



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**“Análisis funcional de la interacción entre *Echinococcus granulosus* y los
receptores linfocitarios CD5 y CD6”**

Lic. Joaquín García Luna

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Junio 2022

**“Análisis funcional de la interacción entre *Echinococcus granulosus* y los
receptores linfocitarios CD5 y CD6”**

Tribunal:

Dra. Analía Rial

Dra. Estela Castillo

Dra. Teresa Freire

Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin
Director de Tesis

Dra. Sylvia Dematteis
Directora Académica

**“Análisis funcional de la interacción entre *Echinococcus granulosus* y los
receptores linfocitarios CD5 y CD6”**

Lic. Joaquín García Luna

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORES: Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin

Dra. Sylvia Dematteis

Área Inmunología

Departamento de Biociencias/Instituto de Química Biológica

Facultad de Química/Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, sobre todo a la cercana, que me tienen que bancar en el día a día. En segundo lugar, a Gus y a la Rubia, por ser dos grandes tutores, atentos y dispuestos al diálogo. En tercer lugar, a toda la “Casita de Adelante” del Laboratorio de Inmunología por la buena onda y compañerismo; especialmente a quienes han colaborado con este trabajo (Seba, Javi, Flo y Pau). En cuarto lugar, al resto del Laboratorio de Inmunología por el cálido ambiente de trabajo. En quinto lugar, a la gente del IDIBAPS de Barcelona, dónde logré llevar adelante la pasantía planificada a pesar de la pandemia y me hicieron sentir uno más desde el principio, tanto dentro como fuera del laboratorio, especialmente a Paco, María y Cris. En sexto lugar, a las agencias e instituciones de apoyo y financiadoras (ANII, CAP, PEDECIBA) y también a las integrantes del tribunal evaluador (Analía, Estela y Teresa) por haber dedicado su tiempo a la corrección de esta tesis. En séptimo lugar, a todos mis amigos y compañeros de mis círculos cercanos: a mis amigos ex compañeros del Colegio Yvyrá, a los de la música, a los del estadio y la cancha, a los integrantes de Katana Dojo, a los del Tu Madre Fútbol Club y a mis compañeros cercanos de la AUPP. En fin, a los amigos de la vida en general. Por último, y no por eso menos importante, a quienes me llevo de Facultad de Ciencias: un gran grupo de estudio, de joda y de amigos, que continúan siéndolo hasta hoy; y a Cami, que apareció el año pasado en un momento difícil y se ha convertido en la mejor compañía que uno puede tener. En definitiva, gracias a quienes han compartido y comparten parte de su tiempo conmigo, y sepan que es recíproco. Con cariño, ¡muchas gracias!

RESUMEN

Los receptores CD5 y CD6 forman parte de la Superfamilia de Receptores *Scavenger* Ricos en Cisteínas (SF-SRCR). Ambos se expresan básicamente en linfocitos T y linfocitos B1a, cumpliendo funciones moduladoras de la activación linfocitaria, y de reconocimiento de patógenos. Así, CD5 (pero no CD6) detecta componentes fúngicos, mientras que CD6 (pero no CD5) interactúa con estructuras bacterianas. Asimismo, ambos receptores han mostrado ser capaces de interactuar con componentes virales. De manera interesante, estudios pre-clínicos de infusión de las formas recombinantes solubles de sus ectodominios (denominadas rshCD5 y rshCD6) apoyan su potencial uso profiláctico/terapéutico en modelos murinos de sepsis fúngicas o bacterianas, respectivamente. Recientemente, y debido a su amplio espectro de ligandos microbianos conocidos, nuestro grupo exploró y demostró que CD5 y CD6 también son capaces de reconocer componentes del tegumento de protoscolec (PSC) del cestodo parásito *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.); agente etiológico de la equinococosis quística (EQ). La EQ es una zoonosis de distribución cosmopolita, focalizada principalmente en zonas con climas tropicales y sub-tropicales, donde suele generar impactos socio-económicos altamente negativos. Actualmente, la EQ integra la lista de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud; y es, de estas, la de mayor incidencia y prevalencia en nuestro país. En particular, la forma denominada EQ secundaria es consecuencia de la siembra interna de PSC en hospederos intermediarios infectados; y en humanos, puede ser un problema serio asociado al procedimiento quirúrgico de remoción de quistes hidáticos. En este sentido, nuestro grupo reportó exitosamente el efecto profiláctico derivado de la infusión intraperitoneal de rshCD5 o rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria. Este modelo, basado en la inoculación intraperitoneal de PSC viables en ratones inmunocompetentes, ha sido ampliamente utilizado y validado para diversos estudios relacionados a la inmunobiología de *E. granulosus* s.l. Así, en la presente tesis, analizamos la relevancia funcional, desde el punto de vista inmunológico, de la interacción entre los antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. y los receptores linfocitarios CD5 y CD6. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que los ligandos parasitarios para rshCD5 y rshCD6, así como la expresión en membrana de ambos receptores en el hospedero experimental, son relevantes para el desarrollo de la respuesta inmune temprana, inducida frente al estímulo con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. A su vez, permitieron demostrar que tanto rshCD5 como rshCD6 presentan, al menos *in vitro*, actividad protoscolicida intrínseca. Finalmente, los resultados obtenidos también permitieron sugerir que las moléculas rshCD5 y rshCD6, son capaces de inducir inmuno-modulación en el hospedero experimental infectado. Por lo tanto, y tomados en su conjunto, nuestros resultados indican que tanto los receptores CD5 y CD6, como sus ligandos parasitarios, cumplirían funciones relevantes en la interacción hospedero-parásito, al menos en el modelo murino de EQ secundaria.

ABSTRACT

The CD5 and CD6 receptors belong to the Cysteine-Rich Scavenger Receptor Superfamily (CRSR-SF). Both are mainly expressed in T and B1a lymphocytes, fulfilling functions that modulate lymphocyte activation as well as pathogen recognition. Thus, CD5 (but not CD6) detects fungal components, while CD6 (but not CD5) interacts with bacterial structures. Likewise, both receptors have been shown to interact with viral components. Interestingly, pre-clinical infusion studies of the soluble recombinant forms of their ectodomains (designated rshCD5 and rshCD6) support their prophylactic/therapeutic use in murine models of fungal or bacterial sepsis, respectively. Recently, and due to its broad spectrum of known microbial ligands, our group explored and showed that CD5 and CD6 are also able to recognize components present in the tegument of protoscoleces (PSC) from the parasitic cestode *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.); the etiologic agent of cystic echinococcosis (CE). CE is a zoonosis with a cosmopolitan distribution, mainly focused on areas with tropical and sub-tropical climates, where it usually generates highly negative socio-economic impacts. Currently, CE is included in the list of Neglected Tropical Diseases of the World Health Organization; and among them, it is the one with the highest incidence and prevalence in our country. In particular, the infection form called secondary CE is a consequence of the internal seeding of PSC within the infected intermediate hosts; and in humans, it can be a serious problem associated with the surgical procedure of hydatid cysts removal. In this sense, our group successfully reported the prophylactic effect derived from the intraperitoneal infusion of rshCD5 or rshCD6 in the murine model of secondary CE. This model, based on the intraperitoneal inoculation of viable PSC into immunocompetent mice, has been widely used and validated for various studies related to the immunobiology of *E. granulosus* s.l. Thus, in this thesis, we analyzed the functional relevance, from an immunological point of view, of the interaction between the tegumental antigens from *E. granulosus* s.l. PSC with CD5 and CD6 lymphocyte receptors. The results obtained confirmed that the parasitic ligands for rshCD5 and rshCD6, as well as the membrane expression of both receptors in the experimental host, are relevant for the development of the early immune response, induced against stimulation with tegumental antigens from *E. granulosus* s.l. PSC. In turn, they made it possible to demonstrate that both rshCD5 and rshCD6 have at least *in vitro*, intrinsic protoscolicidal activity. Finally, the results obtained also suggested that the rshCD5 and rshCD6 molecules are capable of inducing immunomodulation in the infected experimental host. Therefore, and taken as a whole, our results indicate that both the CD5 and CD6 receptors, as well as their parasitic ligands, would play relevant roles in the host-parasite interaction, at least in the murine model of secondary CE.

ABREVIATURAS

- ADAM: En inglés, “*a disintegrin and metalloproteinase*”
- ADCC: Citotoxicidad Celular Mediada por Anticuerpos (del inglés *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)
- AgB: Antígeno B
- AGE: Productos Finales de Glicación Avanzada
- AIM: En inglés, *Apoptosis inhibitor of macrophages* (también llamado, A π 6)
- ASGP: Asialoglicoproteína
- BCA: Ácido Bicinconínico
- BCR: Receptor de Células B
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- CCP: Péptido Cíclico Citrulinado
- CD: Grupo de Diferenciación
- CD5L: CD5 ligando, anteriormente llamada Sp α (Proteína Scavenger α)
- CDCP1: Proteína-1 con Dominio CUB
- CE: Región Extracelular
- Células NK: Células *Natural Killer*
- CIA: Artritis Inducida por Colágeno
- CLEC: Subfamilia de Receptores Lectina de Tipo C de Células NK
- CLEVER: En inglés, *Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor*
- CLR: Receptores lectina de tipo C
- CMV: Citomegalovirus
- Cy: Región Citoplasmática
- Cys: Cisteína
- DI.LA.VE.: Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino”
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNP: 2,4-dinitrofenol
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
- Dominio FEEL: En inglés, *fasciclin, EGFlite, laminin-type EGF-like and link domain*
- Dominio MAM: En inglés, “*meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu Domain*”
- Dominio CUB: En inglés, “*domain for complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1*”
- DTT: DL-Ditiotreitol
- E. granulosus* s.l.: *Echinococcus granulosus sensu lato*
- EGF: En inglés, *Epidermal Growth Factor*
- ELISA: En inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- EQ: Equinococosis quística
- ETD: Enfermedades Tropicales Desatendidas (del inglés: *Neglected Tropical Diseases*)
- FCS: En inglés, *fetal calf serum*
- Fc ϵ RI: Receptor del fragmento cristalizable (región Fc de las Ig) épsilon I

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

Gp: Glicoproteína

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

HARE: En inglés, *Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis*

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos

HMGB: En inglés, *High Mobility Group Box*

IDIBAPS: Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IgVH: Variable de Cadena Pesada de Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

ITAM-like: inmuno-receptor tipo motivo de activación basado en tirosina

IWGE: Grupo Informal de Trabajo sobre Equinococosis

LAMP: Familia de Proteínas de Membrana asociadas a lisosomas

LDL: En inglés, *Low-Density Lipoprotein*

LDLR: En inglés, *Low-Density Lipoprotein Receptor*

LIM: En inglés, *Lysosomal integral membrane protein*

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

LPS: Lipopolisacárido

LRP: En inglés, *LDL receptor-related protein*

LTA: Ácido Lipoteicoico

MAPK: Proteín-quinasa activada por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*)

MARCO: Receptor de Macrófagos con Estructura Colágena

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

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NaN₃: Azida de Sodio

NLR: Receptores de unión a nucleótidos y con dominios de oligomerización

NO (ON): Óxido Nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBMCs: Células Mononucleares de sangre periférica (del inglés: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: Buffer Fosfato Salino (del inglés, *Phosphate-buffered saline*)

PE: Ficoeritrina

PGN: Peptidoglicano

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Proteína DMBT1: Proteína Eliminada en tumores cerebrales malignos 1 (del inglés, *Deleted In Malignant Brain Tumors 1 protein*)

PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos (del inglés, *Pathogen Recognition Receptors*)

PSC: Protoscoleces

PSEx: Extracto de componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l.

RAGE: Receptor Para Productos Finales de Glicación Avanzada

shCD5 μ Tg: Ratones transgénicos que expresan constitutivamente una forma soluble del ectodominio de CD5 humano

RLR: Receptores de genes inducibles por ácido retinoico

RM: Resonancia Magnética

RS: Receptores barrenderos o *Scavenger*

rshCD5/rshCD6: Formas recombinantes solubles de los ectodominios de CD5 y CD6, respectivamente

SAG: En inglés, *S-arrestin gene*

SCARA-1: Receptor *Scavenger* A1 (nomenclatura inicial)

SCARF: Receptor *Scavenger* de Clase F (nomenclatura inicial)

SF-SRCR: Superfamilia de Receptores *Scavengers* Ricos en Cisteínas

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*)

SRCL-I: Receptor *Scavenger* con Dominio de Lectina de Tipo C I (nomenclatura inicial)

SRCR: dominio de Receptores *Scavengers* Ricos en Cisteína

TAP: En inglés, *Transporter associated with antigen processing complex*

TC: Tomografía Computarizada

TCR: Receptor de Células T

TGF: En inglés, *Transforming growth factor*

TLR: Receptores de tipo Toll

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

US: Ultrasonido

UTR: Región No Traducida

VHC (HCV): Virus de la Hepatitis C

VIH (HIV): Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLDLR: En inglés, *Very Low-Density Lipoprotein Receptor*

ÍNDICE

Capítulo 1

1.	Introducción	13
1.1.	Receptores <i>scavenger</i> (RS)	13
1.2.	La Superfamilia de Receptores <i>Scavenger</i> Ricos en Cisteína	18
1.3.	Los Receptores <i>scavenger</i> CD5 y CD6	19
1.4.	CD5 y CD6 como receptores de reconocimiento de patógenos	22
1.5.	Parásitos helmintos	25
1.5.1.	Características generales de la inmunidad contra parásitos helmintos	27
1.6.	<i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	29
1.6.1.	Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i> s.l.	30
1.6.2.	Epidemiología de la equinococosis quística	33
1.6.3.	Diagnóstico y tratamiento de la equinococosis quística	34
1.6.4.	Respuesta inmune en humanos con EQ	36
1.7.	Modelo murino de equinococosis quística secundaria	39
2.	Relevancia del tema de estudio y antecedentes inmediatos	45
3.	Hipótesis y Objetivos	47

Capítulo 2

4.	Materiales y Métodos	48
4.1.	Proteínas recombinantes	48
4.2.	Parásitos	48
4.3.	Cultivo <i>in vitro</i> de PSC con las moléculas rshCD5 y rshCD6	48
4.4.	Animales	49
4.5.	Protocolos de ética	49

4.6.	Administración de las moléculas rshCD5 o rshCD6 e infección experimental	49
4.7.	Obtención de sueros	50
4.8.	Obtención de células de bazo	50
4.9.	Obtención de células y exudados peritoneales	50
4.10.	Obtención de componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. (PSEx)	50
4.11.	Co-inoculación de ratones Balb/c con (PSEx + rshCD5) o (PSEx + rshCD6)	51
4.12.	Cuantificación relativa de citoquinas por RT-qPCR	51
4.12.1.	Extracción de ARN	51
4.12.2.	Tratamiento con DNAsa	52
4.12.3.	Retrotranscripción	52
4.12.4.	qPCR	52
4.13.	Citometría de flujo	52
4.14.	Determinación del título de anticuerpos específicos y poli-reactivos por ELISA	53
4.15.	Análisis estadísticos	54
5.	Resultados	55
5.1.	Evaluación de la actividad anti-parasitaria intrínseca de las moléculas rshCD5 y rshCD6	55
5.2.	Análisis de los efectos inducidos por la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune del hospedero experimental infectado por <i>E. granulosus</i> s.l.	57
5.2.1.	Efectos de la administración exógena de las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la expresión de transcritos para citoquinas a nivel sistémico y a nivel local, en ratones Balb/c experimentalmente infectados por <i>E. granulosus</i> s.l.	57
5.2.2.	Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre el perfil fenotípico celular peritoneal durante la infección secundaria experimental por <i>E. granulosus</i> s.l.	66
5.2.3.	Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la producción sistémica y local de anticuerpos específicos y poli-reactivos en la etapa temprana de la infección secundaria por <i>E. granulosus</i> s.l.	71
5.3.	Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune contra antígenos del tegumento de <i>E. granulosus</i> s.l.	76

5.3.1. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de citoquinas en células peritoneales de ratones Balb/c	76
5.3.2. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre el perfil fenotípico de las células peritoneales de ratones Balb/c	79
5.3.3. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la producción de anticuerpos poli-reactivos y específicos en ratones Balb/c	84

Capítulo 3

6. Materiales y Métodos	88
6.1. Proteínas recombinantes	88
6.2. Animales	88
6.3. Protocolos de ética	88
6.4. Obtención de componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. (PSEx)	88
6.5. Conjugación de componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. (PSEx) a isotiocianato de fluoresceína (FITC)	88
6.6. Análisis <i>in vivo</i> de la unión de componentes del tegumento PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. a células peritoneales de ratones C57BL/6	89
6.7. Análisis <i>ex vivo</i> de la unión de componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. (PSEx) y células CD19 ⁺ o células F4/80 ⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57BL/6	89
6.8. Ensayos de competencia por la interacción con componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. (PSEx) entre las moléculas rshCD5 o rshCD6 y células peritoneales de ratones C57BL/6	90
6.9. Co-inoculación de (PSEx y rshCD5) o (PSEx y rshCD6) en ratones C57BL/6	90
6.10. Interacción entre las células CD19 ⁺ o F4/80 ⁺ peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes con componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l.	90
6.11. Análisis de la respuesta inmune de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l.	90
6.12. Obtención de células y exudados peritoneales	91
6.13. Cuantificación relativa de citoquinas por RT-qPCR	91
6.14. Citometría de flujo	91

6.15.	Determinación del título de anticuerpos específicos o poli-reactivos por ELISA	91
6.16.	Análisis estadísticos	91
7.	Resultados	92
7.1.	Interacción <i>in vivo</i> entre antígenos del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. y diferentes tipos celulares de la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6	92
7.2.	Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune de ratones C57Bl/6	97
7.2.1.	Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones C57Bl/6	97
7.2.2.	Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones C57Bl/6	100
7.2.3.	Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre el fenotipo de las células de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6	101
7.2.4.	Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta de anticuerpos específicos y poli-reactivos de ratones C57Bl/6	106
7.3.	Interacción entre los componentes del tegumento de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l. y las células peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes	108
7.4.	Análisis de la respuesta inmune de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con antígenos tegumentarios de PSC de <i>E. granulosus</i> s.l.	111
7.4.1.	Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx	111
7.4.2.	Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx	114
7.4.3.	Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx	117
7.4.4.	Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx	118
7.4.5.	Análisis del fenotipo de las células peritoneales CD19 ⁺ en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx	119

7.4.6. Análisis del fenotipo de las células peritoneales CD19 ⁺ en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx	121
7.4.7. Análisis del fenotipo de las células peritoneales F4/80 ⁺ en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx	123
7.4.8. Análisis del fenotipo de las células peritoneales F4/80 ⁺ en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx	124
7.4.9. Análisis de la respuesta peritoneal de anticuerpos específicos y poli-reactivos en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx	126
7.4.10. Análisis de la respuesta peritoneal de anticuerpos específicos y poli-reactivos en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx	128

Capítulo 4

8. Discusión	13
9. Bibliografía	145
Anexo 1. Citometría de Flujo: Estrategia de <i>gating</i> para células B	161
Anexo 2. Citometría de Flujo: Estrategias de <i>gating</i> para células T y NK	162
Anexo 3. Citometría de Flujo: Estrategia de <i>gating</i> para monocitos/macrófagos	163
Anexo 4. Artículo de primer autor publicado en una revista internacional arbitrada	164

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento temprano de patógenos por parte del sistema inmune se basa principalmente en la detección de estructuras moleculares de microorganismos caracterizadas por ser altamente conservadas y ampliamente distribuidas entre diversas especies patógenas (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estas estructuras colectivamente son detectadas por receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, del inglés *Pathogen Recognition Receptors*), los cuales son un grupo limitado de receptores no-polimórficos, codificados en la línea germinal y con distribución no-clonal pertenecientes a diversas familias proteicas. Entre estas familias destacan los receptores de tipo Toll (TLR), los receptores lectina de tipo C (CLR), los receptores de unión a nucleótidos y con dominios de oligomerización (NLR), los receptores de genes inducibles por ácido retinoico (RLR) y los receptores barrenderos o *scavenger* (RS) [Medzhitov, 2007].

1.1. Receptores *scavenger* (RS).

Los RS son un grupo de proteínas con distintos niveles de relacionamiento estructural, que suelen expresarse predominantemente en células mieloides y que presentan un amplio espectro de funciones biológicas. Los RS se definieron originalmente por su capacidad de interactuar con lipoproteínas de baja densidad modificadas. Sin embargo, son capaces de reconocer una amplia variedad de ligandos tanto endógenos (modificados o no) como exógenos (PAMP). La gran mayoría de los ligandos comparten como característica su naturaleza polianiónica y, por lo tanto, hoy en día el término RS define a aquellas glicoproteínas (solubles o unidas a membrana) involucradas en el reconocimiento de moléculas con carga neta negativa. Este reconocimiento suele promover la eliminación de componentes exógenos y/o endógenos mediante mecanismos que incluyen endocitosis, fagocitosis, adhesión y señalización [Sarrías *et al.*, 2004; Prabhu Das *et al.*, 2017]. Asimismo, la amplia variedad de ligandos reconocidos por los RS hace que estos participen en la regulación de diversos estados fisiopatológicos, como son diversas enfermedades neurodegenerativas, trastornos metabólicos como la diabetes, la aterosclerosis, enfermedades infecciosas, inmunovigilancia y cáncer, entre otros [Zani *et al.*, 2015]. Por ello, los RS han

sido objeto de múltiples estudios que los sugieren como potenciales receptores blanco para diversas intervenciones terapéuticas [PrabhuDas *et al.*, 2017].

En la actualidad, los RS se suelen clasificar de acuerdo con sus secuencias de aminoácidos compartidas. Inicialmente, algunos RS se identificaron como homólogos a otros receptores y por eso se les asignó el nombre de estos (por ejemplo: MSR1, RS-AI, CD204, y SCARA-1). Por otro lado, existen proteínas con actividad de RS que se nombraron originalmente en función de otros criterios y por eso no se incluyeron en la nomenclatura general inicial de RS (por ejemplo: RAGE, LRP1, LRP2, ASGP, CD163, SR-PSOX y CXCL16). Por ello, y debido a que en la actualidad se siguen descubriendo e identificando nuevos RS, distintas sociedades científicas de investigadores en este campo han sugerido nomenclaturas sistemáticas y estandarizadas para su adopción por parte de la comunidad científica en general. Así, en la actualidad se reconocen doce clases de RS que van desde la clase A hasta la L [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase A (RS-A). Los RS de clase A (RS-A) se expresan principalmente en macrófagos tisulares y en ciertos subtipos de macrófagos como las células de Kupffer hepáticas y los macrófagos tímicos, tanto medulares como corticales. También han sido identificados en las vénulas del alto endotelio y en subpoblaciones de células dendríticas. Los miembros de esta clase tienen una estructura similar, compuesta por una cola citoplásmica N-terminal, un dominio transmembrana, una región espaciadora, un dominio α -hélice, un dominio de colágeno y un dominio C-terminal de Receptor Scavenger Rico en Cisteína (SRCR, del inglés *Scavenger Receptor Cysteine Rich*). El RS prototipo de esta clase es RS-AI, el cual a su vez presenta tres isoformas que son variantes de *splicing* alternativo del ARNm: RS-AI, RS-AII y RS-AIII. Otros miembros de esta clase incluyen al receptor de macrófagos con estructura colágena (MARCO), receptor scavenger A5 (SCARA-5) y el receptor scavenger con dominio de lectina de tipo C (SRCL-I/II) [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase B (RS-B). Los RS incluidos en la clase B son RS-BI (y su forma de *splicing* alternativo RS-BII), CD36 y LIMP2. Todos ellos se caracterizan por poseer dos dominios transmembrana que flanquean un bucle extracelular, con sus extremos tanto N- como C-terminales ubicados en el citoplasma celular. El dominio extracelular de estos receptores se encuentra altamente N-glicosilado, y esta modificación les proporciona protección frente a las proteasas que generalmente se encuentran en los sitios inflamados [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase C (RS-C). Los RS de clase C se describieron originalmente en *Drosophila* y se encuentran solamente en insectos como moscas y mosquitos, formando parte de un rudimentario sistema inmune innato. Por ejemplo, la falta del RS-C1 en *Drosophila* reduce la fagocitosis de hongos y bacterias patógenas, reflejando una conservación generalizada durante la evolución de los RS en la inmunidad innata [Zani *et al.*, 2015]. Los RS-C están compuestos por 320-629 aminoácidos y son proteínas de membrana de tipo I (RS-C1 y RS-C2) o proteínas solubles secretadas (RS-C3 y RS-C4), donde el dominio extracelular contiene una región CCP en su extremo N-terminal que precede a un motivo MAM. Actualmente, no se reconocen miembros de esta clase en mamíferos [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase D (RS-D). CD68 es el único miembro conocido de la RS-D. Es una glicoproteína transmembrana de tipo I perteneciente a la familia de proteínas de membrana asociadas a lisosomas (o LAMP), y está compuesto por un dominio extracelular de 300 aminoácidos ricos en treonina y serina (que pueden servir como sitios de unión a carbohidratos) y una cola citoplasmática corta. El dominio extracelular de CD68 en humanos comparte un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con su homólogo en ratones. Este receptor se expresa en monocitos y macrófagos de cavidad peritoneal, pulmones, hígado, bazo, células de Langerhans y microglía, y presenta una función clásica de RS para LDL oxidada [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase E (RS-E). Los RS de clase E son proteínas transmembrana de tipo 2 con motivos de lectina tipo C y actividad RS demostrada. Según su estructura, estas proteínas pertenecen a una subfamilia de receptores lectina tipo C de células NK conocidos como CLEC. El complejo génico de receptores para células NK codifica una gran variedad de receptores tipo CLEC (por ejemplo: CLEC, LOX-1 y dectin-1), los cuales se expresan en estas células, así como en otros leucocitos [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase F (RS-F). En la actualidad se conocen tres miembros pertenecientes a la clase F de RS. SCARF (o SCARF-1) fue el primero identificado y se lo describió como un receptor endotelial para LDL modificada. Actualmente, SCARF es el prototipo de RS de la clase F, caracterizándose por presentar un dominio extracelular de unión a ligando con múltiples repeticiones de dominios similares a los factores de crecimiento epidérmicos, un dominio transmembrana y una larga cola citoplásmica. Esta última es rica en aminoácidos de carga positiva incluyendo una región rica en serina/prolina seguida de una región rica en glicina. Además de su expresión en células endoteliales, SCARF también se expresa en macrófagos y células dendríticas, donde colabora en la unión de

calreticulina y péptidos asociados para su internalización vía moléculas MHC de tipo I [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase G (RS-G). RS-PSOX es el único representante de la clase G de RS en la actualidad. En humanos, RS-PSOX es una proteína de membrana de tipo 1 compuesta por 254 aminoácidos conteniendo un dominio extracelular N-terminal, una sola región transmembrana y un dominio citoplásmico corto. El dominio extracelular media la endocitosis de fosfatidilserina y de LDL oxidada, entregándolas al sistema endosoma-lisosoma. A su vez, el dominio extracelular de RS-PSOX contiene un motivo relacionado a quimioquinas seguido de un tallo tipo mucina, el cual puede ser escindido por metaloproteasas ADAM generando la liberación del ectodominio soluble. En humanos RS-PSOX se expresa en células vasculares del músculo liso, células endoteliales, monocitos, macrófagos, podocitos renales y en lesiones ateroscleróticas. RS-PSOX tiene una importante funcionalidad en la inmunidad innata ya que es capaz de reconocer diversas estructuras moleculares presentes en patógenos, principalmente bacterias [Zani *et al.*, 2015].

- Receptores scavenger de clase H (RS-H). Los RS de clase H son proteínas transmembrana que contienen dominios tipo fasciclina, tipo EGF y EGF de tipo lámina (FEEL). Actualmente, sus miembros son dos: FEEL-1/estabilina-1/CLEVER-1 y FEEL-2/estabilina-2/HARE. En cuanto a su localización, FEEL-1 se expresa predominantemente en macrófagos, células mononucleares, células madre hematopoyéticas y células endoteliales, mientras que FEEL-2 se encuentra principalmente en células endoteliales sinusoidales. Ambos RS están involucrados en la adhesión de linfocitos, trans migración, angiogénesis, *clearance* de cuerpos apoptóticos y tráfico intracelular [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase I (RS-I). CD163 es el RS prototípico de la clase I. Es una glicoproteína de membrana de 130 kDa que se expresa únicamente en monocitos y macrófagos, y se une a los complejos haptoglobina-hemoglobina promoviendo el *clearance* de la hemoglobina plasmática. Por ello, ha recibido el nombre funcional "*RS de hemoglobina*" para describir su principal función en macrófagos tisulares. A modo general, los RS de clase I son receptores transmembrana de tipo I caracterizados por contener múltiples dominios SRCR del grupo B en su dominio extracelular. A su vez, la estructura de cada dominio SRCR ofrece potenciales sitios de unión a ligandos en bucles hidrofílicos, hojas β , en una α -hélice y en una cavidad hidrofóbica [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase J (RS-J). El único miembro de la clase J de RS es RAGE, el receptor para productos finales de glicación avanzada (AGEs). Este receptor es capaz de interactuar con un amplio espectro de ligandos, incluidos los AGEs, HMGB-1 y la proteína S-100. RAGE se compone de un solo dominio transmembrana que conecta al ectodominio de reconocimiento de ligandos ubicado en el extremo N-terminal con un dominio citoplasmático corto. El dominio extracelular también contiene tres regiones *Ig-like*. RAGE está involucrado principalmente en el reconocimiento de moléculas endógenas liberadas en el contexto de infecciones, estrés fisiológico y/o inflamación crónica; y su señalización media procesos inflamatorios, de estrés oxidativo y/o de inducción de apoptosis [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase K (RS-K). La clase K de RS está compuesta únicamente por el receptor CD44, el cual, aunque no presenta homología estructural con ningún otro RS conocido, comparte varias características funcionales por las cuales ha sido recientemente incluido dentro de la familia de RS. CD44 es una glicoproteína de superficie celular conocida como “receptor para hialuronano”. Se trata de una proteína transmembrana multidominio de un solo tramo, con una pequeña cola citosólica capaz de realizar una limitada señalización directa. El dominio extracelular contiene motivos capaces de unir diversos ligandos que incluyen hialuronano, glicoproteínas, proteoglicanos, metaloproteasas de matriz extracelular, factores de crecimiento y citoquinas [PrabhuDas *et al.*, 2017].

- Receptores scavenger de clase L (RS-L). La clase L de RS está compuesta por los miembros de la familia de genes *LDLR*, entre los cuales destacan RS-L1, LRP-1b, LRP-2, LRP-4, LRP-8 y VLDLR. Esta familia de genes se denomina así gracias a su miembro más conocido: LDLR, que actúa como el principal receptor para el recambio del colesterol plasmático. En mamíferos, los RS de clase L exhiben un notable grado de conservación en su secuencia de aminoácidos, poniendo de manifiesto la importancia de sus miembros para la supervivencia de todas las especies [PrabhuDas *et al.*, 2017].

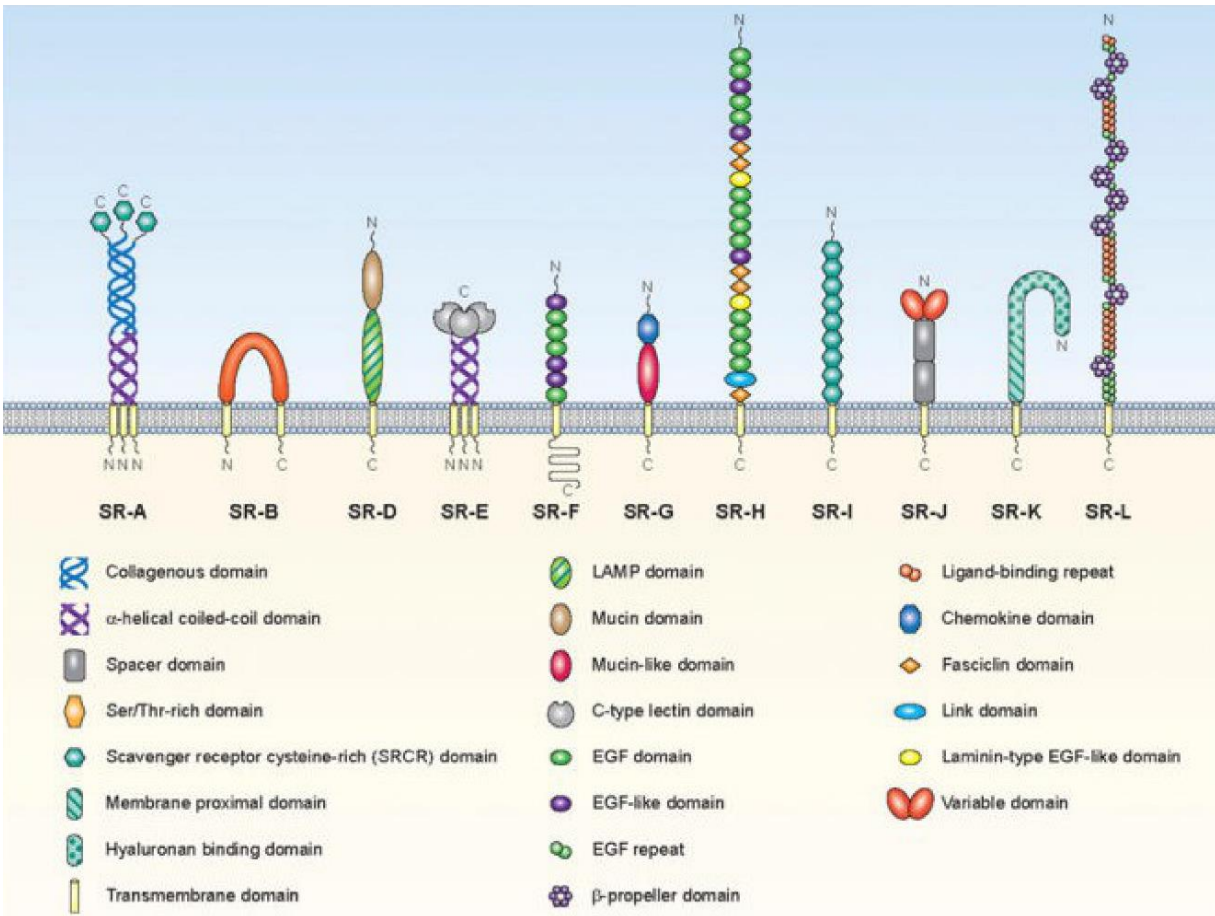


Figura 1. Representación esquemática de las doce clases de receptores *scavenger* en mamíferos. La clase C no está representada ya que sólo se expresa en *Drosophila melanogaster* [tomado de PrabhuDas et al., 2017].

1.2. La Superfamilia de Receptores *Scavenger* Ricos en Cisteína.

La superfamilia de RS ricos en cisteína (SF-SRCR, del inglés *Super Family of Scavenger Receptors Cysteine-Rich*) se describió a comienzos de 1990, luego de que se identificaran varios receptores que poseían al menos un dominio homólogo al presente en el extremo C-terminal del RS denominado RS-AI en macrófagos [Freeman et al., 1990]. El hecho que algunos miembros de la SF-SRCR tengan funciones de tipo RS ha causado cierto nivel de confusión entre ambas familias de receptores innatos, por lo que es necesario aclarar ambos conceptos. Como se mencionó previamente, los RS se definen actualmente como aquellas glicoproteínas (solubles o de membrana) involucradas en el reconocimiento y/o endocitosis de moléculas poli-aniónicas, ya sean de origen endógeno o exógeno [Sarrias et al., 2004]. Sin embargo, no

se ha identificado hasta el momento un dominio proteico en particular que confiera actividad RS, por lo que constituyen una familia funcional de receptores sin relaciones estructurales [Gough & Gordon, 2000].

En contraposición, los miembros de la SF-SRCR, si bien están estructuralmente muy relacionados, comparten escasas funciones. El modelo actual plantea que los dominios SRCR intervendrían en interacciones de tipo proteína-proteína, tanto homo- como hetero-típicas [Bowdish & Gordon, 2009]. A su vez, existe clara evidencia sobre la capacidad de algunos miembros de la superfamilia para reconocer PAMP; como por ejemplo los receptores RS-AI, MARCO, CD5, CD6, CD163, DMBT1/SAG/gp340, Spα y AIM/Apí6/CD5L [Martínez *et al.*, 2011]. Además, algunos miembros han sido involucrados en el desarrollo del sistema inmune y la regulación de respuestas inmunes innatas y adaptativas [Aruffo *et al.*, 1997; Chappell *et al.*, 2015; Sanjurjo *et al.*, 2015].

Actualmente, la SF-SRCR está compuesta por más de 30 miembros -de membrana y/o secretados- descritos en diversos mamíferos, así como en distintas especies muy distantes filogenéticamente, lo que la convierte en una superfamilia muy antigua y altamente conservada [Martínez *et al.*, 2011]. En cuanto a la estructura, los dominios SRCR se componen de 90-110 aminoácidos, destacándose su alto y bien definido contenido de cisteínas (Cys) [Sarrías *et al.*, 2004]. Asimismo, estos dominios pueden clasificarse en 2 grupos: tipo A y tipo B. Los primeros están codificados por al menos 2 exones y contienen 6 residuos de Cys, y los segundos están codificados por un único exón y contienen 8 residuos de Cys. La posición relativa de los residuos es constante, definiéndose un patrón de enlaces disulfuro del tipo Cys2-Cys7, Cys3-Cys8 y Cys5-Cys6; y para los dominios tipo B además se observa Cys1-Cys4. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha reportado la co-existencia de ambos tipos de dominios en una misma proteína [Resnick *et al.*, 1996].

1.3. Los receptores *scavenger* CD5 y CD6.

Los receptores CD5 y CD6 son glicoproteínas de membrana de 67 kDa y 105-130 kDa, respectivamente, que pertenecen a la SF-SRCR y se clasifican dentro de la clase I de RS. Presentan gran homología estructural y funcional, así como similitudes en sus perfiles de expresión. De hecho, ambas proteínas están codificadas por genes contiguos ubicados en la misma región cromosómica (cromosoma 11q22 en humanos y cromosoma 9 en ratones), lo cual podría deberse a fenómenos de duplicación génica partiendo de un ancestro común [Lecomte *et al.*, 1996; Padilla *et al.*, 2000]. Ambos receptores poseen

ectodominios compuestos exclusivamente por 3 dominios SRCR de tipo B en tándem, una región transmembrana y una cola citoplasmática encargada de mediar procesos de señalización intracelular [Sarrias *et al.*, 2004].

