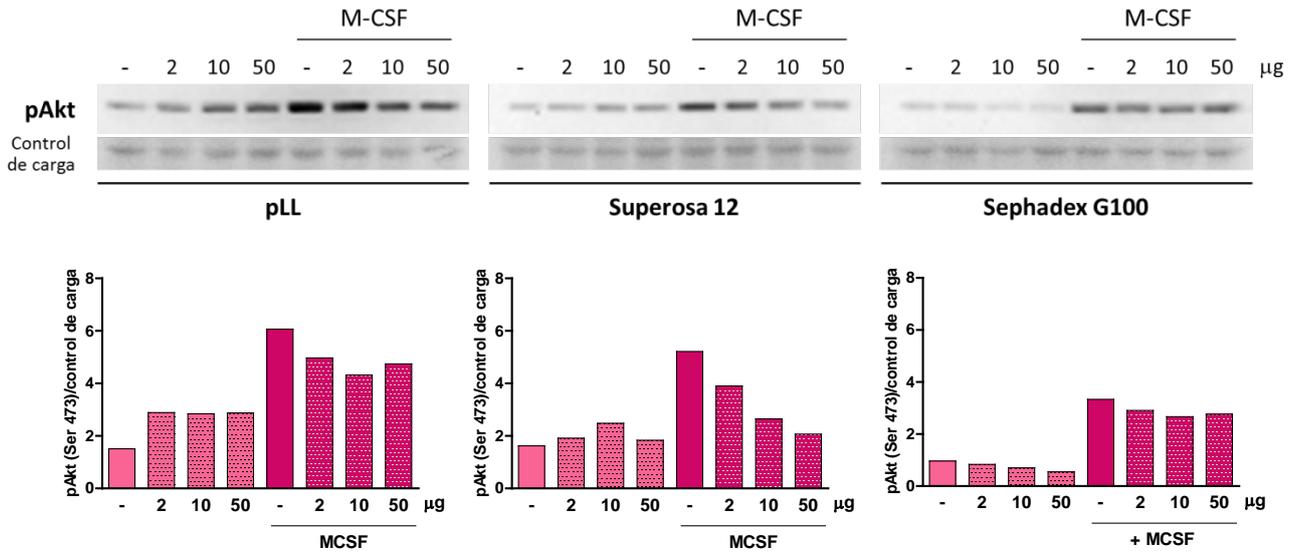


Figura 4.39 Fosforilación de Akt en respuesta a M-CSF en ThioMφ, en presencia o ausencia de materiales particulados

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ ThioMφ con M-CSF 20 ng/mL, en presencia de distintas dosis de pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 durante 80 minutos. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de Akt fosforilado en la posición S473 (pAkt) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra el *blot* y la densitometría correspondiente. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

Se desprende claramente de la figura que Superosa 12 fue capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por M-CSF, incluso a un grado mayor al de pLL. En cuanto a Sephadex G100, el material no presentó ningún efecto en dos de tres experimentos y tuvo un efecto inhibitorio menor en el último.

4.9 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre activación de ERK *in vitro*

También se estudió un posible efecto de los materiales particulados sintéticos sobre la activación de ERK en BMDC (Figura 4.40).

Se puede apreciar que no hubo activación de ERK por ninguno de los particulados *per se*. La Superosa 12 potenció fuertemente la fosforilación de ERK inducida por GM-CSF en forma transitoria (2,5 – 5 minutos). En tanto, Sephadex G100 pareció no tener efecto.

Se realizaron ensayos similares en ThioMφ (Figura 4.41). Ninguno de los particulados suscitó la activación de ERK *per se*, ni pareció tener un efecto significativo sobre la fosforilación de ERK inducida por M-CSF en ThioMφ. Si bien

en este primer experimento se apreció una disminución de la fosforilación de ERK a los 5 minutos de incubación con Superosa 12, el efecto no fue reproducible.

A.

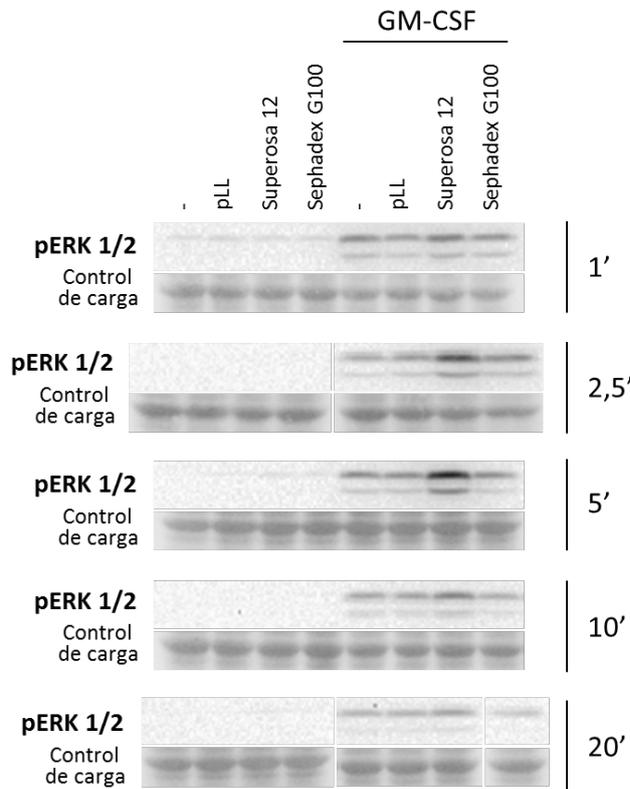
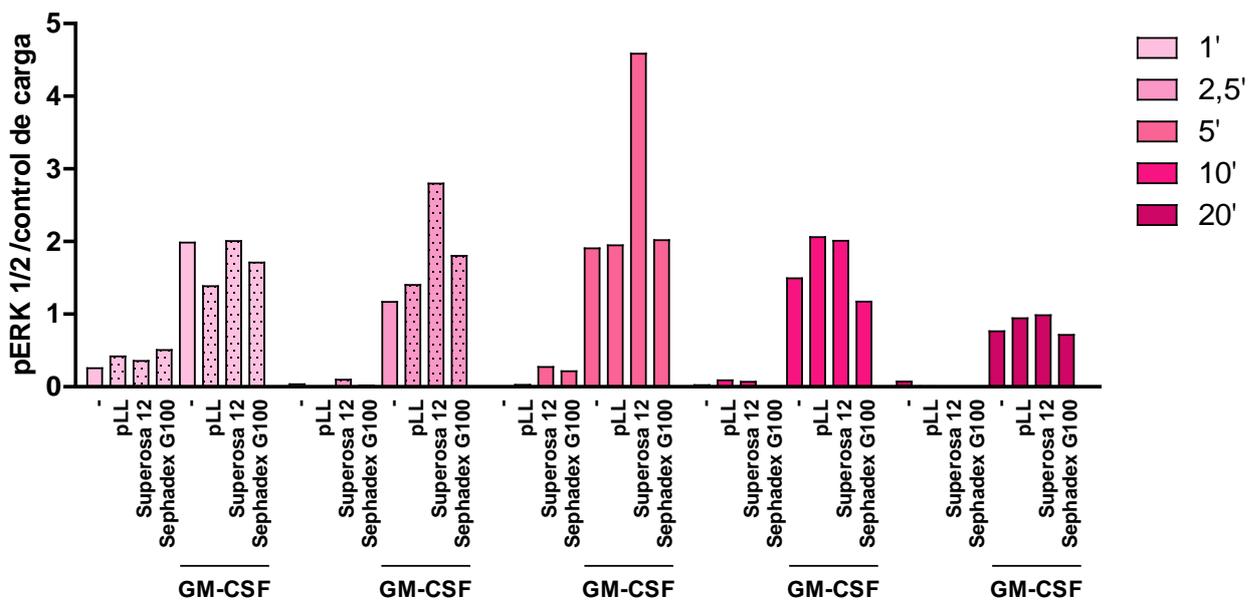


Figura 4.40 Fosforilación de ERK en respuesta a GM-CSF en BMDC, en presencia o ausencia de materiales particulados

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ BMDC con GM-CSF 20 ng/mL, en presencia o ausencia de 10 μ g pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de ERK fosforilado en las posiciones T202 y Y204 (pERK 1/2) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra el *blot* (A) y la densitometría correspondiente (B).

B.



A.

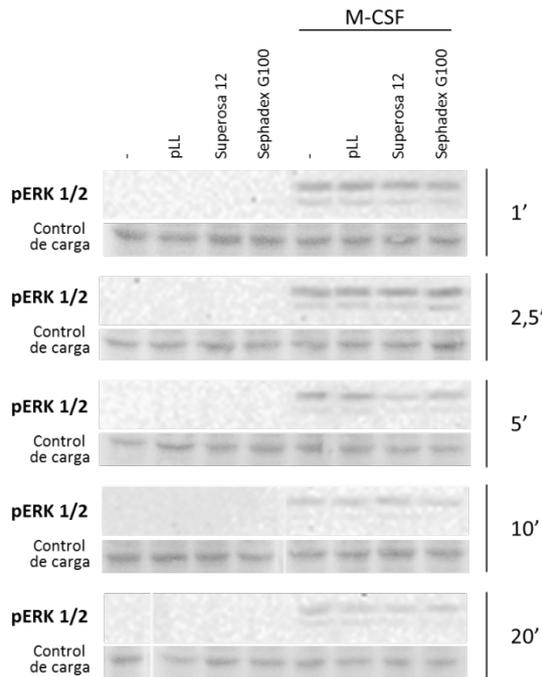
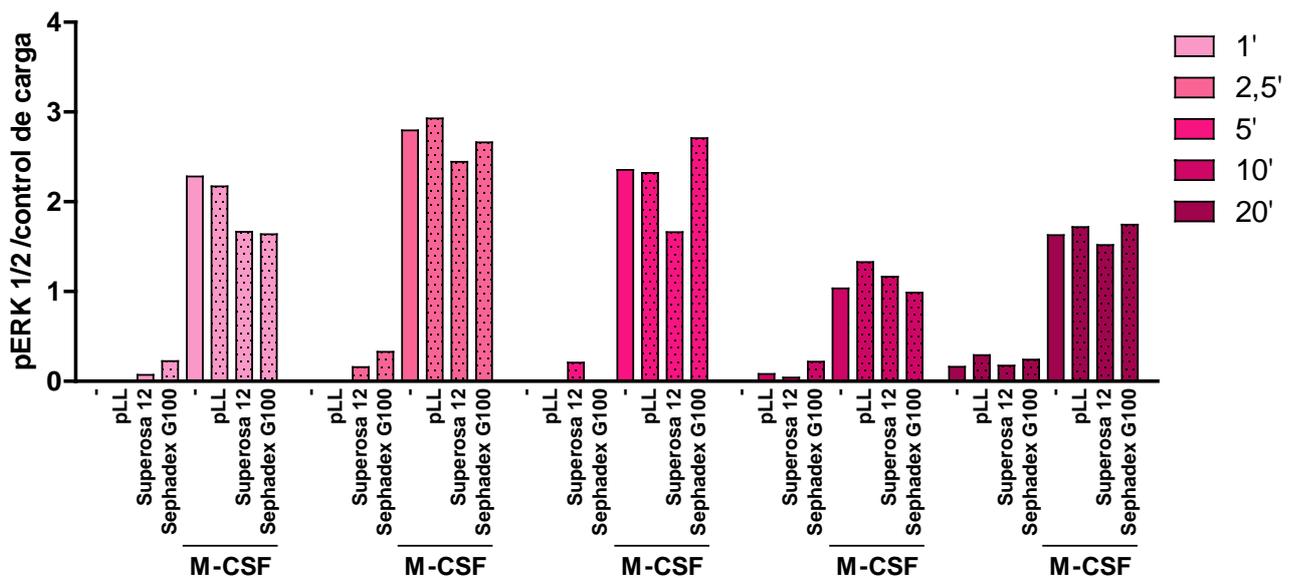


Figura 4.41 Fosforilación de ERK en respuesta a M-CSF en ThioMφ, en presencia o ausencia de materiales particulados

Se incubaron $0,4 \times 10^6$ ThioMφ con M-CSF 20 ng/mL, en presencia de 10 μg pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 durante los tiempos especificados. A tiempo cumplido, se midieron los niveles de ERK fosforilado en las posiciones T204 y Y202 (pERK 1/2) en lisados celulares totales mediante *Western Blot*. Se muestra el *blot* (A) y la densitometría correspondiente (B). Resultado representativo de dos experimentos independientes.

B.



En suma, se observó que: (i) de forma similar a pLL, ninguno de los materiales particulados control dieron lugar a fosforilación de Akt ni de ERK por sí mismos, a los tiempos estudiados; (ii) el material no fagocitable control (Sephadex G100) no tuvo efectos claros sobre la activación de Akt ni de ERK para ninguna de las combinaciones tipo celular:agonista ensayadas; (iii) el material fagocitable control (Superosa 12) tuvo efectos que variaron según la combinación tipo celular:agonista, diferenciándose claramente de pLL por potenciar la fosforilación de ERK y por no inhibir la fosforilación de Akt en BMDC tratadas con GM-CSF.

4.10 Comparación de pLL con otras preparaciones particuladas en relación a los efectos sobre la respuesta a IL-4 *in vivo*

Los siguientes experimentos se realizaron en el bioterio del Instituto de Higiene, Laboratorio de Inmunología. El protocolo empleado fue aprobado por la CHEA, N° 101900-000316-15.

Siguiendo el diseño experimental de los experimentos *in vivo* previamente comentados, se inyectó IL-4c en presencia o ausencia de 30 µg de pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 y se analizaron las células recuperadas en el lavado peritoneal 24 horas post inyección.

La estrategia de *gating* en estos experimentos varió respecto a los de la sección anterior, ya que se trabajó con un citómetro de flujo distinto (6 colores en lugar de 8) y distinta disponibilidad de anticuerpos (Figura 4.42). Las diferencias experimentales determinaron que no fuera posible definir la población de células dendríticas en forma razonablemente reproducible respecto a la de los experimentos realizados en Edimburgo. Por ello, el análisis se centró en los macrófagos y monocitos. En la presente estrategia de *gating* no se cuenta con un marcador para eosinófilos (que expresan F4/80 bajo al igual que macrófagos reclutados y monocitos), haciendo imprescindible la selección de las poblaciones de macrófagos y monocitos por su expresión de CD115.