La homología que presentan entre sí no solo es importante desde un punto de vista estructural, sino también en cuanto a sus perfiles de expresión y a sus propiedades funcionales, ya que ambos receptores se expresan principalmente en timocitos desde las etapas tempranas de maduración, en linfocitos T maduros y en la subpoblación de linfocitos B1a [Martínez *et al.*, 2011]. Además, se ha descrito que CD6 (pero no CD5) se expresa también en algunas regiones del cerebro [Mayer *et al.*, 1990] y en subpoblaciones de células NK [Zimmerman *et al.*, 2006].

Tanto CD5 como CD6 están asociados físicamente al TCR (células T) o al BCR (células B1a) [Beyers *et al.*, 1992; Lankester *et al.*, 1994]. En linfocitos T, ambas proteínas, junto a otras moléculas co-estimuladoras, componen un complejo macromolecular [Carmo *et al.*, 1999]. Por otro lado, está descrito que la molécula CD6 es capaz de asociarse físicamente en forma independiente al receptor CD5 [Gimferrer *et al.*, 2003] y al TCR/CD3 [Gimferrer *et al.*, 2004]. Estos hechos sugieren que ambos receptores se encuentran en buena posición para regular señales inducidas mediante el reconocimiento específico de antígenos, dependiendo del tipo y del estado de maduración celular. En este sentido, se postula que CD5 actuaría como molécula co-estimuladora en linfocitos T maduros, y como molécula de señalización negativa en timocitos y células B1a [Tarakhovsky *et al.*, 1995; Bikah *et al.*, 1996; Lozano *et al.*, 2000]. En línea con estos postulados, resultados obtenidos utilizando ratones transgénicos que expresan constitutivamente una forma soluble del ectodominio de CD5 humano (ratones shCD5E μ Tg) mostraron que los mismos desarrollan respuestas más fuertes contra auto-antígenos; específicamente manifiestan mejores respuestas anti-tumorales y formas más severas de autoinmunidad [Fenutría *et al.*, 2014]. Estos hechos se correlacionarían con una menor proporción de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tanto en bazo como en ganglios linfáticos, y con una disminución en el número de células B productoras de IL-10 en cavidad peritoneal. Así, la interacción de CD5 con su(s) ligando(s) cumpliría un importante rol en la regulación de la respuesta inmune contra autoantígenos y en la homeostasis de ciertas subpoblaciones linfocitarias [Fenutría *et al.*, 2014].

Por otro lado, se han descrito alelos de CD5 con SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) funcionalmente relevantes como marcadores de susceptibilidad en enfermedades autoinmunes (nefritis lúpica, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) o neoplásicas (melanoma y leucemia linfoide crónica); y

alelos de CD6 sólo en enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple y enfermedad de Behçet) [Casadó-Llobart *et al.*, 2021]. Esta evidencia apoyaría la función reguladora de las respuestas inmunes mediada por ambos receptores.

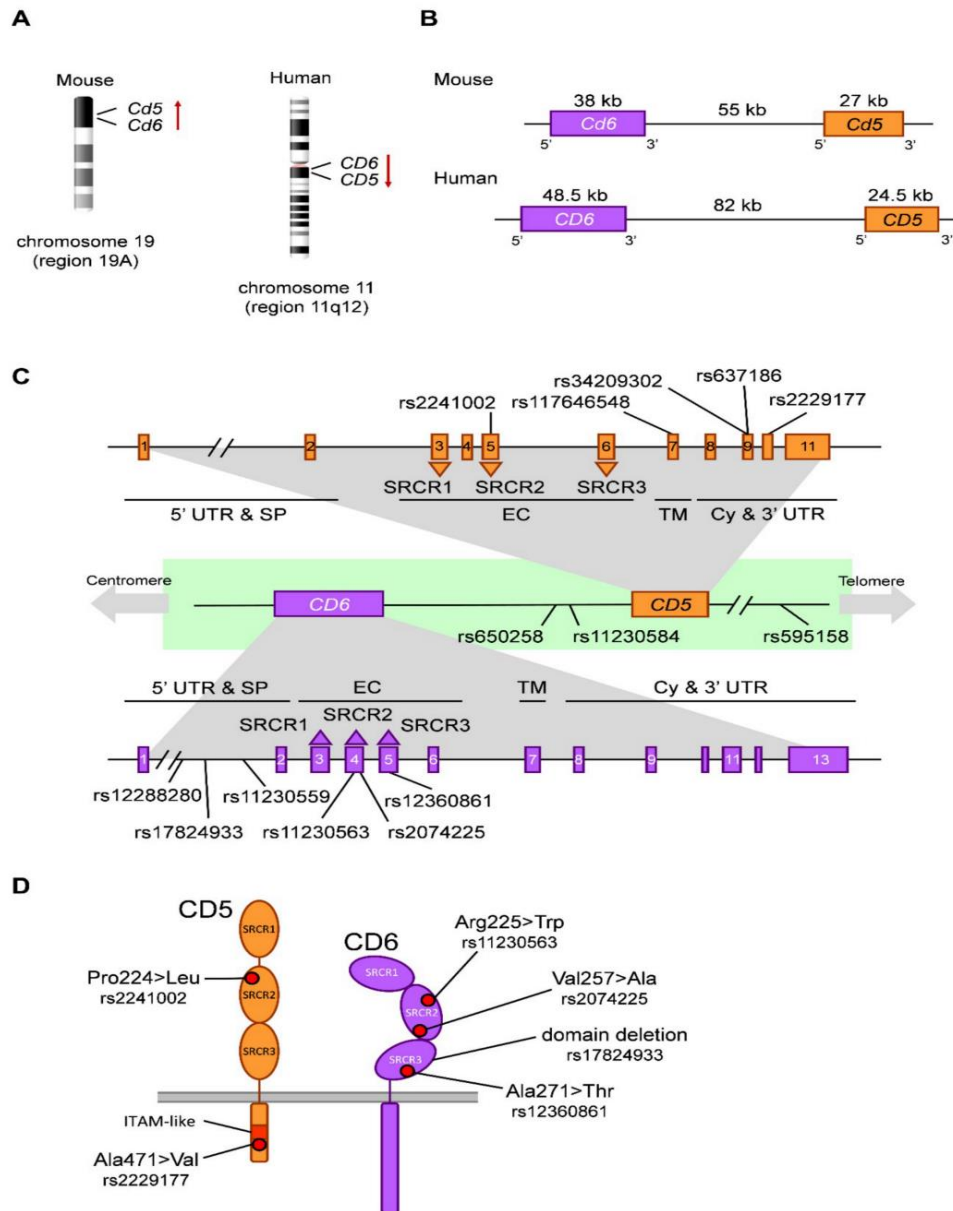


Figura 2. Localización genómica y disposición de CD5 y CD6. (A) Ubicación cromosómica en humanos y ratones de los genes que codifican para CD5 y CD6. Las flechas rojas indican la dirección 5' a 3'. (B) Tamaño, orientación y distancia intergénica entre los genes para CD5 y CD6 en ratón y humanos. (C) Organización exón/intrón, regiones codificantes de proteínas y ubicación de SNPs relevantes en los genes para CD5 y CD6. (D) Estructura de CD5 y CD6 de membrana con destaque en el impacto de los SNPs relevantes. UTR, región

no traducida; CE, región extracelular; Cy, región citoplasmática; SRCR, dominio de Receptores Scavengers ricos en cisteína; ITAM-like, inmuno-receptor tipo motivo de activación basado en tirosina [tomado de Casadó-Llombart et al., 2021]

1.4. CD5 y CD6 como receptores de reconocimiento de patógenos.

Como se comentó previamente, existe clara evidencia sobre la capacidad de reconocer PAMPs por parte de algunos miembros pertenecientes a la SF-SRCR [Brännström *et al.*, 2002; Bikker *et al.*, 2004; Sarrias *et al.*, 2005; Fabriek *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2014; Sanjuro *et al.*, 2015]. En este sentido, se ha descrito que los ectodominios de CD5 y CD6 interactúan también, y en forma directa, con PAMPs presentes en hongos y bacterias, respectivamente [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009]. Así, los dominios extracelulares de CD5 (pero no los de CD6) son capaces de interactuar con motivos β -glucanos presentes en las paredes de hongos, con una afinidad equivalente a la reportada para Dectina-1 (el principal receptor mamífero para β -glucanos) [Vera *et al.*, 2009]. En cambio, la región extracelular de CD6 (pero no la de CD5) es capaz de unir LPS de bacterias Gram (-) y ácido lipoteicoico y peptidoglicanos de bacterias Gram (+); destacándose que la afinidad de la interacción CD6-LPS es equivalente a la reportada para CD14, el principal receptor de LPS en mamíferos [Sarrias *et al.*, 2007].

Tanto el ectodominio de CD5 como el de CD6 son capaces de inducir agregación microbiana (fúngica y bacteriana, respectivamente), hecho que pudiera ser relevante en la prevención del tránsito de patógenos microbianos a través de barreras epiteliales y que además facilitarían su eliminación de la circulación por parte de células fagocíticas. Por último, los estudios anteriores demostraron que las estructuras microbianas mencionadas también se unen a los receptores de membrana CD5 y CD6, e inducen señales de activación, vía MAPK, que permiten a los linfocitos la detección rápida de una amplia gama de patógenos [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009]. En este sentido, aunque aún no existen reportes al respecto, se podría suponer que la interacción de CD5 y CD6 con sus ligandos microbianos generaría efectos trascendentes en la expansión y función de linfocitos T y B1a, ya sea mediante modulación y/o interferencia de la señalización antígeno-específica vía TCR o BCR, según sea el caso. De hecho, este tipo de fenómenos ha sido previamente reportado para otros PRRs presentes en linfocitos, en particular para receptores de tipo TLR [Caron *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Lampropoulou *et al.*, 2008, Yanaba *et al.*, 2009].

Curiosamente, la capacidad de reconocimiento de agentes microbianos por CD5 y CD6 parecería extenderse más allá de hongos y bacterias, dado que se reportó que CD5 actúa como receptor de entrada del VHC (virus de la hepatitis C) en linfocitos T [Sarhan *et al.*, 2012], y que existen datos preliminares sobre la interacción de CD6 con gp120 del VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana) [Carrasco *et al.*, 2014]. En este sentido, nuestro grupo demostró recientemente, que tanto CD5 como CD6 son capaces también de reconocer componentes antigénicos presentes en *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.), ampliando de esta forma el espectro de ligandos conocidos al mundo de los parásitos helmintos [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Estos resultados son en sí mismos relevantes, ya que son escasos los reportes sobre receptores innatos capaces de reconocer antígenos parasitarios [Paveley *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Tundup *et al.*, 2015; Ponichtera & Stadecker, 2015; Aldridge & O'Neill, 2016].

La relevancia práctica de la capacidad de CD5 y CD6 de reconocer antígenos microbianos quedó evidenciada luego de observar que la administración de las formas recombinantes solubles de los ectodominios de CD5 o CD6 humanos (denominados rshCD5 y rshCD6, respectivamente) tiene efectos beneficiosos en diversos modelos murinos de infección. Así, mientras rshCD6 ha mostrado interesantes funciones profilácticas y terapéuticas en modelos de infecciones bacterianas [Sarrias *et al.*, 2007; Martínez-Florensa *et al.*, 2014 & 2016], rshCD5 ha mostrado funciones equivalentes en modelos de infecciones fúngicas [Vera *et al.*, 2009; Velasco-de-Andrés *et al.*, 2020a], y ambos en ciertas infecciones virales [Sarhan *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2014]. La administración terapéutica de rshCD5 y rshCD6 aumenta el porcentaje de supervivencia y reduce los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) a la vez que se observa un aumento de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) en los modelos murinos de infección mencionados [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009; Martínez-Florensa *et al.*, 2014; Velasco-de-Andrés *et al.*, 2020a]. Estos resultados pre-clínicos promueven el planteamiento del uso profiláctico o terapéutico de rshCD5 y rshCD6 en humanos con cuadros de sepsis.

Por otro lado, nuestro grupo reportó que rshCD5, y en menor medida rshCD6, mostraron funciones profilácticas significativas en el modelo murino de equinocosis quística secundaria, ya que su infusión pre-inoculación de protoscoleces redujo la proporción de ratones efectivamente infectados, así como el número de quistes hidáticos desarrollados y la carga parasitaria total por ratón [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Desde un punto de vista mecanístico, estos efectos profilácticos podrían atribuirse a una inmunomodulación inducida mediante el bloqueo de componentes parasitarios claves presentes en el tegumento de los protoscoleces. En este sentido, la adición de rshCD5/rshCD6 a cultivos celulares de células

peritoneales estimuladas con antígenos tegumentarios mostró una polarización del perfil de citoquinas hacia componentes principalmente pro-inflamatorios, el cual sería potencialmente beneficioso para el hospedero [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Además, mediante estudios proteómicos de interactomas, nuestro grupo identificó recientemente posibles ligandos para rshCD5 y/o rshCD6 presentes en el tegumento de protoscolecques, muchos de los cuales previamente fueron reportados como importantes objetivos terapéuticos contra *E. granulosus* s.l., ya sea como candidatos vacunales o como blancos farmacológicos [Miles *et al.*, 2020b]. Estos resultados podrían plantear a futuro la evaluación de rshCD5/rshCD6 como agentes profilácticos/terapéuticos frente a posibles recidivas, post-quirúrgicas, de equinococosis en humanos.

Reported CD5 Ligands

Endogenous

CD72
mouse gp40-80
human gp150
bovine gp200
Framework IgVH
IL-6
CD5

Exogenous

Fungi (β -glucans)
Virus (HCV, CMV, HIV-1)
Parasite (PSEx)



Therapeutic targets

Infection



Cancer



Autoimmunity



Figura 3. Estrategias terapéuticas basadas en el uso de rshCD5 en infección, auto-inmunidad y cáncer. Ligandos reportados para CD5 y sus dianas terapéuticas. CD, grupo de diferenciación; gp, glicoproteína; IL, interleuquina; IgVH, variable de cadena pesada de inmunoglobulina; HCV, virus de la hepatitis C; CMV, citomegalovirus; HIV, virus inmunodeficiencia humana. [tomado de Velasco-de-Andrés *et al.*, 2021].

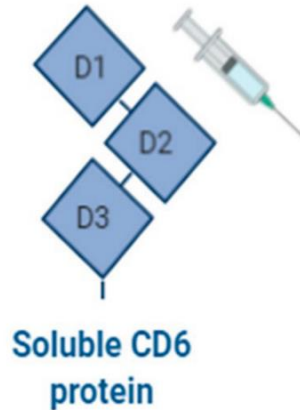
Reported CD6 Ligands

Endogenous

CD166/ALCAM
Galectin 1 and 3
CD318/CDCP1

Exogenous

Gram + bacteria (LTA PGN)
Gram - bacteria (LPS)
Virus (CMV, HIV-1)
Parasite (PSEx)



Therapeutic targets

Infection

Viral



HIV-1

Helminth



Hydatidosis

Bacterial



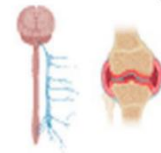
Gram + sepsis
Gram - sepsis
Polymicrobial sepsis

Cancer



ALCAM+ tumors
(e.g., melanoma)
CLL

Autoimmunity



Multiple sclerosis (EAE)
Rheumatoid arthritis (CIA)

Figura 4. Estrategias terapéuticas basadas en el uso de rshCD6 en infecciones, immuno-modulación, auto-inmunidad y cáncer. Ligandos reportados para CD6 y sus dianas terapéuticas. ALCAM, molécula de adhesión de leucocitos activados; CD, grupo de diferenciación; CDCP1, Proteína-1 con dominio CUB; CIA, artritis inducida por colágeno; LLC, leucemia linfocítica crónica; CMV, citomegalovirus; HIV, virus de inmunodeficiencia humana; LTA, ácido lipoteicoico; LPS, lipopolisacárido; PGN, peptidoglicano. [tomado de Velasco-de-Andrés et al., 2021].

1.5. Parásitos helmintos.

El término helminto (del griego *hélminthos*) significa gusano y se utiliza de manera general para agrupar diversos organismos multicelulares eucariotas invertebrados que presentan simetría bilateral y tienen forma de “tubo” o “cinta aplanada”. Poseen tejidos endo, meso y ectodérmicos, siendo los gusanos planos acelomados y los nematodos pseudocelomados. Existen helmintos de vida libre en ambientes acuáticos y terrestres; otros son parásitos de algunas plantas y animales. De hecho, gran parte de los vertebrados son hospederos de helmintos parásitos. Generalmente, estos últimos atraviesan por tres etapas durante su ciclo vital: huevo, larva (o juvenil) y gusano adulto; pudiendo requerir de dos o más hospederos para completar el ciclo. Los helmintos parásitos se clasifican en tres grupos: cestodos, trematodos y nematodos; caracterizándose los dos primeros grupos por ser gusanos planos (platelmintos) [Castro, 1996].

Los cestodos son gusanos planos que tienen forma de cinta, son segmentados y principalmente son parásitos intestinales. No ingieren material particulado ya que no poseen sistema digestivo; en su lugar, absorben directamente los nutrientes a través de su tegumento, el cual presenta gran cantidad de microvellosidades. La anatomía del gusano adulto está compuesta por una cabeza (denominada escólex) que presenta ganchos y ventosas que tienen como función la fijación a la pared intestinal de su hospedero, un cuello y un cuerpo (denominado estróbila) formados por una serie de segmentos llamados proglótides. Cada proglótide desarrolla un juego completo de órganos reproductores (femeninos y masculinos) que producen huevos fecundados. Las proglótides maduras, llenas de huevos y localizadas en la porción final del organismo, se pueden romper librándose al medio exterior junto con las heces del hospedero [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

Los trematodos también son gusanos planos, pero poseen forma de hoja y son capaces de infestar diferentes órganos, dependiendo de la especie. Su ciclo vital puede presentar uno o varios hospederos intermediarios, siendo siempre uno de ellos un caracol de agua dulce. Poseen una ventosa oral y una ventral que utilizan para adherirse a los tejidos de su hospedero. Además, presentan un desarrollado canal alimentario con faringe y esófago. Sus intestinos se componen de una sola capa de células epiteliales y tienen forma de tubo bifurcado, pudiendo presentar o no una vesícula excretora. La mayoría de las especies son hermafroditas (excepto los miembros del género *Schistosoma*) [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

Por último, y a diferencia de los platelmintos, los nematodos son gusanos cilíndricos que suelen desarrollarse en un único hospedero. Su cuerpo presenta una cutícula externa acelular que lo recubre, una hipodermis fina y gran musculatura. Su canal alimentario es completo, con ano y boca, presentando esta última, labios con papilas sensoriales. Su esófago bombea alimento hacia el intestino gracias a su naturaleza muscular. El intestino posee una estructura tubular y se compone de una capa de células columnares que poseen prominentes microvellosidades en la superficie luminal. Los nematodos presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras generalmente más grandes que los machos. Su desarrollo pasa por cuatro etapas de su larva, cada una seguida por una muda de cutícula, y una quinta etapa que corresponde al gusano adulto [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

1.5.1. Características generales de la inmunidad contra parásitos helmintos.

Los helmintos parásitos son un grupo complejo y heterogéneo de metazoarios compuesto por diversas especies que difieren en aspectos tales como tamaño, ciclo de vida e impacto clínico. Las patologías derivadas de la infección por helmintos parásitos integran el grupo de las denominadas Enfermedades Tropicales Desatendidas (del inglés: *Neglected Tropical Diseases*), que en su conjunto se estima que afectan a un tercio de la población mundial [Hotez *et al.*, 2011]. Asimismo, dentro de estas enfermedades, sólo las helmintiasis afectan a 1 de cada 4 individuos en el planeta [Hotez *et al.*, 2008].

Generalmente, los helmintos parásitos se desarrollan en los aparatos digestivo, circulatorio, reproductor y en el sistema nervioso de sus hospederos [Hotez *et al.*, 2008], y muchos de ellos pasan por distintos hospederos a lo largo de sus ciclos de vida. En hospederos mamíferos, los helmintos suelen crecer de forma extensa y diferenciarse a estadios que permiten su transmisión hacia el siguiente hospedero. El estadio responsable de infectar mamíferos suele ser la larva, la cual debe migrar a un nicho apropiado donde alojarse para poder crecer, reproducirse y posteriormente salir de allí, debido a que requieren distintos hospederos para completar su ciclo [MacDonald *et al.*, 2002].

La alta prevalencia de las helmintiasis refleja una de las características más importantes de las infecciones parasitarias: su cronicidad. Este hecho implica que los parásitos deben tener habilidades especiales para adaptarse a los mecanismos de defensa desencadenados por el hospedero, y así poder sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados. No es extraño entonces observar que en la mayoría de los casos la respuesta inmune que genera el hospedero no sea efectiva en la eliminación del parásito, a pesar de que este sea inmunocompetente [Pearce *et al.*, 2004]. Desde un punto de vista evolutivo, los helmintos parásitos han convivido e interactuado con el sistema inmune de sus hospederos desde muy temprano en la historia, de forma tal que han logrado un equilibrio que favorece su establecimiento. Esta estrategia de asentamiento, mediante la evasión de las respuestas del sistema inmune y la reducción de síntomas y signos en los hospederos infectados, favorece su supervivencia y posterior diseminación, siendo este su objetivo principal [Vuitton *et al.*, 2010]. A su vez, esta misma adaptación sería beneficiosa para el hospedero, ya que restringiría el daño en los tejidos y órganos propios generado durante la respuesta inmune. Este hecho se condice además con que la mayoría de las infecciones por helmintos parásitos no posean sintomatología claramente observable. Actualmente se reconocen más de 20 especies de helmintos parásitos capaces de afectar directamente a los humanos, los cuales en su mayoría generan infecciones inicialmente leves, asintomáticas y raramente son motivo de consulta directa en los centros

de salud. A pesar de ello, en niños la persistencia de helmintiasis gastrointestinales suele derivar en desnutrición, retraso en el crecimiento físico y en el desarrollo intelectual, pudiendo llevar a deficiencias cognitivas en la edad adulta [Wiria *et al.*, 2012].

La cronicidad previamente mencionada de las helmintiasis se correlaciona comúnmente con respuestas de citoquinas polarizadas. Generalmente, las infecciones por parásitos intracelulares se asocian a respuestas de citoquinas de tipo Th1. Por otro lado, y aunque los helmintos son un grupo de animales muy divergente, suelen inducir respuestas estereotipadas de tipo Th2, con nulos o muy bajos niveles de componentes de tipo Th1 [Díaz & Allen, 2007]. La respuesta inmune contra parásitos helmintos se caracteriza por la acción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, así como por una marcada expansión de eosinófilos y mastocitos [Hotez *et al.*, 2010; Allen & Maizels, 2011]. A su vez, se generan niveles elevados de anticuerpos de todos los isotipos/subclases, pero especialmente de IgE, IgG1 e IgG4 en humanos [McSorley & Loukas, 2010; Caldas *et al.*, 2008; Wright & Bickle, 2005]. El rol de estos actores en la interacción hospedero-parásito se mantiene desconocido para muchas infecciones [Baz *et al.*, 2006]. A su vez, la resistencia a la infección y la eliminación de los helmintos no depende únicamente de un fenotipo celular particular o de un solo mecanismo molecular de eliminación, sino de múltiples vías de desarmado, degradación y dislocación ("*disable, degrade and dislocate*") del parásito, que en última instancia llevan a su expulsión [Zhang *et al.*, 2012].

Las células innatas son las principales productoras iniciales de las citoquinas clave en las respuestas de tipo Th2 contra helmintos [Koyasu *et al.*, 2010; Neill & McKenzie, 2011], y son factores importantes en la regulación del sistema inmune. La comunicación entre células, tanto en un mismo sitio anatómico como a distancia ocurre vía citoquinas, las cuales determinan la calidad y la potencia de la respuesta inmune innata y adaptativa [Baz *et al.*, 2006]. Por su parte, los componentes adaptativos que participan en la respuesta contra helmintos son células Th2 efectoras y células T reguladoras, las cuales suelen minimizar la patogenicidad, aunque paradójicamente pueden llegar a bloquear también la expulsión del parásito [Taylor *et al.*, 2012]. Las células B cumplen un papel dual, actuando tanto en detrimento [Harris & Gause, 2011] como a favor [Amu *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010] de la inmunidad anti-parasitaria, según sea el caso. Durante este tipo de respuestas, la IL-4 induce el cambio de clase en las células B activadas hacia la producción de IgE, la cual se une al FcεRI de mastocitos y basófilos. La subsiguiente unión del antígeno específico a las IgE produce el entrecruzamiento de los receptores, derivando en la

degranulación de las mencionadas células y la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, prostaglandinas y leucotrienos [Boyce, 2003].

Por último, se ha reportado que los linfocitos B podrían sesgar la respuesta inmune hacia un perfil Th2 en el contexto de las helmintiasis mediante la secreción de grandes cantidades de IL-10 [Macaulay *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2007]. Así, los linfocitos B podrían regular negativamente las respuestas de tipo Th1, reduciendo las respuestas inflamatorias que dañarían tanto al parásito como a su hospedero, y también favoreciendo indirectamente el desarrollo de respuestas de tipo Th2. Por ejemplo, en el caso de *S. mansoni* se ha visto que el parásito induce la expansión de células B1 peritoneales y de bazo, y que oligosacáridos presentes en sus huevos promueven la secreción de IL-10 en estas células [Velupillai & Harn, 1994; 1996]. Este hecho sugiere entonces que estructuras parasitarias podrían modular la inflamación crónica mediante la inducción temprana de IL-10 en células B [Harris & Gause, 2011].

1.6. *Echinococcus granulosus sensu lato.*

Los parásitos del género *Echinococcus* son un grupo de platelmintos cestodos causantes de variadas formas de equinococosis (quística, alveolar o poliquística) [Xiao *et al.*, 2005; Hüttner *et al.*, 2008; Thompson, 2008; Nakao *et al.*, 2010]. Originalmente se consideraba a *E. granulosus* como el único agente causante de equinococosis quística (en adelante EQ), pero en la actualidad se reconocen otras especies dentro del mismo taxón que son capaces de causar dicha patología [Nakao *et al.*, 2013]. Por ello, y desde un punto de vista taxonómico, *E. granulosus* está compuesto por numerosas variantes inicialmente identificadas por Smyth y Davies, denominadas “cepas fisiológicas” [Smyth & Davies, 1974]. Desde ese entonces, se han identificado más cepas en base a diferentes criterios bioquímicos, fisiológicos, inmunológicos y de distribución geográfica [Thompson, 2008; Cucher *et al.*, 2015]. Luego, mediante el uso de técnicas de biología molecular se identificaron polimorfismos en el ADN mitocondrial parasitario permitiendo la asignación de un genotipo a cada una de las cepas previamente descritas. Actualmente se describen 10 genotipos (G1-10) y la “cepa león” (sólo hallada en hospederos salvajes) [McManus, 2013]. De esta manera, a medida que los diferentes genotipos de *E. granulosus* se han ido identificando, se observó que cada uno de ellos muestra diferencias en su preferencia respecto al hospedero intermediario [McManus & Thompson, 2002; 2003]. Por ejemplo, entre ellos existen dos de ovejas (G1 y G2), uno de cerdos (G7) y uno de cérvidos (G8). Un noveno genotipo (G9) ha sido descrito más recientemente en

cerdos de Polonia [McManus & Thompson, 2003] y una décima cepa (G10) en cérvidos de América del norte y Eurasia.

Esta nueva clasificación genera el complejo *E. granulosus sensu lato* (s.l.) formado por las especies *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) (genotipos G1/G2/G3), *E. equinus* (genotipo G4), *E. ortleppi* (genotipo G5), *E. canadensis* (genotipos G6/G7/G8/G9/G10) y *E. felidis* (“cepa león”) [Thompson, 2008; Nakao *et al.*, 2010]. Si bien la discusión taxonómica continúa y está lejos de llegarse a un acuerdo final [Lymbery *et al.*, 2015], la misma es de gran relevancia, ya que distintas especies del género *Echinococcus* causan diferentes tipos de equinococosis en humanos. Así, mientras la EQ en humanos es causada por infecciones con *E. granulosus* s.s., *E. ortleppi* y *E. canadensis*; la equinococosis alveolar es causada por *E. multilocularis*; y la equinococosis poliquistica por *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. En general, *E. granulosus* s.s. (particularmente el genotipo G1) es el que presenta mayor distribución mundial y es el responsable de la amplia mayoría de casos humanos de EQ. A su vez, tanto *E. ortleppi* como todos los genotipos de *E. canadensis* han sido reportados como causantes de un número menor de casos de EQ en humanos, mientras que hasta el momento no existen reportes de EQ en humanos debidos a infecciones por *E. equinus* o *E. felidis* [Álvarez-Rojas *et al.*, 2014; Cucher *et al.*, 2015].

1.6.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* s.l.

Echinococcus granulosus s.l. requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo vital: un hospedero definitivo donde se desarrolla el gusano adulto (en el intestino delgado) y un hospedero intermediario en el cual se desarrolla el metacestode (en las vísceras) [Moro & Schantz, 2009]. El hospedero definitivo es siempre carnívoro (perros u otros cánidos), el cual se infecta al ingerir el estadio parasitario de protoscólex (en adelante PSC) resultante de la reproducción asexual del metacestode o quiste hidático (Figuras 5A, 5B y 5C). Un único quiste puede contener miles de PSC en su interior y cada uno de ellos tiene la potencialidad de desarrollarse en un gusano adulto, normalmente de unos 3 mm de longitud (Figura 5D). Estos producen huevos conteniendo al embrión (la oncósfera) que son expulsados a través de las heces del hospedero definitivo (Figura 5E). Los huevos son capaces de sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo y son infectivos para sus hospederos intermediarios (ungulados domésticos y salvajes) luego de su ingesta accidental [Thompson, 1995]. Una vez ingeridas, las oncósferas se activan en el intestino delgado del hospedero intermediario (herbívoro u omnívoro) y atraviesan la

mucosa intestinal hacia el sistema circulatorio del hospedero (venoso y linfático) gracias a la producción de secreciones líticas (Figura 5F y 5G). A partir de allí pasan principalmente a hígado y pulmones, y otros sitios óptimos para el desarrollo post-oncósfera (Figuras 5H y 5A). Días después, las oncósferas comienzan a desarrollarse en quistes, y la duración de este proceso varía según las distintas especies de hospederos intermediarios (Figuras 5H y 5A).

El metacestode o quiste hidático es unilocular esférico y se mantiene distendido gracias a que contiene un líquido claro y transparente llamado líquido hidático. La pared del quiste se compone de dos capas: una externa y acelular, de estructura laminada y formada por mucopolisacáridos; y otra interna, la membrana germinativa, constituida por epitelio nucleado, capaz de proliferar originando agregados de células que se vacuolizan y generan las denominadas vesículas prolíferas. Asimismo, en el interior de éstas, se forman por gemación los PSC (cabezas de futuros gusanos). Con el tiempo, las vesículas se desprenden de la capa germinativa y flotan libremente en el interior del quiste (vesículas hijas); algunas se rompen y liberan los PSC que se acumulan constituyendo la llamada “arenilla hidatídica”. El quiste queda recubierto por una capa de tejido conjuntivo (capa adventicia) resultante de la reacción inflamatoria del hospedero [Siracusano *et al.*, 2009].

En el humano (hospedero intermediario accidental), los quistes crecen lentamente, de 1 a 5 cm por año, pudiendo llegar a los 20 cm de diámetro en el hígado. Luego de un tiempo pueden formarse septos internos y quistes hijos que modifican el patrón unilocular característico de los quistes jóvenes. En el transcurso de su desarrollo pueden comprimir estructuras adyacentes, fisurarse, infectarse o romperse. En caso de que las vísceras infectadas de un hospedero intermediario sean el alimento de un potencial hospedero definitivo, los PSC tienen la capacidad de diferenciarse en gusanos adultos intestinales, cerrándose así el ciclo de vida del parásito [Thompson, 1995]. Cabe destacar que toda especie animal en la que es naturalmente posible el establecimiento de metacestodos puede ser considerada hospedero intermediario, aunque si dicha especie no permite la continuidad del ciclo, se la denomina “hospedero intermediario accidental”, como es el caso de los humanos [Agudelo-Higueta *et al.*, 2016].

Finalmente, cuando un quiste fértil se rompe accidentalmente, se produce una siembra interna de PSC que, dada su plasticidad, pueden evolucionar a nuevos quistes en el hospedero intermediario [Thompson, 1995]. A este tipo de EQ, denominada secundaria, se la considera un problema grave asociado al procedimiento quirúrgico de remoción de quistes hidáticos primarios, tratamiento de referencia para la EQ en humanos. De hecho, y aunque los porcentajes reales de casos de EQ secundaria son difíciles de

analizar, en la literatura existente se han reportado tasas de recidivas que alcanzan hasta un 35% de los pacientes operados; dependiendo principalmente del tipo de cirugía, las características técnico-sanitarias del block quirúrgico, el tiempo de seguimiento post-cirugía y la administración -o no- de fármacos antiparasitarios [Schiller, 1966; Mottaghian & Saidi, 1978; Morel *et al.*, 1988; Little *et al.*, 1988; Teggi *et al.*, 1993; Saimot, 2001; Abdelraouf *et al.*, 2015; Velasco-Tirado *et al.*, 2017; Pang *et al.*, 2018].

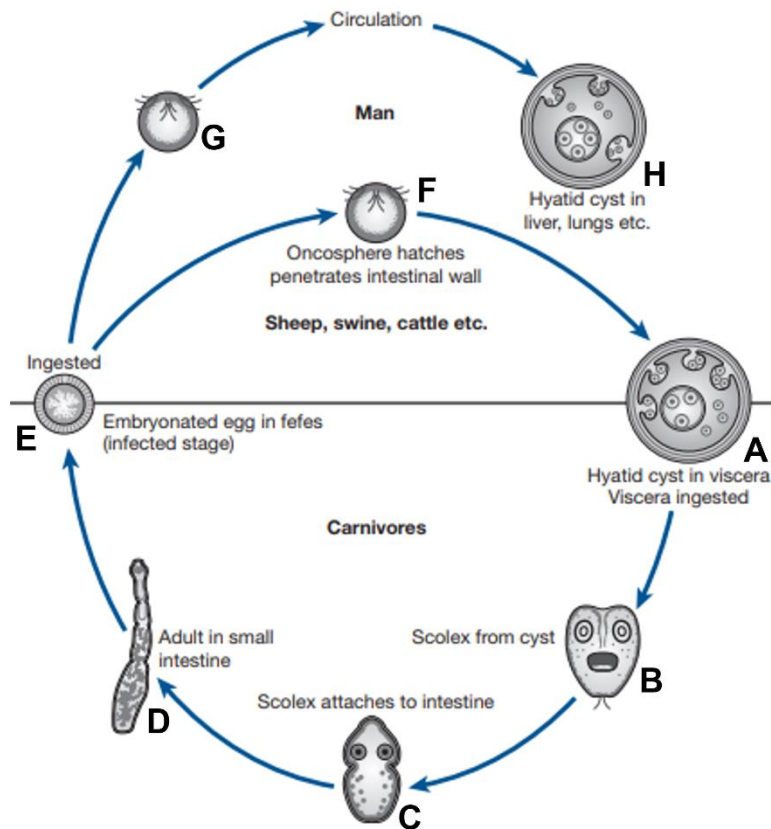


Figura 5. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* s.l. (A): Quistes hidáticos fértiles provenientes de vísceras de hospederos intermedios son ingeridos por hospederos definitivos; (B y C): los escólex se liberan de los quistes y se adhieren al intestino del hospedero definitivo; (D y E): el gusano adulto se desarrolla en el intestino delgado del hospedero definitivo produciendo huevos embrionados (oncósferas); (F y G): las oncósferas liberadas con las heces de hospederos definitivos son ingeridas por hospederos intermedios y atraviesan su pared intestinal; (H y A): a partir de las oncósferas se desarrollan los quistes hidáticos en las vísceras de los hospederos intermedios (principalmente hígado y pulmones) [modificada de Ryan *et al.*, 2019].

1.6.2. Epidemiología de la equinococosis quística.

La EQ es una zoonosis de distribución cosmopolita, siendo especialmente endémica (e incluso hiperendémica) en gran parte del territorio oeste de China y Asia central, en los países litorales del mar Mediterráneo, en el sur de Brasil, en las regiones montañosas de Perú, en el cono sur de América del Sur (Argentina, Chile y Uruguay), en Australia y en partes del cuerno de África [Yang *et al.*, 2006; Moro *et al.*, 2008; Cucher *et al.*, 2015]. Particularmente, en humanos presenta una prevalencia mundial aproximada de 6 millones de personas infectadas [Siracusano *et al.*, 2009; Thompson, 2008; Moro & Schantz, 2009] y es considerada actualmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad desatendida [www.who.int/topics/tropical_diseases/]. Asimismo, es la enfermedad tropical desatendida de mayor prevalencia e incidencia en Uruguay [Cucher *et al.*, 2015]. Estimaciones sobre el impacto económico de esta enfermedad han sugerido pérdidas mundiales anuales de entre 1 y 3.6 millones de DALYs (del inglés, *Disability-Adjusted Life Year*) a causa de EQ en humanos, y de 3 mil millones de dólares americanos en las industrias ganaderas, y la magnitud de dichas pérdidas se debe, en parte, a su amplia distribución mundial [Budke *et al.*, 2006; Craig *et al.*, 2007].

Desde el punto de vista epidemiológico, la identificación regional de las cepas/genotipos circulantes de *E. granulosus* s.l. es relevante para la salud pública por distintos motivos. Por ejemplo, la forma adulta del parásito de las cepas G2, G5 y G6 posee un tiempo de maduración más corto y esto lleva a que el intervalo para la administración de medicamentos para tratar perros infectados deba ser menor en las zonas donde dichas cepas son predominantes [Rosenzvit *et al.*, 1999]. A su vez, ciertas actividades humanas (por ejemplo, alimentar perros con vísceras crudas de ovejas) facilitan la transmisión de la cepa G1 y, por consiguiente, elevan el riesgo de infecciones humanas [Moro *et al.*, 2008]. En Uruguay, la epidemiología molecular de *E. granulosus* s.l. ha sido escasamente estudiada, habiéndose reportado solamente la circulación de *E. granulosus* s.s. (genotipo G1) y *E. ortleppi* (genotipo G5) en ganado bovino [Cucher *et al.*, 2015].