Se comprobó que, a pesar de que la estrategia de *gating* fuera distinta, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos anteriormente en macrófagos y monocitos para los tratamientos IL-4c en presencia o ausencia de 30 µg pLL y control. Cabe destacar que en estos experimentos se utilizó una dosis mayor de IL-4c (2 µg rIL-4), ya que la dosis de 1 µg no alcanzaba a inducir los efectos de proliferación y expresión de marcadores de activación alternativa al grado observado anteriormente (ya sea por variación en el lote de citoquina utilizado o por diferencias en el estado de los ratones).

Se realizaron 3 experimentos de este tipo, encontrando gran dispersión entre individuos en los datos obtenidos. Por esta razón, el último experimento de la serie contó con grupos de 7 animales, lográndose ver diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos de este experimento en particular son los que se muestran a continuación, pero no se debe olvidar que anteriormente se habían obtenido las mismas tendencias, sin alcanzar significancia estadística.

Se analizó el número de células recuperadas en el lavado peritoneal (Figura 4.43), el porcentaje de células positivas para BrdU (Figura 4.44) y la expresión de Relmα (Figura 4.45).

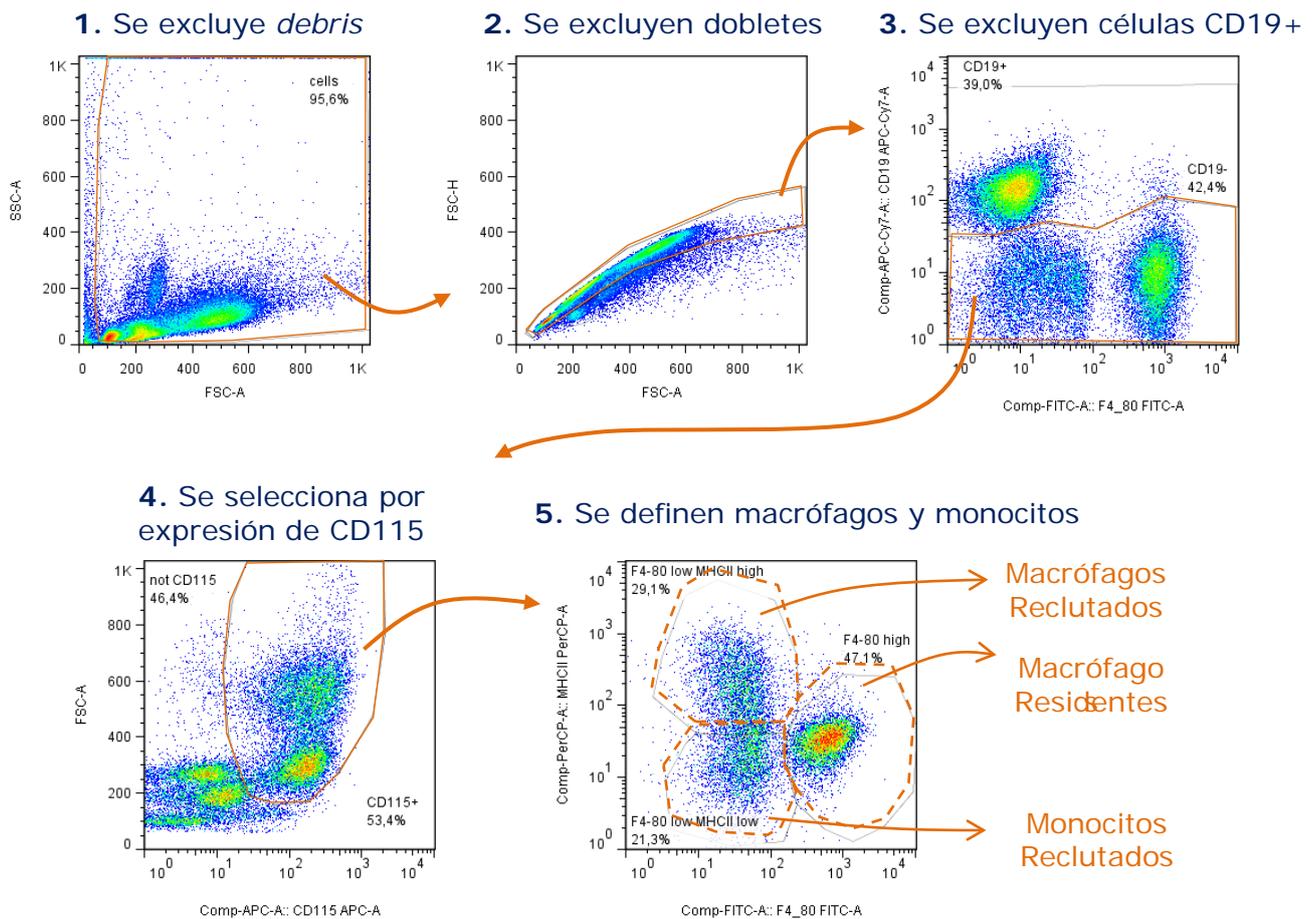


Figura 4.42 Estrategia de *gating* para experimentos *in vivo*

Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir las poblaciones celulares de interés.

Se observó que los grupos correspondientes a IL-4c en combinación con Superosa 12 o Sephadex G100 son los que presentaron mayor dispersión en el número de células recuperadas en el lavado peritoneal. A pesar de ello, se alcanzó una diferencia significativa en este parámetro para el grupo IL-4c en combinación con 30 μ g Sephadex G100 respecto a IL-4c en presencia de 30 μ g pLL (Figura 4.43A).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos en el número total de macrófagos reclutados o monocitos presentes en la cavidad. Sin embargo, existió una clara tendencia hacia mayor reclutamiento de macrófagos luego de inyección de los dos materiales particulados sintéticos que luego de inyección de pLL, siempre en combinación con IL-4c, estímulo que por sí solo no generó reclutamiento. En el caso de macrófagos residentes, se vio una disminución significativa entre el grupo IL-4c con pLL respecto a las demás condiciones ensayadas (Figura 4.43B).

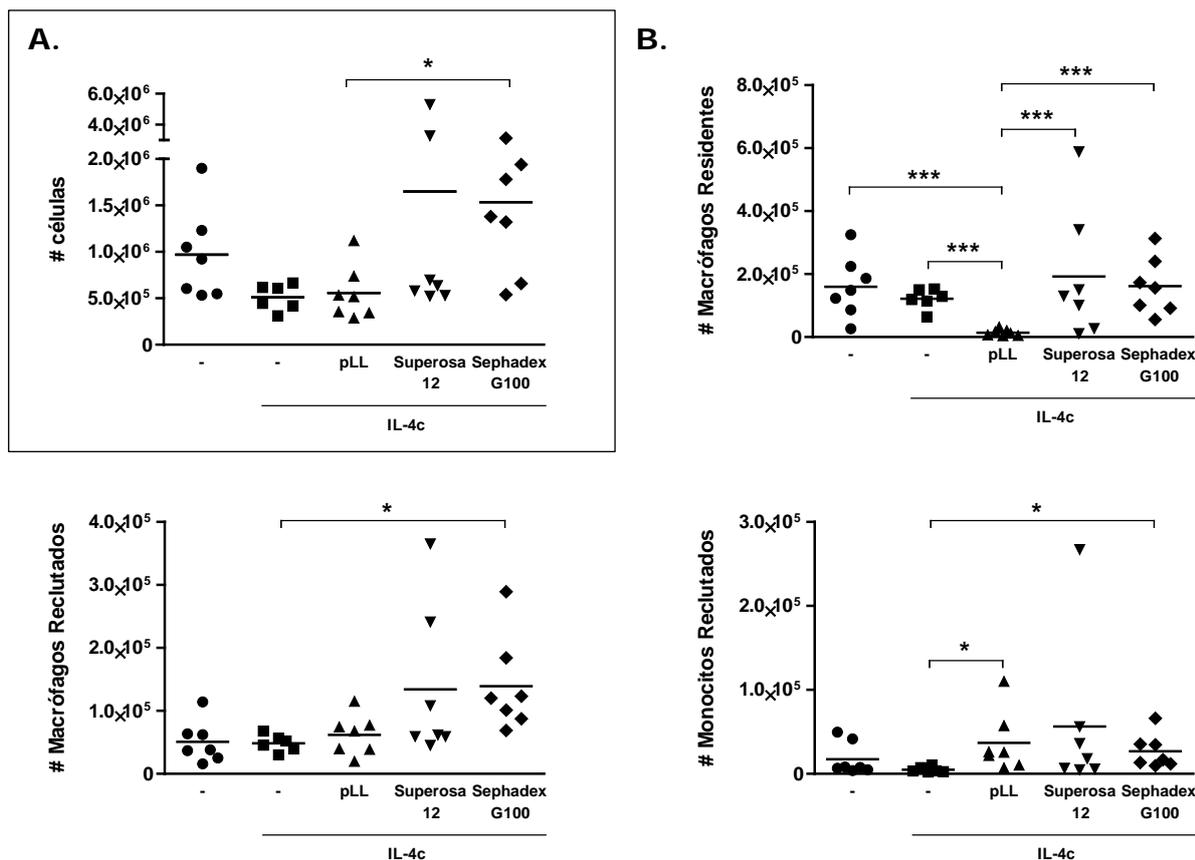


Figura 4.43 Números de células peritoneales recuperadas luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c únicamente o en combinación con 30 μg de pLL, Superosa12 o Sephadex G100. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Se muestra el número total de células recuperado (A) y el mismo desglosado según la población celular de interés (B). Las gráficas muestran promedios y datos de animales individuales (n=7 por grupo). Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. * y *** indican diferencias significativas con $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente.

Respecto a la incorporación de BrdU, se apreció un aumento significativo en este parámetro para el grupo tratado con IL-4c respecto al grupo control para macrófagos residentes y monocitos reclutados. En macrófagos residentes pudo verse una tendencia a la inhibición por co-inyección de IL-4c y pLL o Sephadex G100, aunque la misma no fue significativa. En el caso de monocitos reclutados, tanto pLL como Sephadex G100 causaron una inhibición significativa de la incorporación de BrdU suscitada por IL-4c (Figura 4.44).

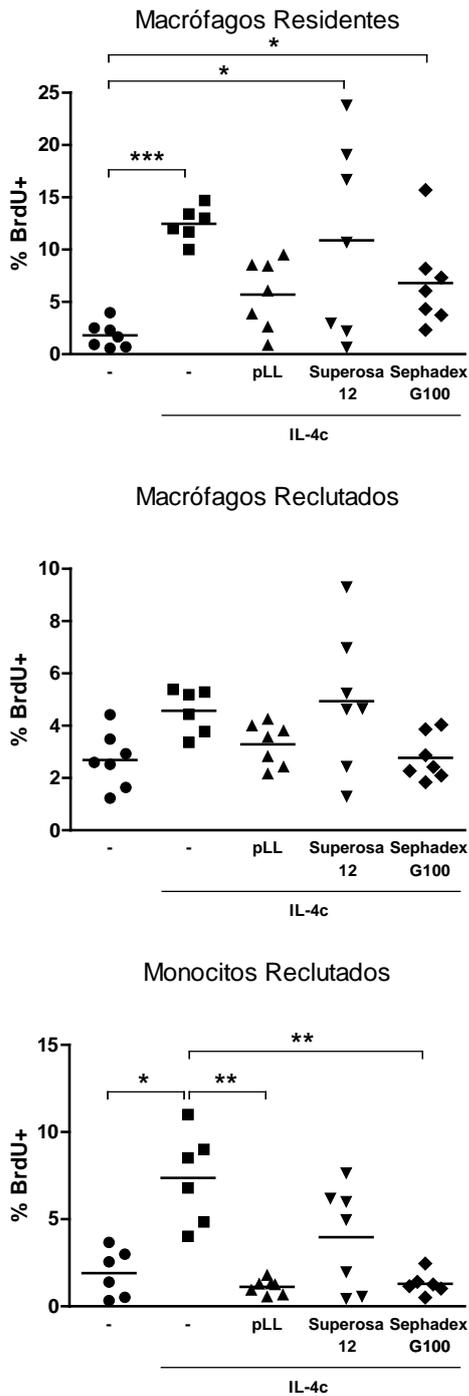


Figura 4.44 Incorporación de BrdU en macrófagos/monocitos peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c únicamente o en combinación con 30 μ g de pLL, Superosa12 o Sephadex G100. Se administró un pulso de 3 horas de BrdU inmediatamente previo al tiempo final. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Las gráficas muestran promedio y datos de animales individuales del porcentaje de células positivas para BrdU en cada población de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. * , ** y *** indican a diferencias significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

En cuanto a la inducción de Relm α por parte de IL-4c, la dosis de IL-4c utilizada indujo niveles de Relm α significativos y similares a los obtenidos en experimentos anteriores. Para las poblaciones estudiadas se pudieron ver tendencias a la inhibición de este parámetro en presencia de los materiales particulados, aunque la tendencia fue más fuerte en los casos de pLL o Superosa 12 (Figura 4.45).