En zonas endémicas, los valores de incidencia en humanos pueden superar los 50 cada 100.000 personas-año en áreas endémicas, y tasas de prevalencia tan altas como 5-10% se han reportado en zonas del Perú, del este de África y del oeste de China [Craig *et al.*, 2007]. Más específicamente, en la región central de Perú se ha reportado que un 20% de la población resultó ser seropositiva contra antígenos de *E. granulosus* s.l., mientras que sólo un 3% fue diagnosticada para EQ mediante técnicas imagenológicas [Gavidia *et al.*, 2008]. Resultados similares se han reportado en Yirka, un poblado ubicado en la región

norte de Israel, donde si bien el 9% de los individuos examinados mostró resultados serológicos positivos, solo el 1.6% fue finalmente diagnosticado para EQ [Nahmias *et al.*, 1991]. Esta disonancia entre resultados serológicos e imagenológicos también ha sido reportada en Uruguay, más específicamente en la región de Caraguatá (Tacuarembó), donde el 8.8% de los habitantes mostraron ser seropositivos para antígenos de *E. granulosus* s.l., mientras que solo el 0.8% tuvo diagnóstico positivo para EQ mediante estudios imagenológicos [Hernández *et al.*, 2005]. Estos resultados podrían sugerir que sólo una proporción “pequeña” de desafíos humanos con oncósferas de *E. granulosus* s.l. resultarían en el establecimiento exitoso del parásito con el consiguiente desarrollo de la EQ.

1.6.3. Diagnóstico y tratamiento de la equinocosis quística.

El diagnóstico y seguimiento de la EQ en humanos se basa en gran medida en el resultado de técnicas imagenológicas, principalmente ultrasonido (US), tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM). El US muestra una sensibilidad diagnóstica del 93-98% y es el método de elección para la detección de quistes hidáticos hepáticos, mientras que la TC (de sensibilidad diagnóstica estimada en 90-97%) se utiliza para confirmar el diagnóstico inicial y para detectar la presencia de “quistes hijos” y/o calcificados [Tsaroucha *et al.*, 2005; Mandal & Mandal, 2012]. Por su parte, la RM es fundamental para el diagnóstico de la EQ cerebral [Tsaroucha *et al.*, 2005; Mandal & Mandal, 2012]. Finalmente, el uso de US ha permitido realizar una clasificación de manera estandarizada de quistes hidáticos según su “estado vital” (activos: CE1, CE2 y CE3a; transicionales: CE3b; inactivos: CE4 y CE5) por parte del “Grupo Informal de Trabajo sobre Equinocosis” (IWGE) de la OMS. Esta clasificación es útil desde el punto de vista clínico al momento de elegir la mejor alternativa terapéutica para el paciente [Brunetti *et al.*, 2010; 2016].

Por otro lado, los métodos serológicos utilizados en diagnóstico y seguimiento de pacientes con EQ consisten básicamente en la detección de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de líquido hidático (nativos o recombinantes), mayoritariamente AgB. Sin embargo, se han reportado varias desventajas en su uso debido a su moderada o baja sensibilidad y especificidad diagnósticas, y a su pobre valor pronóstico durante el seguimiento post-quirúrgico, ya que dichos anticuerpos perduran por largos períodos de tiempo en circulación [Manzano-Román *et al.*, 2015]. A su vez, los niveles de IgG específicas varían con el número, el tamaño, la localización y el “estado vital” de los quistes [Lissandrin *et al.*, 2016], haciendo

que solamente un 60-80% de los casos de EQ en humanos confirmados por cirugía muestren serología positiva [Craig, 1997]. Estas debilidades influyen negativamente en el uso de técnicas serológicas por parte de los médicos clínicos tratantes. De todas formas, los niveles de subclases de IgG específicas contra AgB son buenos marcadores del estado de la infección, ya que títulos elevados de IgG4 se asocian a fases evolutivas de la EQ (quistes tipo CE1, CE2 y CE3a-CE3b), mientras que títulos elevados de IgG1, IgG2 e IgG3 se correlacionan con fases involutivas de la enfermedad (quistes tipo CE4 y CE5) [Daeki *et al.*, 2000]. Asimismo, se ha reportado que individuos con infección primaria presentan niveles menores de IgE e IgG4 específicas contra líquido hidático comparado con pacientes con recidivas [Riganò *et al.*, 1995a, 1995b; 1996; Hernández-Pomi *et al.*, 1997]. De esta manera, podría pensarse que la calidad de la respuesta humoral de pacientes con EQ, en términos de isotipos y subclases de anticuerpos inducidas, podría condicionar el desarrollo de la infección.

El espectro clínico de la EQ en humanos se extiende desde infecciones asintomáticas a severas, y raramente fatales. Actualmente existen cuatro aproximaciones para el manejo clínico de la enfermedad: en el caso de quistes activos las opciones son cirugía, técnicas percutáneas y/o quimioterapia, mientras que para quistes inactivos lo usual es el seguimiento continuo de su evolución. Para decidir cuál aproximación utilizar en cada paciente, se debe tomar en cuenta el estadio del quiste, su tamaño y localización anatómica, y las co-morbilidades potencialmente asociadas [Brunetti & Junghans, 2009; Piccoli *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2014].

El tratamiento farmacológico para pacientes con EQ se basa principalmente en el uso de benzimidazoles, dentro de los cuales los más utilizados -albendazol y mebendazol- son a menudo parcialmente efectivos y rara vez curativos con regresión completa de los quistes. Reportes con resultados obtenidos en más de 2.000 casos bien controlados tratados con benzimidazoles y evaluados hasta 12 meses, han demostrado que el 10-30% de los quistes “mueren” (curan), el 50-70% responden parcialmente (degeneración o reducción del tamaño de los quistes) y el 20-30% no desarrolla evidencia de respuesta mediante cambios morfológicos [Horton, 1997; Todorov *et al.*, 1992; Horton, 2003; Junghans *et al.*, 2008]. Además, y sobre la base de un metanálisis con 711 pacientes, se estimó que incluso 2 años después del inicio del tratamiento con benzimidazoles, el 40% de los quistes siguen activos [Stojkovic *et al.*, 2009].

1.6.4. Respuesta inmune en humanos con EQ.

En forma similar a lo que ocurre con otras infecciones por cestodos, la EQ desencadena en el hospedero intermedio respuestas inmunes que se asume no se asocian con inmunidad protectora. Por lo tanto, se ha propuesto ampliamente que el parásito es capaz de evadir y/o modular activamente la respuesta del hospedero en favor de su sobrevivencia a través de distintos mecanismos complejos que aún no conocemos en su totalidad. Por su parte, si bien la respuesta inmune de pacientes con EQ ha sido estudiada mediante distintas aproximaciones, todavía existe incertidumbre acerca del rol que cumplen diversos efectores inmunes en la defensa del hospedero.

La respuesta inmune frente a *E. granulosus* s.l. en hospederos intermedios está dividida en las fases de pre-enquistamiento y post-enquistamiento delimitadas entre sí por la formación de la capa laminar alrededor de las oncósferas en su desarrollo hacia metacestodos [Rogan *et al.*, 2015]. Esta transición se asocia conceptualmente con la pérdida de susceptibilidad del parásito respecto al ataque del sistema inmune del hospedero, ya sea en el contexto de la EQ primaria (causada por la ingesta de oncósferas) o secundaria (debida a la siembra de PSC) [Tamarozzi *et al.*, 2016]. Resulta complejo estudiar la respuesta inmune frente a oncósferas infectivas ya que las infecciones naturales ocurren de manera asintomática, mientras que a nivel experimental su obtención y manipulación presenta problemas de bioseguridad. Sin embargo, se ha visto que, aunque la estrategia de eliminación "*disable, degrade and dislocate*" resulta efectiva para muchas infecciones por helmintos, en el caso de la EQ, una vez que se establece el quiste, este ya no puede ser eliminado por el sistema inmune [Zhang *et al.*, 2012].

De todas formas, distintos parámetros de la respuesta inmune en humanos han sido caracterizados. Primero, se ha reportado que anticuerpos específicos contra antígenos de oncósferas participarían en la eliminación del parásito y serían centrales en la respuesta inmune protectora [Dempster *et al.*, 1992]. A pesar de que los niveles de dichos anticuerpos son bajos en etapas tempranas de la infección [Zhang *et al.*, 2003], se ha visto que las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos serían uno de los mecanismos involucrados en la eliminación del parásito [Beardsell & Howell, 1984; Rogan *et al.*, 1992]. En segundo lugar, y aunque no se le ha podido asignar aún una relevancia real en el contexto de la defensa del hospedero frente a *E. granulosus* s.l., durante la etapa crónica de la infección se producen altos niveles de anticuerpos específicos IgM, IgE e IgG, principalmente las subclases IgG1 e IgG4 [Dessaint *et al.*, 1975; Craig, 1986; Pinon *et al.*, 1987; Wen & Craig, 1994; Sterla *et al.*, 1999; Daeki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Khabiri *et al.*, 2006]. Aun así, en un 30-40% de los pacientes con EQ no se

observan niveles detectables de anticuerpos contra antígenos de líquido hidático, si bien en suero de muchos de ellos se pueden detectar niveles variables de inmunocomplejos circulantes. Estos últimos podrían regular e inhibir la activación y proliferación de células B, directamente sobre ellas o bien mediante mecanismos T reguladores [Zhang *et al.*, 2012]. Además, recientemente se ha reportado que factores tales como la edad del paciente, el número de quistes y el tamaño de estos, también influyen sobre los resultados de las pruebas serológicas, tal como se había demostrado respecto al efecto de la actividad/viabilidad de los quistes hepáticos [Lissandrin *et al.*, 2016].

Por otro lado, y como se mencionó previamente, los helmintos parásitos se caracterizan por inducir el desarrollo de potentes respuestas inmunes de tipo Th2 en sus hospederos [Díaz & Allen, 2007; Jenkins & Allen, 2010]. En cambio, y a diferencia de la mayoría de los helmintos, la inmunidad protectora contra cestodos parecería depender de efectores inmunes típicamente asociados a respuestas de tipo Th1, y *E. granulosus* s.l. no sería la excepción en su grupo [Hernández-Pomi *et al.*, 1997; Riganò *et al.*, 1999a; Riganò *et al.*, 1999b, Amri *et al.*, 2007; Amri *et al.*, 2009]. Estudios de la década de los 90s reportaron que las PBMCs (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de individuos con recidivas estimuladas *in vitro* con líquido hidático producen niveles significativamente mayores de IL-5, IL-4 e IL-10, con valores indetectables o muy bajos de IFN- γ respecto al grupo de pacientes con EQ primaria [Riganò *et al.*, 1995a; Riganò *et al.*, 1995b; Riganò *et al.*, 1996]. En consonancia con estos resultados, se reportó luego la presencia de un número mayor de eosinófilos circulantes en pacientes con recidivas respecto a los individuos con EQ primaria [Hernández-Pomi *et al.*, 1997]. Resultados recientes han confirmado que la existencia de un perfil de citoquinas tipo Th2 en pacientes con EQ no sería protector para el hospedero intermediario [Shan *et al.*, 2011]. Por ejemplo, se observó que en pacientes operados y con quimioterapia antihelmíntica post-quirúrgica, sólo en aquellos donde el tratamiento resultó exitoso los valores de la concentración sérica de IL-4 e IL-10 descendieron significativamente. Además, aquellos pacientes con tratamiento no exitoso mostraron valores indetectables de IFN- γ [Naik *et al.*, 2016]. Asimismo, se ha visto que los niveles de nitritos producidos *in vitro* por PBMCs de pacientes estimuladas con Ag5, aumentan en concomitancia con la secreción de IFN- γ ; proponiéndose entonces que la producción de óxido nítrico (NO) por parte del hospedero influiría en el estatus de los quistes hidáticos [Ait-Aissa *et al.*, 2006]. En este sentido, se reportó también que el co-cultivo de PBMCs con PSC en presencia de IFN- γ resulta en una alta tasa de muerte de los parásitos, en paralelo con altos niveles de producción de NO, mientras que lo contrario se observó al realizar los co-cultivos en presencia de IL-4 o IL-10 [Amri *et al.*, 2007; Amri *et al.*, 2009]. Además, siguiendo esta hipótesis, se ha reportado que la concentración de nitritos en el suero

de pacientes con recidivas es significativamente menor a la hallada en individuos con EQ primaria, apoyando el posible papel anti-parasitario de la producción de NO [Zeghir-Bouteldja *et al.*, 2013]. A su vez, se ha sugerido también que las respuestas Th17 podrían actuar en forma conjunta con las respuestas Th1 en la EQ humana [Mezioug & Touil-Boukoffa, 2012]. Estos y otros resultados [Touil-Boukoffa *et al.*, 1997] sugerirían que la producción de NO inducida por IFN- γ constituiría un mecanismo de defensa contra *E. granulosus* s.l. en humanos y, por ende, el perfil de citoquinas inducido en los pacientes condicionaría el pronóstico de la infección.

Por otro lado, se ha postulado que el perfil de la respuesta humoral y de citoquinas del hospedero determinaría en gran medida el éxito del establecimiento de la infección (susceptibilidad del hospedero) o la eliminación del parásito (resistencia del hospedero), ya sea en humanos o en modelos experimentales [Yang *et al.*, 2012]. Existen algunos reportes en los que se trata el tema de la susceptibilidad/resistencia a la infección por *E. granulosus* s.l. en humanos. Por ejemplo, se analizaron los polimorfismos existentes en los genes TAP1 y TAP2 en niños turcos con EQ, y se reportó que la heterocigosis u homocigosis en ciertos polimorfismos se asocia con distintos niveles de susceptibilidad a la infección [Kiper *et al.*, 2010]. Además, se ha visto que, sobre la población yemení, los portadores del alelo HLA-DR16 serían más susceptibles al desarrollo de EQ, mientras que aquellos portadores de los alelos HLA-DR1, -DR8 y -DR52 mostrarían ciertos niveles de resistencia a la infección [Al-Ghoury *et al.*, 2010]. En este punto, cabe destacar que el alelo HLA-DR1 también ha sido asociado con resistencia (junto al alelo HLA-B18) en niños turcos, mientras que en esta población el alelo HLA-DR15 se asociaría con susceptibilidad frente a la EQ [Yalcin *et al.*, 2010]. En este sentido, se ha reportado que en la población egipcia aquellos portadores de los alelos HLA-DR3 y -DR11 presentan mayor riesgo de padecer la enfermedad [Azab *et al.*, 2004a]. De esta manera, se ha visto una correlación elevada entre portar dichos alelos y muy altos títulos de anticuerpos IgG específicos contra líquido hidático [Azab *et al.*, 2004b]. Por último y más recientemente, nuestro grupo ha reportado que los anticuerpos de tipo poli-reactivo podrían ser potenciales marcadores humorales de resistencia frente a la EQ tanto en humanos como en el modelo murino de EQ secundaria [García-Luna *et al.*, 2021]. Así, las respuestas de anticuerpos influenciadas por la carga inmunogenética del hospedero podrían relacionarse con fenómenos de resistencia/susceptibilidad frente a la infección por *E. granulosus* s.l. en humanos.

1.7. Modelo murino de equinococosis quística secundaria.

Los ratones de laboratorio han sido extensamente utilizados como modelos biológicos para el estudio de diversos aspectos relacionados a la inmunobiología de la infección por *E. granulosus* s.l. Así, múltiples cepas de ratones y distintos estadios parasitarios (además de diversas vías de inoculación) han sido utilizados para realizar dichas infecciones experimentales [Pennoit-De Cooman *et al.*, 1974; Hernández y Nieto, 1994; Baz *et al.*, 1995; Urrea-Paris *et al.*, 2001; Casado *et al.*, 2001; Siles-Lucas & Hemphill, 2002; Baz *et al.*, 2006; Cucher *et al.*, 2013]. En este sentido, el modelo murino de EQ secundaria ha sido ampliamente utilizado no solo para el estudio de aspectos básicos de la infección por *E. granulosus* s.l. [Baz *et al.*, 2006; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; 2011b; Cucher *et al.*, 2013], sino también para el ensayo preclínico de nuevos agentes quimioterapéuticos [Ceballos *et al.*, 2010; Breijo *et al.*, 2011; Cumino *et al.*, 2012], estudios de potenciales candidatos vacunales [Hernández & Nieto, 1994; Hashemitabar *et al.*, 2005; Burgu *et al.*, 2007]; y de herramientas diagnósticas y/o de seguimiento [Denegri *et al.*, 1995; Ferragut *et al.*, 1998; Mamuti *et al.*, 2002].

En gran medida, el modelo de EQ secundaria ha ganado terreno sobre otros modelos de infección (principalmente la primaria, que consiste en trabajar con oncósferas infectivas) ya que permite utilizar estadios parasitarios no infectivos para el ser humano y, por ende, permite trabajar bajo condiciones de bioseguridad menos estrictas. Sin embargo, algunos trabajos reportan que las oncósferas activan una respuesta inmune potente que suele eliminarlas en su mayoría en pocos días, induciendo además altos niveles de protección frente a desafíos posteriores. Ambos eventos se han demostrado en modelos murinos utilizando diversas rutas de inoculación [Dempster *et al.*, 1991; 1992; Zhang *et al.*, 2001] y en ovejas desafiadas experimentalmente con exposición oral a oncósferas [Heath *et al.*, 1981; Heath & Lawrence, 1996]. La protección reportada dependería de la exposición del hospedero a antígenos presentes en oncósferas y no sería consecuencia de la respuesta inmune generada tras el desarrollo del quiste [Lightowers, 2010]. Asimismo, la protección observada dependería de la presencia de anticuerpos específicos y de la activación del sistema complemento, mejorando en presencia de neutrófilos [Tamarozzi *et al.*, 2016].

Los estudios en base a los cuales se han propuesto algunos mecanismos desencadenados por el parásito para evadir el sistema inmune de su hospedero han sido realizados sobre todo utilizando el modelo de infección secundaria, el cual consiste en la inoculación de PSC viables en la cavidad peritoneal de ratones inmunocompetentes, y se basa en la capacidad de los PSC para diferenciarse a quistes en

hospederos intermediarios [Heath, 1970]. La cepa de ratones Balb/c ha sido la más utilizada y es a partir de la cual se ha obtenido la mayor parte de la información disponible. En ella, la EQ secundaria se desarrolla en dos etapas: una etapa temprana (pre-enquistamiento) que dura hasta el día 20-30 post-inoculación (p.i.), durante la cual los PSC se diferencian a quistes y se establece la infección [Richards *et al.*, 1983]; seguida de una etapa tardía o crónica (post-enquistamiento) la cual puede durar meses y en la que los quistes ya establecidos aumentan de tamaño, y eventualmente se vuelven fértiles [Rogan *et al.*, 2015].

En cuanto a la respuesta celular, se ha visto que la inoculación de PSC provoca una fuerte respuesta inflamatoria local con reclutamiento rápido de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, seguido de linfocitos y observándose activación del sistema complemento [Tamarozzi *et al.*, 2016]. Asimismo, se ha demostrado en distintos sistemas *in vitro* e *in vivo* que los macrófagos, el NO, la proteína catiónica de eosinófilos y el sistema complemento son capaces de afectar negativamente la viabilidad de los PSC [Tamarozzi *et al.*, 2016]. Luego de la inoculación i.p. de ratones con PSC, estos últimos son encapsulados muy rápidamente (7 días p.i.) dando lugar a la formación de pequeños granulomas en ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y diafragma [Riley *et al.*, 1984]. A su vez, se reportó mediante el uso de cámaras de difusión implantadas i.p. que hacia el día 100 p.i., aproximadamente el 2-3% del total de parásitos inoculados se encuentran completamente diferenciados en quistes viables [Breijo *et al.*, 1998]. Además, utilizando el mismo modelo se reportó que la inflamación local desencadenada inicialmente se resuelve y desaparece completamente en torno al día 30 p.i. [Breijo *et al.*, 2008]. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el establecimiento y la sobrevivencia de los quistes hidáticos en la infección secundaria experimental, se asocian con un control local fuerte de la inflamación durante la fase inicial de la diferenciación de los PSC a quistes.

Por otro lado, y en cuanto a la respuesta humoral, los primeros reportes en el modelo de infección secundaria mostraron que en la etapa crónica de la infección existen variaciones cuantitativas y cualitativas en la producción de anticuerpos en forma dependiente del estadio específico del parásito [Araj *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 1992; Haralabidis *et al.*, 1995]. A su vez se ha visto que, a pesar del alto título y la variada especificidad de los anticuerpos generados en los animales infectados, el proceso natural de establecimiento de la infección no parecería verse afectado ya que los quistes son capaces de diferenciarse completamente [Liu *et al.*, 1992; Haralabidis *et al.*, 1995]. Además, estos alcanzan altos niveles en solo unas pocas semanas post-inoculación de PSC viables, pero sus niveles son bajos si se inoculan PSC

muertos; sugiriéndose así que la respuesta inmune sería dependiente de un desarrollo eficiente del proceso infeccioso [Ferragut & Nieto, 1996; Severi *et al.*, 1997]. Asimismo, se ha demostrado que en la respuesta de anticuerpos contra el líquido hidático analizada durante la fase crónica de la infección, no se induce maduración de la avidéz y que además dichos anticuerpos están dirigidos principalmente contra epítopes glucídicos [Ferragut & Nieto, 1996]. También se determinó que los epítopes glucídicos presentes en PSC son inmunodominantes en ratones infectados, y se observó que el cociente entre los títulos específicos de IgG1 e IgG3 contra antígenos somáticos de PSC, así como la avidéz de los anticuerpos IgG3 específicos, decrece a lo largo del tiempo al igual que el reconocimiento de epítopes peptídicos [Severi *et al.*, 1997].

Por su parte, se ha reportado que en la etapa temprana de la infección experimental en ratones Balb/c con una semana de infección, se producen anticuerpos IgM e IgG específicos contra antígenos somáticos de PSC tanto a nivel local como sistémico, pero cuando la inoculación se realizó con PSC muertos los títulos de anticuerpos específicos inducidos fueron muy inferiores (a nivel local y sistémico) [Dematteis *et al.*, 1999], y los mismos serían en su mayoría producto de respuestas T-independientes dirigidas principalmente contra epítopes glucídicos [Baz *et al.*, 2006; 2008]. Más recientemente, nuestro grupo reportó que en ratones Balb/c con 5 días de infección se producen niveles significativos de anticuerpos IgM e IgG2b específicos, contra antígenos somáticos de PSC, secretados por plasmoblastos peritoneales [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b]. Esta respuesta específica inducida tempranamente podría ser relevante en el establecimiento de la infección, ya que se ha reportado que tanto *in vivo* como *in vitro* los anticuerpos contribuirían a la actividad protoscolicida de la respuesta inmune del hospedero [Dempster *et al.*, 1992; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a; Miles *et al.*, 2020a].

Con respecto a la respuesta de citoquinas, uno de los primeros trabajos en el área mostró que en el suero de ratones Balb/c en etapa crónica de infección se detectan citoquinas tanto del tipo Th1 como del tipo Th2 [Haralabidis *et al.*, 1995]. En este sentido, y en forma análoga a lo que sucede en humanos, los helmintos parásitos se caracterizan por potenciar el desarrollo de potentes respuestas inmunes de tipo Th2 también en modelos murinos [Díaz & Allen, 2007; Jenkins & Allen, 2010]. Sin embargo, y como se comentó previamente, la inmunidad contra *E. granulosus* s.l. dependería de efectores inmunes asociados a respuestas de tipo Th1 [Rogan, 1998; Dematteis *et al.*, 2003; Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2008]. Más específicamente, Dematteis *et al.* (1999) mostraron que en la etapa temprana de la infección secundaria en ratones Balb/c la respuesta sistémica de citoquinas es claramente de tipo Th2. La estimulación *in vitro* (con antígenos somáticos de PSC) de esplenocitos de ratones con 1 a 3 semanas de infección, induce

niveles significativos de IL-4, IL-5 e IL-10, sin detectarse niveles apreciables de IFN- γ . Es claro que esta respuesta temprana de tipo Th2 no se asocia con mecanismos protectores, ya que la infección igualmente logra establecerse. Todos estos resultados apoyarían la hipótesis de que el IFN- γ (citoquina clave en las respuestas de tipo Th1) tendría un papel central en la eliminación del parásito. En línea con estos datos, y al analizar con más detalle la respuesta de citoquinas, nuestro grupo describió en ratones Balb/c la existencia de una cinética bifásica en la expresión temprana de citoquinas a nivel peritoneal, caracterizada por una inducción inicial de citoquinas tipo-Th1 seguida de un cambio hacia un perfil tipo-Th2 durante los primeros días post-infección [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a]. En dicho trabajo, se reportó que durante la primera semana post-inoculación de PSC, la inducción de IFN- γ se eleva en los primeros 3 días p.i., mientras que la de IL-4 e IL-5 aumenta a partir del día 5 p.i. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a].

Por su parte, y como se comentó previamente, la información existente ha sido obtenida principalmente en base al uso de ratones de la cepa Balb/c como modelo de estudio. Sin embargo, se sabe que el perfil de la respuesta inmune del hospedero depende -al menos en parte- de sus características genéticas. En este sentido, son varios y variados los estudios que muestran diferencias en las respuestas inmunes adaptativas desarrolladas por ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6, polarizándolas hacia perfiles del tipo Th2 y Th1, respectivamente. Un ejemplo clásico es la infección experimental por *Leishmania spp.*, en la cual los ratones de la cepa Balb/c son susceptibles a la infección, mientras que los ratones de la cepa C57Bl/6 son resistentes [Bogdan *et al.*, 1996; Etes & Muller, 1998; Launois *et al.*, 1998]. Sin embargo, los fenómenos de resistencia o susceptibilidad de cada una de dichas cepas a infecciones por helmintos, ha mostrado ser patógeno-específica [Hoffmann *et al.*, 2000; Terrazas, 2008; Filbey *et al.*, 2014]. En este sentido, existe un reporte de la década de los 90 [Dempster *et al.*, 1991] y cuatro trabajos más recientes de nuestro grupo de investigación [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a; 2016b; García-Luna *et al.*, 2021; Miles *et al.*, 2020a] en los que se demostró que distintas cepas de ratones de laboratorio experimentan susceptibilidad diferencial frente a la infección por *E. granulosus* s.l., estableciéndose algunas diferencias en el desarrollo de sus respuestas inmunes que podrían explicar dicho fenómeno.

En primer lugar, Dempster *et al.* (1991) reportaron que al administrar por vía oral oncósferas activadas a ratones endogámicos de las cepas DBA, CBA, Balb/c y C57Bl/6 y exogámicos CF-1, los ratones Balb/c mostraron la mayor susceptibilidad a la infección, mientras que aquellos pertenecientes a la cepa C57Bl/6 resultaron ser los únicos totalmente resistentes. De manera interesante, la administración i.p. de oncósferas activadas tuvo un efecto diferente: mientras que los ratones de la cepa CBA fueron los

más susceptibles a la infección, las cepas C57Bl/6 y Balb/c resultaron ser más resistentes, aunque no totalmente refractarias [Dempster *et al.*, 1991]. En segundo lugar, en los trabajos de nuestro grupo se demostró que los ratones Balb/c son más susceptibles al desarrollo de EQ secundaria que los C57Bl/6 [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Así, se profundizó en la búsqueda de mecanismos que ayuden a explicar dicha diferencia y se observó que ambas cepas desarrollan distintos perfiles de respuestas tempranas y locales de citoquinas. Globalmente, se reportó que -a diferencia de los ratones Balb/c- los ratones C57Bl/6 desarrollan respuestas mezcladas de IL-5/TNF- α en concomitancia con respuestas de tipo Th2 de baja intensidad. Asimismo, exhiben infiltrados peritoneales ricos en macrófagos y células B, pero pobres en eosinófilos. Por último, se vio también que las diferencias mencionadas a nivel local en ratones C57Bl/6, se correlacionan con una mayor producción de óxido nítrico y con una mayor actividad anti-parasitaria *in vitro* de sus células peritoneales (actuando en forma directa o mediante mecanismos de ADCC, del inglés *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Estos resultados sugerirían entonces que respuestas de tipo Th2 de baja intensidad en concomitancia con mecanismos celulares activos asociados a respuestas de tipo Th1 determinarían la resistencia del hospedero intermediario experimental frente a la EQ secundaria.

Por otro lado, las cepas de ratones Balb/c y C57Bl/6 poseen distintos haplotipos de moléculas del MHC-II, lo cual provocaría una presentación diferencial de antígenos que influiría sobre el espectro de especificidades y avidéz de los anticuerpos inducidos en cada una de ellas [Miles, *et al.*, 2020a]. En este sentido, nuestro grupo reportó la existencia de diferencias entre cepas en cuanto a los niveles de anticuerpos específicos -naturales e inducidos- contra el parásito [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Así, se observó que niveles mayores de IgG2b naturales se correlacionan con un número menor de quistes desarrollados y una menor carga parasitaria, e interesantemente, dichos anticuerpos están significativamente elevados en los ratones de la cepa C57Bl/6. Por otro lado, se observó que los ratones Balb/c infectados exhiben una polarización temprana de anticuerpos inducidos hacia IgG1 de alta avidéz, mientras que los C57Bl/6 muestran una respuesta con predominancia de IgM/IgG2c/IgG2b; sugiriéndose así que las respuestas polarizadas hacia IgG1 se relacionarían con susceptibilidad a la EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Estos resultados son de gran interés ya que IgM, IgG2c e IgG2b son isotipos/subclases de anticuerpos con excelente capacidad activadora del sistema complemento [Nimmerjahn & Ravetch, 2005; 2006], el cual posee una demostrada actividad protoscolicida [Ferreira *et al.*, 1992].

Por último, hemos reportado muy recientemente que los anticuerpos de tipo poli-reactivo podrían ser potenciales marcadores humorales de resistencia frente a la EQ tanto en humanos como en el modelo murino de EQ secundaria [García-Luna *et al.*, 2021]. Estos reportes sugieren que los anticuerpos (naturales e inducidos) jugarían un papel importante en la susceptibilidad del hospedero experimental frente a infección por *E. granulosus* s.l., quedando claro entonces que estas diferencias en susceptibilidad han sido útiles a la hora de descifrar cuáles serían los mecanismos inmunes efectores óptimos para el hospedero experimental frente al desarrollo de la EQ secundaria.

Es importante destacar que toda esta evidencia experimental se obtuvo trabajando con PSC como estadio infectivo, pudiendo no ser exactamente extrapolable a la situación natural de infección del hospedero intermediario con el estadio de oncósfera [Tamarozzi *et al.*, 2016]. Por último, creemos importante destacar que el establecimiento de la EQ en humanos es generalmente un proceso asintomático y que, por lo tanto, resulta prácticamente imposible estudiar la respuesta inmune temprana contra *E. granulosus* s.l. en contextos naturales de infección humana. En este sentido, si bien el modelo de EQ secundaria tiene sus limitaciones, ya que por ejemplo al utilizar ratones normales no quedan reflejados los posibles efectos que tendría la infección primaria original, igualmente resulta de gran ayuda para la interpretación de los procesos inmunológicos que ocurren en la etapa crónica de la infección, y para proponer posibles hipótesis referidas a los eventos que ocurrirían en las etapas tempranas de la misma [Tamarozzi *et al.*, 2016].

2. Relevancia del tema de estudio y antecedentes inmediatos.

Dentro de la lista de 17 Enfermedades Tropicales Desatendidas elaboradas por la OMS, la EQ es la enfermedad de mayor prevalencia e incidencia en Uruguay. Asimismo, es una enfermedad que genera impactos socio-económicos altamente negativos en regiones donde la densidad de ganado (bovino, ovino y/o porcino) es muy alta. Además, en humanos (hospederos intermediarios accidentales para *E. granulosus* s.l.) la denominada EQ secundaria es considerada un serio problema asociado al procedimiento quirúrgico de remoción de quistes hidáticos primarios, tratamiento de referencia para dicha enfermedad. De hecho, se han reportado tasas de recidivas post-quirúrgicas de hasta un 35%. En este sentido, el modelo murino de EQ secundaria ha sido ampliamente validado y utilizado tanto para el estudio de aspectos básicos como aplicados de la infección, permitiendo proponer que (i) la inducción temprana de respuestas de tipo Th2 favorecería el establecimiento de la infección, mientras que las respuestas de tipo Th1 serían perjudiciales para el parásito, y (ii) que las respuestas de anticuerpos contra antígenos parasitarios y las características fenotípicas de los infiltrados celulares juegan un papel relevante en limitar el desarrollo de la infección secundaria.

La EQ secundaria experimental se desarrolla a nivel de cavidad peritoneal, sitio anatómico rico en linfocitos B1a que, al igual que las células T, se caracterizan por co-expresar los receptores CD5 y CD6. Por ello, y en colaboración con el grupo de investigación “*Inmunorreceptores del Sistema Innato y Adaptativo*” dirigido por el Dr. Francisco Lozano (Departamento de Biomedicina - Facultad de Medicina - Universidad de Barcelona, España), nuestro grupo analizó y demostró la capacidad que tienen los ectodominios de estos receptores de reconocer antígenos parasitarios presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Además, y en base a los reportes existentes sobre el uso profiláctico y/o terapéutico exitoso de rshCD5 y rshCD6 en modelos murinos de infecciones fúngicas y/o bacterianas, evaluamos su potencial uso profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria. Así, demostramos que la administración exógena -pre-inoculación de PSC- de rshCD5, y en menor medida de rshCD6, redujo la proporción de ratones efectivamente infectados, así como el número de quistes hidáticos desarrollados y la carga parasitaria total por ratón [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Estos efectos profilácticos podrían atribuirse a una inmuno-modulación inducida mediante bloqueo de componentes parasitarios clave presentes en los PSC ya que (i) la adición de rshCD5 o rshCD6 a cultivos de células peritoneales estimuladas con antígenos tegumentarios altera el perfil de citoquinas inducido de manera potencialmente

beneficiosa para el hospedero, y (ii) los ligandos parasitarios identificados para ambos receptores han sido previamente reportados como importantes blancos terapéuticos contra *E. granulosus* s.l.

Así, los resultados obtenidos hasta el momento son, por un lado, relevantes en sí mismos ya que son escasos los receptores innatos (codificados en la línea germinal) a los cuales se les conoce capacidad de reconocer antígenos de helmintos parásitos y, por otro lado, de manera análoga a lo observado en modelos de infecciones bacterianas o fúngicas, nos permitieron explorar un posible uso profiláctico de rshCD5 y/o rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria. Por ello, en la presente tesis se exploraron mediante distintas aproximaciones experimentales diversos efectos funcionales derivados del bloqueo de la interacción entre antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. con los receptores linfocitarios CD5 y CD6.

3. Hipótesis y objetivos.

Hipótesis. Nuestra hipótesis de trabajo plantea que el reconocimiento de antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. por parte de los receptores *scavenger* CD5 y CD6 influye en el desarrollo de la respuesta inmune contra el parásito en el modelo murino de EQ secundaria. En consecuencia, el bloqueo de dicha interacción -ya sea mediante la administración exógena de rshCD5/rshCD6 o por ausencia de su expresión en la superficie celular- permitiría modular la respuesta inmune anti-parasitaria con fines profilácticos.

Objetivo general. Analizar la relevancia funcional del reconocimiento de antígenos parasitarios por parte de los receptores *scavenger* CD5 y CD6 en el desarrollo de infecciones por helmintos. En particular, se plantea utilizar la etapa temprana del modelo murino de EQ secundaria como un caso de estudio.

Objetivo específico #1. Evaluar posibles mecanismos de protección inducidos mediante la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria. Así, las preguntas que plantea responder este objetivo específico son:

¿Poseen las moléculas rshCD5 o rshCD6 una acción anti-parasitaria intrínseca?

¿Ejercen las moléculas rshCD5 o rshCD6 una modulación de la respuesta inmune anti-parasitaria?

Objetivo específico #2. Analizar el papel de los receptores *scavenger* CD5 y CD6 en la interacción entre antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. y células peritoneales murinas. Así, las preguntas que plantea responder este objetivo específico son:

¿Cuál es la relevancia de los receptores CD5 y CD6 en la interacción física entre antígenos tegumentarios de *E. granulosus* s.l. y células peritoneales murinas?

¿Son relevantes los receptores CD5 y CD6 en la respuesta inmune frente a la inoculación con antígenos tegumentarios de *E. granulosus* s.l.?

CAPÍTULO 2

Objetivo específico 1. *Evaluar posibles mecanismos de protección inducidos mediante la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria.*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Proteínas recombinantes. Los receptores recombinantes utilizados fueron gentilmente cedidos por el Dr. Francisco Lozano del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS) de Barcelona (España). La producción de las proteínas recombinantes solubles que abarcan los ectodominios completos de los receptores humanos CD5 (rshCD5; desde R²⁵ hasta D³⁴⁵) y CD6 (rshCD6; desde D²⁵ hasta R³⁹⁷) se realizó en bases a métodos generales previamente reportados por el equipo del Dr. Lozano [Sarrías *et al.*, 2004], pero utilizando clones de la línea celular SURE CHO-M de la plataforma Selexis SURE (Ginebra, Suiza). Los sobrenadantes de producción -libres de suero- se procesaron mediante protocolos de cromatografía de exclusión molecular desarrollados por la empresa PX'Therapeutics (Grenoble, Francia), y tanto rshCD5 como rshCD6 se almacenaron hasta su uso a -80°C en PBS estéril (pH 7,4) conteniendo glicerol 10% (v/v).

4.2. Parásitos. Los protoscoleces (PSC) fueron obtenidos por punción aséptica de quistes hidáticos fértiles -de pulmón- de origen bovino según Baz *et al.* (1995). Luego, los PSC fueron lavados varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 conteniendo Gentamicina (40 µg/mL) y su viabilidad fue determinada mediante tinción (exclusión) con eosina 0,5% (m/v) [Dematteis *et al.*, 2003]. Solo fueron utilizados aquellos lotes de PSC con valores de viabilidad superiores al 90%.