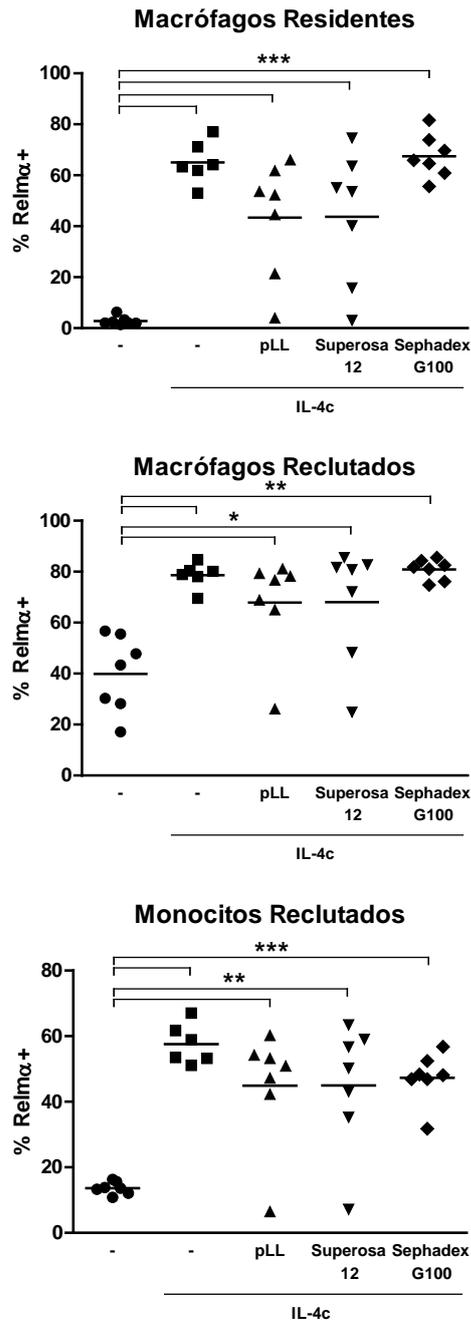


Figura 4.45 Expresión de Relm α en macrófagos/monocitos peritoneales luego de inyección de IL-4c en presencia o ausencia de materiales particulados

Se inyectaron ratones C57BL/6 con IL-4c únicamente o en combinación con 30 μ g de pLL, Superosa12 o Sephadex G100. 24 horas post inyección se recuperaron las células por lavado peritoneal. Las gráficas muestran promedios y datos de animales individuales del porcentaje de células positivas para Relm α en cada población de interés. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey, luego de transformación logarítmica de los datos. * , ** y *** indican diferencias significativas con $p < 0,05$ $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

En suma, esta serie de experimentos *in vivo* muestra claramente que los datos obtenibles por tratamiento con materiales particulados presentan grandes dispersiones entre individuos y ello impone el uso de más animales por grupo para lograr visualizar diferencias significativas entre los tratamientos. Aun así, las tendencias observadas muestran por un lado, que la capacidad de inhibir la proliferación de macrófagos residentes podría estar presente en la preparación sintética no fagocitable, y por otro, que los efectos de pLL en su conjunto no son imitados por ninguna de las dos preparaciones particuladas ensayadas.

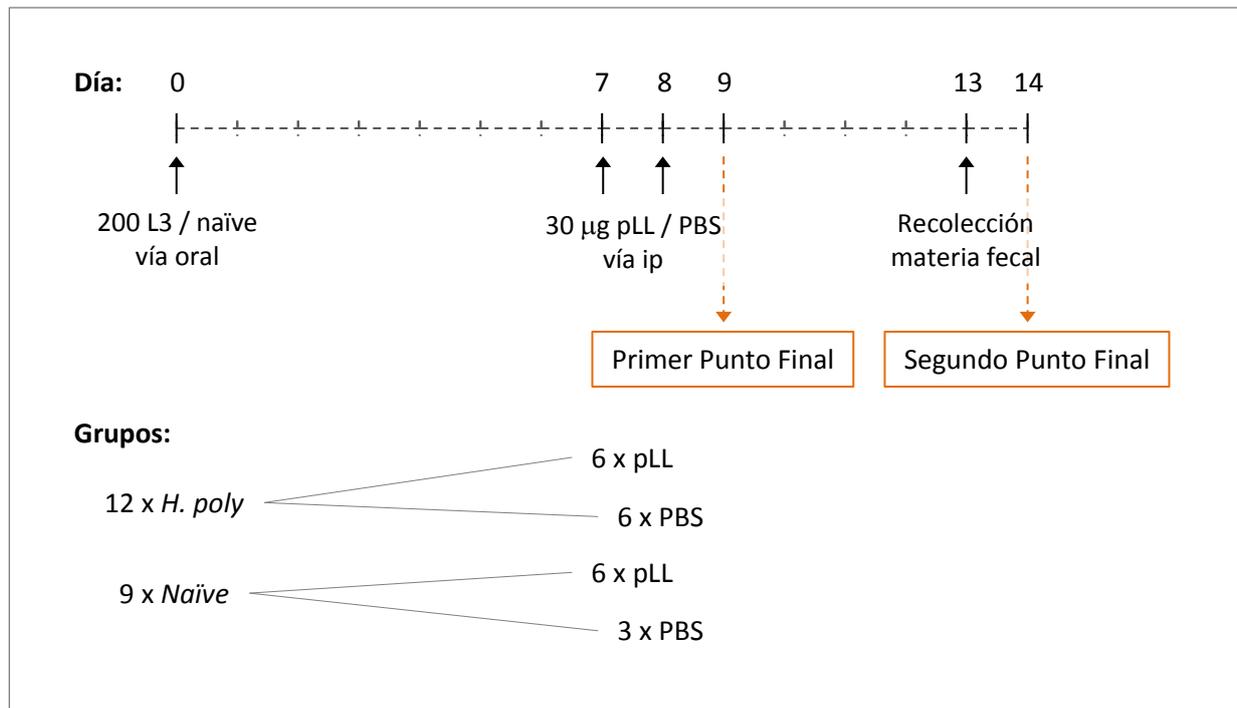
4.11 Implicancia funcional de los efectos de pLL observados

Hasta ahora se ha presentado el análisis de los efectos de pLL en un sistema con IL-4 exógena, encontrándose que pLL afecta tanto la proliferación como la activación alternativa inducida por esta citoquina. En la última parte de esta Tesis se presenta un intento de buscar una implicancia funcional a los efectos observados, en particular la inhibición de la proliferación de macrófagos, en un modelo sin IL-4 exógena. Puesto que en infección experimental con *E. granulosus* es muy improbable (por los datos histológicos) que se detecte proliferación de macrófagos, se utilizó un modelo de otra infección helmíntica en la cual se observa proliferación de macrófagos, específicamente en la cavidad peritoneal. En concreto, se utilizó el modelo de infección con *Heligmosomoides polygyrus* (*H. poly*). Éste es un nemátodo, parásito intestinal murino natural, cuyo ciclo de vida puede ser reproducido en el laboratorio. En condiciones experimentales, los ratones se infectan por vía oral con larvas infectivas L3. Las larvas pasan a través del tracto digestivo y dentro de las 24 horas post ingestión penetran la pared intestinal hacia la submucosa. Una vez allí, sufren dos mudas y luego re-emergen al lumen intestinal como parásitos adultos, alrededor del día 10 post ingestión. Los parásitos adultos se enrollan sobre las vellosidades para resguardarse mientras se nutren del tejido intestinal del hospedador. En el lumen intestinal se aparean y producen huevos que serán expulsados junto con las heces. Una vez en el ambiente exterior, los huevos eclosionan y sufren dos mudas para convertirse en larvas infectivas L3, completando así el ciclo [69].

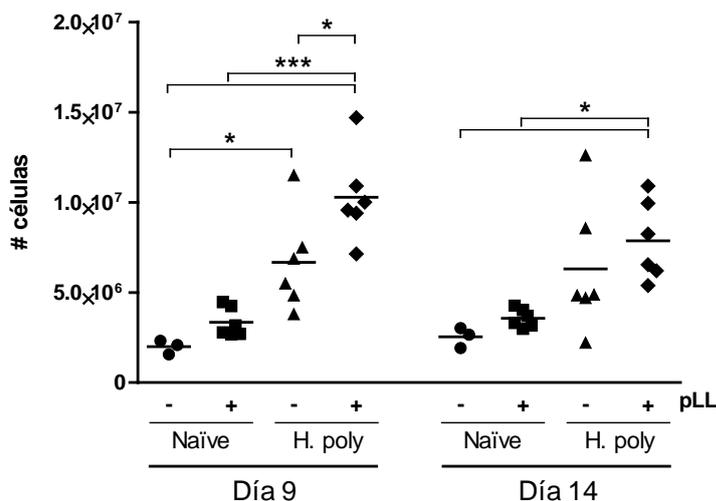
La infección con *H. poly* induce una fuerte respuesta Th2, que es muy importante para el control y expulsión del parásito [70]. Dentro de esta respuesta, la IL-4 es esencial tanto para la expulsión del parásito adulto como para la inhibición de la producción de huevos [70]. Más aún, la administración de IL-4 exógena durante la infección (en forma de IL-4c) acelera la resolución de la infección en ratones BALB/c [71]. Se ha visto, mediante ensayos de depleción de macrófagos con clodronato, que los macrófagos son importantes para la eliminación de *H. poly* [72]. Además, utilizando un inhibidor de la enzima arginasa (S-(2-boronoetil)-L-cisteína), se constató que la actividad arginasa podría causar un daño directo al parásito ya que aumenta los niveles de marcadores de estrés en el mismo [72]. Por ello, se supone que la proliferación de macrófagos inducida por IL-4 en este contexto ayudaría a la resolución de la infección al aumentar el número de células con un papel activo en la remoción del parásito. En particular, la formación de granulomas dependiente de IL-4 en la pared intestinal parece correlacionar con la expulsión del parásito. Pese a encontrarse el parásito en el lumen intestinal, se observa en el modelo un aumento transitorio en el número de macrófagos en la cavidad peritoneal, el

cual se presume se debe a proliferación inducida por IL-4 [73]. No se conoce aún si este cambio tiene efecto sobre el parásito en el intestino.

Gracias a estos antecedentes y por tratarse de un modelo que se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio de la Prof. Judith Allen, se decidió investigar si la administración de pLL durante la infección con *H. poly* tenía algún efecto sobre el resultado de infección. Se debe recordar que los resultados que se muestran a continuación corresponden a un primer experimento piloto, donde se probó un diseño experimental arbitrario (ver Esquema 1 a continuación). Se eligieron los días 7 y 8 de infección para la administración de pLL ya que éstos son los días en los que se observa aumento en el número de macrófagos en la cavidad peritoneal en respuesta a *H. poly* [73]. Por ende, la administración de pLL precisamente en estos días podría afectar la proliferación de estas células y potencialmente el resultado global de la infección. El empleo de ratones C57BL/6 para este experimento, además de ser consistente con los previos experimentos *in vivo* realizados en esta Tesis, respondió a que esta cepa de ratones es relativamente resistente a la infección con *H. poly* (le lleva entre 8 y 20 semanas expulsar los gusanos [69]). De esta manera, permitiría observar potenciales efectos de pLL en uno u otro sentido, situación que sería más difícil si se tratara con animales altamente resistentes (como las cepas SJL o SWR, que demoran entre 4 y 6 semanas en expulsar los gusanos), o susceptibles (como las cepas CBA o C3H, que demoran más de 20 semanas en expulsar los gusanos) [69].



A.



B.

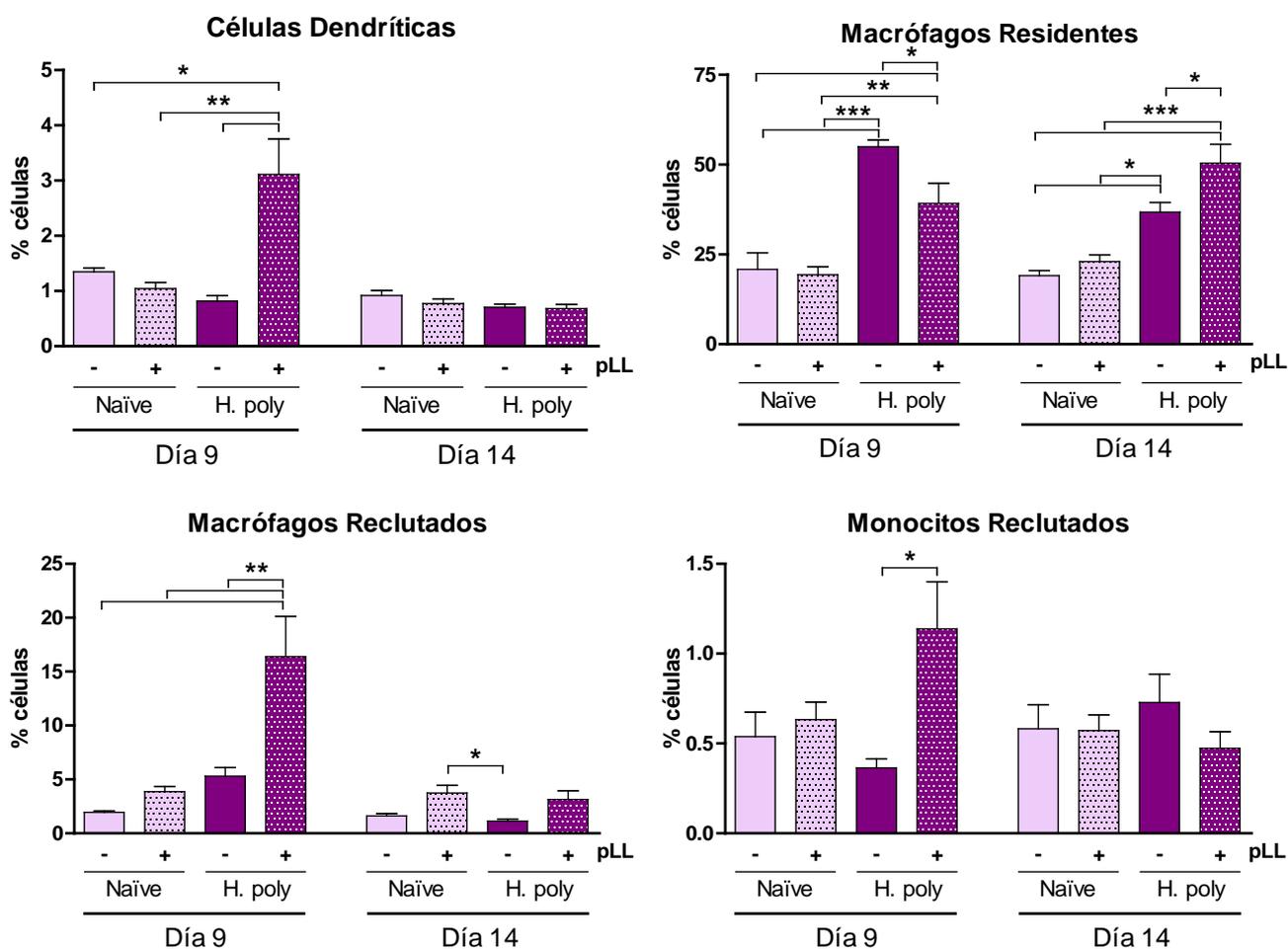


Figura 4.46 Números de células peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con *H. polygyrus* o *naïve*

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. A los días 9 y 14 de infección se analizaron las células de la cavidad peritoneal por citometría de flujo. Se muestra el número total de células recuperadas (A) y promedio + SEM del porcentaje del total correspondiente a cada población de interés (B). Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *, ** y *** indican diferencias con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

Tal como se desprende del esquema anterior, se trabajó con cuatro tratamientos; animales sin infectar (*naïve*) o infectados con *H. poly*, ambos con y sin administración de pLL. Se analizaron las células de la cavidad peritoneal y de los ganglios mesentéricos a los días 9 y 14 de infección (Figuras 4.46 – 4.50). Asimismo, se analizó el número de huevos de *H. poly* presentes en materia fecal al día 13 y el número de gusanos en el intestino al día 14 de infección (Figura 4.51).

En primer lugar, se aprecia que los números de células recuperadas en los lavados peritoneales no son similares entre todos los grupos. Los animales infectados con *H. poly* presentan un número significativamente mayor a los *naïve*, como era de esperar, al día 9 de infección (Figura 4.46A). Hubo también una diferencia significativa dentro los animales infectados, mostrando números significativamente mayores aquellos que recibieron pLL. En términos de proporciones de los distintos tipos celulares de interés, la administración de pLL en animales infectados (pero no en animales *naïve*) causó un aumento en la proporción de células dendríticas, macrófagos reclutados y monocitos en la cavidad peritoneal al día 9 de infección (Figura 4.46B). Al día 14 de infección estas diferencias ya no se evidenciaron.

En el caso de macrófagos residentes, se observó un notable aumento en su proporción inducido por la infección tanto al día 9 como 14. En los animales infectados, la administración de pLL dio lugar a una disminución de la proporción de macrófagos residentes al día 9 y un aumento del mismo parámetro al día 14.

Los datos de incorporación de BrdU como de expresión de marcadores de activación alternativa se muestran únicamente para macrófagos residentes, en el entendido de que es en esta población donde se observaron los mayores efectos de pLL en los experimentos *in vivo* anteriores, y que esta es la población dominante en número.

Coincidente con lo esperado, al día 9 de infección se observó un aumento en la incorporación de BrdU en los animales infectados respecto a los animales *naïve*, aunque el mismo no fue estadísticamente significativo (Figura 4.47A). A este tiempo, la administración de pLL en animales infectados causó un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos residentes positivos para BrdU, opuesto a lo que se esperaba. También inesperadamente, se observó una tendencia hacia mayor porcentaje de macrófagos positivos para BrdU en el grupo de animales no infectados que recibieron pLL. A los 14 días de infección no se observó incorporación de BrdU por encima del valor basal en ninguno de los grupos (Figura 4.47B).

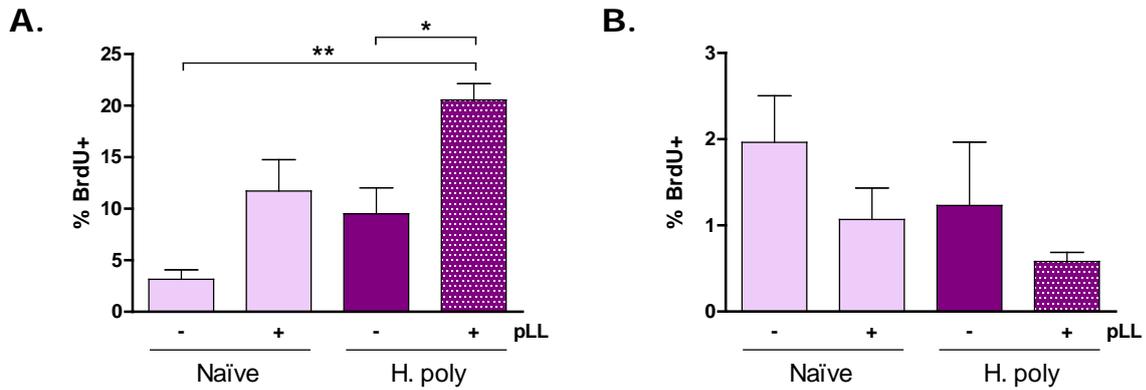


Figura 4.47 Incorporación de BrdU en macrófagos residentes peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con *H. polygyrus* o *naïve*

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. A los días 9 y 14 de infección se analizaron las células de la cavidad peritoneal por citometría de flujo, habiéndose realizado un pulso de 3 horas de BrdU inmediatamente previo al tiempo final. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de macrófagos residentes positivos para BrdU al día 9 (A) o 14 (B) de infección. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *, ** y *** indican diferencias con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

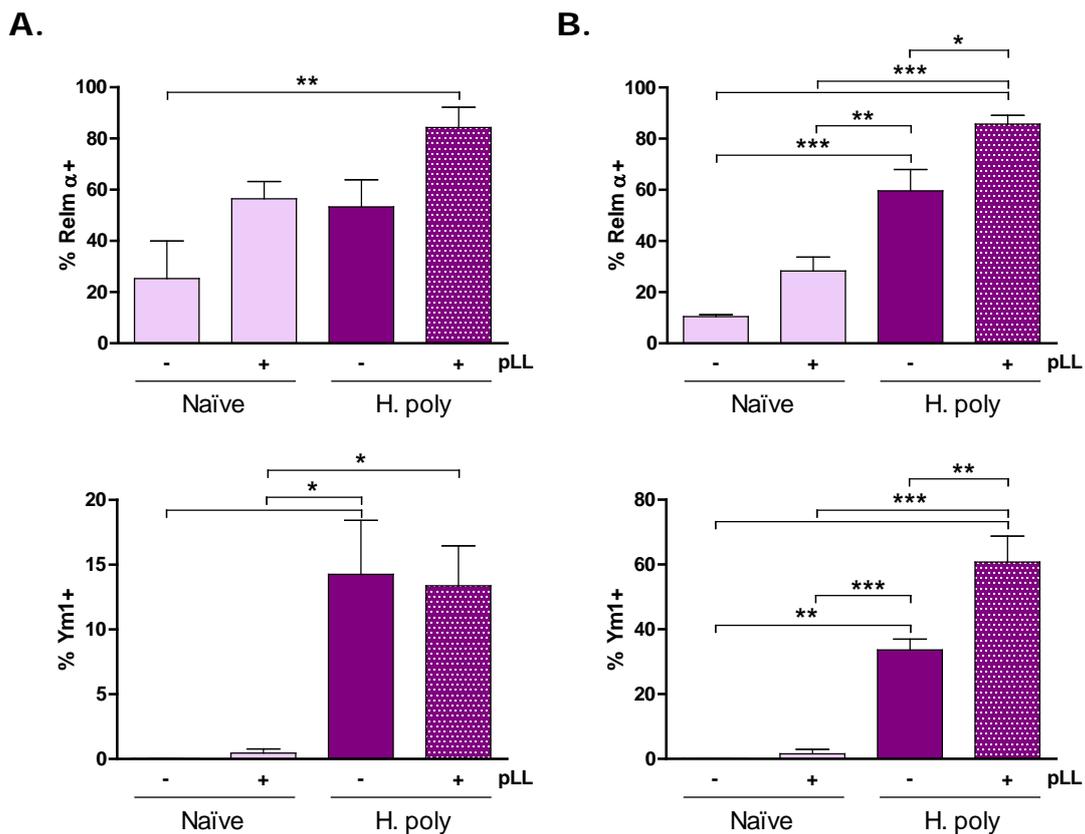


Figura 4.48 Expresión de Relm α o Ym1 en macrófagos residentes peritoneales luego de inyección de pLL en animales infectados con *H. polygyrus* o *naïve*

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. A los días 9 y 14 de infección se analizaron las células de la cavidad peritoneal por citometría de flujo. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de macrófagos residentes positivos para Relm α o Ym1 al día 9 (A) o 14 (B) de infección. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *, ** y *** indican diferencias con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

Se observó un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos que expresaban Relm α al día 14 de infección. En cuanto a Ym1, la infección indujo su expresión significativamente tanto al día 9 como al día 14, a partir de valores nulos. La administración de pLL potenció la expresión de ambos marcadores en forma significativa al día 14 de infección (Figura 4.48).

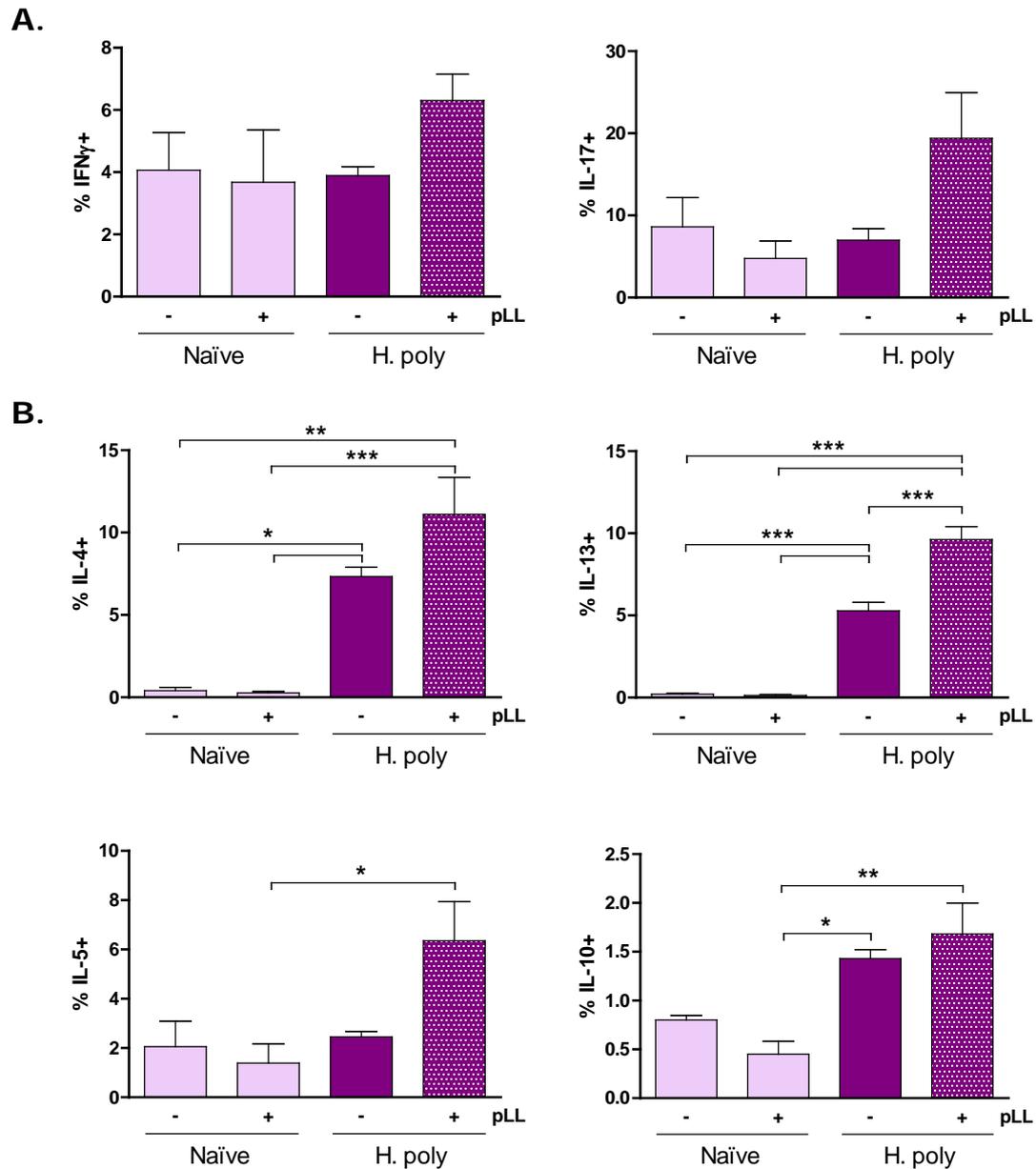


Figura 4.49 Expresión de citoquinas por linfocitos T CD4⁺ de los ganglios mesentéricos provenientes de animales infectados con *H. polygyrus* o *naïve*, inyectados con pLL o PBS

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. Al día 14 de infección se analizaron las células de los ganglios mesentéricos por citometría de flujo. Se muestra promedio + SEM del porcentaje de LT CD4⁺ positivos para citoquinas Th1 o Th17 (A) o citoquinas Th2 (B). Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *, ** y *** indican diferencias con grado de significancia p<0,05, p<0,01 o p<0,001, respectivamente.

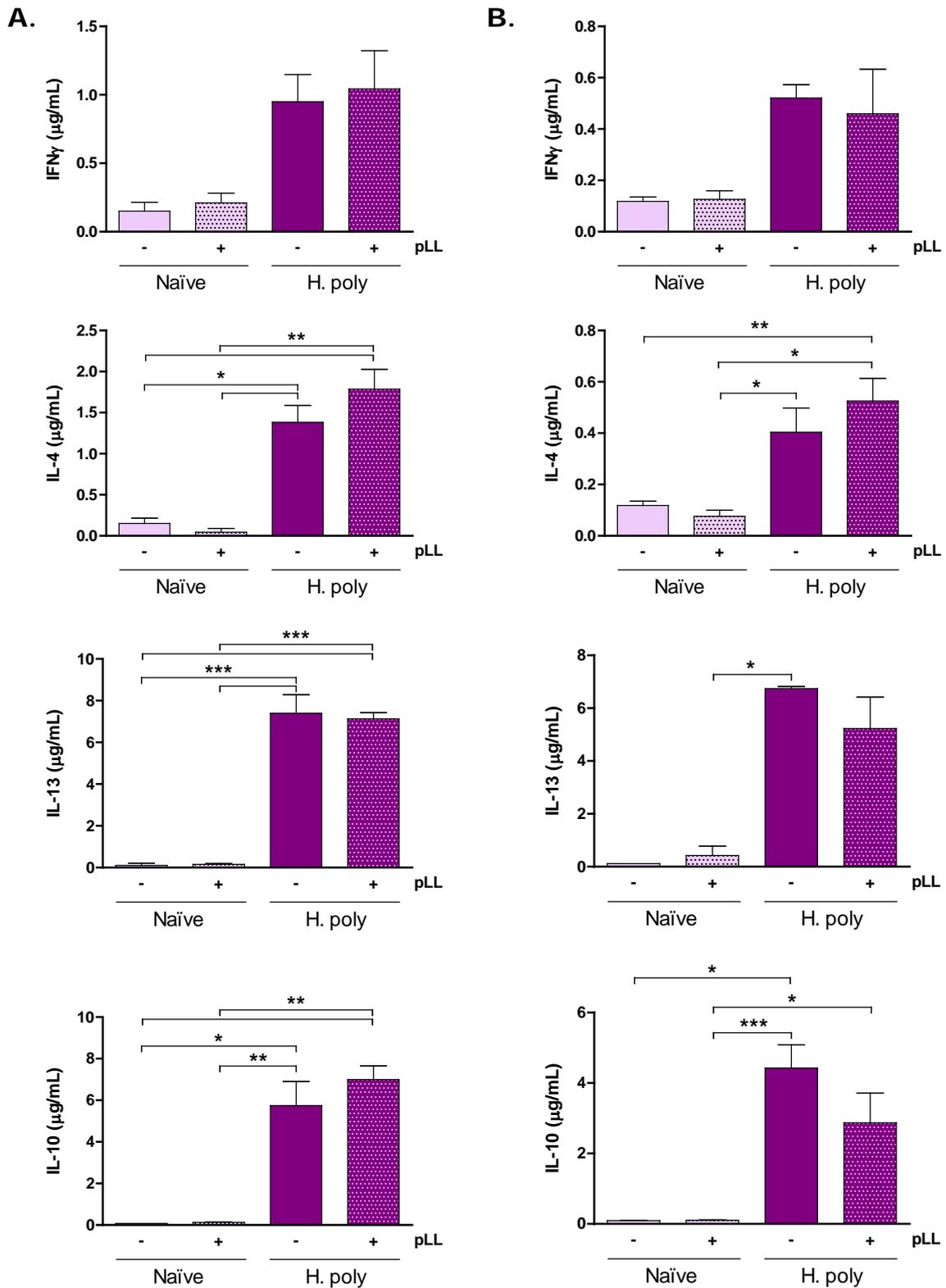


Figura 4.50 Re-estimulación *ex vivo* de linfocitos provenientes de animales infectados con *H. polygyrus* o *naive*, inyectados con pLL o PBS