4.3. Cultivo *in vitro* de PSC con las moléculas rshCD5 y rshCD6. Se seleccionaron dos condiciones de cultivo *in vitro*: en condiciones metabólicamente estresantes (PBS) u óptimas (RPMI). Así, en primer lugar, los PSC obtenidos fueron resuspendidos en PBS estéril conteniendo Estreptomycin (100 µg/mL); Penicilina (60 µg/mL) y Anfotericina B (250 ng/mL). Luego, 100 µL de la suspensión fueron dispensados en placas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de 100 PSC/pocillo. Posteriormente, fueron dispensadas por quintuplicado, concentraciones crecientes de rshCD5 o rshCD6 (0,1; 1,0 y 10,0 µg/mL), así como glicerol 0,5% v/v en PBS (control del vehículo) y solo PBS también como control negativo. Las placas

fueron incubadas durante 48 h a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5% (v/v) (Miles S., comunicación personal). Finalmente, la viabilidad de los PSC post-incubación fue determinada como se describió anteriormente [Dematteis *et al.*, 2003]. En segundo lugar, parte de los PSC obtenidos fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) conteniendo 1 g/L de Bicarbonato de sodio; Estreptomocina (100 µg/mL); Penicilina (60 µg/mL) y Anfotericina B (250 ng/mL). Luego, 100 µL de la suspensión fueron dispensados en placas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de 100 PSC/pocillo. Posteriormente, fueron dispensadas por quintuplicado, concentraciones crecientes de rshCD5 o rshCD6 (0,1; 1,0 y 10,0 µg/mL), así como glicerol 0,5% v/v en RPMI (como control del vehículo) y además solo en medio de cultivo RPMI como control negativo. Las placas fueron incubadas durante 120 h a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5% (v/v) (Miles S., comunicación personal). Finalmente, la viabilidad de los PSC post-incubación se determinó como se describió anteriormente [Dematteis *et al.*, 2003].

4.4. Animales. En todos los experimentos, se utilizaron ratones hembra Balb/c normales (vírgenes) de 8-12 semanas de edad, adquiridos en el Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (D.L.A.V.E.) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Posteriormente, todos los animales fueron mantenidos en el Laboratorio de Experimentación Animal del Área Inmunología en el Instituto de Higiene (Universidad de la República) bajo condiciones reguladas y controladas de luz/oscuridad (ciclos de 12h/12h) y temperatura (21°C), alimentándose *ad libitum* con ración y agua esterilizadas.

4.5. Protocolos de ética. Los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A., Universidad de la República) siguiendo la Guía Canadiense para el Cuidado de Animales y la Ley Nacional Uruguaya N°18.611. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética para el Uso de Animales (Facultad de Química, Universidad de la República), con número de aprobación de protocolo 101900-000361-16 (www.expe.edu.uy).

4.6. Administración de las moléculas rshCD5 o rshCD6 e infección experimental. Tres grupos de ratones Balb/c (n= 5/grupo), fueron inoculados vía intraperitoneal (i.p.) 1 hora antes y 1 hora después de ser inoculados con 2.000 PSC viables/ratón en 200 µL de PBS estéril con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 µg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)]; c) 25 µg de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones (n= 5) utilizados como control

basal fueron inoculados en los mismos puntos temporales solo con PBS estéril (Grupo PBS) [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. A los 7 días post-inoculación, previa anestesia inhalatoria, todos los individuos fueron sangrados y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. Finalmente, fueron recuperados de cada animal: a) muestras de sangre; b) bazo; c) células peritoneales; y d) exudados de cavidad peritoneal.

4.7. Obtención de sueros. La sangre obtenida de cada individuo fue incubada a 37°C durante 2 h, y luego centrifugada a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante resultante (suero) fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

4.8. Obtención de células de bazo. Las células de bazo de cada individuo fueron obtenidas por perfusión con 4 mL (2 veces) de PBS conteniendo suero fetal bovino (FCS) al 2% (v/v) frío. Luego, cada suspensión celular fue centrifugada a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C. Posteriormente, los “pellets” resultantes fueron tratados con Buffer de Lisis comercial (*Red Blood Cell Lysing Buffer*, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y almacenadas en TRIzol® (Invitrogen®) a -80°C hasta su posterior uso.

4.9. Obtención de células y exudados peritoneales. La cavidad peritoneal de cada ratón fue lavada inicialmente con 1 mL/ratón de PBS frío suplementado con FCS al 2% (v/v), obteniéndose así el exudado peritoneal (almacenado a -20°C hasta su uso posterior). Luego, el lavado se repitió 4 veces con 2 mL/ratón para la obtención del mayor número de células posible. Las suspensiones celulares obtenidas fueron luego centrifugadas a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron tratadas con buffer de lisis comercial (*Red Blood Cell Lysing Buffer*, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego de ser lavadas 2 veces con PBS, el “pellet” celular fue resuspendido en PBS suplementado con FCS al 2% (v/v). Finalmente, el pellet de células contenidas en un tercio de cada suspensión fue almacenado en TRIzol® a -80°C hasta su uso posterior. Las células restantes de cada suspensión fueron utilizadas para el análisis por citometría de flujo.

4.10. Obtención de componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx). La obtención del extracto de componentes del tegumento de PSC fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Hernández & Nieto (1994). Brevemente, 125.000 PSC viables/mL de solución de extracción (detergente MEGA-10 1% m/v; EDTA 5mM y PMSF 2mM en PBS) fueron incubados durante 2 h a temperatura ambiente con rotación constante. Luego, el sobrenadante fue dializado exhaustivamente contra PBS a temperatura ambiente. La fracción obtenida (denominada PSEx) fue filtrada a través de

membranas estériles de 0,22 μm , y finalmente conservada a -20°C hasta su uso posterior. La concentración proteica de PSEx fue determinada mediante el método del ácido bicinonínico (*Kit QuantiPro BCA Assay*, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) en PBS, partiendo desde una concentración inicial de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fue utilizada para realizar la curva de calibración.

4.11. Co-inoculación de ratones Balb/c con (PSEx + rshCD5) o (PSEx + rshCD6). Tres grupos de ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n= 5$) utilizado como control basal fue inoculado solo con PBS estéril (Grupo PBS). A las 48 hs post-inoculación, previa anestesia inhalatoria, se realizó la eutanasia de todos los ratones de cada grupo experimental mediante dislocación cervical, y los exudados y células peritoneales de cada individuo fueron obtenidos como se describió anteriormente.

4.12. Cuantificación relativa de citoquinas por RT-qPCR. El nivel de transcritos para citoquinas fue analizado, en todos los casos de acuerdo con Mourglia-Ettlin *et al.* (2016b). La metodología utilizada fue la siguiente:

4.12.1. Extracción de ARN. La extracción de ARN fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante (TRIZOL[®]). Brevemente, las células almacenadas a -80°C en Trizol[®] fueron descongeladas y luego homogeneizadas en 500 μL finales de TRIZOL[®], centrifugadas a temperatura ambiente durante 5 min a 7.500 g y el sobrenadante de cada muestra fue recuperado. Luego, se agregaron 100 μL de cloroformo 99,9% (v/v), se mezcló durante 15 s haciendo uso de un vórtex y se los dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 12.000 g y 4°C , transfiriendo la fase acuosa (superior, aproximadamente 200 μL) a microtubos nuevos. Estos, fueron luego centrifugados durante 10 min a 12.000 g y 4°C , y al sobrenadante recuperado se le agregaron 250 μL de isopropanol 99,9% (v/v), dejando reposar por 10 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 12.000g y 4°C , descartando el sobrenadante por volcado y el pellet resultante fue lavado con 500 μL de etanol 75% (v/v). Para ello, las muestras fueron mezcladas mediante uso de vórtex, centrifugadas por 5 min a 7.500 g a temperatura ambiente, y finalmente el sobrenadante fue descartado por volcado. Posteriormente, un spin de centrífuga fue aplicado a cada muestra, se retiró la última gota de etanol con pipeta automática y los tubos abiertos se dejaron secar dentro de una campana

de extracción de gases durante 15 min a temperatura ambiente. El pellet de ARN obtenido fue resuspendido en 20 μL de agua libre de nucleasas, se calentó durante 10 min a 65°C, para luego aplicarles un spin de centrifuga. Finalmente, se determinó la concentración y calidad del ARN obtenido mediante *Nanodrop* (2 μL de muestra; los ARN de buena calidad muestran relaciones de lecturas Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ en el rango 1.8-2.0), y fue conservado a -80°C hasta su posterior uso.

4.12.2. Tratamiento con DNAsa. La mezcla de DNAsa de Fermentas[®] fue preparada con 1 μL de buffer 10x y 0,5 μL de DNAsa (1U) por cada reacción. Un μg de ARN de cada muestra fue colocado en microtubos para PCR (0,2 mL), agregándole luego 1,5 μL de la mezcla y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 8 μL totales. Las mezclas fueron incubadas durante 30 min a 37°C en un termociclador, y finalmente 1 μL de EDTA 25 mM fue adicionado, previo a una última incubación de los microtubos durante 10 min a 65°C.

4.12.3. Retrotranscripción. La mezcla de retro-transcripción de Invitrogen[®] fue preparada con 4 μL de buffer 5x, 2 μL de DTT (0,1 M), 1 μL de dNTPs (10 mM), 1 μL de *Random Primers* (N6; 10 pmol/ μL) y 1 μL de retro-transcriptasa (200 U), por cada reacción. 9 μL de la mezcla fueron agregados a cada tubo de ARN tratado con DNAsa, y luego fueron incubados en un termociclador de acuerdo con el siguiente esquema: 10 min a 25°C, 50 min a 37°C y 15 min a 70°C. Por último, las muestras de ADNc obtenidas fueron diluidas al 1:4 con agua libre de nucleasas y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso.

4.12.4. qPCR. Primers específicos fueron utilizados en la amplificación de los ADNc correspondientes a ARNm para las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 (subunidad p40), IL-17A, IL-10, IL-4, IL-13 e IL-5 adquiridos a la empresa Operon. La β -actina de ratón (expresión constitutiva) fue utilizada como gen normalizador. Las qPCRs fueron realizadas utilizando *QuantiTech SYBR Green PCR Kit*[®] (QIAGEN[®]) y 2 μL de ADNc (diluido 1:4) en presencia de 0,9 μM de cada primer específico. Las mismas fueron realizadas en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Muy brevemente, las muestras fueron desnaturalizadas durante 15 min a 95°C y seguidamente se aplicaron 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Las cantidades relativas de los ARNm en cada muestra fueron calculadas usando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [Livak & Schmittgen, 2001] donde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{analito}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actina}}$. Las mismas fueron expresadas como *fold change* de la muestra en estudio respecto al promedio del grupo control.

4.13. Citometría de flujo. La caracterización fenotípica de las células recuperadas fue realizada por citometría de flujo. Para ello, 2×10^5 células/pocillo, mantenidas en frío, fueron dispensadas en placas de

96 pocillos de fondo en U y posteriormente centrifugadas a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C. Luego, los receptores Fc fueron bloqueados adicionando 100 µL/pocillo de una dilución apropiada de *Mouse BD FcBlock* en PBS suplementado con BSA 0,5% (m/v) y NaN₃ 0,02% (m/v) (PBS-BSA-NaN₃), seguido de una incubación durante 20 min a 4°C. Posteriormente, las células -salvo aquellas destinadas a utilizarse como controles sin marcar- fueron incubadas con 100 µL de diluciones apropiadas de anticuerpos conjugados a fluorocromos (todos BectonDickinson®) para caracterizar: células B totales (CD19⁺); células B1 (CD19⁺CD11b⁺); células B2 (CD19⁺CD11b⁻); células T totales (CD3⁺CD49b⁻); células Th (CD3⁺CD4⁺); células Tc (CD3⁺CD8⁺); células NK (CD3⁻CD49b⁺); o monocitos/macrófagos (F4/80⁺). Marcadores adicionales de diferenciación/activación (CD80; CD86 y CD25), fueron utilizados según el caso. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-BSA-NaN₃ e incubados a 4°C durante 20 min en oscuridad. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C y luego resuspendidas en 200 µL de *FACS Buffer* (BectonDickinson®) suplementado con para-formaldehído 0,5% (v/v) (Dorwil). La adquisición de eventos fue realizada en un citómetro de flujo *FACSCalibur*® (Becton Dickinson) utilizando el software *CellQuest*®. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software libre *Flowing Software* disponible en www.flowingsoftware.btk.fi.

4.14. Determinación del título de anticuerpos específicos y poli-reactivos por ELISA. Para la determinación de anticuerpos específicos se utilizó para sensibilizar las placas de micro-titulación la fracción de antígenos del tegumento del parásito (PSEx), mientras que para la determinación de anticuerpos poli-reactivos se utilizó el hapteno DNP (2,4-dinitrofenol, frecuentemente utilizado como parámetro sustituto para medir respuestas poli-reactivas) acoplado a BSA. El título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG, específicos o poli-reactivos, fue determinado por ELISA. Brevemente, placas de micro-titulación de 96 pocillos fueron sensibilizadas con: a) 50 µL/pocillo de DNP-BSA (5 µg/mL) en PSB, o b) 50 µL/pocillo de PSEx (10 µg/mL) diluido en PBS. Las placas fueron luego incubadas durante toda la noche a 4 °C. Luego de descartar los sobrenadantes, las placas fueron bloqueadas por incubación con PBS conteniendo BSA al 1% (m/v) (PBS-BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS conteniendo Tween-20 al 0,05% (v/v) (PBS-T), fueron dispensados 50 µL/pocillo de las muestras diluidas en PBS conteniendo BSA al 0,5% (m/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v) (PBS-BSA-T), y posteriormente fueron incubadas durante toda la noche a 4°C. Después de descartar los sobrenadantes y lavar con PBS-T, fueron dispensados 50 µL/pocillo de una dilución apropiada de anticuerpos monoclonales específicos contra IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, cada uno conjugado a peroxidasa (Sigma) y diluidos en PBS-BSA-T. Posteriormente, las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C.

Finalmente, luego de lavar con PBS-T y con PBS, la actividad enzimática fue detectada dispensando 50 μL /pocillo de solución de H_2O_2 1% (v/v) como sustrato y TMB (6 mg/mL) como cromógeno en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 incubando durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. La reacción fue detenida agregando 25 μL /pocillo de H_2SO_4 1M y la absorbancia a 450 nm fue medida utilizando un espectrofotómetro para micro-placas *Titertek Multiscan Plus* (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). El título de anticuerpos fue definido como el valor de la absorbancia obtenida a una dilución no-saturante de cada muestra. Luego, se determinó el cociente entre ambos títulos (anti-DNP/anti-PSEx) en cada individuo de todos los grupos experimentales. De esta manera, aumentos en el valor del cociente anti-DNP/anti-PSEx respecto al control basal indicaría una polarización hacia una respuesta poli-reactiva, mientras que disminuciones en el valor de dicho cociente evidenciaría un sesgo hacia una respuesta específica contra antígenos del parásito.

4.15. Análisis estadísticos. El procesamiento de tablas de datos fue realizado utilizando *Microsoft Office Excel*[®], mientras que la construcción de gráficos y los análisis estadísticos fueron realizados mediante *GraphPad Prism*[®]. Los análisis de comparación entre grupos fueron realizados siempre mediante el test no-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. El test paramétrico Student's t-Test fue utilizado para comparar los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de cultivo de PSC. En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Nuestro grupo reportó recientemente que la administración de las moléculas rshCD5, y en menor medida de rshCD6, inducen protección en ratones Balb/c contra la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Para comenzar a dilucidar los potenciales mecanismos involucrados en los efectos protectores de estas moléculas, nos planteamos diferentes escenarios: (1) los receptores recombinantes podrían ejercer directamente alguna acción sobre el parásito; (2) los receptores podrían inducir una eventual acción inmuno-estimulante o inmuno-supresora sobre algún efector (soluble o celular) de la respuesta del hospedero durante la infección; (3) los receptores solubles podrían modular algún mecanismo de la respuesta inmune específica mediante el bloqueo de antígenos parasitarios; y/o (4) los receptores podrían participar en más de uno de estos mecanismos a la vez.

5.1. Evaluación de la actividad anti-parasitaria intrínseca de las moléculas rshCD5 y rshCD6.

Para evaluar si los receptores recombinantes ejercen directamente alguna acción sobre el parásito, se analizó *in vitro* el efecto de rshCD5 y rshCD6 sobre la viabilidad de los PSC. La estrategia utilizada consistió en el cultivo *in vitro* del parásito (PSC) con las moléculas rshCD5 y rshCD6, para luego determinar el efecto inducido sobre la viabilidad de los PSC. Para ello, los PSC fueron incubados con diferentes concentraciones de rshCD5 o de rshCD6 en condiciones metabólicamente estresantes, es decir un cultivo sin nutrientes (solo PBS), y en paralelo, incubados con diferentes concentraciones de rshCD5 o de rshCD6, pero en condiciones metabólicamente no estresantes, es decir un cultivo con nutrientes (medio RPMI-1640).

Los resultados obtenidos mostraron que en el ensayo sin nutrientes el porcentaje de PSC no viables aumentó significativamente con respecto al control (PSC solos en PBS) únicamente en presencia de 10 µg/mL de rshCD5 (Figura 6A). Mientras que, en el caso de rshCD6 los resultados mostraron un aumento significativo del porcentaje de PSC no viables para las tres concentraciones de rshCD6 testeadas, con respecto a aquellos valores observados en el control (PSC solos en PBS) (Figura 6A).

En el ensayo de cultivo con nutrientes los resultados mostraron un aumento significativo del porcentaje de PSCs no viables respecto a la condición control (PSC solos en RPMI) solo en presencia de 10 µg/mL para cualquiera de los dos receptores (Figura 6B).

Finalmente, se realizó un ensayo de control del vehículo con glicerol (0,5 % v/v) con el cual se descartaron posibles efectos de matriz en el accionar de los receptores solubles (Figura 6C).

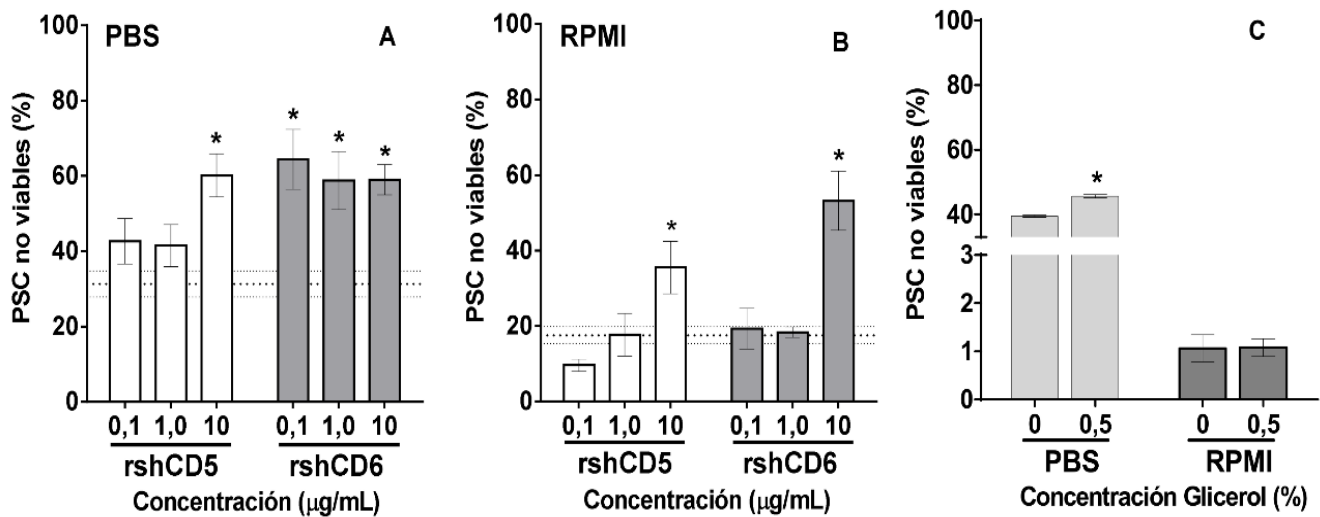


Figura 6. Evaluación de la actividad anti-parasitaria intrínseca de rshCD5 y rshCD6. Los PSC fueron cultivados *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de rshCD5 o de rshCD6 (0,1; 1,0 y 10,0 µg/mL) en dos condiciones: (A) sin nutrientes y (B) con nutrientes. Para realizar un control sobre potenciales efectos del vehículo (C) los PSC fueron además incubados con PBS o RPMI con o sin glicerol 0,5% (v/v). El porcentaje de PSCs no viables se muestra como media (\pm SEM) de los valores obtenidos por quintuplicado para cada condición de cultivo. (*): Diferencia significativa (Student *t* test, $p < 0,05$) entre los cultivos con receptores recombinantes vs el control correspondiente (PBS o RPMI; ---).

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que, al menos *in vitro*, las moléculas rshCD5 y rshCD6 tienen la capacidad intrínseca, dependiendo de la dosis, de inducir la muerte de un porcentaje significativo de PSC. Esto podría estar relacionado, por ejemplo, con una modulación metabólica y/o con un efecto tóxico directo inducido por las moléculas.

5.2. Análisis de los efectos inducidos por la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune del hospedero experimental infectado por *E. granulosus* s.l.

Un conjunto de experimentos fue diseñado con el objetivo de dilucidar si, la respuesta inducida por la administración exógena de las moléculas rshCD5 o rshCD6, durante las primeras etapas de la infección secundaria experimental, podrían condicionar o estar asociadas con un eventual mecanismo protector inducido por estas moléculas contra la infección por *E. granulosus* s.l. Así, la estrategia utilizada consistió en determinar y comparar, a los 7 días post-infección, varios parámetros inmunológicos (celulares y humorales) entre ratones inoculados con PSC viables (infectados) y ratones que fueron infectados y a su vez tratados con las moléculas rshCD5 o rshCD6. Este punto temporal se escogió en base a los resultados previamente reportados por nuestro grupo donde se demuestra que es en ese momento cuando ocurren la mayor cantidad de cambios inmunológicos en la cavidad peritoneal de ratones infectados [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; 2016b].

5.2.1. Efectos de la administración exógena de las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la expresión de transcritos para citoquinas a nivel sistémico y a nivel local, en ratones Balb/c experimentalmente infectados por *E. granulosus* s.l.

En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión de varias citoquinas tanto en células de bazo (respuesta sistémica) como en células de cavidad peritoneal (respuesta local). En particular, se analizó el perfil de expresión de citoquinas típicamente asociadas a perfiles pro-inflamatorios de respuestas Th1/Th17 (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-17A) y anti-inflamatorios de respuestas Th2/Treg (IL-10, IL-4, IL-13 e IL-5). Los resultados obtenidos a nivel sistémico se muestran en la Figura 7 y en la Figura 8.

Los resultados obtenidos muestran que, a nivel sistémico, la infección (Grupo PSC) indujo un aumento en los niveles de expresión de IFN- γ (Figura 7A) e IL-12 (Figura 7D); así como cierta tendencia ($p= 0,074$) a un aumento de IL-6 (Figura 7B), y una reducción significativa de TNF- α (Figura 7C), respecto a aquellos niveles observados en el Grupo Control PBS.

Por su parte, en el Grupo (PSC+rshCD5), se observó un aumento significativo en los niveles de IFN- γ (Figura 7A) e IL-12 (Figura 7D), pero no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-6

(Figura 7B) ni de TNF- α (Figura 7C); todos comparados con aquellos niveles observados en el Grupo Control PBS.

Los resultados obtenidos mostraron además que, no se observaron diferencias significativas, en los niveles de expresión para ninguna de las citoquinas seleccionadas, entre el Grupo (PSC+rshCD5) y el grupo de ratones infectados (Grupo PSC).

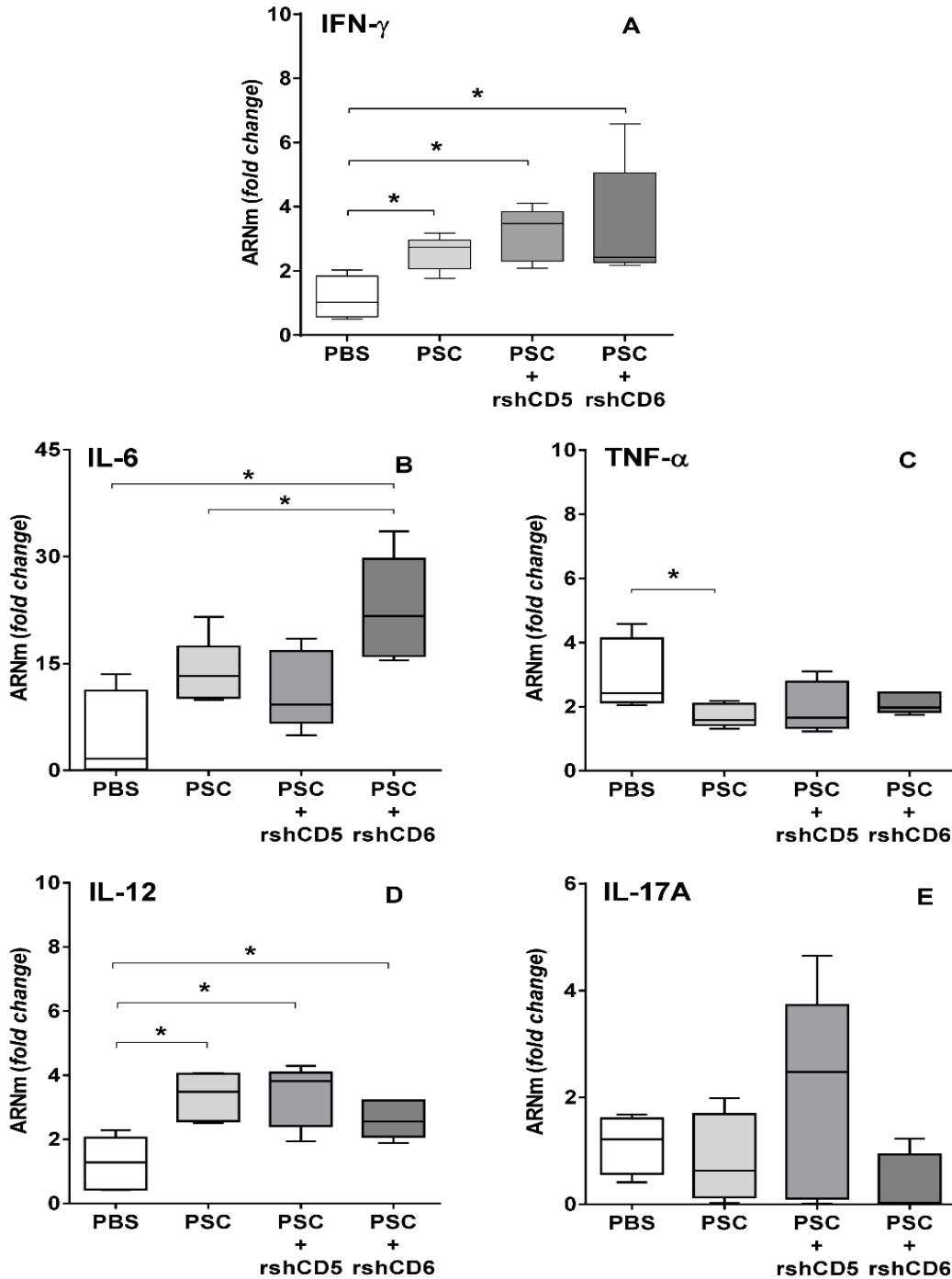


Figura 7. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta sistémica de citoquinas tipo Th1/Th17 en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n=5$ /grupo), fueron inoculados por vía i.p. 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μ g de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)], y c) 25 μ g de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n=5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles

basales para cada citoquina (Grupo PBS). A los 7 días post-inoculación, las células de bazo fueron recuperadas y almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IFN- γ , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IL-12 y (E) IL-17A. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Por su parte, en el Grupo (PSC+rshCD6), se observó un aumento significativo en los niveles de IFN- γ (Figura 7A), IL-12 (Figura 7D) e IL-6 (Figura 7B), pero no de TNF- α (Figura 7C); todos comparados con aquellos niveles observados en el Grupo Control PBS.

De manera interesante, los resultados obtenidos mostraron además un aumento significativo en los niveles de IL-6 (Figura 7B) en el Grupo (PSC+rshCD6) comparado con el grupo control de ratones infectados (Grupo PSC).

Tomados en su conjunto, los resultados mostraron que si bien se observaron varias diferencias significativas en los niveles de expresión de ciertas citoquinas en los Grupos (PSC+rshCD5) y (PSC+rshCD6) con respecto al Grupo PBS, una única variación resultó ser relevante entre los grupos infectados y tratados con rshCD5 o rshCD6 comparados con el grupo infectado. En efecto, la administración exógena de rshCD6 fue capaz de inducir un aumento significativo en los niveles de expresión IL-6 a nivel sistémico, durante las primeras etapas de la infección por *E. granulosus* s.l.

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre la expresión sistémica de los niveles de IL-10; IL-4; IL-5; e IL-13, en todos los grupos experimentales, se muestran en la Figura 8.

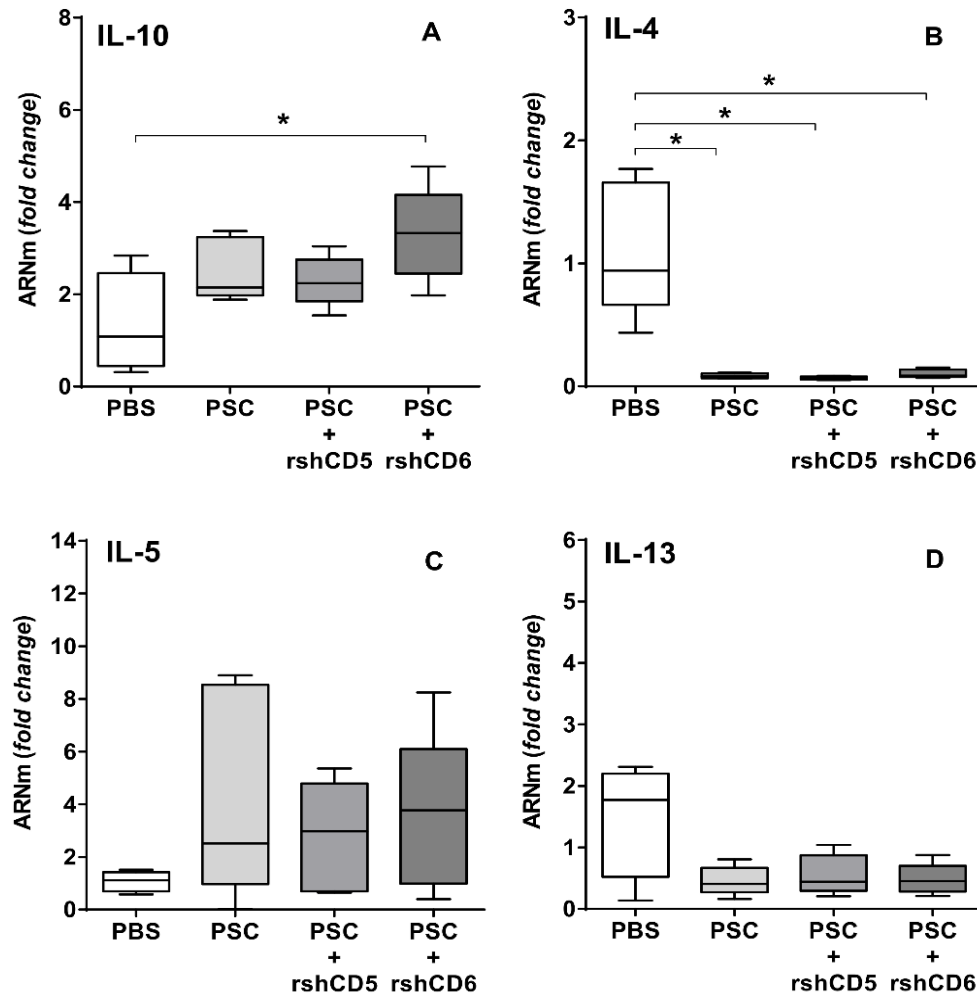


Figura 8. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta sistémica de citoquinas tipo Th2/Treg en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 h antes y una hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón, con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μg de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales para cada citoquina analizada (Grupo PBS). A los 7 días post-inoculación, las células de bazo fueron obtenidas y almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IL-10, (B) IL-4, (C) IL-6, y (D) IL-13. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Los resultados obtenidos mostraron que, a nivel sistémico, la infección (Grupo PSC) indujo una reducción significativa en el nivel de expresión de IL-4 (Figura 8B), con respecto al Grupo control PBS. Por su parte, el Grupo (PSC+rshCD5) mostró un comportamiento similar al control de infección (Grupo PSC), comparado con el Grupo control PBS (Figura 8B). Ninguna diferencia significativa fue observada entre los Grupos (PSC+rshCD5) y PSC (control infección).

Por otra parte, se observó en el Grupo (PSC+rshCD6), que si bien hay una reducción significativa en el nivel de IL-4, se produce un aumento significativo en el nivel de expresión de IL-10, comparados con aquellos observados en el Grupo control PBS (Figura 8A). Nuevamente, ninguna diferencia significativa fue observada entre los Grupos (PSC+rshCD6) y PSC (control infección).

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que las moléculas rshCD5 o rshCD6 parecen no inducir ningún un efecto, a nivel sistémico, sobre los niveles de expresión de IL-4; IL-5; IL-10; o IL-13, por los menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

En forma paralela, se estudió la respuesta local de citoquinas analizando los niveles de expresión para las mismas citoquinas, en células de cavidad peritoneal recuperadas de los ratones de los mismos cuatro Grupos Experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9 y en la Figura 10.

Primero se analizó el nivel de expresión de citoquinas relacionadas con respuestas tipo Th1/Th17, en células peritoneales de ratones infectados (Grupo PSC). Así, los resultados mostraron una reducción significativa en la expresión de IL-12 (Figura 9D) y una cierta tendencia ($p= 0,055$) al aumento de IL-6 (Figura 9B), comparados con aquellos niveles observados en el grupo control (Grupo PBS).

Por su parte, el Grupo (PSC+rshCD5) mostró una reducción significativa en los niveles de IL-12 (Figura 9D) y TNF- γ (Figura 9C), así como un aumento significativo en el nivel de IFN- γ (Figura 9A), todos comparados con aquellos valores correspondientes al Grupo control PBS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IFN- γ ; IL-6; TNF- α ; o IL-17A entre los Grupos (PSC+rshCD5) y PSC (control infectado). Estos resultados sugieren que la administración exógena de rshCD5 no induce cambios en el patrón de expresión de citoquinas tipo Th1/Th17 en cavidad peritoneal, por lo menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

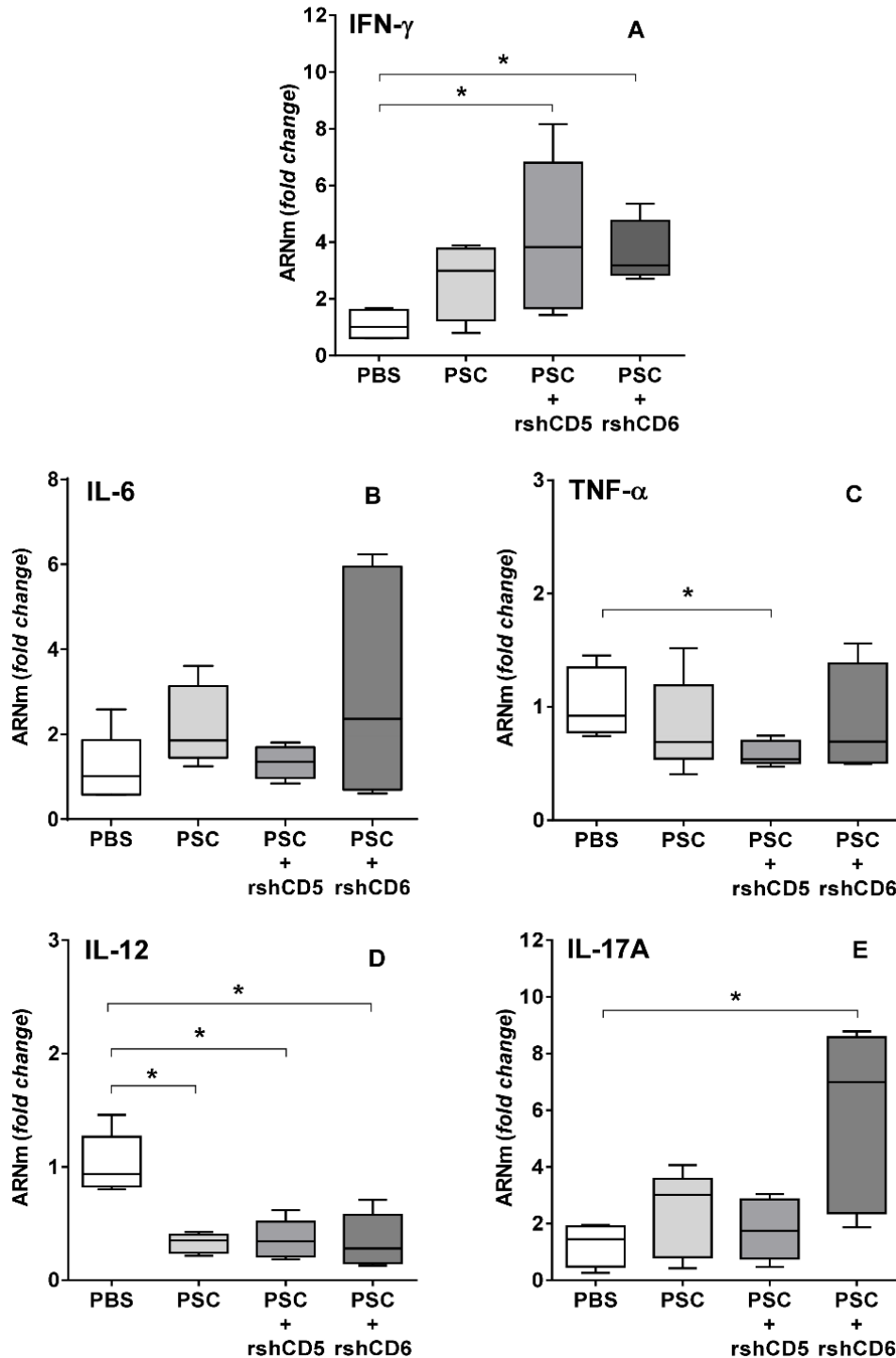


Figura 9. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta local de citoquinas tipo Th1/Th17 en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5$ /grupo), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μ g de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μ g de rshCD6 /ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles

basales (Grupo PBS). A los 7 días post-inoculación, fueron obtenidas las células de la cavidad peritoneal, almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IFN- γ , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IL-12 y (E) IL-17A. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Además, se observaron diferencias significativas en la expresión de IFN- γ (aumento; Figura 9A) y en la de IL-12 (reducción; Figura 9D) entre el Grupos (PSC+rshCD6) y el Grupo PBS. Sin embargo, los niveles de estas dos citoquinas no fueron significativamente diferentes entre los Grupos (PSC+rshCD6) y PSC (control infectado). Estos resultados preliminares sugieren que la administración exógena de rshCD6 no induce cambios en el patrón de expresión de citoquinas del tipo Th1/Th17 en cavidad peritoneal, al menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

Por otra parte, se analizó el nivel de expresión de citoquinas relacionadas con respuestas tipo Th2/Treg, en células peritoneales de ratones infectados (Grupo PSC) (Figura 10). Así, los resultados muestran un aumento significativo de la expresión de IL-10 (Figura 10A); IL-5 (Figura 10C); e IL-13 (Figura 10D) con respecto a aquellos valores observados en el grupo de ratones control (Grupo PBS). Un patrón similar fue observado en los Grupos (PSC+ rshCD5) y (PSC+ rshCD6) comparado con el Grupo PBS (Figura 10).