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. Al día 9 y 14 de infección se analizaron las células de los ganglios mesentéricos. Sobre ellas se realizó un ensayo de re-estimulación *ex vivo* con anti-CD3 durante tres días. Se muestra promedio + SEM del nivel de citoquina en el sobrenadante para células del día 9 (A) o 14 (B) post infección al cabo de dicho ensayo. Se aplicó el test estadístico One-Way ANOVA con post-test de Tukey. *, ** y *** indican diferencias con grado de significancia $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

Se estudiaron también los linfocitos provenientes de los ganglios mesentéricos, ganglios drenantes del sitio infectado, a los días 9 y 14 de infección. Se analizó la expresión de citoquinas mediante citometría de flujo (Figura 4.49) y por ensayo de re-estimulación *ex vivo* con anti-CD3 (Figura 4.50).

Se muestran los resultados para linfocitos T CD4⁺ al día 14 de infección, por ser donde se observan las mayores diferencias. En cuanto a la producción de IFN γ o IL-17, citoquinas características de las respuestas Th1 y Th17, la infección con *H. poly* no indujo su expresión por encima de niveles basales. En estos animales, la administración de pLL tendió a aumentar la expresión de estas citoquinas, sin que ello alcanzara significancia estadística (Figura 4.49A).

Respecto a las citoquinas características de la respuesta Th2, la infección con *H. poly* indujo aumentos en la expresión de IL-4, IL-13 e IL-10 en LT CD4⁺. La administración de pLL tendió a potenciar su expresión, alcanzando este efecto significancia únicamente en el caso de IL-13 (Figura 4.49B).

Se realizó también un ensayo de re-estimulación de células provenientes del ganglio mesentérico con anti-CD3 y medida de citoquinas en sobrenadantes (Figura 4.50). Si bien se observó un aumento en el nivel de IFN γ para las muestras provenientes de animales infectados, el mismo no fue significativo. En estos casos, la administración de pLL no causó mayores efectos (Figura 4.50, primer panel). La infección con *H. poly* sí causó un aumento significativo en el nivel de IL-4, IL-13 e IL-10, tanto al día 9 como 14 de infección. Nuevamente, la administración de pLL no tuvo efectos significativos sobre la producción de estas citoquinas.

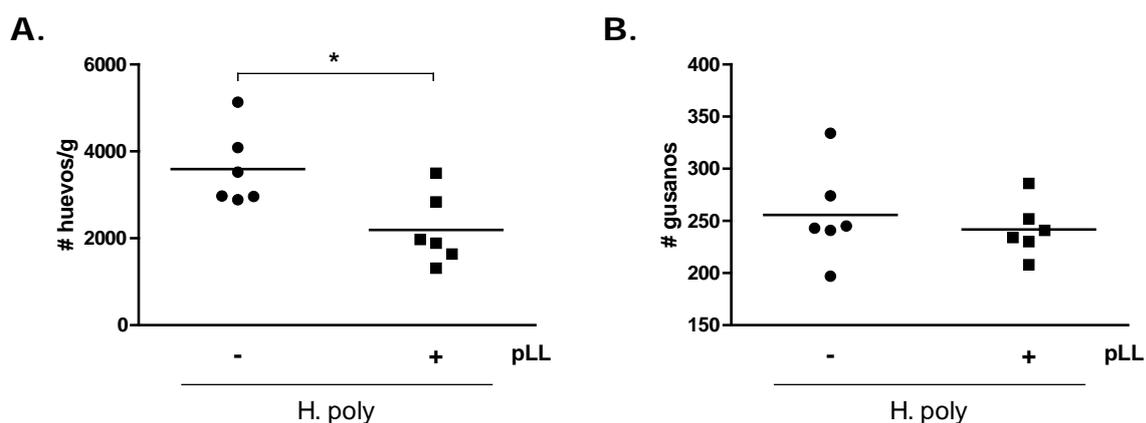


Figura 4.51 Número de huevos y gusanos de *H. polygyrus* luego de inyección de pLL o control

Se infectaron ratones C57BL/6 con *H. polygyrus* (*H. poly*) y se les administró pLL a los días 7 y 8 de infección. A los días 13 y 14 de infección se analizó el número de huevos en la materia fecal (A) y el número de gusanos en el intestino (B), respectivamente. Se aplicó el test estadístico de Student para comparar ambos grupos. * indica una diferencia con grado de significancia $p < 0,05$.

Finalmente, se analizó la presencia de huevos en materia fecal al día 13 y el número de gusanos al día 14 de infección (Figura 4.51). La administración de pLL redundó en un número significativamente menor de huevos por gramo de materia fecal al día 13. Este efecto no se trasladó al número de gusanos en el intestino al día 14, en el que no se apreciaron diferencias con la administración de pLL (Figura 4.51).

5. Discusión

5.1 Efectos de pLL

A lo largo de este trabajo se encontraron diversos efectos de pLL sobre células dendríticas y macrófagos en el contexto de estimulación con IL-4. Estos efectos fueron predominantemente inhibitorios de los ejercidos por IL-4 sobre estas células (expresión de Relm α , fosforilación de Akt, proliferación en un modelo *in vivo*), si bien también hubo efectos potenciadores de la acción de esta citoquina (expresión de Ym1 en un modelo *in vivo*). Además, algunos de estos efectos se extendieron al contexto de estimulación por los factores de crecimiento GM-CSF y M-CSF (inhibición de la fosforilación de Akt y de la proliferación *in vitro* e *in vivo*). El trabajo también puso en evidencia efectos de pLL aún en ausencia de IL-4 (desaparición de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, y reclutamiento de macrófagos y monocitos a dicha cavidad, en un modelo *in vivo*), solo observados previamente al inyectar dosis más altas de la preparación [74].

A continuación se discutirán una serie de aspectos de estos resultados que se consideran de especial interés.

5.1.1 Inhibición de la fosforilación de Akt y su posible relación con la inhibición de la activación alternativa

Se constató la capacidad de pLL de inhibir la fosforilación de Akt en la posición Ser473. La misma fue independiente del agonista de la vía empleado (IL-4, GM-CSF, M-CSF o LPS, a partir de resultados propios no mostrados y del grupo, no publicados), y también del tipo celular estudiado (BMDC o ThioM ϕ). Estas observaciones, si bien no descartan completamente la posibilidad de una acción de pLL a nivel de los receptores específicos de estos agonistas, la limitan a una contribución menor en caso de existir. Esto lleva en principio al razonamiento de que las señales iniciadas por la exposición a pLL deben inhibir la fosforilación de Akt de una o varias de las siguientes formas: (i) desfosforilando PIP3 y así impidiendo que Akt sea reclutado a membrana, (ii) inhibiendo mTORC2, complejo encargado de la fosforilación en la posición mencionada, o (iii) desfosforilando Akt directamente, actuando a través de las fosfatasas PHLPPs, que se conoce desfosforilan a Akt en Ser473 [75].

En el caso de la primera opción, pLL podría actuar a través de las fosfatasas SHIP o PTEN. Como se mencionó anteriormente, el grupo obtuvo resultados preliminares en el sistema de estimulación con LPS que apoyaban la

participación de SHIP1 en algunos de los efectos de pLL sobre BMDC en dicho contexto. En el presente trabajo se realizaron ensayos intentando determinar una posible contribución de SHIP1 a los efectos de pLL en el contexto de estimulación con IL-4, utilizando el inhibidor 3AC. Los resultados de este experimento, *in vivo*, mostraron que los efectos de pLL se mantenían aún en presencia del inhibidor, aunque se observó una tendencia a un efecto más débil específicamente en la potenciación de la expresión de Ym1 inducida por IL-4c. Podría existir entonces una contribución de la fosfatasa SHIP1 en lo que respecta a este efecto particular, pero debería comprobarse realizando repeticiones del experimento original y complementando con ensayos *in vitro*. Se debe considerar, sin embargo, que en este ensayo no se pudo comprobar la eficacia del tratamiento con 3AC en término de aumento de neutrófilos en sangre, como está reportado [68]. Por lo tanto, la repetición del experimento ensayando distintas dosis del inhibidor es necesaria para corroborar o refutar los resultados obtenidos en cuanto a la participación de SHIP1 en los efectos de pLL en otro contexto ya estudiado.

Además de los tres mecanismos planteados, existe una cuarta posibilidad para comprender la inhibición de Akt en respuesta a estímulos diversos, poco intuitiva *a priori*, pero que se ajusta bien a los resultados observados. La misma se basa en la retroalimentación negativa existente para la activación de mTORC1 a través de PI3K/Akt (Figura 5.1). El mecanismo se encontró a partir de ratones genéticamente deficientes en TSC1 o TSC2, proteínas que (como heterodímero) regulan negativamente mTORC1. Las células de estos ratones muestran actividad exacerbada de mTORC1 y activación de Akt inhibida en respuesta a diversos estímulos [76].

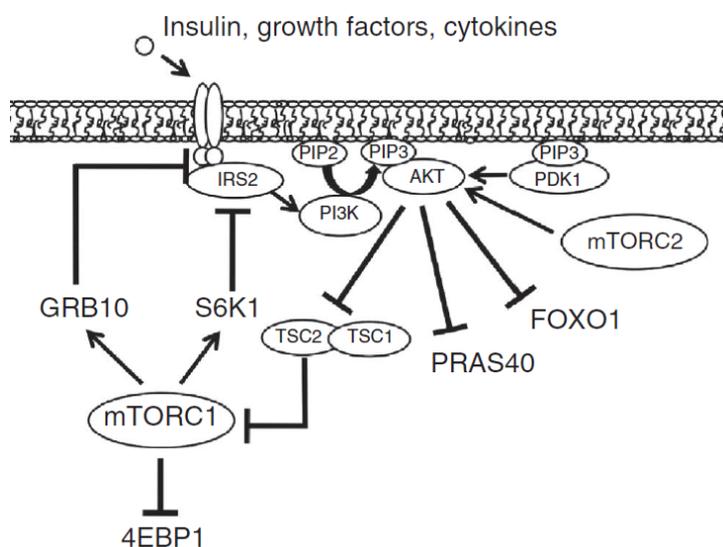


Figura 5.1 Mecanismo de retroalimentación negativa de PI3K/Akt a través de mTORC1

El asa de retroalimentación negativa consiste en que mTORC1, activado por Akt, fosforila por un lado a GRB10, que inhibe la activación de PI3K en respuesta a diversos RTKs, y por otro a la quinasa S6K1, que promueve la degradación del adaptador IRS2. Tomado de [54].

Byles et al. [54] reportan que este mecanismo de retroalimentación negativa funciona en macrófagos regulando las respuestas tanto a IL-4 como a LPS, lo que hace probable que tenga un papel en el contexto estudiado en esta Tesis. Más en detalle, los autores muestran que la hiperactivación de mTORC1 en ratones genéticamente deficientes en TSC1, da lugar a la hipofosforilación de Akt en las posiciones Thr308 y Ser473, e inhibición de la activación alternativa (en términos de actividad arginasa y expresión de Relm α y Ym1, pero no de expresión del receptor de manosa), inducidas por IL-4. La mutación en TSC1 da lugar a dicha inhibición de la activación alternativa sin afectar la señalización a través de STAT6. Esto coincide con lo ya reportado de que la vía de PI3K/Akt es necesaria para este tipo de activación y más aún, que ciertos marcadores son más sensibles a la señalización por dicha vía (Relm α y en menor medida Ym1 y Arginasa1) que otros (MR) [44, 52, 53].

Byles et al. [54] también muestran que la retroalimentación negativa afecta fuertemente la fosforilación de Akt en respuesta a LPS, si bien el mecanismo molecular detallado no se conoce. Otros artículos muestran que la deficiencia en TSC1/2 también da lugar a hipofosforilación de Akt en células dendríticas derivadas de médula ósea, generadas tanto en presencia de Flt3L como de GM-CSF [77, 78].

Considerando todo lo anterior, el mecanismo de retroalimentación negativa podría explicar los resultados de esta Tesis y más en general del grupo, si se postula que la exposición a pLL de alguna manera potencia la actividad de mTORC1, o de otro de los componentes involucrados en la retroalimentación mencionada. Se debería entonces ensayar los efectos de pLL sobre la fosforilación de Akt (en respuesta a IL-4 y a LPS), en presencia de rapamicina, inhibidor de mTOR. Si la suposición anterior es correcta, la inhibición farmacológica de mTOR (a dosis de rapamicina bajas, que selectivamente afectan a mTORC1) debería revertir la inhibición de la fosforilación de Akt causada por exposición a pLL.