Sin embargo, y de manera interesante, el nivel de IL-5 en el Grupo (PSC+ rshCD5) mostró cierta tendencia ($p = 0,095$) a ser mayor que el observado en el Grupo PSC. Estos resultados preliminares, sugieren que, la administración exógena de rshCD5 estaría asociada con un aumento del nivel de expresión de IL-5, a nivel local, al menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

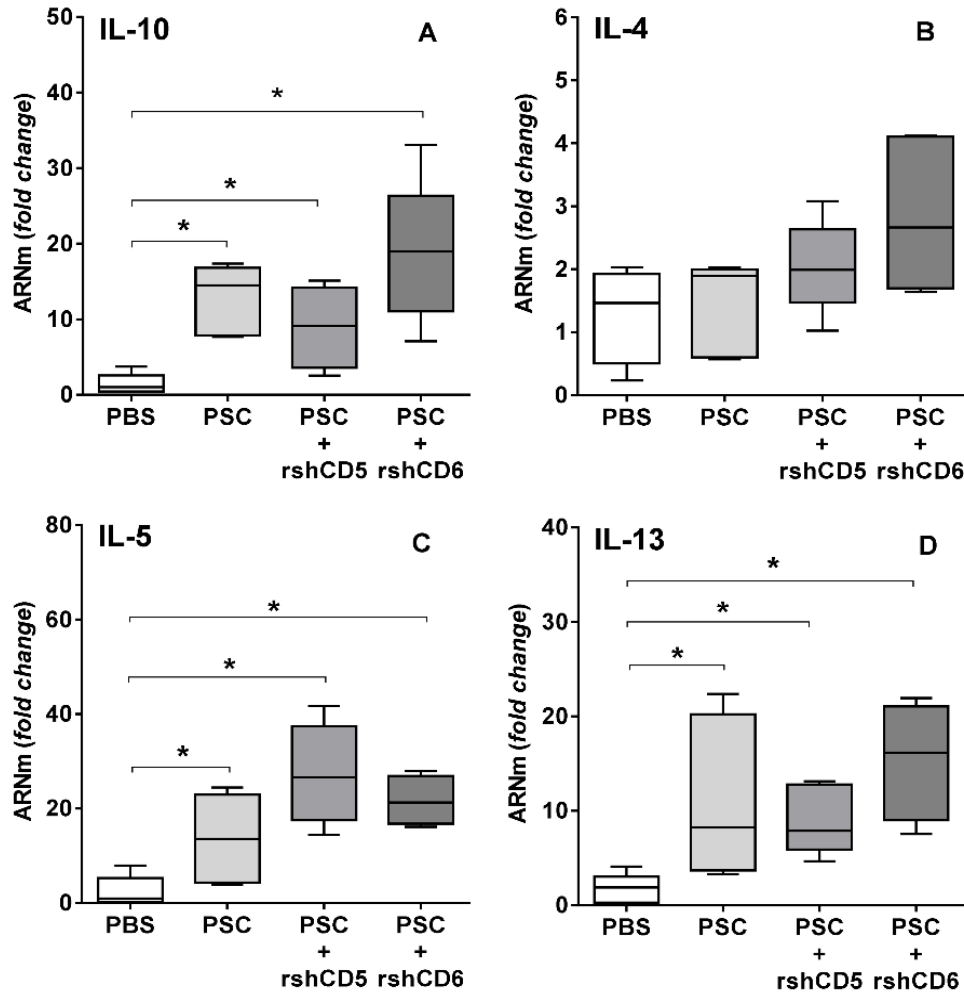


Figura 10. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta local de citoquinas tipo Th2/Treg en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5$ /grupo), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μ g de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μ g de rshCD6 /ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-infección, las células de la cavidad peritoneal fueron obtenidas y almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IL-10, (B) IL-4, (C) IL-5, y (D) IL-13. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

5.2.2. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre el perfil fenotípico celular peritoneal durante la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

Con el fin de evaluar si las moléculas rshCD5 o rshCD6 podrían ser capaces de inducir algún efecto sobre el perfil fenotípico celular del hospedero experimental infectado, se utilizaron diversos paneles de anticuerpos para identificar, mediante citometría de flujo, las distintas poblaciones leucocitarias presentes en cavidad peritoneal. En particular, se analizaron diferencias entre los grupos experimentales en cuanto al porcentaje de células B totales, así como las subpoblaciones B1 y B2; células T CD4⁺ y T CD8⁺; células NK y monocitos/macrófagos; así como marcadores asociados a sus estados de activación/diferenciación. Las estrategias de *gating* se muestran en los anexos 1., 2. y 3, respectivamente.

Así, los ratones del Grupo PSC (control de infección) mostraron: a) un aumento significativo en el porcentaje de células linfoides (Figura 11A); y b) una reducción significativa en el porcentaje de: i) células B totales (Figura 11B); ii) células B1 (Figura 11C); iii) células B2 (Figura 11D); además de una reducción en la intensidad de fluorescencia de CD86 sobre células B totales (Figura 11F), todas con respecto a aquellos valores correspondientes observados en el grupo control basal (Grupo PBS).

Por su parte, el grupo tratado con rshCD5 (Grupo PSC+rshCD5) mostró una reducción significativa en el porcentaje de células B totales (Figura 11B) y en la intensidad de fluorescencia de CD86 sobre células B totales (Figura 11F) comparados con aquellos valores observados en el Grupo PBS. Sin embargo, y de manera interesante, el (Grupo PSC+rshCD5) mostró un aumento significativo en el porcentaje de células B2 comparado con lo observado en el grupo control de infección (Grupo PSC) (Figura 11D). Estos resultados preliminares indican que la administración de la molécula rshCD5 estaría asociada con un aumento significativo del porcentaje de células B2, a nivel local, por lo menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. Este aumento en el porcentaje de células B2 podría estar asociado con algún mecanismo que involucre, por ejemplo, la cantidad y calidad en la producción de anticuerpos contra antígenos parasitarios, los cuales podrían eventualmente participar en un posible mecanismo de protección contra la infección.

Por otra parte, el Grupo (PSC+rshCD6) mostró también diferencias significativas en la disminución/aumento del porcentaje en alguna de las poblaciones celulares comparadas con aquellos valores observados en el grupo de control basal (Grupo PBS). Sin embargo, este grupo no mostró diferencias significativas en ninguna de las poblaciones celulares analizadas al compararlo con el Grupo

PSC (control de infección). Estos resultados preliminares sugieren que la administración exógena de rshCD6 no induce cambios en el perfil fenotípico a nivel local, por lo menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

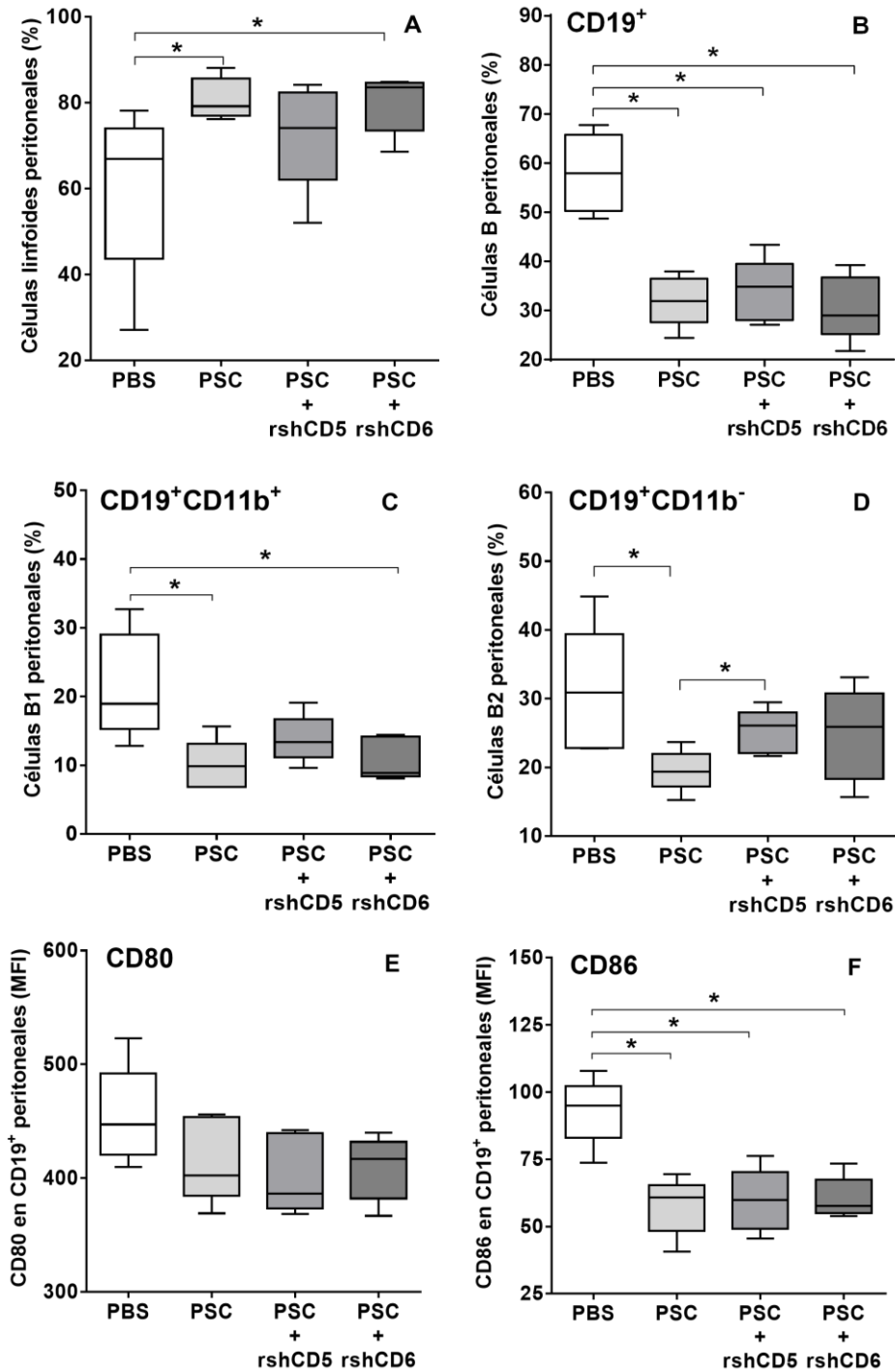


Figura 11. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre el porcentaje de las células B en cavidad peritoneal en las primeras etapas de la infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μg de rshCD6 /ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-infección, fueron obtenidas las células peritoneales de todos los individuos y el porcentaje de células linfoides (A), células B (CD19^+) (B), B1 ($\text{CD19}^+\text{CD11}^+$) (C), B2 ($\text{CD19}^+\text{CD11b}^-$) (D), y la potencial activación de los linfocitos B (CD80 y/o CD86) (E y F), fueron analizadas por citometría de flujo. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Por otro lado, en la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos sobre el potencial efecto de la administración exógena de las moléculas rshCD5 o rshCD6 en el aumento/disminución del porcentaje de células NK ($\text{CD3}^-\text{CD49b}^+$) (Figura 12A); células T totales ($\text{CD3}^+\text{CD49b}^-$) (Figura 12B); células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (Figura 12C); y células T $\text{CD8}^+\text{CD25}^+$ (Figura 12D).

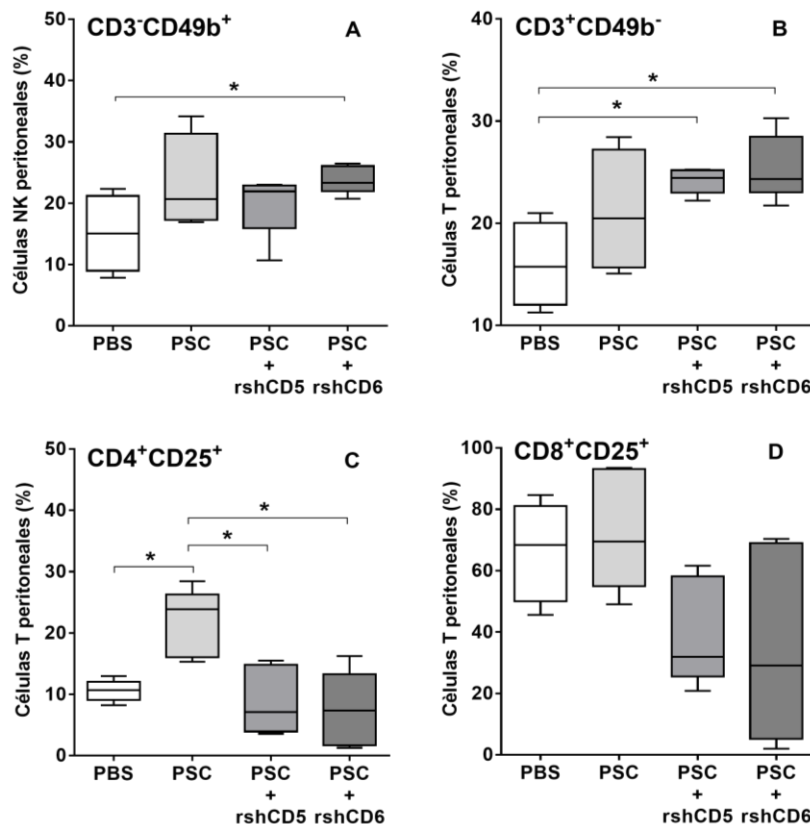


Figura 12. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre el porcentaje de células T y células NK de cavidad peritoneal en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μg de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-infección, fueron obtenidas las células peritoneales de todos los individuos y el porcentaje de células NK ($\text{CD}3^-\text{CD}49^+$) (A); células T ($\text{CD}3^+\text{CD}49^-$) (B); células ($\text{CD}4^+\text{CD}25^+$) (C); y células ($\text{CD}8^+\text{CD}25^+$) (D), fue analizado por citometría de flujo. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

El grupo de ratones infectado con PSC de *E. granulosus* s.l. (Grupo PSC) mostró únicamente un aumento significativo en el porcentaje de células T $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ comparado con aquel observado en el grupo de control basal (Grupo PBS) (Figura 12C).

Por su parte, tanto el Grupo (PSC+rshCD5) como el Grupo (PSC+rshCD6) no mostraron variaciones significativas en el porcentaje de células T $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ comparado con aquel observado en el grupo de control basal (Grupo PBS) (Figura 12C).

Sin embargo, y de manera muy interesante, se observó que el porcentaje células T $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ en los Grupos (PSC+rshCD5) y (PSC+rshCD6) mostró una reducción significativa en el porcentaje de células T $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ comparado con aquel observado en el grupo control de infección (Grupo PSC) (Figura 12C). Por lo tanto, estos resultados preliminares indican que la administración exógena de la molécula rshCD5 y la molécula rshCD6 estarían asociadas con una reducción significativa del porcentaje de células T $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$, a nivel local, por lo menos a los 7 días de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. Esto podría sugerir que, la administración de estas moléculas solubles podría tener como consecuencia una regulación negativa sobre las células Treg, inducidas por el parásito, en el sitio anatómico en el cual este es capaz de sobrevivir y desarrollarse.

Finalmente, se analizó si la administración de rshCD5 o rshCD6 podrían tener algún efecto sobre el porcentaje de células no linfoides (Figura 13A); monocitos/macrófagos ($\text{F}4/80^+$) (Figura 13B); macrófagos ($\text{F}4/80^{\text{high}}$) (Figura 13C); y monocitos ($\text{F}4/80^{\text{low}}$) (Figura 13D); así como sobre sus marcadores de activación (CD80 y CD86) (Figuras 13E y 13F).

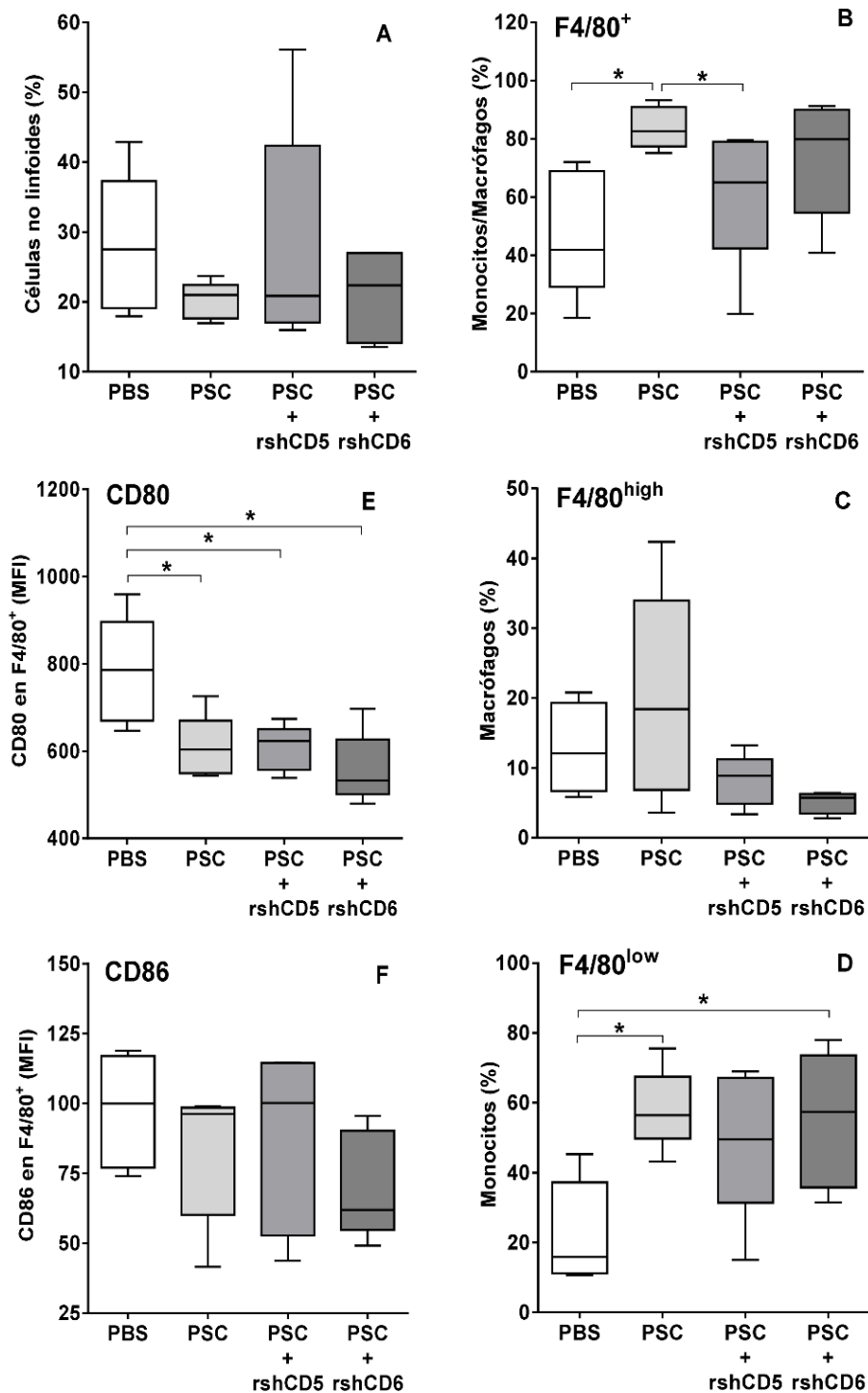


Figura 13. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre el porcentaje de las células no linfoides en cavidad peritoneal en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis

[Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μ g de rshCD6 /ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-infección, fueron recuperadas las células peritoneales de todos los individuos y el porcentaje de: células no linfoides (A); monocitos/macrófagos ($F4/80^+$) (B); macrófagos ($F4/80^{high}$) (C); monocitos ($F4/80^{low}$) (D); y marcadores de activación (CD80 y CD86) en células $F4/80^+$ (E y F), fue analizado por citometría de flujo. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Los animales infectados (Grupo PSC) mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células $F4/80^+$ (Figura 13B) y de células $F4/80^{low}$ (Figura 13D), así como una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD80 sobre células $F480^+$ (Figura 13E); todos en comparación con aquellos valores obtenidos en el grupo de control basal (Grupo PBS).

Por su parte, el Grupo (PSC+rshCD5) mostró también una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD80 sobre células $F480^+$ (Figura 13E), así como una tendencia ($p= 0,055$) hacia el aumento en el porcentaje de células $F4/80^{low}$ con respecto a los valores observados en el grupo de control basal (Grupo PBS) (Figura 13D). En los individuos del Grupo (PSC+rshCD6) se observaron prácticamente las mismas variaciones que aquellas descritas para el Grupo (PSC+rshCD5).

De manera interesante, se observó un descenso significativo en el porcentaje de células $F4/80^+$ en el Grupo (PSC+rshCD5) comparado con el grupo control de infección (Grupo PSC). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la administración exógena de rshCD5 podría estar asociada con un descenso significativo del porcentaje de células $F4/80^+$, en el sitio anatómico en donde el parásito crece y se desarrolla, por lo menos en el día 7 de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

5.2.3. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la producción sistémica y local de anticuerpos específicos y poli-reactivos en la etapa temprana de la infección secundaria por *E. granulosus* s.l.

Finalmente, se evaluó el posible efecto inmuno-modulador inducido por la administración de rshCD5 o rshCD6, sobre la producción de anticuerpos específicos y de anticuerpos poli-reactivos. Teniendo en cuenta que los niveles de anticuerpos contra el hapteno DNP (2,4-dinitrofenol) han sido sugeridos como

parámetro sustituto de los niveles de anticuerpos poli-reactivos en diferentes escenarios biológicos [Gunti & Notkins, 2015], la misma idea fue considerada en nuestros ensayos. Por lo tanto, se determinó por ELISA, en todos los individuos de cada grupo experimental, el título de anticuerpos IgM; IgA; y subclases de IgG, tanto anti-DNP (anticuerpos poli-reactivos) como anti-PSEx (anticuerpos específicos). El valor del cociente entre título anti-DNP/título anti-PSEx, nos podría indicar si la respuesta se sesga hacia una respuesta predominantemente poli-reactiva o una específica. Esto podría ser bien importante ya que nuestro grupo reportó recientemente que la producción de anticuerpos poli-reactivos podría ser un marcador de resistencia a la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. [García-Luna *et al.*, 2021].

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos a nivel sistémico. En este sentido, se observó que el Grupo PSC (control de infección), mostró una reducción significativa en el valor del cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgM (Figura 14A); IgA (Figura 14B); IgG1 (Figura 14C); IgG2a (Figura 14D); e IgG2b (Figura 14E), comparado con los valores basales (Grupo PBS). Esto sugiere que la respuesta de anticuerpos en los individuos infectados está sesgada hacia una respuesta predominantemente específica.

Resultados similares se observaron en los Grupos (PSC+rshCD5) y (PSC+rshCD6). Sin embargo, el Grupo (PSC+rshCD6) mostró un aumento significativo en el cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgG1 comparado con el grupo control de infección (Grupo PSC). Esto sugiere que la administración exógena de rshCD6 sería capaz de sesgar la producción de IgG1 hacia un perfil poli-reactivo, a nivel sistémico, por lo menos al día 7 de la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.

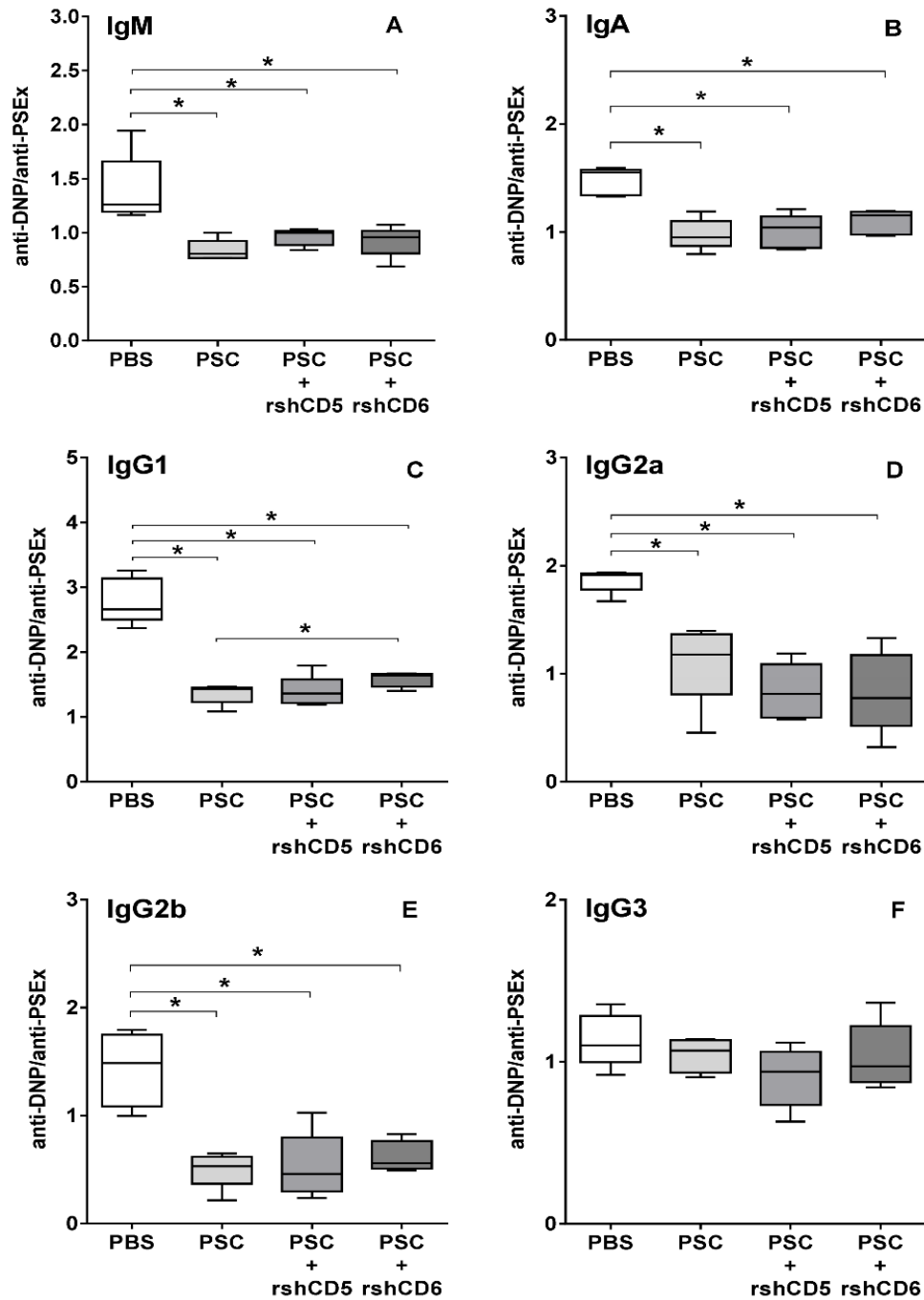


Figura 14. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la producción sistémica de anticuerpos específicos y/o anticuerpos poli-reactivos en el modelo experimental de infección secundaria por *E. granulosus* s.l. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μg de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-inoculación, se recolectaron muestras de sangre de cada individuo de todos los grupos experimentales, y el título de anticuerpos específicos (anti-PSEx)

y poli-reactivos (anti-DNP), fue determinado por ELISA. El valor del cociente entre el título de Ac anti-DNP/título y de Ac anti-PSEx para cada isotipo (A) IgM; (B) IgA; y subclases de IgG: (C) IgG1; (D) IgG2a; (E) IgG2b; y (F) IgG3; son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

Por otra parte, se analizó la producción local de anticuerpos anti-DNP (poli-reactivos) y la de anticuerpos anti-PSEx (específicos) en exudados peritoneales. En este sentido, se observó que el Grupo PSC (control de infección), mostró una reducción significativa en el valor del cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgA (Figura 15B); mientras que este valor fue significativamente mayor para IgG3 (Figura 15F) comparado con el valor del grupo de control basal (Grupo PBS).

Por su parte, los individuos del Grupo (PSC+rshCD5) mostraron una reducción significativa en los cocientes (anti-DNP/anti-PSEx) para IgA (Figura 15B) e IgG2a (Figura 15D), y cierta tendencia ($p = 0,095$) para IgG2b (Figura 15E); mientras que se observó un aumento significativo para IgG3 (Figura 15F); todos comparados con los valores del grupo de control basal (Grupo PBS).

Por su parte, el Grupo (PSC+rshCD6) mostró una reducción significativa en el cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgG2a (Figura 15D) e IgG2b (Figura 15E), y cierta tendencia ($p = 0,065$) para IgA (Figura 15B), mientras que mostró un aumento significativo en el cociente para IgG3 (Figura 15F) comparados con los valores del grupo de control basal (Grupo PBS).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los valores de cocientes (anti-DNP/anti-PSEx) entre los Grupos (PSC+rshCD5) y (PSC+rshCD6), para ninguno de los anticuerpos analizados, con respecto lo observado en el grupo control de infección (Grupo PSC). Esto sugiere que la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 no parece modificar el sesgo inducido por la infección en cuanto a la producción local de anticuerpos específicos y poli-reactivos.

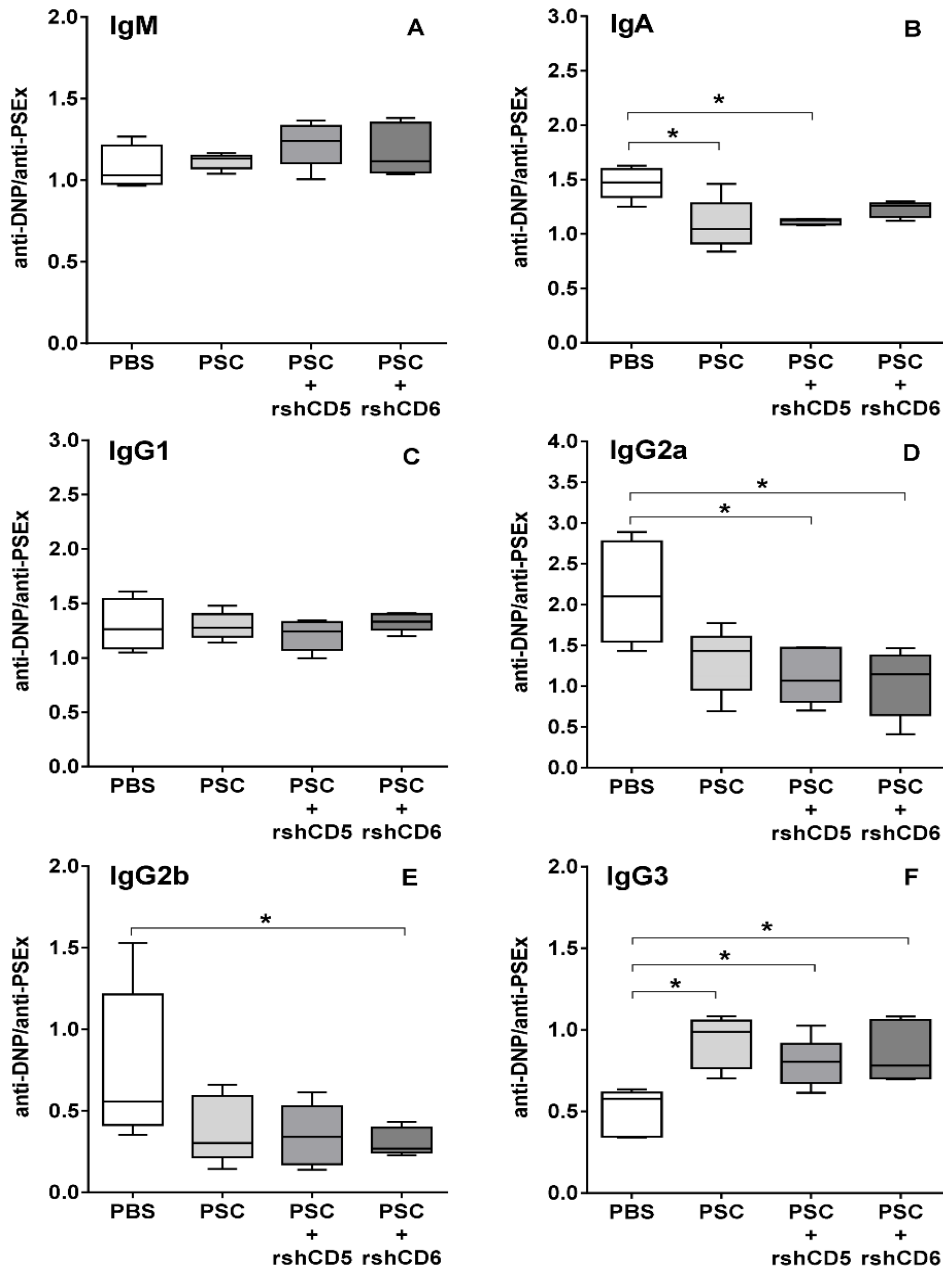


Figura 15. Efectos de la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 sobre la producción de anticuerpos específicos y poli-reactivos, a nivel local en el modelo murino de EQ secundaria. Tres grupos ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados por vía i.p., 1 hora antes y 1 hora después, de ser infectados con 2.000 PSC viables/ratón con: a) PBS estéril (Grupo PSC, control de infección); b) 25 μg de rshCD5/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD5)] y c) 25 μg de rshCD6/ratón/dosis [Grupo (PSC+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculados con PBS estéril, en los mismos puntos temporales, fue utilizado como grupo control de los niveles basales (Grupo PBS). A los 7 días post-inoculación, se obtuvieron muestras de exudado peritoneal de cada individuo de todos los grupos experimentales, y el título de anticuerpos específicos (anti-PSEx) y poli-reactivos (anti-DNP), fue determinado por ELISA. El valor del cociente entre el título de Ac anti-DNP/título de Ac anti-PSEx para cada isotipo (A) IgM; (B) IgA; y subclases de IgG: (C) IgG1; (D) IgG2a; (E) IgG2b; y (F) IgG3; son

mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSC+rshCD5), (PSC+rshCD6) o PSC vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSC+rshCD5) o (PSC+rshCD6) vs el Grupo PSC (control de infección).

5.3. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune contra antígenos del tegumento de *E. granulosus* s.l.

Existen particularmente tres reportes que han mostrado características relevantes de la fracción antigénica denominada PSEx, constituida por antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. En efecto, Hernández y Nieto (1994) mostraron que PSEx presenta capacidad protectora contra la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l.; y más recientemente, Mourglia-Ettlin *et al.* (2018) mostraron que las moléculas rshCD5 y rshCD6 interactúan principalmente con antígenos presentes en PSEx; identificándose varios de los ligandos parasitarios para ambos receptores [Miles *et al.*, 2020b].

Por otra parte, hipotéticamente, resulta razonable pensar que al estar PSEx constituido por antígenos del tegumento de PSC, sería altamente probable que estos antígenos fueran los primeros en interactuar con componentes del sistema inmune del hospedero durante la fase temprana de la infección secundaria experimental. Por ello, la estrategia utilizada para analizar esta idea consistió en determinar y comparar, a las 48 horas post-inoculación, las diferencias en parámetros inmunológicos (celulares y humorales, en cavidad peritoneal) entre ratones inoculados con antígenos del tegumento (PSEx) y ratones que fueron inoculados con mezclas de PSEx y la molécula rshCD5, o PSEx y la molécula rshCD6. De esta forma, en las mezclas, los ligandos parasitarios para ambos receptores estarían “bloqueados” por su unión a las moléculas recombinantes solubles.

5.3.1. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de citoquinas en células peritoneales de ratones Balb/c.

Los resultados obtenidos sobre la expresión de citoquinas a nivel local fueron interesantes y se muestran en las Figuras 16 y 17.