Es altamente probable que la inhibición de la inducción de marcadores de activación alternativa observada en presencia de pLL se deba a la inhibición de la activación de Akt. En efecto, el patrón de inhibición de la expresión de Relm α y la actividad arginasa, sin modificación de la expresión del receptor de manosa, observado en este trabajo se observó también en los ratones *knock out* para TSC1 [54] en los que, como se dijo, la vía de STAT6 está intacta y la de PI3K/Akt inhibida. Estos autores obtuvieron resultados similares con dos inhibidores químicos de Akt (si bien no reportan expresión de MR en estos casos). Como ya se mencionó, estos resultados son coherentes con los

reportados antes por *Rückerl et al.* [53] en ThioM ϕ , y por *Heller et al.* [44] y *Weisser et al.* [52] en BMDM, y más recientemente también por *Barret et al.* [45]. En los experimentos antes planteados empleando rapamicina junto con pLL, se deberían entonces analizar también los niveles de marcadores de activación alternativa, en particular Relm α .

Se debe mencionar que el artículo reciente de *Barret et al.* [45] muestra además que existe en macrófagos un mecanismo de retroalimentación positiva en la vía de PI3K/Akt a través de la producción de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, del inglés *insulin-like growth factor 1*). La producción de esta proteína depende, y a su vez activa, esta vía. Además, reportan que los macrófagos producen IGF-1, y por ende activan la vía de PI3K/Akt, ante la adición de nutrientes (cambio de medio de cultivo). Esta observación pone aún más en evidencia lo complejo del sistema empleado en esta Tesis, y además avala el procedimiento de "hambreado" de las células realizado previo a la estimulación con IL-4 o factores de crecimiento para estudiar la fosforilación de Akt.

Si efectivamente la inhibición de la activación alternativa causada por exposición a pLL se debe a inhibición de la vía de PI3K/Akt, entonces podemos especular que la fosforilación de Akt debe estar inhibida para la posición Thr308 además de la posición Ser473 analizada. De hecho, *Byles et al.* [54] muestran que en BMDM, la disrupción del complejo mTORC2 y consiguiente impedimento de la fosforilación de Akt en la posición Ser473 no tiene efecto sobre la activación alternativa de estas células en presencia de IL-4 *in vitro*. A su vez, si la exposición a pLL inhibe la fosforilación de Akt en ambas posiciones, entonces las opciones mecánicas para lograrlo basadas en la hidrólisis de PIP3 y/o la vía de retroalimentación negativa a través de mTORC1 son las más probables. En este trabajo se intentó estudiar la fosforilación de Akt en la posición Thr308 sin éxito. Esta fosforilación es más lábil que la de la posición Ser473 [79] y se especula que los inhibidores de fosfatasa presentes en el *buffer* de lisis, que no incluyen inhibidores de las fosfatasa PP2A (principales fosfatasa de Akt en Thr308 [79]), no son capaces de impedir su desfosforilación. Se planea incorporar el inhibidor de estas fosfatasa, el ácido okadaico, al *buffer* de lisis en futuros ensayos.

Si bien no se ha mencionado hasta el momento, se debe considerar que Akt presenta 3 isoformas. Las herramientas empleadas en nuestro trabajo, así como en los otros trabajos citados hasta el momento en esta discusión, no discriminan entre isoformas de Akt. Sin embargo, datos publicados sugieren que es la isoforma Akt-1 la que es necesaria para la activación alternativa, mientras que

por el contrario la isoforma Akt-2 promovería la activación clásica [80]. Además, está reportado que Akt-1 es la isoforma predominante en BMDC [81], por lo cual, al menos en los ensayos con este tipo celular, la inhibición de la fosforilación de Akt observada probablemente refleje cambios en Akt-1 principalmente, justamente la isoforma necesaria para la activación alternativa.

En suma, surge la hipótesis que pLL podría inhibir la vía de PI3K/Akt, y los elementos de la activación alternativa que dependen de esta vía, a consecuencia de una hiperactivación del complejo mTORC1. Esta hipótesis puede ser evaluada de forma relativamente sencilla, empleando el inhibidor rapamicina.

5.1.2 Relación entre inhibición de la fosforilación de Akt e inhibición de la proliferación celular

Utilizando inhibición farmacológica de Akt, *Rückerl et al.* [53] muestran que la proliferación de macrófagos inducida por IL-4c *in vivo* depende de la vía de PI3K/Akt. Similarmente, *Wang et al.* [78] muestran que la proliferación de BMDC en respuesta al factor homeostático de crecimiento Flt3L, también medida por incorporación de BrdU, está inhibida en células TSC1 *knock out*, que como ya se dijo, presentan hipofosforilación de Akt. Considerando lo anterior, es muy probable que los efectos de inhibición de la fosforilación de Akt y de inhibición de la proliferación en presencia de pLL observados tengan una relación causal. Esto no significa que la hipofosforilación de Akt sea el único factor contribuyente a la baja proliferación. De hecho, *Wang et al.* [78] observan que la deficiencia en TSC1 da lugar a un defecto en proliferación mucho más profundo que la falta de complejo mTORC2 (con consiguiente falta de fosforilación de Akt en Ser473).

La hipótesis que la hipofosforilación de Akt observada en presencia de pLL determine, o contribuya a, la inhibición de la proliferación observada no fue evaluada directamente en nuestro trabajo.

Una opción para evaluar esta hipótesis sería realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando factores de crecimiento o IL-4c, respectivamente, en combinación con pLL, en presencia o ausencia de activadores o inhibidores de Akt (por ejemplo SC79 [82] o triciribina, respectivamente). Estos ensayos podrían permitir determinar si la inhibición de la proliferación causada por pLL se revierte en un contexto de activación artificial de Akt, o si es imitada en presencia de inhibidores químicos de Akt, revelando una contribución de dicha quinasa en el efecto observado. También sería útil medir el nivel de fosforilación de GSK3, así como los efectos de inhibidores químico de esta quinasa, en células estimuladas

con factores de crecimiento o IL-4 en presencia de pLL. Como se mencionó en la introducción, GSK3 es un blanco de Akt que controla varios factores que regulan el pasaje de fase G1 a S [50]. En células dendríticas estimuladas por LPS se observó que pLL causa hipofosforilación de GSK3, lo que es esperable dada la hipofosforilación de Akt (Á. Pittini, resultados no publicados). Es razonable especular que la hipofosforilación de GSK3, que la vuelve más activa, regule negativamente la entrada en fase S, contribuyendo a la inhibición de la proliferación en presencia de pLL.

También resultaría útil la medición de Akt fosforilado *ex vivo* en células provenientes de ratones estimulados con IL-4c en presencia o ausencia de pLL. Estos ensayos requerirían de un método de detección de Akt fosforilado lo suficientemente sensible como para ver una señal proveniente de células individuales. Hasta el momento no se ha conseguido detectar Akt fosforilado en estas condiciones con los reactivos disponibles. La detección de Akt fosforilado mediante *western blot* sobre estas células no sería una opción viable, ya que requeriría un proceso de selección del tipo celular específico, por adherencia o *sorting*, que sin duda afectaría el estado de fosforilación de Akt en la muestra. Aun en caso de poder detectarlo, habría que comprobar si las cinéticas de ambos eventos (fosforilación de Akt y proliferación celular) permiten la evaluación de ambos parámetros sobre una misma célula.

Una dificultad adicional para investigar esta potencial relación de causalidad es que no existe un buen modelo *in vitro* para macrófagos residentes, población sobre la cual pLL mostró mayor efecto en cuanto a inhibición de la proliferación inducida por IL-4c *in vivo*. La utilización de macrófagos peritoneales provenientes de ratones sin estimular, si bien es la más similar a un modelo de macrófagos residentes, tiene la limitante de que se obtienen aproximadamente 1×10^6 macrófagos por ratón (experiencia previa del grupo de trabajo). El trabajo *in vitro* sistemático con estas células significaría el sacrificio de demasiados animales. Una alternativa podría ser la purificación de macrófagos provenientes de ratones inoculados con IL-4c. Este tratamiento induce un aumento considerable en número de macrófagos residentes, compatible con el necesario para el trabajo *in vitro*, pero además los polariza hacia un fenotipo de activación alternativa [35]. Si bien se sabe que los macrófagos *in vivo* tienen cierta plasticidad y pueden reprogramarse a otros fenotipos de activación [15], no hay evidencia de que la activación inicial no genere cambios permanentes en la célula. Esto llevó a realizar ensayos *in vitro* con modelos de macrófagos, como los ThioM ϕ , que son modelo de macrófagos reclutados no activados. Sobre esta población pLL tiene efectos más débiles que sobre los residentes *in vivo*. Existen algunos trabajos que proponen la posibilidad de inducir un fenotipo similar al de

los macrófagos residentes en macrófagos reclutados [83], pero este sistema sería difícil de implementar con las herramientas disponibles al momento.

5.1.3 Sistema experimental empleando IL-4c

En este trabajo se utilizó el modelo de IL-4c para generar activación alternativa y proliferación, de macrófagos residentes principalmente, *in vivo*. El mecanismo de acción detrás del efecto proliferativo de la IL-4 no se conoce completamente, pero se especula que la IL-4 sensibiliza a las células para un factor de crecimiento aún no identificado que permite su proliferación, sabiéndose que dicho factor no es M-CSF [36]. Si este fuese el caso, y la inhibición de Akt efectivamente contribuyera al efecto de inhibición de la proliferación, especulamos que pLL sería capaz de inhibir esta proliferación “en dos puntos”: en la señalización de PI3K/Akt activada por IL-4 en primera instancia, y luego la activada por el factor de crecimiento no identificado.

Se decidió trabajar con un protocolo levemente distinto al reportado por *Jenkins et al.* (dos dosis con IL-4c 30 µg en los días 0 y 2, para luego analizar las células al día 4 [35, 36]), a la espera de poder observar un efecto inhibitorio por parte de pLL y en el entendido de que el sistema previamente reportado podría estar “saturado” en términos de actividad de IL-4. Se comprobó que aún a la dosis menor utilizada (única dosis con IL-4c 6 µg y análisis de las células 24 horas post inyección), se observan aumentos en la incorporación de BrdU en células peritoneales y pleurales, así como también en la expresión de marcadores de activación alternativa en estas células.

Durante la puesta a punto del sistema se definieron las poblaciones celulares de interés como células dendríticas ([CD19⁻ TCRβ⁻ SiglecF⁻ Ly6G⁻] F4/80⁻ CD11c⁺ MHCII alto), macrófagos residentes ([CD19⁻ TCRβ⁻ SiglecF⁻ Ly6G⁻] F4/80 alto), macrófagos reclutados ([CD19⁻ TCRβ⁻ SiglecF⁻ Ly6G⁻] F4/80 medio MHCII alto) y monocitos reclutados ([CD19⁻ TCRβ⁻ SiglecF⁻ Ly6G⁻] F4/80 medio MHCII bajo). La definición de macrófagos residentes y reclutados está de acuerdo con la reportada en otras publicaciones [84]. La definición de monocitos reclutados se basa en los datos no publicados de Stephen Jenkins (Universidad de Edimburgo), pero además es de sentido común, ya que se trata de células reclutadas a la cavidad peritoneal en respuesta a estímulos particulados, que expresan marcadores de la línea monocito-macrófago, pero expresan MHCII bajo, reflejando que no han completado su diferenciación. Además, la expresión de PDL2 y MR es ampliamente mayor en las poblaciones definidas como macrófagos y monocitos reclutados, que en la definida como macrófagos residentes (resultados no mostrados), lo que es coincidente con lo reportado por *Gundra et al.* [37]. La definición de células dendríticas empleada es amplia, y

probablemente incluye eventos correspondientes a macrófagos/monocitos F4/80 bajo CD11c+, de acuerdo a los resultados no publicados de Stephen Jenkins, y como parece quedar en evidencia luego con la respuesta observada de estas células a M-CSF (Figura 4.31). En forma similar, ya que no se ha reportado que las células dendríticas proliferen en respuesta a IL-4c, nuestra observación de incorporación significativa de BrdU en la población definida como células dendríticas podría explicarse por la presencia de macrófagos/monocitos en esta población. Sin embargo, luego de una clasificación más estricta basada en la ausencia de expresión de CD115 (receptor para M-CSF), igualmente se observó incorporación significativa de BrdU en células dendríticas en respuesta a IL-4c (resultados no mostrados), si bien los niveles alcanzados (4%) fueron menores que para macrófagos residentes (12%).

5.1.4 Inhibición de la proliferación celular

En este trabajo se vio que pLL es capaz de inhibir fuertemente la proliferación inducida por IL-4c o por Fc·M-CSF en macrófagos *in vivo*, así como también la de BMDC inducida por GM-CSF *in vitro*. Ensayos realizados por Dominik Rückerl (Universidad de Edimburgo) en colaboración con nuestro grupo mostraron también una inhibición en presencia de pLL de la proliferación de ThioM ϕ inducida por M-CSF *in vitro*. La imitación del resultado en los sistemas *in vitro* sugiere que no sería indispensable la participación de otros tipos celulares presentes en el sistema *in vivo* para el efecto anti-proliferativo observado.

En los experimentos *in vivo* se comprobó además que el efecto de pLL es local, ya que está ausente en células de la cavidad pleural luego de una administración intraperitoneal del material. Esta observación apunta a que el efecto depende de señales inter-celulares locales y/o de contacto directo con el material. Como ya se comentó, pLL contiene partículas de diversos tamaños, abarcando los rangos fagocitable y no fagocitable, por lo que este contacto directo podría involucrar contacto con la superficie celular y/o fagocitosis.

5.1.5 Diferencias entre efectos sobre la activación alternativa *in vitro* e *in vivo*

Se observó que la presencia de pLL inhibió fuertemente la expresión de Relm α en BMDC *in vitro*, con efectos menores o nulos sobre los demás marcadores de activación alternativa estudiados (Ym1, PDL2, MR, Arginasa 1). Estos resultados confirmaron estudios previos del grupo, no publicados, en los que se había

observado estos efectos sobre BMDC y BMDM, en ensayos de 18 horas de incubación con pLL e IL-4 [74] (determinaciones por PCR cuantitativa y ELISA de los sobrenadantes de cultivo). En los ensayos *in vivo* con IL-4c, se observó una inhibición leve de la expresión de Relm α en macrófagos en presencia de pLL, y una potenciación de la expresión de Ym1, en células dendríticas principalmente. Resultados similares se habían obtenido empleando inyección ip de huevos del helmintho *Schistosoma mansoni* como estímulo para activación alternativa, junto con pLL [74]. Además en nuestro trabajo se observó una inducción de expresión de Ym1 en células dendríticas y macrófagos frente a la inyección de pLL como único estímulo. Este efecto "adicional" también se observó en experimentos *in vivo* inyectando altas dosis de pLL (900 μ g/ratón) como único estímulo (C. Casaravilla, resultados no publicados).