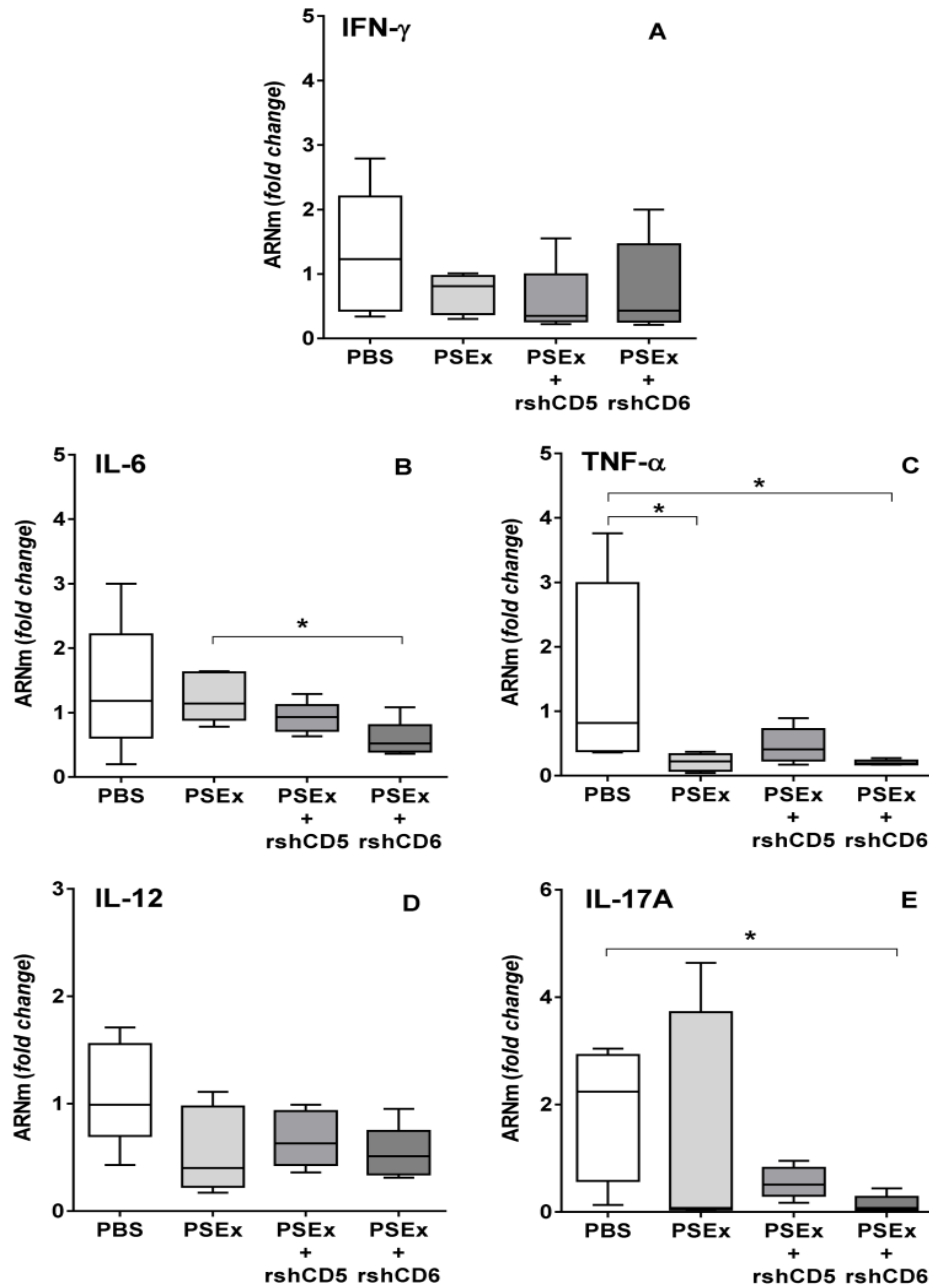


Figura 16. Efectos de la co-administración de rshCD5 o rshCD6 con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) sobre la respuesta local de citoquinas tipo Th1/Th17. Tres grupos de ratones Balb/c ($n=5$ /grupo) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) PSEx (50 μ g/ratón) en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) (50 μ g de PSEx + 25 μ g de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) (50 μ g de PSEx + 25 μ g de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n=5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control basal (Grupo PBS). Dos días post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal fueron recuperadas y almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IFN- γ ; (B) IL-6; (C) TNF- α ; (D) IL-12; y (E) IL-17A. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test;

$p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (grupo inoculado solo con PSEx).

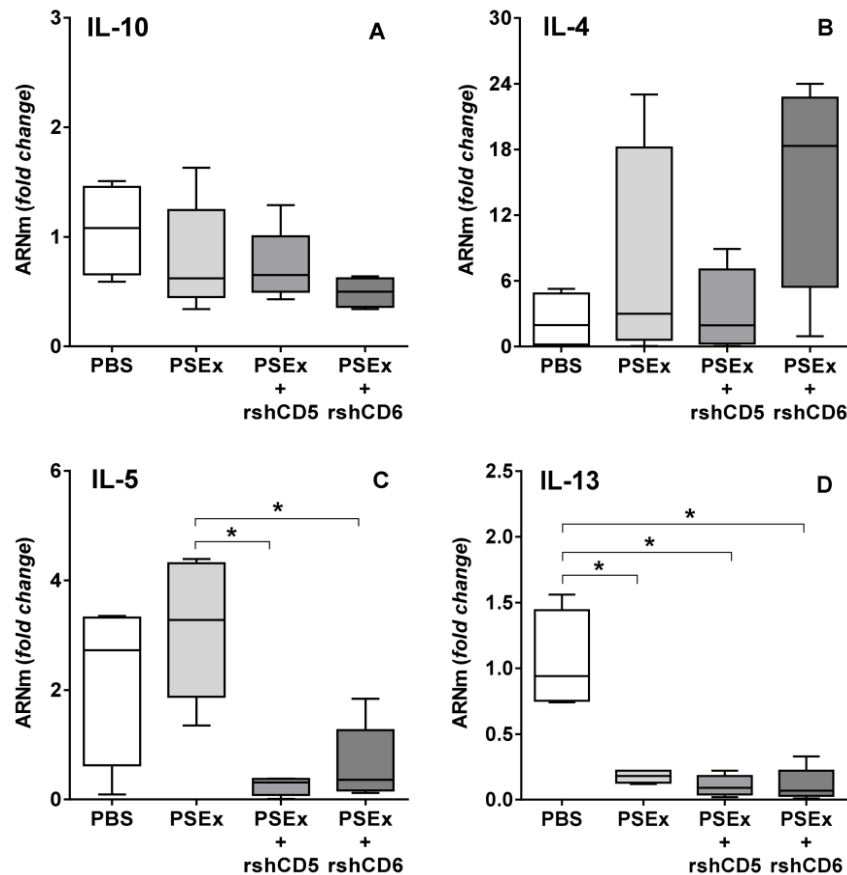


Figura 17. Efectos de la co-administración de rshCD5 o rshCD6 con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) sobre la respuesta local de citoquinas tipo Th2/Treg. Tres grupos de ratones Balb/c ($n=5$ /grupo) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) PSEx ($50 \mu\text{g}$ /ratón) en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) ($50 \mu\text{g}$ de PSEx + $25 \mu\text{g}$ de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) ($50 \mu\text{g}$ de PSEx + $25 \mu\text{g}$ de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n=5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). Dos días post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal fueron removidas y almacenadas en TRIzol, para luego determinar por RT-qPCR los niveles de expresión de (A) IL-10; (B) IL-4; (C) IL-5; y (D) IL-13. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (grupo inoculado solo con PSEx).

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación de PSEx (Grupo PSEx) induce una reducción significativa en los niveles de expresión de TNF- α (Figura 16C) e IL-13 (Figura 17D), así como cierta tendencia ($p= 0,095$) en la reducción de IL-12 (Figura 16D); respecto a los valores observados a nivel basal (Grupo PBS). Al comparar este perfil de citoquinas con aquel observado en los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6), los resultados fueron interesantes. En efecto, en el caso del Grupo (PSEx+rshCD6) se observó una tendencia ($p= 0,055$) en inducir la reducción en el nivel de expresión de IL-12 (Figura 16D) comparado con lo observado en ratones inoculados solo con PSEx (Grupo PSEx). Sin embargo, el nivel de TNF- α (Figura 16C) o el de IL-13 (Figura 17D) no fueron significativamente diferentes a lo observado en el (Grupo PSEx). Estos resultados sugieren que los antígenos de PSEx que interaccionan con rshCD6, no están involucrados en la reducción de TNF- α ni la de IL-13, o en la tendencia a reducir los niveles de IL-12, inducida por PSEx.

Por su parte, al comparar el perfil de expresión de citoquinas inducido por PSEx con aquel observado en el Grupo (PSEx+rshCD5) se observó que los antígenos de PSEx que interaccionan con rshCD5, no parecen afectar la reducción de TNF- α , IL-13 o IL-12 inducida por PSEx. En efecto, los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en el nivel de expresión de TNF- α , IL-13 o IL-12 entre el Grupo (PSEx+rshCD5) y el Grupo PSEx.

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que los antígenos presentes en PSEx capaces de interaccionar con las moléculas rshCD5 o rshCD6, parecen no afectar el perfil de expresión de citoquinas inducidos por PSEx a nivel peritoneal, al menos 48 horas post-inoculación.

5.3.2. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre el perfil fenotípico de las células peritoneales de ratones Balb/c.

Los resultados obtenidos sobre diferencias en el perfil fenotípico de las poblaciones linfoides y no linfoides peritoneales, entre los grupos en estudio se muestran en las Figuras 18 y 19. Las estrategias de *gating* se muestran en los anexos 1. y 3, respectivamente.

En este sentido, se observó que PSEx fue capaz de inducir una reducción tanto en el porcentaje de células linfoides (Figura 18A), como en el porcentaje de la sub-población de células B2 (Figura 18D), con respecto a los niveles del grupo de control basal (Grupo PBS). Sin embargo, los Grupos (PSEx+rshCD5)

y (PSEx+rshCD6) no mostraron una diferencia significativa en el porcentaje de células linfoides ni en el porcentaje de células B2 comparado con aquellos observados en el Grupo inoculado solamente con PSEx (Grupo PSEx).

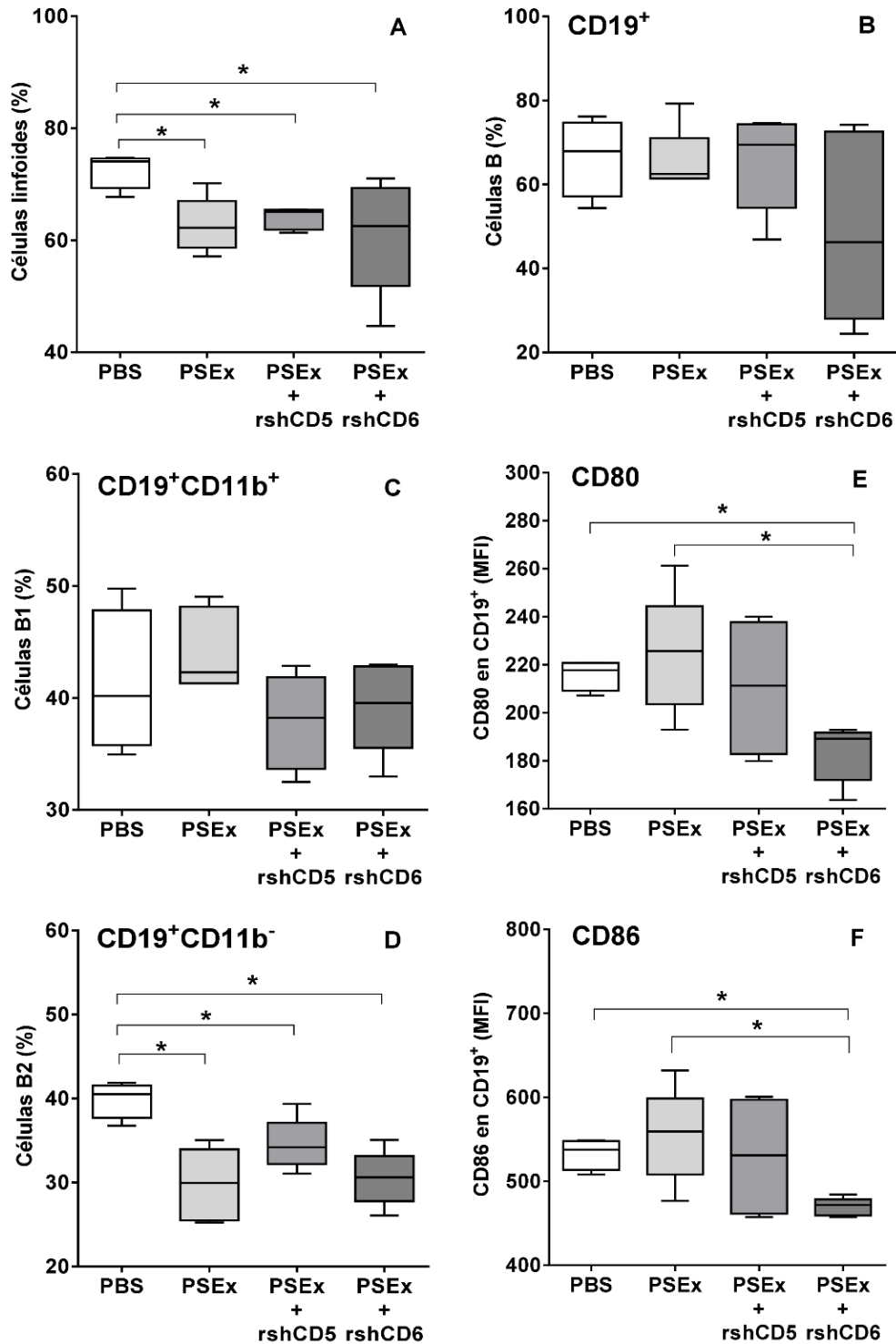


Figura 18. Efectos de la co-administración de rshCD5 o rshCD6 con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) sobre el porcentaje de las células linfoides de cavidad peritoneal. Tres grupos de ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) PSEx (50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n= 5$) inoculado con PBS estéril fue

utilizado como control (Grupo PBS). Dos días post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal fueron removidas de todos los individuos y el porcentaje de: células linfoides (A); B totales (CD19⁺) (B); B1 (CD19⁺CD11b⁺) (C); B2 (CD19⁺CD11⁻) (D); monocitos (F4/80^{low}) (D); y marcadores de activación (CD80 y CD86) en células F4/80⁺ (E y F), fue analizado por citometría de flujo. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (grupo inoculado solo con PSEx).

Estos resultados sugieren nuevamente, que los antígenos que presentes en PSEx y que tienen la capacidad de interaccionar con las moléculas rshCD5 o rshCD6, no juegan un papel relevante en la reducción en el porcentaje de células linfoides o en el porcentaje de células B2, inducido por PSEx.

Por su parte, cabe hacer notar que el análisis de la expresión de marcadores de activación (CD80 o CD86) sobre las células B totales (CD19⁺) (Figuras 18E y 18F), mostró que la interacción de la molécula rshCD6 (pero no de rshCD5) con PSEx indujo una reducción significativa en la intensidad de expresión de CD80 y de CD86 sobre células CD19⁺ comparada con aquellas observadas tanto en el Grupo PSEx como en el Grupo PBS.

Finalmente, el análisis del perfil fenotípico de las células no linfoides peritoneales no mostró resultados destacables (Figura 19).

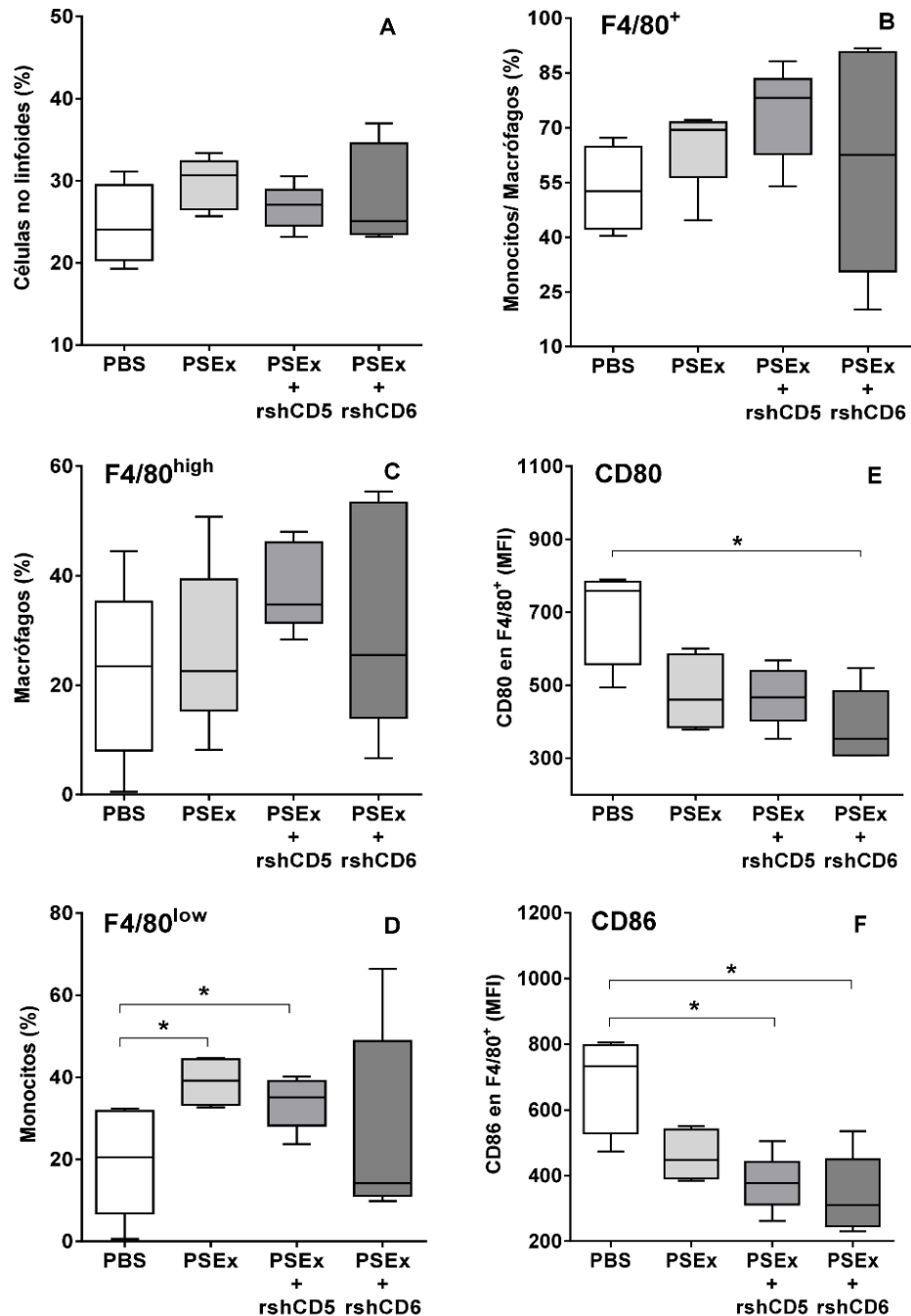


Figura 19. Efectos de la co-administración de rshCD5 o rshCD6 con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) sobre el porcentaje de las células no linfoides en cavidad peritoneal. Tres grupos de ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) PSEx (50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) (50 μg de PSEx + 25 μg de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n= 5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). Dos días post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal fueron removidas de todos los individuos y el porcentaje de: células no linfoides (A); Monocitos/Macrófagos (F4/80⁺) (B); Macrófagos (F4/80^{high}) (C); Monocitos (F4/80^{low}) (D); y marcadores de activación (CD80 y CD86) en células

F4/80⁺ (E y F, fue analizado por citometría de flujo. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (grupo inoculado solo con PSEx).

5.3.3. Efectos de la co-inoculación de PSEx con las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la producción de anticuerpos poli-reactivos y específicos en ratones Balb/c.

Por último, se estudió el perfil de la producción de anticuerpos anti-PSEx (específicos) y la de anticuerpos anti-DNP (poli-reactivos) en el exudado de la cavidad peritoneal de todos los ratones de los cuatro grupos experimentales. El perfil o sesgo de la respuesta de anticuerpos hacia la producción de anticuerpos específicos o hacia la de anticuerpos poli-reactivos inducidos por PSEx, fue analizado como el cociente entre el título de anticuerpos anti-DNP y el título de anticuerpos anti-PSEx (anti-DNP/anti-PSEx) (Figura 20).

En caso del grupo de ratones inoculados con (Grupo PSEx) se observó un aumento significativo del cociente para IgA (Figura 20B) así como una disminución significativa para IgG2a (Figura 20D); en ambos casos comparados con los valores observados en el grupo de control basal (Grupo PBS). Por su parte, en el Grupo (PSEx+rshCD5) se observó un aumento significativo en el cociente para IgM (Figura 20A), IgA (Figura 20B) e IgG2a (Figura 20D); en comparación con los valores observados a nivel basal (Grupo PBS). En el caso del Grupo (PSEx+rshCD6) solo se observó un aumento significativo en el cociente para IgM (Figura 20A) comparado con los niveles basales (Grupo PBS).

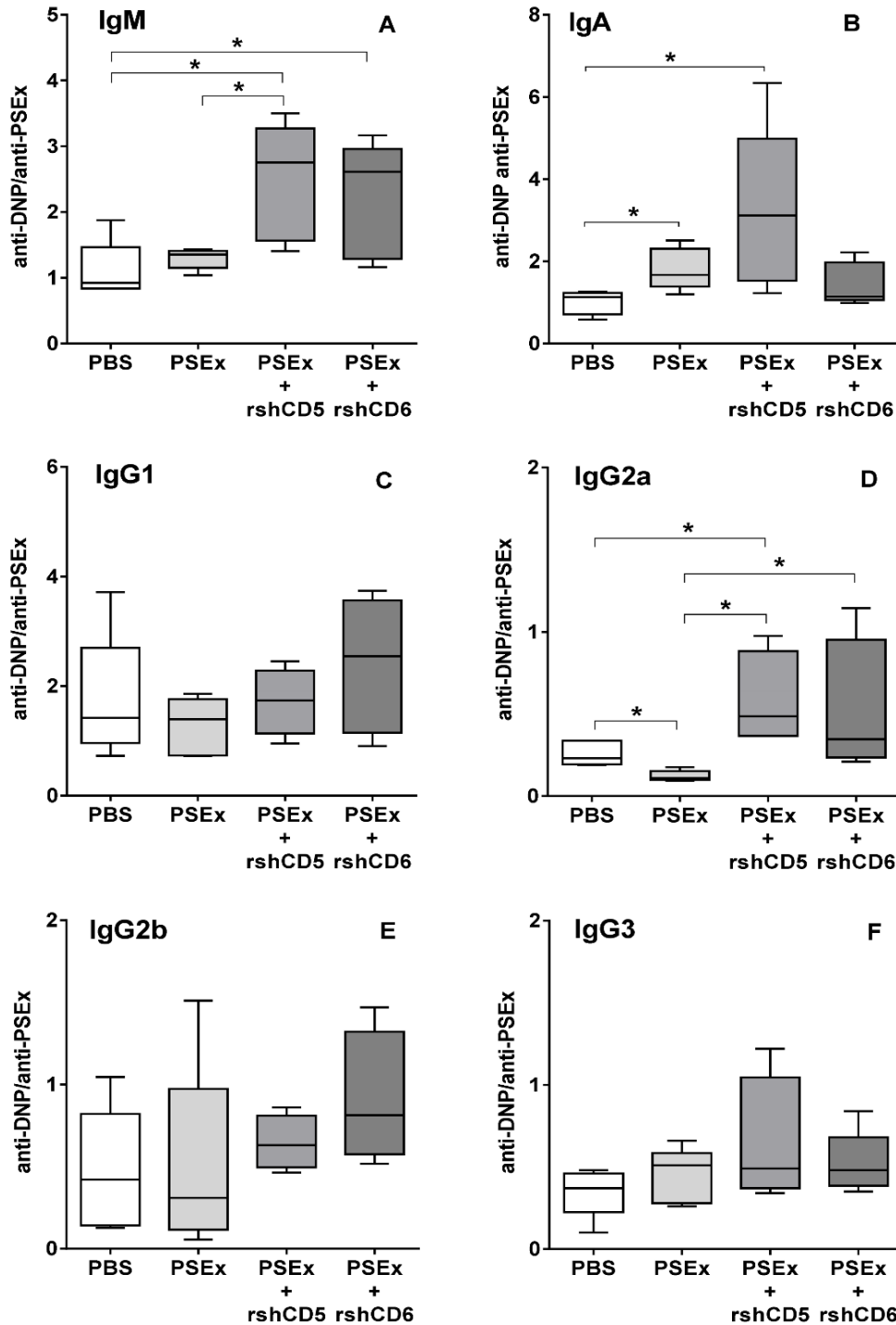


Figura 20. Efectos de la co-administración de rshCD5 o rshCD6 con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) sobre la producción de anticuerpos específicos y poli-reactivos en cavidad peritoneal. Tres grupos de ratones Balb/c ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía i.p. con: 1) PSEx ($50 \mu\text{g}/\text{ratón}$) en PBS estéril (Grupo PSEx); 2) ($50 \mu\text{g}$ de PSEx + $25 \mu\text{g}$ de rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; y 3) ($50 \mu\text{g}$ de PSEx + $25 \mu\text{g}$ de rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de animales ($n= 5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). Dos días post-inoculación, el exudado de la cavidad peritoneal fue

removido de todos los individuos y el título de anticuerpos específicos y poli-reactivos fue determinado por ELISA. Luego, el valor del cociente entre título de anticuerpos anti-DNP y el título de anticuerpos específicos fue determinado para los isotipos: (A) IgM; (B) IgA; y las cuatro subclases de IgG, (C) IgG1; (D) IgG2a; (E) IgG2b; y (F) IgG3. Los resultados son mostrados en formato “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (grupo inoculado solo con PSEx).

De manera bien interesante, el Grupo (PSEx+rshCD5) mostró un aumento significativo del cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgM (Figura 20A) e IgG2a (Figura 20D); comparado con lo observado en el grupo de ratones inoculados con PSEx. Esto sugiere que, la administración exógena de la molécula rshCD5 es capaz de modular la respuesta de anticuerpos IgM e IgG2a hacia un perfil poli-reactivo en ratones inoculados con PSEx.

Además, resulta interesante destacar que el Grupo (PSEx+rshCD6) mostró un aumento significativo en el valor del cociente (anti-DNP/anti-PSEx) para IgG2a (Figura 20D) comparado con lo observado en el grupo de ratones inoculados con PSEx (Grupo PSEx). Estos resultados preliminares sugieren entonces que la administración exógena de rshCD6 es capaz de modular la respuesta de anticuerpos IgG2a hacia un perfil poli-reactivo en ratones inoculados con PSEx.

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que los antígenos presentes en PSEx capaces de interactuar con las moléculas rshCD5 o rshCD6, parecen afectar el sesgo o polarización temprano (48 horas post-inoculación) de la respuesta de ciertos isotipos/subclases de anticuerpos, en términos poli-reactivos/específicos, a nivel peritoneal. Esto podría ser bien importante a la luz del reporte reciente de nuestro grupo con relación a que la producción de anticuerpos poli-reactivos sería un marcador de resistencia a la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. [García-Luna *et al.*, 2021].

En suma, los resultados más destacables obtenidos en este capítulo mostraron que las moléculas rshCD5 y rshCD6 presentan *in vitro* actividad protoscolicida intrínseca. Por otro lado, se observó que la administración exógena de rshCD5 y rshCD6 induce inmuno-modulación, principalmente a nivel local (peritoneal) en ratones Balb/c inoculados con PSC de *E. granulosus* s.l. En particular, rshCD6 potenció la expresión de IFN- γ e IL-17A en células peritoneales. En paralelo, la administración de rshCD5 y rshCD6 redujo el porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺ peritoneales. Además, rshCD5 indujo el incremento del porcentaje de células B2, en paralelo con una reducción del porcentaje de monocitos/macrófagos

peritoneales. Por último, en el modelo de inmunización con PSEx, la administración de rshCD5 y rshCD6 polarizó parcialmente la respuesta de anticuerpos peritoneales de los isotipos IgM e IgG2a hacia un perfil de tipo poli-reactivo.

CAPÍTULO 3

Objetivo específico 2. *Analizar el papel de los receptores scavenger CD5 y CD6 en la interacción entre antígenos tegumentarios de PSC de E. granulosus s.l. y células peritoneales murinas.*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Proteínas recombinantes. Ver la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.2. Animales.

6.2.1. Ratones hembra C57Bl/6 normales (vírgenes) adquiridos y mantenidos de igual manera y en los mismos lugares descritos en la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.2.2. Ratones CD5-deficientes (CD5^{-/-}) y CD5-*wild-type*, o CD6-deficientes (CD6^{-/-}) y CD6-*wild-type*, todos con *background* genético en C57Bl/6 [C. Raman, Universidad de Alabama, Birmingham, AL./Dr. Francisco Lozano, Universitat de Barcelona, España], fueron mantenidos en las instalaciones de Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona (España), bajo condiciones reguladas y controladas de luz/oscuridad (ciclos de 12 h/12 h) y temperatura (21°C), alimentándolos *ad libitum* con ración y agua esterilizadas.

6.3. Protocolos de ética. Los procedimientos con animales de experimentación que se realizaron en Uruguay siguieron los lineamientos de los protocolos de ética descritos en la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2, mientras que los realizados en el IDIBAPS (Barcelona, España) fueron llevados a cabo con aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona (España).

6.4. Obtención de componentes del tegumento de PSC de E. granulosus s.l. (PSEx). Ver la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.5. Conjugación de componentes del tegumento de PSC de E. granulosus s.l. (PSEx) a isotiocianato de fluoresceína (FITC). La conjugación de FITC a PSEx se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mourglia-Ettlin *et al.* (2018). Brevemente, 1 mg de PSEx fue dializado contra buffer NaHCO₃

100 mM pH 9 a 4°C. Luego, se adicionaron 500 µg de FITC (*Sigma*) solubilizados en DMSO (*Amresco*), y la mezcla fue incubada durante 8 h en oscuridad a 4°C con agitación constante y en oscuridad. Finalmente, después de dializar la mezcla exhaustivamente contra PBS, el conjugado obtenido (PSEx-FITC) se almacenó en oscuridad a 4°C hasta su uso. En paralelo, la conjugación de BSA con FITC (BSA-FITC) fue realizada siguiendo el mismo protocolo.

6.6. Análisis *in vivo* de la unión de componentes del tegumento PSC de *E. granulosus* s.l. a células peritoneales de ratones C57BL/6. Un grupo de ratones C57BL/6 (n= 6) fue inoculado por vía i.p. con 100 µg/ratón de PSEx-FITC en PBS estéril. Un segundo grupo de ratones (n= 3) inoculado i.p. con un mismo volumen de PBS estéril fue utilizado como grupo control. A los 30 min post-inoculación, y previa anestesia inhalatoria, se realizó la eutanasia de todos los ratones de cada grupo experimental mediante dislocación cervical, y las células peritoneales de cada individuo fueron recuperadas siguiendo protocolos estándares ya descritos. Posteriormente, 2×10^5 células de cada individuo fueron incubadas con una dilución apropiada de anticuerpos monoclonales linaje-específicos conjugados a Ficoeritrina (PE), diluidos en PBS conteniendo BSA al 0,5% (m/v) y NaN₃ al 0,02% (m/v) (PBS-BSA-NaN₃). Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: i) anti-CD19-PE (células B); ii) anti-CD3-PE (células T); iii) anti-CD49b (células NK); y iv) anti-F4/80-PE (monocitos/macrófagos); todos de *BD-Pharmingen*. Finalmente, la adquisición de eventos fue realizada en un citómetro de flujo *FACSCalibur*[®] (*Becton Dickinson*) utilizando el software *CellQuest*[®]. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software libre *Flowing Software* disponible en www.flowingsoftware.btk.fi.

6.7. Análisis *ex vivo* de la unión de componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) y células CD19⁺ o células F4/80⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57BL/6. Un grupo de ratones C57BL/6 (n= 4) fue sacrificado, previa anestesia inhalatoria, mediante dislocación cervical, y las células peritoneales de cada individuo fueron recuperadas siguiendo protocolos estándares ya descritos. Luego, las células peritoneales recuperadas de cada individuo fueron mezcladas para tener un número de células suficiente para realizar el ensayo. Posteriormente, 2×10^5 células/pocillo fueron incubadas (por triplicado) con 100 µL de cantidades crecientes de PSEx-FITC o de BSA-FITC (0,2; 1,0; 5,0; 15,0 y 25,0 µg en ambos casos) en simultáneo con diluciones apropiadas de anticuerpo monoclonal anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE. Finalmente, la adquisición de eventos fue realizada en un citómetro de flujo *FACSCalibur*[®] (*Becton Dickinson*) utilizando el software *CellQuest*[®]. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software libre *Flowing Software* disponible en www.flowingsoftware.btk.fi.

6.8. Ensayos de competencia por la interacción con componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx) entre las moléculas rshCD5 o rshCD6 y células peritoneales de ratones C57BL/6. Las células peritoneales de ratones normales C57BL/6 fueron obtenidas siguiendo los protocolos anteriormente descritos. Luego, 2×10^5 células/pocillo fueron incubadas con: a) 1 μ g de PSEx-FITC y cantidades crecientes de rshCD5 o rshCD6 (0,1; 1,0 y 10,0 μ g en ambos casos) en simultáneo con una dilución apropiada de anticuerpo monoclonal anti-CD19-PE; y b) 1 μ g de PSEx-FITC y cantidades crecientes de rshCD5 o rshCD6 (1,0; 3,0 y 6,0 μ g en ambos casos) en simultáneo con una dilución apropiada de anticuerpo monoclonal anti-F4/80-PE. El 100% de interacción entre los antígenos del tegumento y las células peritoneales fue determinado por incubación de las mismas con 1 μ g de PSEx-FITC en simultáneo con una dilución apropiada de los anticuerpos monoclonales anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE. La adquisición de eventos fue realizada en un citómetro de flujo *FACSCalibur*[®] (*Becton Dickinson*) utilizando el software *CellQuest*[®]. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software libre *Flowing Software* disponible en www.flowingsoftware.btk.fi.

6.9. Co-inoculación de (PSEx y rshCD5) o (PSEx y rshCD6) en ratones C57BL/6. Tres grupos de ratones C57BL/6 (n= 5/grupo) fueron inoculados por vía i.p. para luego obtener muestras para analizar parámetros de la respuesta inmune local siguiendo el mismo esquema mostrado para ratones Balb/c en la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.10. Interacción entre las células CD19⁺ o F4/80⁺ peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes con componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. Las células peritoneales de los individuos de cuatro grupos de ratones (n= 4/grupo): i) CD5-deficientes; ii) control *wild-type* correspondiente (WT-CD5); iii) CD6-deficientes; y iv) control *wild-type* correspondiente (WT-CD6); fueron recuperadas siguiendo procedimientos estándares previamente descritos. Luego, las células peritoneales recuperadas de cada individuo fueron utilizadas de manera análoga al ítem 6.7. la sección *Materiales y Métodos* del presente capítulo (Capítulo 3).

6.11. Análisis de la respuesta inmune de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. Dos grupos de ratones (n= 5/grupo): i) CD5-deficientes (Grupo CD5^{-/-}) y ii) control *wild-type* correspondiente (Grupo WT-CD5), fueron inoculados por vía i.p. con 50 μ g/ratón de PSEx en PBS estéril. Otros dos grupos de ratones (n= 5/grupo): iii) CD5-deficientes (Grupo CD5^{-/-}) y iv) control *wild-type* correspondiente (Grupo WT-CD5), fueron inoculados por vía i.p. con PBS estéril. Por otra parte, dos grupos de ratones (n= 5/grupo): v) CD6-

deficientes (Grupo CD6^{-/-}) y vi) controles *wild-type* correspondientes (Grupo WT-CD6), fueron inoculados por vía i.p. con 50 µg/ratón de PSEx en PBS estéril. Otros dos grupos de ratones (n= 5/grupo): vii) CD6-deficientes (Grupo CD6^{-/-}) y viii) controles *wild-type* correspondientes (Grupo WT-CD6), fueron inoculados por vía i.p. con PBS estéril. A las 48 h p.i. se obtuvieron muestras para analizar parámetros de la respuesta inmune local siguiendo el mismo esquema mostrado para ratones Balb/c en la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.12. Obtención de células y exudados peritoneales. Ver la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.13. Cuantificación relativa de citoquinas por RT-qPCR. El nivel de transcritos para citoquinas fue analizado en células peritoneales, siguiendo en todos los casos los protocolos reportados en Mourglia-Ettlin *et al.* (2016b); según los detalles descritos en la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.14. Citometría de flujo. Ver la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2 para los experimentos realizados en Uruguay (ratones C57BL/6). Para los experimentos realizados en el IDIBAPS (Barcelona, España) con ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes, se realizaron las mismas etapas de procesamiento exceptuando la adquisición de datos, la cual se realizó con un citómetro de flujo *FACS Canto II*[®] (*Becton Dickinson*) utilizando el software *FACSDiva*[®]. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software libre *Flowing Software* disponible en www.flowingsoftware.btk.fi.

6.15. Determinación del título de anticuerpos específicos o poli-reactivos por ELISA. Ver la sección *Materiales y Métodos* del Capítulo 2.

6.16. Análisis estadísticos. El procesamiento de tablas de datos fue realizado utilizando *Microsoft Office Excel*[®], mientras que la construcción de gráficos y los análisis estadísticos fueron realizados mediante *GraphPad Prism*[®]. Los análisis de comparación entre grupos fueron realizados utilizando el test no-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. El test paramétrico Student's t-Test fue utilizado para comparar los resultados provenientes de los ensayos *ex vivo* y de los ensayos de competencia. En todos los casos, una diferencia $p < 0,05$ fue considerada significativa.

7. RESULTADOS

En el capítulo previo de la presente tesis se evaluaron algunos de los posibles mecanismos involucrados en la protección inducida frente a la infección secundaria experimental por *E. granulosus* s.l. en ratones Balb/c, mediante la administración de las moléculas rshCD5 o rshCD6 [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Dada la relevancia que tienen las células peritoneales en dicho modelo de infección [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b; Baz *et al.*, 2006], en el presente capítulo profundizamos en el estudio de la relación (celular y molecular) existente entre distintas poblaciones leucocitarias peritoneales, los receptores solubles y de membrana CD5 o CD6, y su interacción con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l.

Cabe destacar que, en este capítulo, se describen experimentos realizados en el marco de una pasantía de investigación llevada a cabo en el “Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer” (IDIBAPS, Barcelona), y que fue supervisada por el Dr. Francisco Lozano (Barcelona, España). Esto fue muy importante, ya que nos permitió trabajar con ratones deficientes en el receptor CD5 (*Cd5^{-/-}*, CD5-deficientes), y con ratones deficientes en el receptor CD6 (*Cd6^{-/-}*, CD6-deficientes), ambos con *background* genético C57Bl/6 [Orta-Mascaró, *et al.*, 2016; Velasco-de Andrés, 2021].

7.1. Interacción *in vivo* entre antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. y diferentes tipos celulares de la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6.