La diferencia entre los efectos observados *in vitro* e *in vivo* podría explicarse por la presencia de otros tipos celulares en el sistema *in vivo*, que interactúen con las células dendríticas, macrófagos, IL-4c y pLL, afectando el resultado final observado. Algunos tipos celulares candidatos a mediar estos efectos son los mastocitos y/o eosinófilos. Los mastocitos están presentes constitutivamente en la cavidad peritoneal, mientras que hay cierto reclutamiento de eosinófilos a la cavidad luego de inyección con pLL (C. Casaravilla, resultados no publicados). Asimismo, estos tipos celulares son capaces de producir IL-4 e IL-13 [85], por lo que un posible efecto de pLL podría ser la inducción de la producción de IL-4/13 en estas células. Esta IL-4/13 endógena, adicional a la inoculada, llevaría a una inhibición en la expresión de Relm α más leve que la observada *in vitro*. En términos de Ym1, que *in vitro* es inhibida débilmente, el resultado sería la potenciación en la expresión observada. La inducción de IL-4/13 endógena también se reflejaría en un aumento en la expresión de Ym1 en células dendríticas y macrófagos, aún en ausencia de IL-4 exógena, efecto que no se observa en los sistemas *in vitro*. Un detalle técnico a comentar en relación a Ym1 es que se puso especial cuidado en comprobar que la proteína detectada fuese efectivamente la expresada intracelularmente por cada población celular de interés, mediante la implementación de controles en los cuales las células no fueron permeabilizadas. Esto es especialmente importante al tratarse de muestras provenientes de ensayos *in vivo*, donde presumiblemente las células dendríticas y macrófagos/monocitos podrían haber estado en contacto con Ym1 secretada por otros tipos celulares como los neutrófilos [26], que podría unirse fuerte pero inespecíficamente por su actividad lectina a la superficie celular [24].

Coincidente con la hipótesis que la inyección de pLL además de antagonizar efectos de la IL-4 sobre macrófagos/monocitos y células dendríticas induzca la expresión de la misma citoquina y/o IL-13 en otros tipos celulares, se ha reportado que la inoculación con materiales particulados carentes de agonistas de TLR, como alúmina y micro-partículas de titanio, induce la expresión de marcadores de activación alternativa en macrófagos [86].

5.2 Comparación entre pLL y materiales particulados sintéticos

Se elaboró una tabla comparativa con los resultados del trabajo con pLL, Superosa 12 o Sephadex G100 (Tabla 5.1). Como se aprecia, ninguno de los dos materiales particulados sintéticos ensayados fue capaz de imitar todos los efectos de pLL. La exposición a Superosa 12 dio lugar a una fuerte inhibición de la fosforilación de Akt inducida por M-CSF en ThioM ϕ , sin efecto claro sobre la proliferación inducida por IL-4c *in vivo*. En cambio, la exposición a Sephadex G100 no generó cambios claros en la fosforilación de Akt (si bien se apreció una inhibición leve de la fosforilación inducida por GM-CSF o por IL-4 en BMDC) mientras que sí inhibió la proliferación inducida por IL-4c *in vivo*.

Resulta evidente que se trata de un escenario complejo que amerita un estudio más minucioso. Algunos aspectos de los resultados alcanzados hasta el momento se discuten en más detalle a continuación.

5.2.1 Inhibición de la proliferación celular

Resultados previos publicados muestran que la fagocitosis, o fagocitosis frustrada, de diversos materiales particulados (partículas de poliestireno [87], adyuvante de Hjorth, alúmina [88], microcristales cálcicos [89]) promueve la proliferación de macrófagos, o potencia la proliferación inducida por M-CSF. Estos resultados difieren notoriamente con los obtenidos con pLL *in vitro*, aunque se debe notar que en nuestro sistema no se evaluó la fagocitosis del material, y que pLL comprende una muy importante proporción de partículas de tamaño no fagocitable. También es importante destacar que los materiales particulados mencionados no fueron evaluados *in vivo*.

En nuestros experimentos *in vivo* utilizando diferentes materiales particulados en combinación con IL-4c, tanto pLL como Sephadex G100 dieron lugar a una fuerte inhibición de la incorporación de BrdU en monocitos extravasculares. Además, ambos materiales particulados tendieron a inhibir este parámetro

también en macrófagos residentes, si bien no se alcanzó significancia estadística en los ensayos diseñados para comparar los materiales (sí en los ensayos en los que se probó pLL pero no Sephadex G100). La observación apunta a la posibilidad de que el efecto de pLL se deba a sus partículas no fagocitables, y quizás que las partículas (hidrofílicas) no fagocitables en general sean capaces de inhibir la proliferación de macrófagos *in vivo*. En la idea previa de que la inhibición de la proliferación en presencia de pLL está relacionada con la inhibición de la activación de Akt, sorprende entonces que Sephadex G100 no mostró clara capacidad de inhibir la activación de dicha quinasa. Esto podría deberse, como ya se comentó, a que no se dispuso de un modelo *in vitro* apropiado de macrófagos peritoneales residentes, ni se pudo observar la respuesta de fosforilación de Akt frente a estimulación con IL-4 *in vitro* en macrófagos.

5.2.2 Reclutamiento de células a la cavidad peritoneal

A lo largo de este trabajo se constató el moderado potencial inflamatorio de pLL a las dosis empleadas (30 y 10 μg masa seca). Este juicio se basa en el número de células recuperadas en la cavidad peritoneal, que no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento control, y en la ausencia de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, IL-12p40 e IL-6) en el lavado peritoneal 24 horas post inyección del material (datos no mostrados). Más aún, si bien la estrategia de *gating* utilizada no se enfoca en el estudio de neutrófilos, una clasificación aproximada de esta población celular basada en su granularidad y expresión de MHCII reveló que la administración de pLL en estas dosis no generó un aumento significativo en número de neutrófilos respecto a la condición basal. De todos modos, es claro que la inyección de pLL generó reclutamiento de monocitos y macrófagos. Además, como se comenta en la sección siguiente, la administración de pLL dio lugar a la desaparición de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (MDR, del inglés *macrophage disappearance reaction*), reacción poco comprendida pero asociada a estímulos inflamatorios [90]. Ambos resultados habían sido previamente observados por nuestro grupo luego de la inyección intraperitoneal de dosis mayores de pLL (a partir de los 150 μg / ratón [74])

En los ensayos *in vivo* comparando diversos materiales particulados no se incluyeron tratamientos con los materiales particulados en ausencia de IL-4c, por lo que no se puede comentar sobre el reclutamiento celular inducido por cada material *per se*. De todas maneras, puede verse que Sephadex G100 fue el

material que generó un aumento significativo en números de macrófagos y monocitos reclutados, en comparación con IL-4c como único estímulo.

5.2.3 Desaparición de macrófagos residentes

El efecto más robusto de la inyección de pLL como único estímulo, o en combinación con IL-4c, fue una disminución del número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal. Este efecto fue comprobado en todos los experimentos *in vivo* realizados durante este trabajo, desarrollados en distintos laboratorios y con distintos *batches* de pLL.

Este fenómeno no es para nada exclusivo a pLL, ya que se ha observado con la inyección de preparaciones inflamatorias en el peritoneo desde los años 1960 [90]. En esta reacción, muy poco comprendida, se sabe que existe adherencia de macrófagos residentes a las paredes de la cavidad peritoneal, y que se acompaña de reclutamiento de macrófagos desde el torrente sanguíneo. En nuestros experimentos, se observó para pLL pero no para las otras preparaciones particuladas a las dosis ensayadas. De hecho, el número de macrófagos residentes luego de tratamiento con IL-4c en combinación con pLL fue significativamente menor al correspondiente a cualquiera de las otras condiciones ensayadas (condición basal, IL-4c como único estímulo, o IL-4c en combinación con Superosa 12 o Sephadex G100).

5.3 Experimento de infección con *H. polygyrus*

Tal como se mencionó en los resultados (sección 4.11), el experimento de infección con *H. poly* en presencia o ausencia de pLL fue uno piloto, con un diseño experimental que requeriría de repetición, y de exploración de variantes del protocolo experimental para arrojar conclusiones válidas. De todas maneras, se obtuvieron resultados primarios interesantes que merecen ser comentados.

La infección transcurrió como se esperaba, con aumento en el número de células en la cavidad peritoneal, de la expresión de marcadores de activación alternativa sobre dichas células y de linfocitos positivos para la expresión de citoquinas típicamente Th2 (IL-4, IL-13, IL-5) respecto a animales sin infectar. La administración de pLL a los días 7 y 8 de infección causó un efecto diametralmente opuesto al esperado, mostrando una potenciación de las acciones de IL-4 en todos los parámetros estudiados (aumento de la incorporación de BrdU y en la expresión de marcadores de activación alternativa

en macrófagos residentes al día 9, aumento de la expresión de citoquinas Th2 en linfocitos de los ganglios mesentéricos al día 14 y disminución del número de huevos presentes en la materia fecal al día 13 de infección).

Las diferencias en el efecto de pLL observado respecto a lo observado en ensayos anteriores empleando IL-4c podrían responder al hecho de que se administraron dos dosis de pLL (en días sucesivos) en lugar de una única dosis. Para verificar si esta diferencia en el diseño experimental basta para dar lugar a resultados como los vistos en este experimento, se podrían realizar ensayos con el modelo de IL-4c empleando un diseño experimental análogo al de *H. poly*. Alternativamente, se podría repetir el experimento de infección con *H. poly* administrando una única dosis de pLL al día 8 de infección (24 horas antes del primer punto final).

Además se observó interacción entre los efectos de pLL y los de infección con *H. poly*, en el sentido de que algunos parámetros (número de células peritoneales recuperadas, porcentaje de linfocitos T positivos para IL-13) fueron aumentados por la combinación de pLL e infección a un grado claramente mayor que en respuesta a pLL como único estímulo o a la infección con *H. poly* por sí sola. Esto muestra que los efectos de pLL están fuertemente condicionados al contexto inflamatorio/inmunológico en el que se administre.

Un resultado novedoso es que la administración de pLL en la cavidad peritoneal tuvo efectos significativos sobre el resultado de la infección en el intestino. Este resultado es especialmente llamativo si se considera que no se observaron efectos de pLL en células pleurales luego de administración en la cavidad peritoneal. Se podría especular que la diferencia se debe a un contacto más íntimo entre la cavidad peritoneal y el intestino, con eventual diálogo entre las células de ambos sitios. Por otro lado, se debe considerar que los efectos restringidos a la cavidad de administración se observaron únicamente 24 horas post inyección, mientras que en este caso se midieron 5 y 6 días después de la última dosis de pLL. Una posibilidad entonces es que la administración de pLL potencie la producción de IL-4, con impactos a nivel sistémico, con una cinética lenta, no apreciable en los experimentos realizados anteriormente. Coherente con esta idea, se ha reportado recientemente que existe un efecto protector del IL-4c administrado por vía intraperitoneal en ratones C57BL/6 infectados con *H. poly* [91].

Como se dijo al principio, éste fue un experimento piloto, que requiere de repetición y ajustes del diseño experimental. De todas maneras, permitió observar claramente que la administración de pLL es capaz de influir en el resultado de infección con *H. poly*, avalando la idea de que podría tener efectos

moduladores en la infección con *E. granulosus*. Posiblemente los efectos en el contexto de infección con *E. granulosus* sean muy diferentes a los observados en infección con *H. poly*, ya que como se dijo, la respuesta a pLL depende del contexto inmunológico; además parece probable que *E. granulosus* secrete inmunomoduladores evolutivamente diseñados para complementar los efectos de las partículas de la LL de forma que éstas generen el mínimo de inflamación.

5.4 Conclusiones y perspectivas

En suma, el trabajo determinó que las propiedades de pLL, en cuanto a inhibición de la proliferación de macrófagos residentes combinada con poco reclutamiento de monocitos y fuerte desaparición de los macrófagos residentes, no son triviales, en el sentido de ser generales de todos los materiales particulados. Si se considera, como se mencionó en la introducción, que la liberación de partículas de la capa laminar es un proceso inevitable para el crecimiento del parásito, se puede plantear la hipótesis que estas partículas estarán optimizadas para generar el menor reclutamiento posible de células potencialmente dañinas para el parásito y además, inhibir la proliferación de aquellas que estén en el sitio de infección. Esto podría explicar la poca densidad de macrófagos observada en la proximidad de hidátides en infección natural [3], situación completamente opuesta a la observada por ejemplo para granulomas de huevos de *Schistosoma mansoni* [92].

Un posible mecanismo para la inhibición de la proliferación de macrófagos residentes (principalmente) observada es la inhibición de la vía de PI3K/Akt, tal como sugieren resultados de los sistemas *in vitro* con BMDC o ThioM ϕ . De todas maneras, la inhibición de la fosforilación de Akt difícilmente constituya el único mecanismo involucrado, como sugieren los experimentos *in vitro* e *in vivo* comparando los efectos de exposición a pLL con los de exposición a Superosa 12 o a Sephadex G100. Después de todo, la proliferación celular es un proceso altamente regulado, e inhibición de la fosforilación de Akt no es sinónimo de inhibición de toda la vía de PI3K (como se discutió en el contexto de la hipótesis de retroalimentación negativa), y mucho menos de inhibición de la proliferación. Además, aunque moderados, los efectos inflamatorios del material parasitario *in vivo* evidentemente generan mediadores que pueden influir en la proliferación de macrófagos/monocitos y células dendríticas.

Los resultados de la Tesis revelaron además que la exposición a pLL no tiene efectos sobre la fosforilación de ERK. Sin embargo, como ya se mencionó, el proceso de proliferación celular se encuentra sumamente regulado y sería

interesante estudiar si existen otras vías de señalización afectadas por la exposición a pLL.

En este trabajo se mostró también que la exposición a pLL inhibe la fosforilación de Akt en respuesta a estímulos diversos. Esto, junto con artículos publicados por otros grupos durante el curso de esta Tesis, llevó a la hipótesis que la inhibición observada se deba a una retroalimentación negativa a partir de activación de mTORC1, la cual tiene importantes consecuencias para la investigación del grupo globalmente. Son entonces experimentos centrales para la continuación de este trabajo los planteados anteriormente usando rapamicina, así como la evaluación de si la inhibición se extiende a la fosforilación en Thr308.