En primera instancia, se analizó *in vivo* la potencial interacción entre componentes presentes en la fracción PSEx y diferentes tipos celulares en la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6. La estrategia seleccionada consistió en utilizar como “sonda” la fracción PSEx conjugada a FITC (PSEx-FITC) para evidenciar, por citometría de flujo, la capacidad de interacción entre los componentes del tegumento del parásito y los diferentes tipos celulares presentes en cavidad peritoneal. Así, el diseño experimental consistió en inocular i.p. ratones C57Bl/6 con PSEx-FITC o con PBS (control basal de fluorescencia). Luego de 30 min, se recuperaron las células de la cavidad peritoneal de todos los individuos, y finalmente se las marcó con distintos anticuerpos monoclonales linaje-específicos conjugados a ficoeritrina (PE), para su posterior análisis por citometría de flujo.

De manera consistente con varios reportes, los resultados mostraron que las células CD19⁺ y las células F4/80⁺ fueron los tipos celulares mayoritarios (en términos porcentuales) presentes en la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6 (Figura 21A).

Por otra parte, y con el fin de evaluar la potencial interacción *in vivo* entre PSEx-FITC y las células CD19⁺, CD3⁺, CD49b⁺ o F4/80⁺, se determinó el incremento en la intensidad media de fluorescencia (MFI) en el canal de fluorescencia donde se detectó la unión de PSEx-FITC (FL-1) respecto al basal de cada población. Es decir, el cociente entre células provenientes de ratones inoculados con PSEx-FITC vs. células obtenidas de ratones inoculados con PBS. Esto permite, además, evitar sesgos debidos a diferencias en fluorescencia intrínseca de cada población. Los resultados obtenidos mostraron que, si bien todos los tipos celulares analizados fueron capaces de interactuar con componentes presentes en PSEx, fueron las células CD19⁺ y las F4/80⁺ las que exhibieron una mayor capacidad de interacción (Figura 21B).

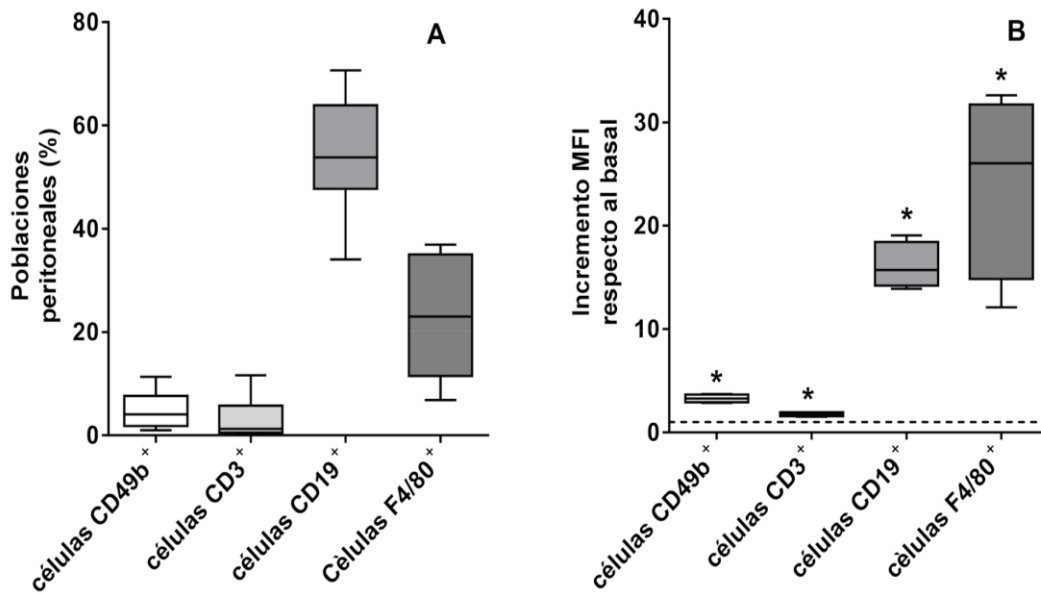


Figura 21. Interacción entre componentes de PSEx y las células de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6. Las células de la cavidad peritoneal fueron recuperadas de los individuos de un grupo de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx-FITC y de un segundo grupo inoculado con PBS. Luego, incubadas con anticuerpos monoclonales linaje-específicos: anti-CD19-PE (células B), anti-CD3-PE (células T), anti-CD49b (células NK) y anti-F4/80-PE (monocitos/macrófagos). Luego, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Porcentaje de cada población celular (A); incremento de MFI para FITC en las distintas poblaciones peritoneales con relación

a ratones inoculados con PBS (---) (nivel basal) (B). Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

En segundo lugar, y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos *in vivo* sugirieron que los componentes presentes en PSEx serían capaces de interactuar principalmente con las células CD19⁺ y/o las células F4/80⁺ de cavidad peritoneal, se realizó un estudio *ex vivo* analizando si estas interacciones entre PSEx y estos dos tipos celulares eran dosis dependiente. Para ello, se incorporó al ensayo el uso de BSA-FITC como control de la especificidad de la interacción. El diseño experimental consistió en recuperar células peritoneales de ratones normales C57Bl/6 e incubarlas con cantidades crecientes de PSEx-FITC, o cantidades equivalentes de BSA-FITC como control de especificidad. Finalmente, se marcaron las células con anticuerpos monoclonales anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE y realizó el análisis por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos indicaron claramente que la interacción entre componentes de PSEx y las células CD19⁺ (Figura 22A) o las células F4/80⁺ (Figura 22B) de cavidad peritoneal, es específica y dosis-dependiente para PSEx.

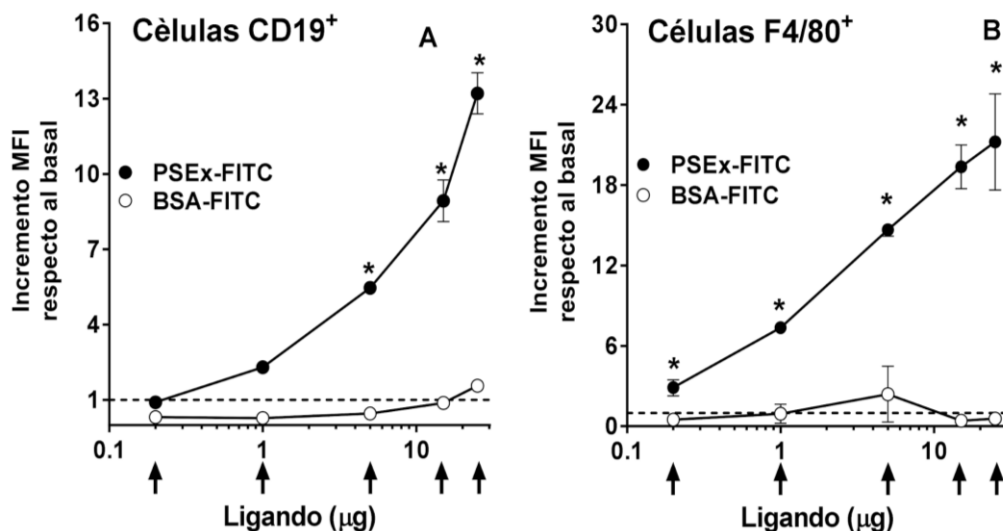


Figura 22. Capacidad de interacción entre componentes del tegumento de *E. granulosus* y células CD19⁺ y/o células F4/80⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6. Células peritoneales cada individuo de un grupo de ratones normales C57Bl/6 ($n = 4$) fueron recuperadas e incubadas con cantidades crecientes (0,2; 1,0; 5,0; 15,0 y

25,0 μ g) de PSEx-FITC o de BSA-FITC. Luego, de incubar con anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Incremento de MFI para FITC sobre células CD19⁺ peritoneales con relación a ratones inoculados con PBS (nivel basal) (A); incremento de MFI para FITC sobre células F4/80⁺ peritoneales con relación a ratones inoculados con PBS (nivel basal) (B). Los resultados se muestran como la media (\pm SEM) de los valores obtenidos por triplicado. (\uparrow): Diferencia significativa (t- Test, $p < 0,05$) entre el grupo PSEx-FITC y el grupo BSA-FITC, a la misma cantidad de los ligandos. (*): Diferencia significativa (t- Test, $p < 0,05$) entre el grupo PSEx-FITC o el grupo BSA-FITC con respecto al grupo control inoculado con PBS (---).

Finalmente, y teniendo en cuenta que los componentes de PSEx son capaces de interactuar con los receptores solubles rshCD5 o rshCD6 [Miles *et al.*, 2020b; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018], no resultaría ilógico pensar que, los “ligandos” presentes en los componentes de PSEx capaces de interactuar con las células peritoneales CD19⁺ y/o F4/80⁺, podrían estar relacionados con aquellos capaces de interactuar con los receptores solubles rshCD5 o rshCD6. Por ello, se diseñó una estrategia para verificar esta idea, la cual consistió en incubar células peritoneales de ratones C57Bl/6 con una cantidad fija y no saturante de la sonda PSEx-FITC, en presencia de cantidades crecientes de rshCD5 o de rshCD6. Luego, mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE, se realizó un análisis por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto rshCD5 como rshCD6 fueron capaces de inhibir, aunque parcialmente, la interacción entre componentes de PSEx y las células CD19⁺ peritoneales (Figura 23A). En efecto, 10 μ g de rshCD5 o rshCD6 inhibieron de forma significativa entre un 16-18 % de esa interacción. Por su parte, los resultados mostraron que rshCD6 (pero no rshCD5) tiene la capacidad de inhibir de manera significativa la interacción entre componentes de PSEx y las células F4/80⁺ peritoneales (Figura 23B). De hecho, 3 μ g de rshCD6 fueron capaces de inhibir cerca de un 15-16% de dicha interacción.

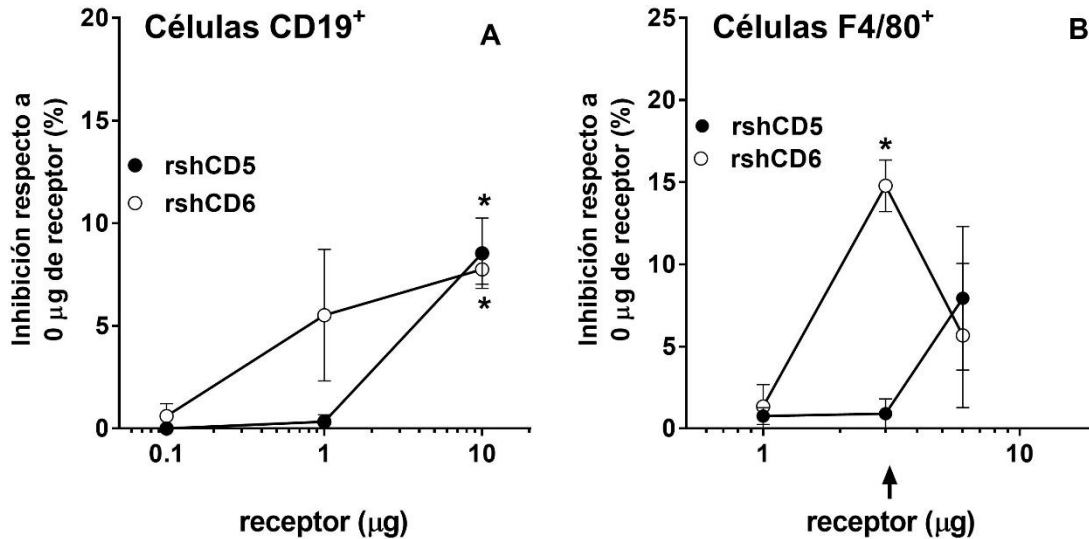


Figura 23. Competencia entre los receptores rshCD5 o rshCD6 y las células CD19⁺ o F4/80⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6, por la interacción con PSEx. Células peritoneales de ratones normales C57Bl/6 fueron incubadas con: 1 µg de PSEx-FITC junto con cantidades crecientes (0,1; 1,0 y 10,0 µg) de rshCD5 o rshCD6 y luego con anti-CD19-PE (A); y 1 µg de PSEx-FITC junto con cantidades crecientes (1,0; 3,0 y 6,0 µg) de rshCD5 o rshCD6 y luego incubadas con anti-F4/80-PE (B). El análisis de cada muestra se realizó por citometría de flujo. El 100% de interacción entre de los antígenos del tegumento y las células peritoneales fue determinado por incubación de estas con 1 µg de PSEx-FITC y luego con anti-CD19-PE o anti-F4/80-PE. Los resultados se muestran como la media (± SEM) de los valores obtenidos por triplicado. (†): Diferencia significativa (*t*- Test, *p* < 0,05) en el porcentaje de inhibición entre rshCD5 y rshCD6 a una igual cantidad de los receptores. (*): Diferencia significativa (*t*- Test, *p* < 0,05) entre porcentaje de inhibición de rshCD5 o de rshCD6 comparado con el control (0 µg de proteína recombinante).

En su conjunto, estos resultados sugieren que rshCD6 tiene una capacidad importante de inhibir, al menos parcialmente, la interacción entre componentes de PSEx y las células CD19⁺, así como con las células F4/80⁺ peritoneales. A su vez, esta capacidad de inhibición resultó ser mayor en el caso de las células F4/80⁺ peritoneales. Por su parte, rshCD5 fue capaz de inhibir en forma importante, únicamente la interacción entre componentes en PSEx y las células CD19⁺ peritoneales. Así, los resultados obtenidos sugieren que, al menos alguno(s) de los ligandos parasitarios para rshCD5 y rshCD6, también están involucrados en la interacción física entre antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. con células B y macrófagos peritoneales.

7.2. Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta inmune de ratones C57Bl/6.

Dado que hemos mostrado que las moléculas rshCD5 o rshCD6, aunque en forma parcial y algo diferente, muestran una potencial capacidad de inhibir la interacción entre PSEx y las células peritoneales CD19⁺ o F4/80⁺, nos planteamos evaluar la relevancia funcional de dicha interacción. Es decir, analizar si la administración de rshCD5 y rshCD6 podría ser capaz de modular la respuesta inmune de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx. Así, La estrategia utilizada consistió en inocular ratones C57Bl/6 con PSEx, en presencia o ausencia de rshCD5 o rshCD6 para luego de 48 h, recuperar las células y exudados de cavidad peritoneal de todos los individuos y analizar diversos parámetros inmunológicos de la respuesta local. Es decir, para analizar: (i) los niveles de expresión de ARNm de varias citoquinas en células peritoneales; (ii) el fenotipo de los infiltrados celulares y (iii) determinar el perfil de anticuerpos específicos y poli-reactivos, en exudados peritoneales.

7.2.1. Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones C57Bl/6.

En primer lugar, se determinó el nivel de expresión de varias citoquinas en células de cavidad peritoneal (respuesta local) de ratones inoculados con PSEx. En particular, se analizó el nivel de expresión de las siguientes citoquinas típicamente asociadas a perfiles pro-inflamatorios de respuestas tipo Th1/Th17: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-17A (Figura 24).

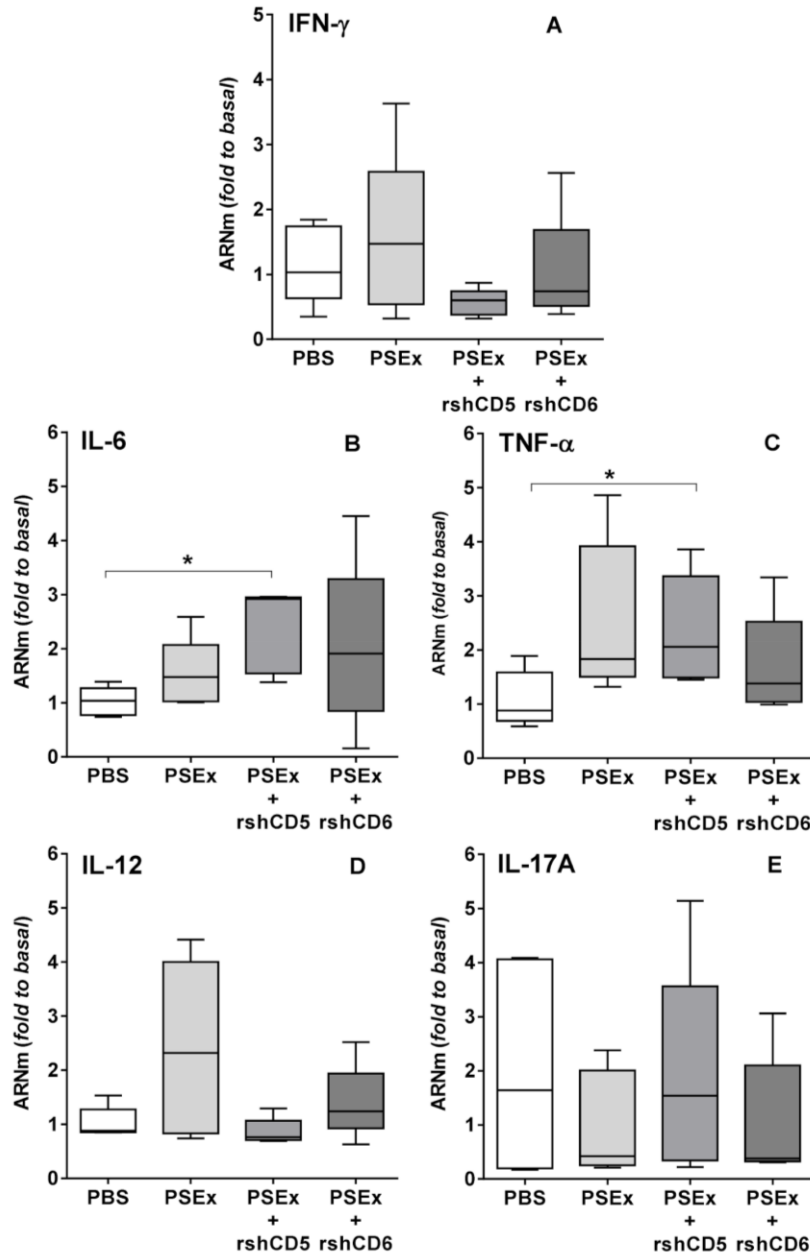


Figura 24. Efectos sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx y las moléculas rshCD5 o rshCD6. Tres grupos de ratones C57Bl/6 ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía i.p. con: a) $50 \mu\text{g}$ PSEx en PBS estéril/ratón (Grupo PSEx); b) ($50 \mu\text{g}$ PSEx + $25 \mu\text{g}$ rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)]; c) ($50 \mu\text{g}$ PSEx + $25 \mu\text{g}$ rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). A las 48 h post-inoculación, fueron recuperadas las células de la cavidad peritoneal de cada individuo y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IFN- γ ; (B) IL-6; (C) TNF- α ; (D) IL-12; y (E) IL-17A por RT-qPCR. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS

(niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (control de inoculación PSEx).

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación solo con PSEx (Grupo PSEx) indujo cierta tendencia ($p=0,055$) hacia un aumento en el nivel de expresión de TNF- α (Figura 24C) con respecto a lo observado en el control basal (Grupo PBS).

Por su parte, en el Grupo (PSEx+rshCD5), se observó un aumento significativo en los niveles de TNF- α (Figura 24C) e IL-6 (Figura 24B), mientras que se observó cierta tendencia hacia una disminución en los niveles de IFN- γ ($p=0,095$; Figura 24A) y de IL-12 ($p=0,095$; Figura 24D); todos comparados con aquellos niveles correspondientes al grupo de control basal (Grupo PBS). Asimismo, los resultados obtenidos mostraron además solo cierta tendencia ($p=0,095$) hacia una disminución del nivel de expresión de IL-12 (Figura 24D) entre el Grupo (PSEx+rshCD5) y el grupo de ratones inmunizados (Grupo PSEx).

Por otra parte, en el Grupo (PSEx+rshCD6), no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión para ninguna de las citoquinas analizadas, comparados tanto con aquellos niveles correspondientes al grupo de control basal (Grupo PBS) como con el Grupo PSEx (Figura 24).

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que si bien se observaron varias diferencias significativas en los niveles de expresión de ciertas citoquinas en el grupo (PSEx+rshCD5) con respecto al Grupo PBS, una única variación resultó ser relevante entre el grupo tratado con rshCD5 (PSEx+rshCD5) y el grupo inoculado con PSEx. En efecto, la inoculación exógena de rshCD5 mostró inducir cierta tendencia, en la expresión IL-12, hacia un aumento en ratones inoculados con PSEx. Por el contrario, la administración de rshCD6 no parece tener ningún efecto local sobre los niveles de expresión para ninguna de las citoquinas analizadas en el grupo de ratones inoculados con PSEx, al menos 48 horas post-inoculación.

7.2.2. Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones C57Bl/6.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión de ARNm para citoquinas típicamente asociadas con perfiles de respuestas anti-inflamatorias tipo Th2/Treg (IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13) se muestran en la Figura 25.

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación solo con PSEx (Grupo PSEx) indujo un aumento significativo en los niveles de IL-10 (Figura 25A) y de IL-4 (Figura 25B), con respecto a los valores correspondientes observados en el grupo de control basal (Grupo PBS).

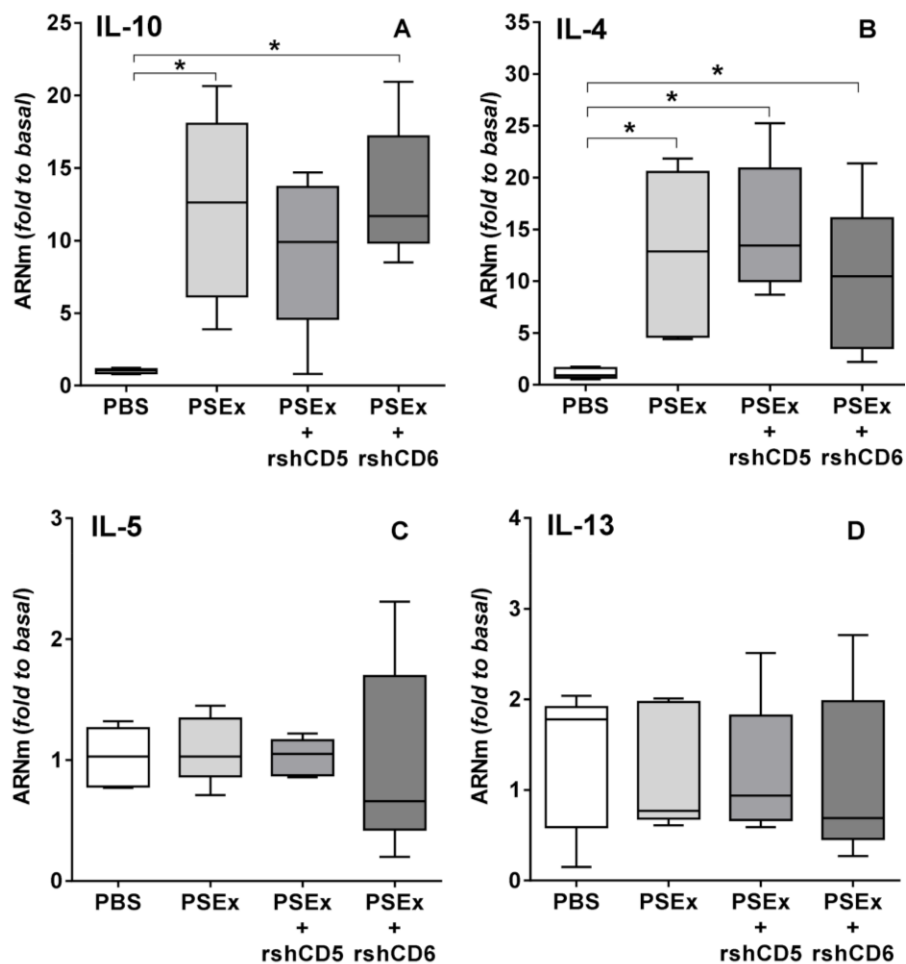


Figura 25. Efectos sobre los niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx y las moléculas rshCD5 o rshCD6. Tres grupos de

ratones C57Bl/6 ($n= 5/\text{grupo}$) fueron inoculados por vía *i.p.* con: a) 50 μg PSEx en PBS estéril/ratón (Grupo PSEx); b) (50 μg PSEx + 25 μg rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)] y c) (50 μg PSEx + 25 μg rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones ($n= 5$) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IL-10; (B) IL-4; (C) IL-5; y (D) IL-13, por RT-qPCR. Los resultados son mostrados en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (control de inoculación con PSEx).

Por su parte, en el Grupo (PSEx+rshCD5), se observó un aumento significativo en los niveles de IL-4 (Figura 25B) y cierta tendencia ($p= 0,087$) hacia un aumento del nivel de IL-10 (Figura 25A) con respecto a aquellos valores correspondientes a lo observado en el Grupo PBS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de ninguna de las citoquinas analizadas, entre los Grupo (PSEx+rshCD5) y el Grupo PSEx.

Por otra parte, el Grupo (PSEx+rshCD6) mostró un aumento significativo en los niveles de IL-10 (Figura 25A) y en los niveles de IL-4 (Figura 25B) comparados con los valores correspondientes a lo observado en el Grupo PBS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión para ninguna de las citoquinas analizadas entre el Grupo (PSEx+rshCD6) y el Grupo PSEx.

Estos resultados en su conjunto indican que la inoculación de rshCD5, o de rshCD6, parece no tener efecto sobre los niveles de expresión de citoquinas tipo Th2/Treg en ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx, al menos a nivel peritoneal 48 horas post-inoculación.

7.2.3. Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre el fenotipo de las células de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6.

Para poder discernir si la administración exógena de las moléculas rshCD5 o rshCD6 podría ser capaz de modular el fenotipo en células peritoneales en ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx, se realizaron varios ensayos analizando los posibles efectos por citometría de flujo. La estrategia utilizada consistió en recuperar células peritoneales de ratones C57Bl/6 inoculados con i) PSEx, ii) PSEx+rshCD5, iii) PSEx+rshCD6, o iv) PBS estéril (control basal). Luego, utilizar diversos paneles de anticuerpos

monoclonales, tanto linaje-específicos, así como contra marcadores asociados a estados de activación/diferenciación celular, y finalmente analizar el resultado del ensayo por citometría de flujo (Figura 26 y Figura 27). Las estrategias de *gating* se muestran en los anexos 1. y 3, respectivamente.

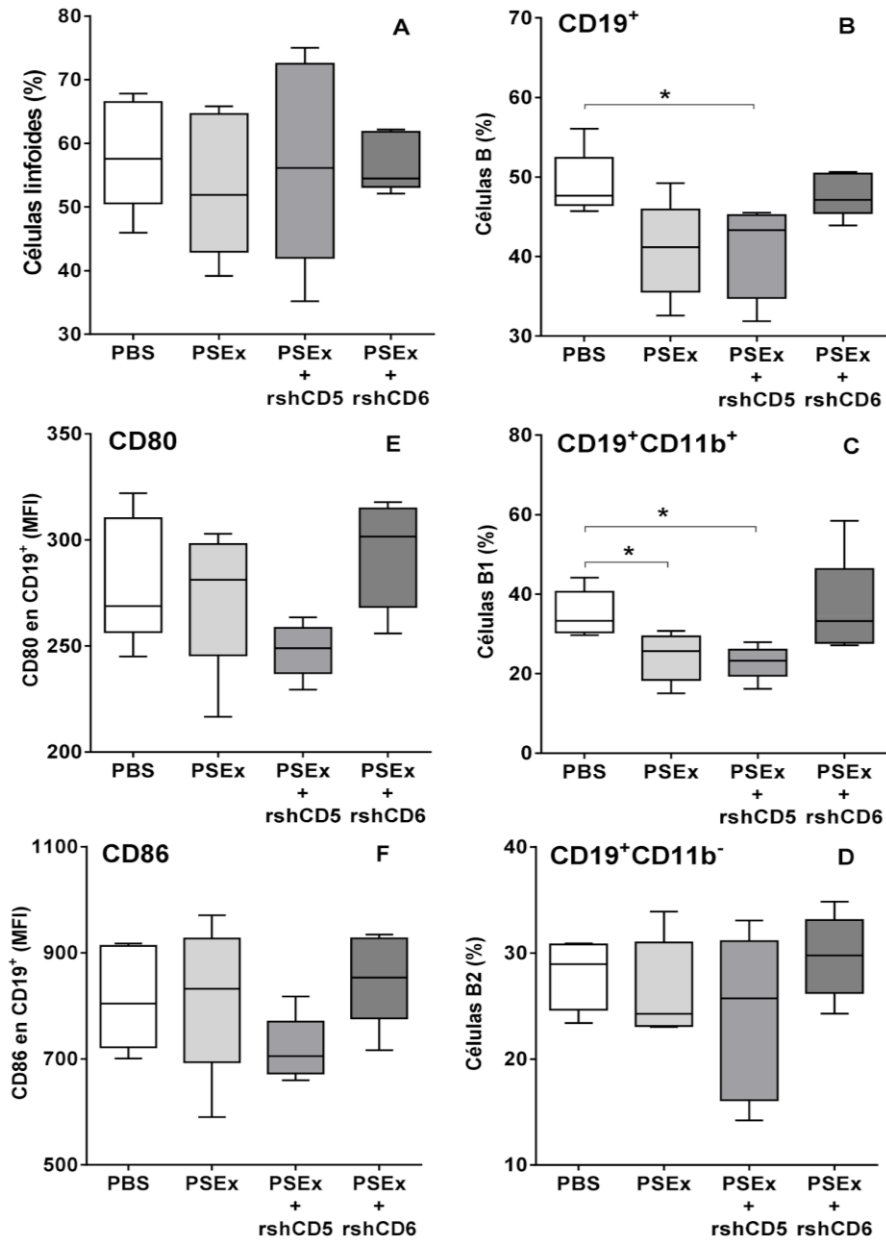


Figura 26. Efectos sobre las células CD19⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx y las moléculas rshCD5 o rshCD6. Tres grupos de ratones C57Bl/6 (n= 5/grupo) fueron inoculados por vía i.p. con: a) 50 µg PSEx en PBS estéril/ratón (Grupo PSEx); b) (50 µg PSEx + 25 µg rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)] y c) (50 µg PSEx + 25 µg rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones (n= 5) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en estas, mediante citometría de flujo, fue determinado: (A) células linfoides (%); (B) células CD19⁺ (%); (C) células CD19⁺CD11b⁺ (%); (D) células

CD19⁺CD11b⁻ (%); (E) MFI CD80 en *CD19⁺*; y (F) MFI CD86 en *CD19⁺*. Los resultados son mostrados en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, *Box and whiskers*). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (control de inoculación con PSEx).

Primero, comenzamos definiendo las poblaciones linfoides y no linfoides en base a los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad celular/irregularidad superficial (SSC), identificando a las células linfoides como (SSC^{low}FSC^{mid}), y a las células no linfoides como (SSC^{mid/high}FSC^{mid/high}). Luego, se determinó el porcentaje de células *CD19⁺* en la población de células linfoides (Figura 26B). Así, el grupo de ratones inoculados con PSEx mostró cierta tendencia ($p = 0,095$) hacia una disminución en el porcentaje de células *CD19⁺* (Figura 26B), comparado con los valores observados en el Grupo PBS.

Por su parte, el Grupo (PSEx+rshCD5) mostró una disminución significativa en el porcentaje de células *CD19⁺* comparado con los valores observados en el Grupo PBS. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de las células *CD19⁺* comparado con los valores observados en el Grupo solo inoculado con PSEx (Figura 26B).

Finalmente, los ratones del Grupo (PSEx+rshCD6) mostraron cierta tendencia ($p = 0,056$) hacia una reducción en el porcentaje de células *CD19⁺*, comparado con los valores observados en el Grupo PBS. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células B totales respecto a los valores observados en el Grupo PSEx.

En segundo lugar, se analizó si la inoculación de rshCD5 o rshCD6 podría tener algún efecto sobre el porcentaje de las sub-poblaciones de células B peritoneales de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx. Es decir, sobre las células B1 definidas como *CD19⁺CD11b⁺* y/o las células B2 definidas como *CD19⁺CD11b⁻*. Los resultados obtenidos mostraron que en los individuos del Grupo PSEx, se dio una reducción significativa en el porcentaje de células B1 (Figura 26C), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el caso de las células B2 (Figura 26D), comparados en ambos casos con los valores observados en el grupo de control basal (Grupo PBS).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células B totales, B1 o B2 en los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) con respecto a aquellos correspondientes a los valores observados en el Grupo PSEx.

En cuanto al perfil de activación, es decir variaciones en los niveles de expresión de las moléculas de membrana CD80 o CD86 sobre células CD19⁺ peritoneales, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales analizados (Figuras 26E y 26F).

Posteriormente, se determinó el porcentaje de células F4/80⁺ en la población de células no linfoides (Figura 27B). Así, en el grupo de ratones inoculados con PSEx, no se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células F4/80⁺ comparado con los valores observados en el Grupo PBS o en el Grupo PSEx (Figura 27B).

Por su parte, el Grupo (PSEx+rshCD5) mostró cierta tendencia ($p=0,095$) hacia una disminución en el porcentaje de células F4/80⁺, comparado con los valores observados en el Grupo PBS. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en comparación con los valores observados en el Grupo PSEx.

Finalmente, los ratones del Grupo (PSEx+rshCD6) no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de células F4/80⁺ comparado con los valores observados tanto en el Grupo PBS como en el Grupo PSEx. Tampoco se observaron diferencias destacables en el porcentaje de células F4/80^{high} (Figura 7C) o F4/80^{low} (Figura 27D), ni en los niveles de expresión de CD80 (Figura 27E) o de CD86 (Figura 27F) sobre las células F4/80⁺ para ninguno de los grupos experimentales analizados.

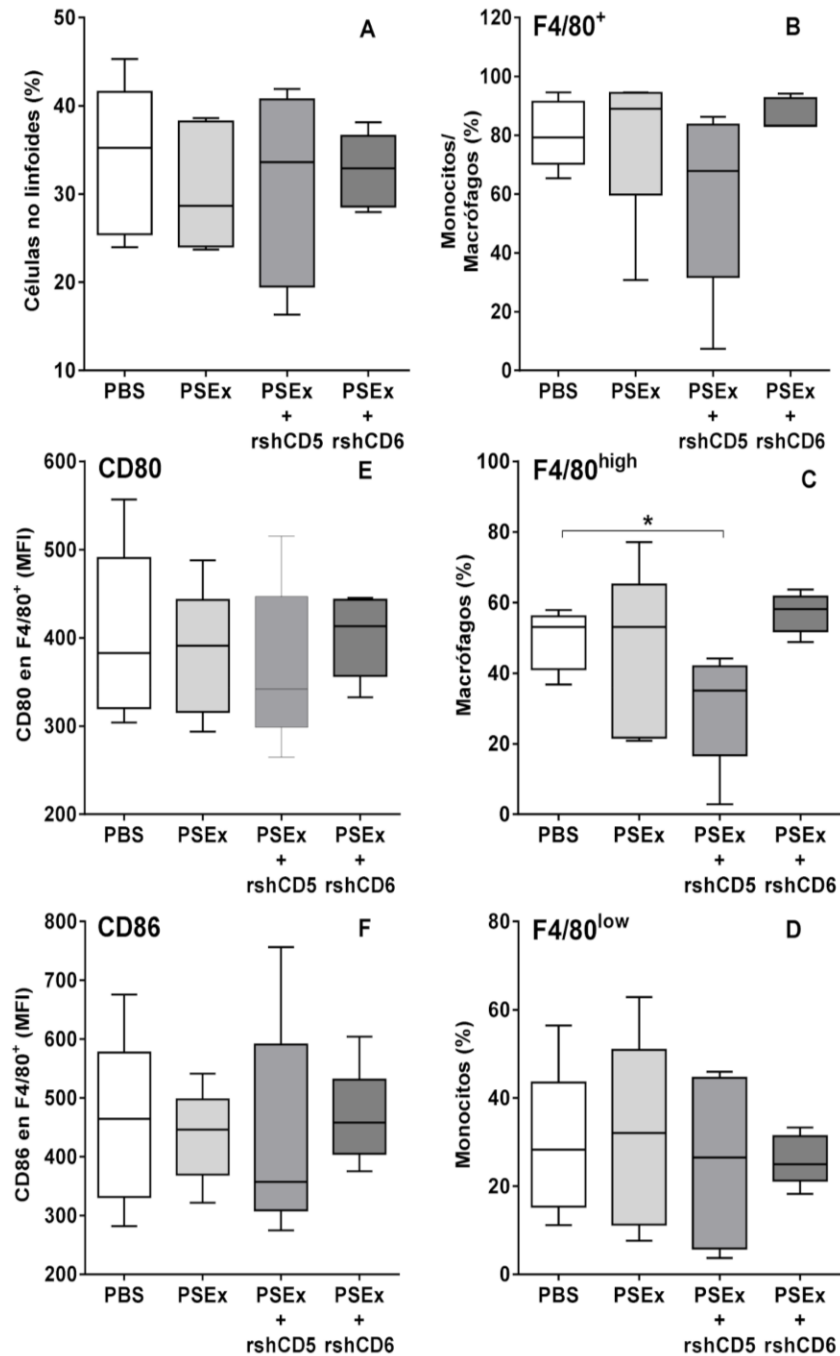


Figura 27. Efectos sobre las células F4/80⁺ de cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx y las moléculas rshCD5 o rshCD6. Tres grupos de ratones C57Bl/6 (n= 5/grupo) fueron inoculados por vía i.p. con: a) 50 µg PSEx en PBS estéril/ratón (Grupo PSEx); b) (50 µg PSEx + 25 µg rshCD5)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD5)] y c) (50 µg PSEx + 25 µg rshCD6)/ratón [Grupo (PSEx+rshCD6)]. Un cuarto grupo de ratones (n= 5) inoculado con PBS estéril fue utilizado como control (Grupo PBS). A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en las mismas mediante citometría de flujo fue determinado: (A) células no linfoides (%); (B) células F4/80⁺ (%); (C) células F4/80^{high} (%); (D) células F4/80^{low} (%); (E) MFI CD89 en F4/80⁺; y (F) MFI CD86 en F4/80⁺. Los resultados son mostrados en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test, p< 0,05) entre: a) los

Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx vs el Grupo PBS (niveles basales) o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) vs el Grupo PSEx (control de inoculación con PSEx).

7.2.4. Efectos de la co-inoculación de PSEx junto a las moléculas rshCD5 o rshCD6 sobre la respuesta de anticuerpos específicos y poli-reactivos de ratones C57Bl/6.