Importantemente, el grupo aún no cuenta con evidencia contundente sobre la potencial fagocitosis de partículas de pLL por macrófagos o células dendríticas *in vitro* o *in vivo*. Esta información podría provenir de estudios de microscopía en ensayos con pLL marcado con una sonda fluorescente, por ejemplo. Ensayos dirigidos a verificar la dependencia de contacto para los efectos observados en sistemas *in vitro* podrían complementar esta información.

Finalmente, y como ya se mencionó, el experimento con infección con *H. poly* buscó encontrarle una implicancia funcional a los efectos causados por exposición a pLL. Este experimento reveló que la administración de pLL a la cavidad peritoneal sí tiene un efecto sobre el resultado global de la infección con *H. poly*, a pesar de no ser el esperado originalmente. Resulta especialmente interesante repetir este experimento, incluyendo modificaciones al diseño experimental inicial, para comprobar si los efectos observados son consistentes.

	Agonista	Tipo celular	pLL	Superosa 12	Sephadex G100			
pAkt (Ser473)	LPS	BMDC	↓	?	?			
		ThioMφ	↓	?	?			
	IL-4	BMDC	↓	- (?)	- o ↓ (?)			
		ThioMφ	?	?	?			
	GM-CSF	BMDC	↓	-	↓ (?)			
M-CSF	ThioMφ	↓	↓	-				
pERK 1/2	GM-CSF	BMDC	-	↑	-			
	M-CSF	ThioMφ	-	- (?)	-			
Proliferación (incorporación de BrdU)	GM-CSF	BMDC	↓	?	?			
	M-CSF	ThioMφ	↓	?	?			
	IL-4c <i>in vivo</i>	Mφ	↓	- (?)	↓			
		mo-Mφ	- o ↓ (?)	-	-			
	Monocitos	DC	↓ leve	- (?)	↓			
		DC	↓ leve	?	?			
	Fc-M-CSF <i>in vivo</i>	Mφ	↓	?	?			
		mo-Mφ	↓	?	?			
Monocitos		↓ leve	?	?				
	DC	↓ leve	?	?				
Activación alternativa	IL-4c <i>in vivo</i>	Mφ	↓ Relmα	-	↓ (?)	Ym1 ?	-	Ym1 ?
		mo-Mφ	↓ Relmα	-	↓ (?)	Ym1 ?	-	Ym1 ?
		Monocitos	↓ Relmα	↑ Ym1	↓ (?)	Ym1 ?	↓ (?)	Ym1 ?
		DC	-	↑ Ym1	Relmα ?	Ym1 ?	Relmα ?	Ym1 ?
Reclutamiento de células	IL-4c <i>in vivo</i>		Si		Si		Si	
MDR	IL-4c <i>in vivo</i>		Si		No		No	

Tabla 5.1 Comparación de los efectos de exposición a pLL, Superosa 12 y Sephadex G100

Se detallan los efectos observados por exposición pLL, Superosa 12 o Sephadex G100, en combinación con diversos estímulos, en sistemas *in vitro* e *in vivo*. ↓ indica inhibición, ↑ indica potenciación, - indica efecto nulo. Se colocó un signo de interrogación (?) en los casos en que no se cuenta con información, o en los casos en que el efecto reportado no fue consistente en los experimentos. En los casos en los que existió duda ente dos posibilidades, se indican ambas, con un signo de interrogación.

Abreviaciones: BMDC = células dendríticas derivadas de médula ósea; DC = células dendríticas; Fc-M-CSF = factor de crecimiento homeostático de los macrófagos fusionado a la porción Fc de un anticuerpo; IL-4 = interleuquina 4; IL-4c = complejo de IL-4; LPS = lipopolisacárido; MDR = reacción de desaparición de macrófagos residentes; mo-Mφ = macrófagos reclutados; Mφ = macrófagos residentes; pAkt = Akt fosforilado; pERK = ERK fosforilado; ThioMφ = macrófagos reclutados por inyección de medio tioglicolato

6. Referencias

1. Nakao, M., et al., *Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae)*. Int J Parasitol, 2013. **43**(12-13): p. 1017-29.
2. Torgerson, P.R., C. Carmona, and R. Bonifacino, *Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income*. Ann Trop Med Parasitol, 2000. **94**(7): p. 703-13.
3. Moro, P. and P.M. Schantz, *Echinococcosis: a review*. Int J Infect Dis, 2009. **13**(2): p. 125-33.
4. CDC, C.f.D.C.a.P. *Parasites - Echinococcosis - Biology*. [web site] 2012 december 2012; Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>.
5. McSorley, H.J. and R.M. Maizels, *Helminth infections and host immune regulation*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 585-608.
6. Bortoletti, G. and G. Ferretti, *Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of Echinococcus granulosus developed in hosts of different species*. Int J Parasitol, 1978. **8**(6): p. 421-31.
7. Rausch, R., *Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of Echinococcus species*. J Infect Dis, 1954. **94**(2): p. 178-86.
8. Diaz, A., et al., *The laminated layer: Recent advances and insights into Echinococcus biology and evolution*. Exp Parasitol, 2015.
9. Diaz, A., et al., *Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure*. Trends Parasitol, 2011. **27**(5): p. 204-13.
10. Diaz, A., et al., *Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology*. Trends Parasitol, 2011. **27**(6): p. 264-73.
11. Breijo, M., et al., *Echinococcus granulosus: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation*. Exp Parasitol, 2008. **118**(2): p. 188-96.
12. Barth, T.F., et al., *Sensitive and specific immunohistochemical diagnosis of human alveolar echinococcosis with the monoclonal antibody Em2G11*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(10): p. e1877.
13. Irigoín, F., *myo-inositolhexakisfosfato en la interfase hospedador-parásito en la hidatidosis*, in *Cátedra de Inmunología, Facultad de Química*2002, UdelaR.
14. Casaravilla, C., et al., *Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval Echinococcus granulosus*. Infect Immun, 2014. **82**(8): p. 3164-76.
15. Ruckerl, D. and J.E. Allen, *Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 113-33.
16. Diaz, A. and J.E. Allen, *Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3319-26.
17. Allen, J.E. and R.M. Maizels, *Diversity and dialogue in immunity to helminths*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 375-88.
18. Roediger, B. and W. Weninger, *Group 2 innate lymphoid cells in the regulation of immune responses*. Adv Immunol, 2015. **125**: p. 111-54.
19. Anthony, R.M., et al., *Protective immune mechanisms in helminth infection*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 975-87.
20. Chen, F., et al., *An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection*. Nat Med, 2012. **18**(2): p. 260-6.
21. Murphy, K.T., P. ; Walport, M., *Inmunología de Janeway*. 7th ed, ed. M.G. Hill2009.
22. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.

23. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
24. Nair, M.G., K.J. Guild, and D. Artis, *Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1393-9.
25. Allen, J.E., T.E. Sutherland, and D. Ruckerl, *IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 99-106.
26. Sutherland, T.E., et al., *Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1116-25.
27. Esser-von Bieren, J., et al., *Antibodies trap tissue migrating helminth larvae and prevent tissue damage by driving IL-4/alpha-independent alternative differentiation of macrophages*. PLoS Pathog, 2013. **9**(11): p. e1003771.
28. Cook, P.C., et al., *Alternatively activated dendritic cells regulate CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(25): p. 9977-82.
29. Jones, L.H., et al., *Modulation of dendritic cell alternative activation and function by the vitamin A metabolite retinoic acid*. Int Immunol, 2015.
30. Weitnauer, M., et al., *Bronchial epithelial cells induce alternatively activated dendritic cells dependent on glucocorticoid receptor signaling*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1475-84.
31. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
32. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
33. Louis, C., et al., *Specific Contributions of CSF-1 and GM-CSF to the Dynamics of the Mononuclear Phagocyte System*. J Immunol, 2015. **195**(1): p. 134-44.
34. Pixley, F.J. and E.R. Stanley, *CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(11): p. 628-38.
35. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
36. Jenkins, S.J., et al., *IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1*. J Exp Med, 2013. **210**(11): p. 2477-91.
37. Gundra, U.M., et al., *Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct*. Blood, 2014. **123**(20): p. e110-22.
38. Girgis, N.M., et al., *Ly6Chigh monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(6): p. e1004080.
39. Nascimento, M., et al., *Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis*. PLoS Pathog, 2014. **10**(8): p. e1004282.
40. Gour, N. and M. Wills-Karp, *IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease*. Cytokine, 2015.
41. Oh, C.K., G.P. Geba, and N. Molfino, *Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma*. Eur Respir Rev, 2010. **19**(115): p. 46-54.
42. Wills-Karp, M. and F.D. Finkelman, *Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways*. Sci Signal, 2008. **1**(51): p. pe55.
43. Kelly-Welch, A., E.M. Hanson, and A.D. Keegan, *Interleukin-4 (IL-4) pathway*. Sci STKE, 2005. **2005**(293): p. cm9.
44. Heller, N.M., et al., *Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages*. Sci Signal, 2008. **1**(51): p. ra17.
45. Barrett, J.P., et al., *Involvement of IGF-1 and Akt in M1/M2 activation state in bone marrow-derived macrophages*. Exp Cell Res, 2015. **335**(2): p. 258-68.

46. Hawkins, P.T. and L.R. Stephens, *PI3K signalling in inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1851**(6): p. 882-897.
47. Rohrschneider, L.R., et al., *Structure, function, and biology of SHIP proteins*. *Genes Dev*, 2000. **14**(5): p. 505-20.
48. Papakonstanti, E.A., et al., *Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 24): p. 4124-33.
49. Andrews, S., L.R. Stephens, and P.T. Hawkins, *PI3K class IB pathway*. *Sci STKE*, 2007. **2007**(407): p. cm2.
50. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
51. Zhang, Y., et al., *Kinase AKT controls innate immune cell development and function*. *Immunology*, 2013. **140**(2): p. 143-52.
52. Weisser, S.B., et al., *Alternative activation of macrophages by IL-4 requires SHIP degradation*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(6): p. 1742-53.
53. Ruckerl, D., et al., *Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo*. *Blood*, 2012. **120**(11): p. 2307-16.
54. Byles, V., et al., *The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2834.
55. Alberts, B.J., A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. , *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed 2014: Garland Sciences.
56. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(6): p. 320-8.
57. Liu, K. and M.C. Nussenzweig, *Origin and development of dendritic cells*. *Immunol Rev*, 2010. **234**(1): p. 45-54.
58. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 533-44.
59. Hamilton, J.A. and A. Achuthan, *Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(2): p. 81-9.
60. Bourette, R.P. and L.R. Rohrschneider, *Early events in M-CSF receptor signaling*. *Growth Factors*, 2000. **17**(3): p. 155-66.
61. Comalada, M., et al., *Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(8): p. 2257-67.
62. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. *J Immunol Methods*, 1999. **223**(1): p. 77-92.
63. Finkelman, F.D., et al., *Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes*. *J Immunol*, 1993. **151**(3): p. 1235-44.
64. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
65. Vadiveloo, P.K., *Macrophages--proliferation, activation, and cell cycle proteins*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(4): p. 579-82.
66. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
67. Liao, X., et al., *Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(7): p. 2736-49.
68. Brooks, R., et al., *SHIP1 inhibition increases immunoregulatory capacity and triggers apoptosis of hematopoietic cancer cells*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3582-9.

69. Reynolds, L.A., K.J. Filbey, and R.M. Maizels, *Immunity to the model intestinal helminth parasite Heligmosomoides polygyrus*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(6): p. 829-46.
70. Urban, J.F., Jr., I.M. Katona, and F.D. Finkelman, *Heligmosomoides polygyrus: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice*. *Exp Parasitol*, 1991. **73**(4): p. 500-11.
71. Urban, J.F., Jr., et al., *IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice*. *J Immunol*, 1995. **154**(9): p. 4675-84.
72. Anthony, R.M., et al., *Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites*. *Nat Med*, 2006. **12**(8): p. 955-60.
73. Filbey, K.J., et al., *Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(5): p. 436-48.
74. Casaravilla, C., *Capa laminar de la larva de Echinococcus granulosus: estructura e interacciones con macrófagos y células dendríticas*, in *Cátedra de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias2011*, UdelaR.
75. Newton, A.C. and L.C. Trotman, *Turning off AKT: PHLPP as a drug target*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014. **54**: p. 537-58.
76. Huang, J. and B.D. Manning, *A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes*. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 1): p. 217-22.
77. Pan, H., et al., *Critical role of the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1 in dendritic cell activation of CD4 T cells by promoting MHC class II expression via IRF4 and CIITA*. *J Immunol*, 2013. **191**(2): p. 699-707.
78. Wang, Y., et al., *Tuberous sclerosis 1 (Tsc1)-dependent metabolic checkpoint controls development of dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(50): p. E4894-903.
79. Yamada, T., et al., *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, an Akt1 kinase, is involved in dephosphorylation of Thr-308 of Akt1 in Chinese hamster ovary cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 5339-45.
80. Arranz, A., et al., *Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(24): p. 9517-22.
81. Park, D., et al., *An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(12): p. 1581-90.
82. Jo, H., et al., *Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(26): p. 10581-6.
83. Okabe, Y. and R. Medzhitov, *Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages*. *Cell*, 2014. **157**(4): p. 832-44.
84. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(10): p. 986-95.
85. Gessner, A., K. Mohrs, and M. Mohrs, *Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 1063-72.
86. Mishra, P.K., et al., *Micrometer-sized titanium particles can induce potent Th2-type responses through TLR4-independent pathways*. *J Immunol*, 2011. **187**(12): p. 6491-8.
87. Luo, Y., S.C. Tucker, and A. Casadevall, *Fc- and complement-receptor activation stimulates cell cycle progression of macrophage cells from G1 to S*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 7226-33.
88. Hamilton, J.A., R. Byrne, and G. Whitty, *Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(2): p. 226-32.
89. Hamilton, J.A., G. McCarthy, and G. Whitty, *Inflammatory microcrystals induce murine macrophage survival and DNA synthesis*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(4): p. 242-6.
90. Barth, M.W., et al., *Review of the macrophage disappearance reaction*. *J Leukoc Biol*, 1995. **57**(3): p. 361-7.

91. Huang, S.C., et al., *Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages*. Nat Immunol, 2014. **15**(9): p. 846-55.
92. Pearce, E.J. and A.S. MacDonald, *The immunobiology of schistosomiasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 499-511.