Finalmente, se analizó si la respuesta de anticuerpos presentes en el exudado de la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx, podría ser modulada por la administración exógena de rshCD5 o rshCD6. Para ello, la estrategia utilizada consistió en recuperar los exudados peritoneales de todos los ratones C57Bl/6 inoculados con: i) PSEx, ii) PSEx+rshCD5, iii) PSEx+rshCD6, o iv) PBS estéril (control basal); para luego determinar por ELISA el título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG, anti-PSEx (específicos) o anti-DNP (poli-reactivos). Como se mencionó previamente, el título de anticuerpos anti-DNP se utilizó como un índice de poli-reactividad de acuerdo a Gunti & Notkins *et al.* (2015) y a García-Luna *et al.*, (2021).

El objetivo principal de este análisis estuvo centrado en tratar de evidenciar la polarización de la respuesta de anticuerpos en uno u otro sentido (es decir, poli-reactiva vs específica). Con este fin fue que se calculó el cociente entre el título de anticuerpos poli-reactivos y el título de anticuerpos específicos (anti-DNP/anti-PSEx) para IgM, IgA, y las subclases de IgG, en todos los individuos de cada grupo experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28.

En el caso del grupo de ratones inoculados solo con PSEx (Grupo PSEx), los resultados mostraron una polarización significativa de la respuesta IgM hacia un perfil predominantemente específico (Figura 28A) y cierta tendencia ($p=0,056$) hacia un sesgo de tipo poli-reactivo en la respuesta IgA (Figura 28B), en ambos casos comparadas con aquellos valores observados en el control basal (Grupo PBS). Esto sugiere que, la respuesta IgM parece polarizarse hacia un perfil específico, mientras que la respuesta IgA parece volcarse hacia un perfil poli-reactivo, en animales C57Bl/6 inoculados con PSEx.

De manera interesante, los resultados mostraron que la respuesta IgA en el Grupo (PSEx+rshCD5) se polarizó significativamente hacia un perfil específico respecto a lo observado en el Grupo PSEx (Figura 28B); sugiriendo que la administración exógena de rshCD5 es capaz de modular tempranamente la respuesta de IgA local hacia un perfil específico en ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx.

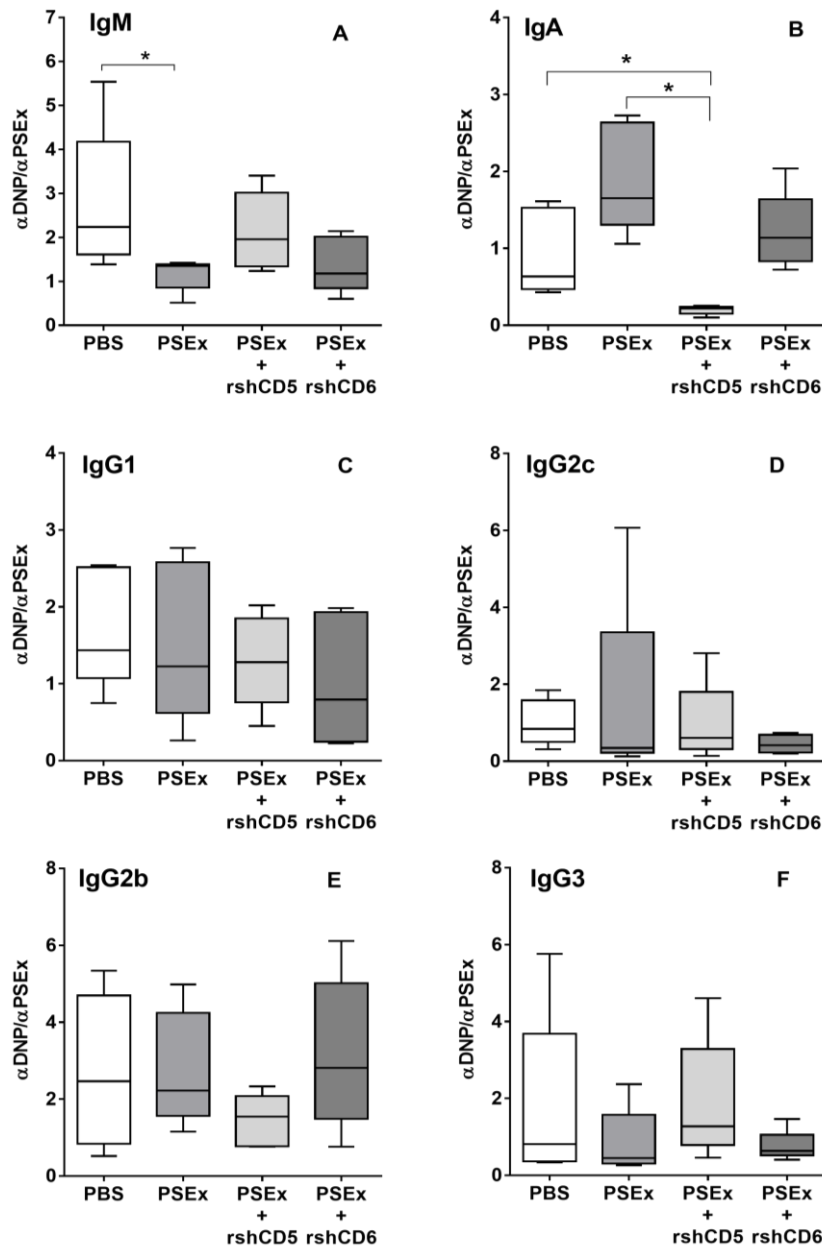


Figura 28. Efectos sobre la respuesta de anticuerpos en ratones C57Bl/6 inoculados con PSEx, inducidos por la administración exógena de rshCD5 o rshCD6. Cuatro grupos de ratones C57Bl/6 ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados i.p. con: (i) PSEx en PBS ($50 \mu\text{g}/\text{ratón}$) (Grupo PSEx), (ii) PSEx ($50 \mu\text{g}/\text{ratón}$) + rshCD5 ($25 \mu\text{g}/\text{ratón}$) [Grupo (PSEx+rshCD5)], (iii) PSEx ($50 \mu\text{g}/\text{ratón}$) + rshCD6 ($25 \mu\text{g}/\text{ratón}$) [Grupo (PSEx+rshCD6)] y (iv) PBS estéril (Grupo control PBS. A las 48 h post-inoculación, fueron recuperados los exudados peritoneales de cada individuo. El título de anticuerpos anti-DNP (poli-reactivos) y el título de anticuerpos anti-PSEx (específicos) fueron determinados por ELISA. Los resultados son mostrados como el cociente para los valores de (A) IgM, (B) IgA); (C) IgG1; (D) IgG2c; (E) IgG2b; y (F) IgG3 anti-DNP/anti-PSEx, en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$) entre: a) los Grupos (PSEx+rshCD5), (PSEx+rshCD6) o PSEx y el Grupo PBS (niveles basales); o b) los Grupos (PSEx+rshCD5) o (PSEx+rshCD6) y el Grupo PSEx (control de inoculación con PSEx).

7.3. Interacción entre los componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. y las células peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes.

Para estudiar los efectos que inducen los antígenos parasitarios sobre la respuesta inmune, se han utilizado como modelos diferentes cepas de ratones (ej. Balb/c, C57Bl/6, entre otras). Existen actualmente, además, numerosas cepas de ratones que son deficientes en la expresión de una (o varias) molécula(s) (*knock-out*), y que resultan modelos muy útiles para estudiar problemas biológicos complejos. En este contexto, diseñamos un primer conjunto de experimentos centrado en evaluar la relevancia que podrían tener los receptores de membrana CD5 y CD6 en el desarrollo temprano de la respuesta inmune inducida por componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx), utilizando como modelo cepas de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes.

La estrategia experimental consistió en utilizar nuevamente como “sonda” la fracción PSEx-FITC, para evidenciar por citometría de flujo, y utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD19-PE y anti-F4/80-PE, la capacidad de interacción entre los componentes del tegumento del parásito y las células peritoneales CD19⁺ o F4/80⁺ de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes. En primer lugar, se determinó el porcentaje de estas dos poblaciones en el total de células peritoneales. Así, y respecto a los linfocitos peritoneales CD19⁺, los resultados mostraron cierta tendencia ($p= 0,055$) hacia una reducción en el porcentaje de estas células en el grupo de ratones CD5-deficientes respecto a lo observado en el grupo de sus WT respectivos (Figura 29A). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células CD19⁺ en el grupo de ratones CD6-deficientes con respecto a su grupo WT (Figura 29B).

Por su parte, respecto a las células peritoneales F4/80⁺, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos de ratones CD5-deficientes (Figura 29A) o CD6-deficientes (Figura 29B) respecto a lo observado en sus respectivos grupos.

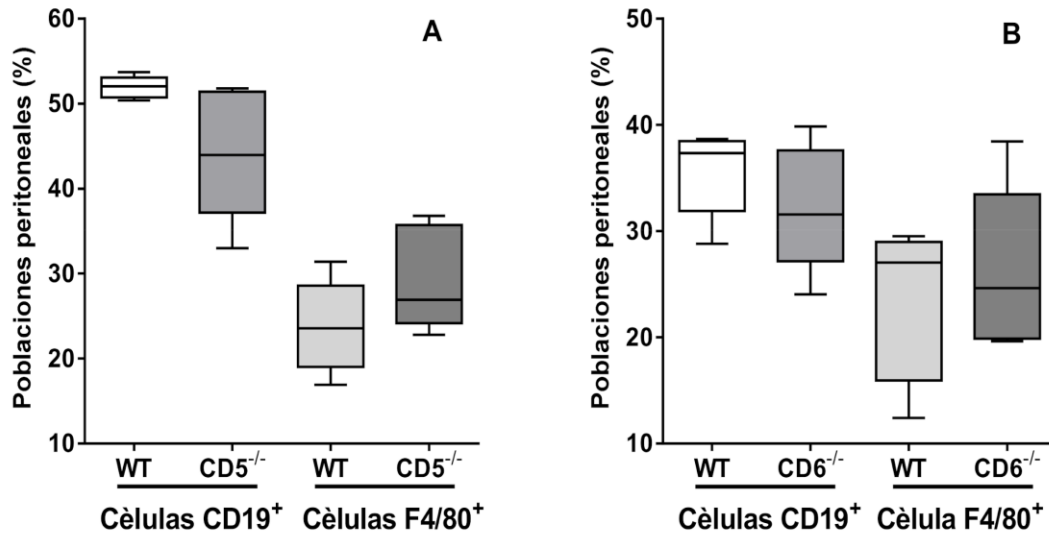


Figura 29. Porcentaje de células CD19⁺ y células F4/80⁺ en cavidad peritoneal de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes. Las células peritoneales, de cuatro grupos de ratones: i) CD5-deficientes; ii) WT respectivo; iii) CD6-deficientes y iv) WT respectivo, fueron recuperadas e incubadas con anti CD19-PE y anti-F4/80. Luego, por citometría de flujo, fue determinado el porcentaje de células CD19⁺ y F4/80⁺ en el total de las células peritoneales de cada grupo experimental. Los resultados son mostrados en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa entre ratones deficientes y sus respectivos WT para cada población estudiada (Mann-Whitney U test, p < 0,05).

Luego, se analizó la capacidad de las células peritoneales CD19⁺ y F4/80⁺ de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes de interactuar con PSEx. Los resultados obtenidos en este sentido se muestran en las Figuras 30 y 31.

En el caso de las células peritoneales CD19⁺, los resultados mostraron que para todas las cantidades de PSEx testeadas, se observó un incremento significativo en la MFI, tanto en el grupo de ratones CD5-deficientes (Figura 30A), como en el grupo CD6-deficientes (Figura 30B), así como en los correspondientes grupos WT; en todos los casos respecto a los niveles basales. Finalmente, se observó que dicha interacción resultó ser dosis dependiente para ambas cepas de ratones (Figuras 30A y 30B).

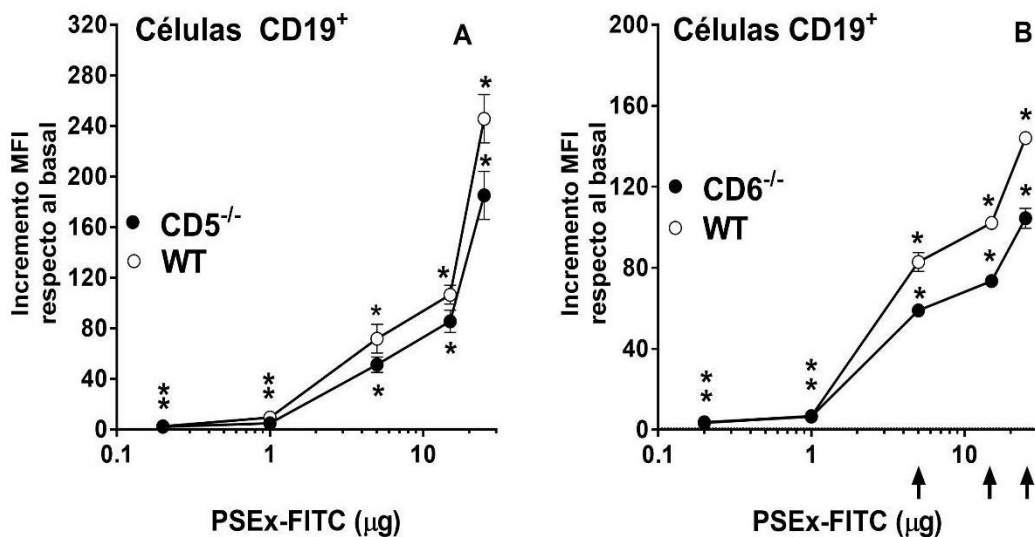


Figura 30. Capacidad de interacción entre los componentes de PSEx y células CD19⁺ de cavidad peritoneal de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes. Células peritoneales de cuatro grupos de ratones (n= 4/grupo): i) CD5-deficientes; ii) WT respectivo; iii) CD6-deficientes; y iv) WT respectivo, fueron recuperadas e incubadas con cantidades crecientes (0,2; 1,0; 5,0; 15,0 y 25,0 µg) de PSEx-FITC. Luego, de incubar con anti-CD19-PE, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (A) incremento de MFI para FITC en células peritoneales CD19⁺ de ratones CD5-deficientes y WT respectivos, con relación al nivel basal; (B) incremento de MFI para FITC en células peritoneales CD19⁺ de ratones CD6-deficientes y WT respectivos, con relación al nivel basal. Los resultados se muestran como la media (± SEM) de los valores obtenidos por triplicado (↑): Diferencia significativa (t-Test, p< 0,05) entre: a) grupo CD5-deficiente y grupo WT respectivo, para una misma cantidad de la sonda PSEx-FITC (A); o b) el grupo CD6-deficiente y grupo WT respectivo, para una misma cantidad de la sonda PSEx-FITC (B). (*): Diferencia significativa (t-Test, p< 0,05) entre: a) el grupo CD5-deficiente o su WT respectivo con respecto a los niveles basales (0 µg PSEx-FITC); o b) el grupo CD6-deficiente o su WT respectivo con respecto a los niveles basales (0 µg PSEx-FITC).

En el caso de las células peritoneales F4/80⁺, los resultados obtenidos mostraron ser similares a los observados para las células CD19⁺ (Figuras 31A y 31B).

De manera interesante, los resultados obtenidos mostraron que la deficiencia en el receptor de membrana CD5 afectó significativamente la unión de PSEx-FITC sólo en macrófagos peritoneales (Figura 31A), ya que no se observaron grandes diferencias entre linfocitos B provenientes de ratones CD5-deficientes y sus WT respectivos (Figura 30A). Por su parte, la deficiencia en el receptor de membrana CD6 afectó significativamente la unión de PSEx-FITC tanto a macrófagos (Figura 31B) como a linfocitos B (Figura 30B).

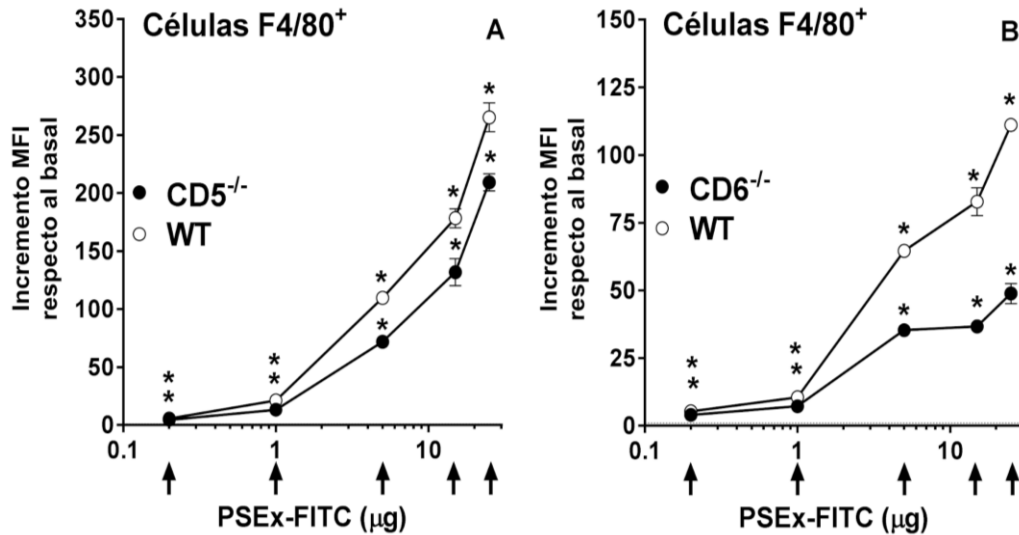


Figura 31. Análisis de la capacidad de interacción entre componentes de PSEx y células F4/80⁺ de cavidad peritoneal de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes. Células peritoneales de cuatro grupos de ratones ($n=4$ /grupo): i) CD5-deficientes; ii) WT respectivo; iii) CD6-deficientes; y iv) WT respectivo, fueron recuperadas e incubadas con cantidades crecientes (0,2; 1,0; 5,0; 15,0 y 25,0 µg) de PSEx-FITC. Luego, de incubarse con anti-F4/80-PE, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (A) incremento de MFI para FITC en células peritoneales F4/80⁺ de ratones CD5-deficientes y WT respectivos, con relación al nivel basal; (B) incremento de MFI para FITC en células peritoneales F4/80⁺ de ratones CD6-deficientes y WT respectivos, con relación al nivel basal. Los resultados se muestran como la media (\pm SEM) de los valores obtenidos por triplicado. (\uparrow): Diferencia significativa (t-Test, $p < 0,05$) entre: a) grupo CD5-deficiente y grupo WT respectivo, para una misma cantidad de la sonda PSEx-FITC (A); o b) el grupo CD6-deficiente y grupo WT respectivo, para una misma cantidad de la sonda PSEx-FITC (B). (*): Diferencia significativa (t-Test, $p < 0,05$) entre: a) el grupo CD5-deficiente o su WT respectivo con respecto a los niveles basales (0 µg PSEx-FITC); o b) el grupo CD6-deficiente o su WT respectivo con respecto a los niveles basales (0 µg PSEx-FITC).

7.4. Análisis de la respuesta inmune de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l.

Teniendo en cuenta que hemos mostrado la capacidad de PSEx de interactuar con células peritoneales CD19⁺ y F4/80⁺ provenientes de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes, nos planteamos evaluar la relevancia funcional de dicha interacción. Es decir, analizar la respuesta inmune de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con PSEx, en comparación con sus respectivos controles WT. Así, la estrategia utilizada consistió en inocular ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes, y sus WT correspondientes, con PSEx o con PBS estériles, para luego de 48h recuperar las células y exudados de cavidad peritoneal de todos los individuos y analizar diversos parámetros inmunológicos de la

respuesta local. Es decir, (i) los niveles de expresión de ARNm de varias citoquinas en células peritoneales; (ii) el fenotipo de los infiltrados celulares y (iii) el perfil de anticuerpos específicos y poli-reactivos en los exudados peritoneales.

7.4.1. Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx.

El nivel de expresión de ARNm para IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-17A en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx, fue determinado por RT-qPCR (Figura 32). En estos resultados, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD5-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron que en los ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx se observó una reducción significativa en el nivel de TNF- α comparado con lo observado en ratones CD5-deficientes inoculados con PBS (Figura 32C). De manera interesante, en los ratones WT no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm para TNF- α frente a la inoculación con PSEx (Figura 32C).

Por su parte, los resultados referidos a los niveles de IL-17A mostraron un aumento significativo en los ratones WT inoculados con PSEx comparado con lo observado en los ratones WT inoculados con PBS (Figura 32E). Por el contrario, en los ratones CD5-deficientes no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm para IL-17A en respuesta a la inoculación con PSEx (Figura 32E).

Por otro lado, para las citoquinas IFN- γ (Figura 32A), IL-6 (Figura 32B) e IL-12 (Figura 32D) no se observaron comportamientos destacables entre los grupos de ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT inoculados con PSEx.

En suma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD5 afecta el perfil de expresión de ARNm para TNF- α (Figura 32C) e IL-17A (Figura 32E) en las células peritoneales en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-administración.

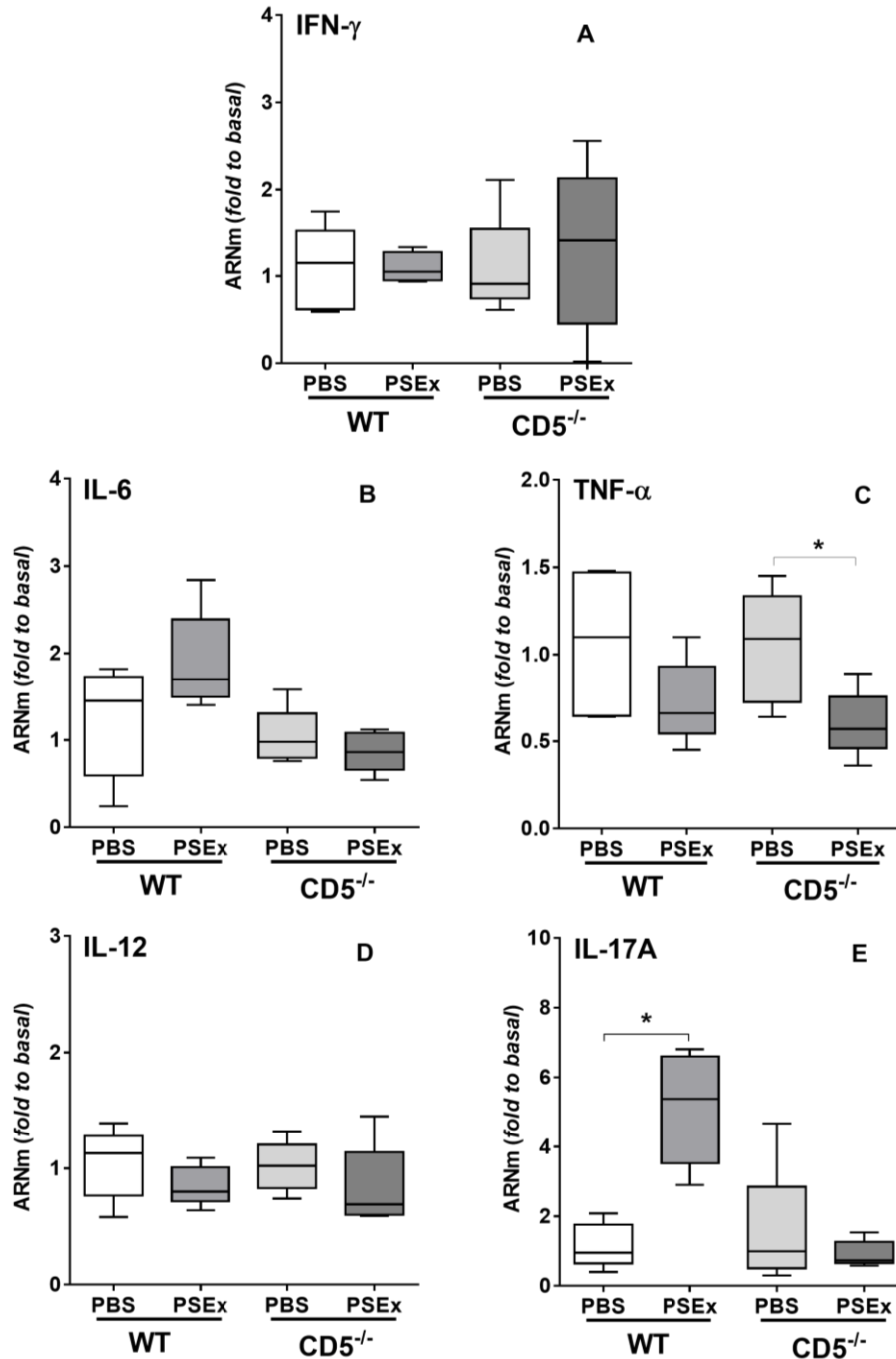


Figura 32. Niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células peritoneales fueron recuperadas de cada individuo y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IFN- γ ; (B) IL-6; (C) TNF- α ; (D) IL12; y (E) IL-17A por RT-qPCR. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.2. Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx.

El nivel de expresión de ARNm para las citoquinas IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx, fue determinado por RT-qPCR (Figura 33). Nuevamente, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD5-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en el nivel de ARNm para IL-10 en los ratones WT inoculados con PSEx en comparación con lo observado en los ratones WT inoculados con PBS (Figura 33A). Contrariamente, no se observaron diferencias significativas en los niveles de transcritos para IL-10 en las células peritoneales de los ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx respecto a aquellos inoculados con PBS (Figura 33A).

Por su parte, para las citoquinas IL-4 (Figura 33B), IL-5 (Figura 33C) e IL-13 (Figura 33D) no se observaron variaciones significativas entre los grupos de ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT inoculados con PSEx.

En suma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD5 afecta en las células peritoneales el perfil de ARNm para IL-10 en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-administración.

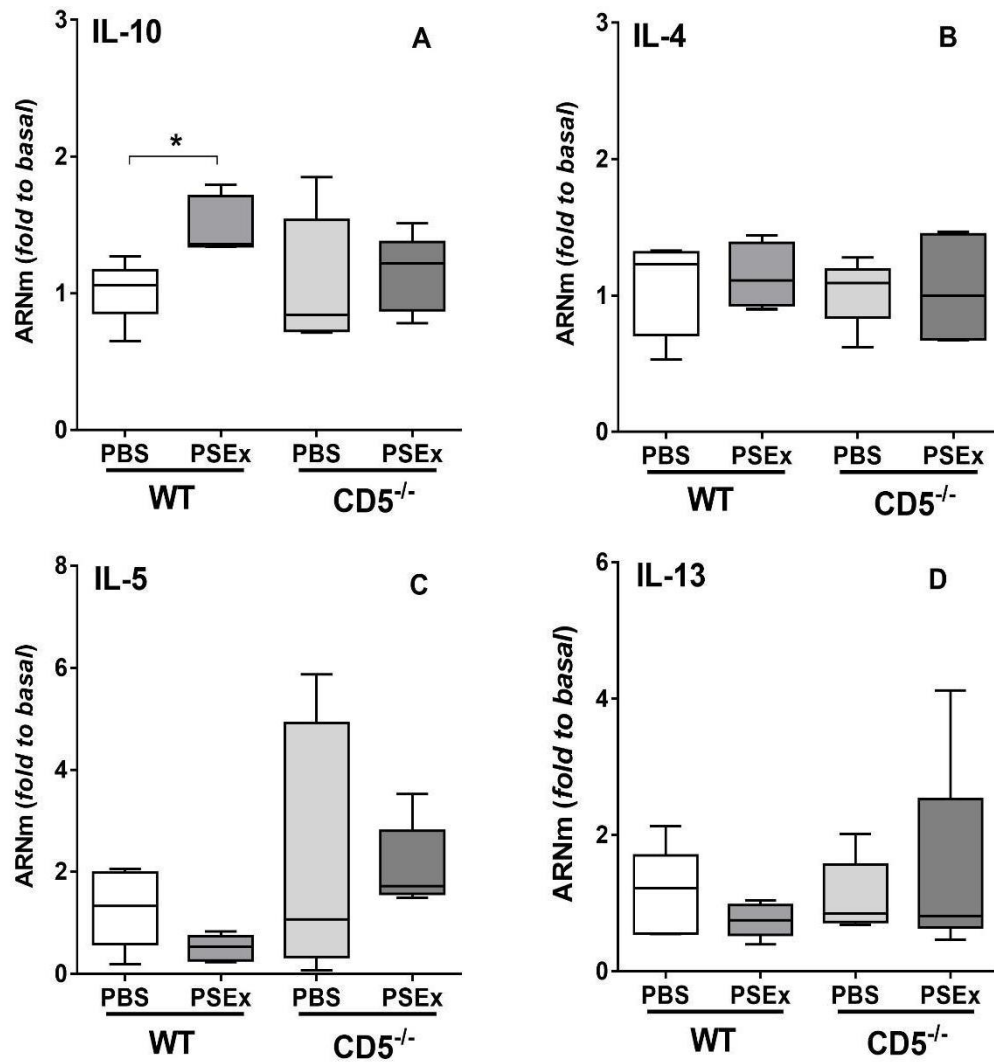


Figura 33. Niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células peritoneales fueron recuperadas de cada individuo y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IL-10; (B) IL-4; (C) IL-5; y (D) IL-13; por RT-qPCR. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.3. Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx.

Por otra parte, también se determinó por RT-qPCR, el nivel de expresión de ARNm para IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-17A en células peritoneales de un grupo de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx (Figura 34). En línea con análisis realizados con animales CD5-deficientes, se evaluaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD6-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación con PSEx no indujo diferencias significativas en los niveles de IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 o IL-17A entre los diferentes grupos experimentales (Figura 34). De esta forma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD6 no afecta en las células peritoneales el perfil de expresión de ARNm para las citoquinas de tipo Th1/Th17 analizadas, al menos 48 h post-inoculación de PSEx.

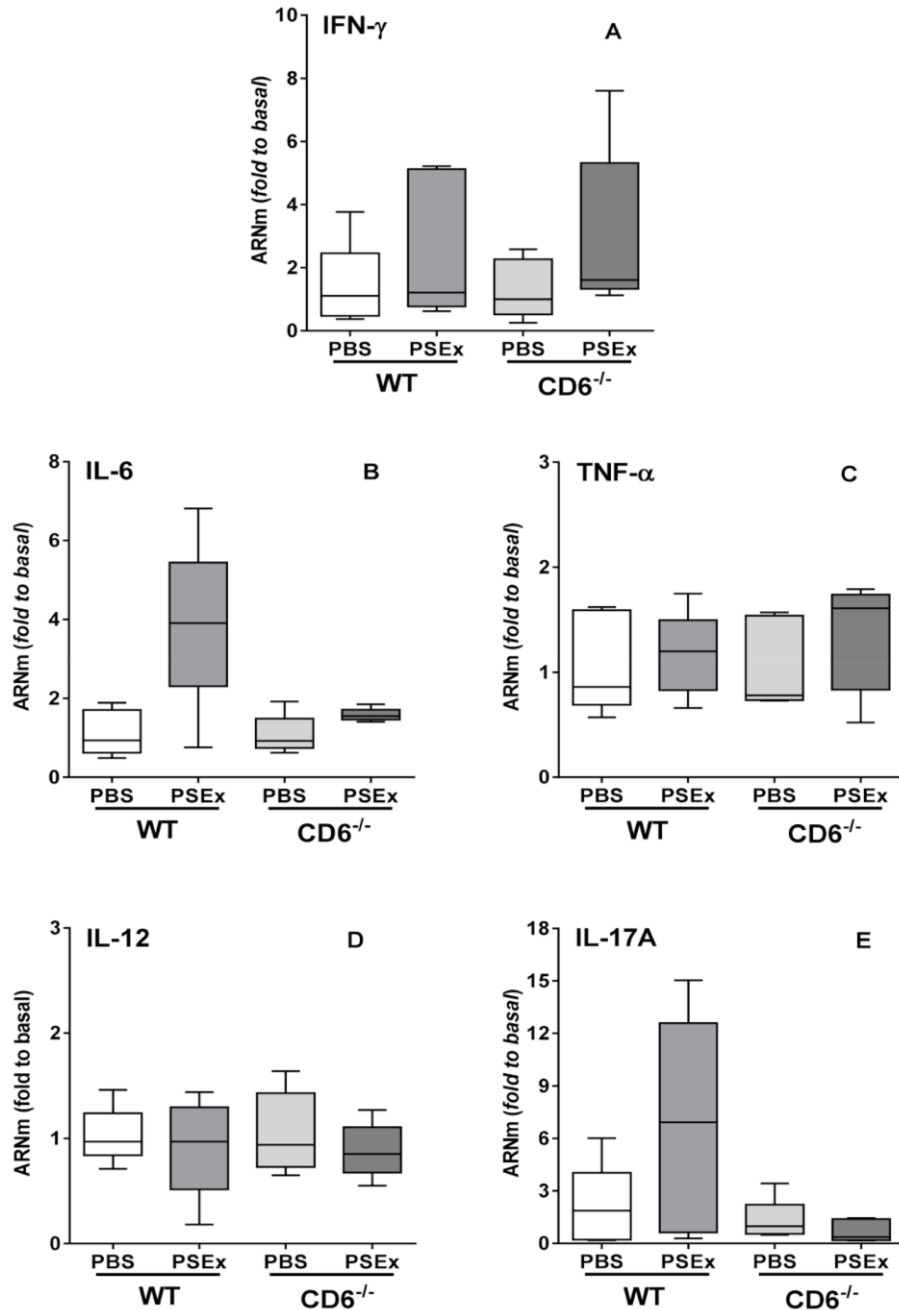


Figura 34. Niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th1/Th17 en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células peritoneales fueron recuperadas de cada individuo y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IFN- γ ; (B) IL-6; (C) TNF- α ; (D) IL12 y (E) IL-17A por RT-qPCR. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.4. Análisis de los niveles de expresión de citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx.

En paralelo, también fue determinado por RT-qPCR, el nivel de expresión de ARNm para IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx (Figura 35). De igual manera a lo realizado en los anteriores ítems, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD6-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación con PSEx no indujo diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm para IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 entre los diferentes grupos experimentales (Figura 35). De esta forma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD6 no afecta en las células peritoneales el perfil de ARNm para las citoquinas de tipo Th2/Treg analizadas, al menos 48 h post-inoculación de PSEx.

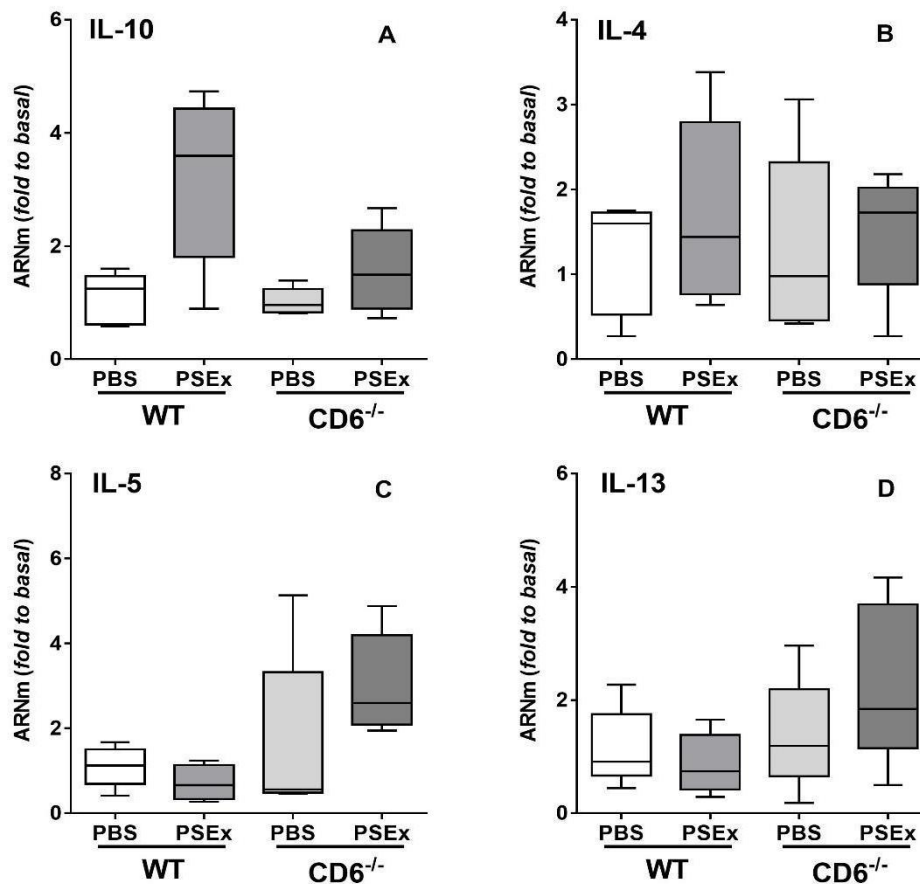


Figura 35. Niveles de expresión de ARNm para citoquinas tipo Th2/Treg en células peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT ($n= 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células peritoneales fueron recuperadas de cada individuo y en las mismas fue determinado el nivel de expresión de ARNm para (A) IL-10; (B) IL-4; (C) IL-5 y (D) IL-13; por RT-qPCR. Los resultados son reportados como “fold change” respecto al grupo control y se muestran en formato “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.5. Análisis del fenotipo de las células peritoneales CD19⁺ en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx.

Los porcentajes de células B totales (CD19⁺), y el porcentaje de las sub-poblaciones B1 (CD19⁺CD11b⁺) y B2 (CD19⁺CD11b⁻) peritoneales en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx, así como los niveles de expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86 sobre estas células, fueron determinados por citometría de flujo (Figura 36). La estrategia de *gating* se muestran en el anexo 1. Al igual que en los anteriores ítems, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD5-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación con PSEx en ratones WT indujo una reducción significativa en el porcentaje de células CD19⁺ comparado con lo observado en el grupo de ratones WT inoculados con PBS (Figura 36B). De manera interesante, en los ratones CD5-deficientes no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células CD19⁺ (Figura 36B). Además, resulta interesante que los resultados mostraron un comportamiento similar en el porcentaje de células B2 (CD19⁺CD11b⁻) en ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT inoculados con PSEx (Figura 36D).

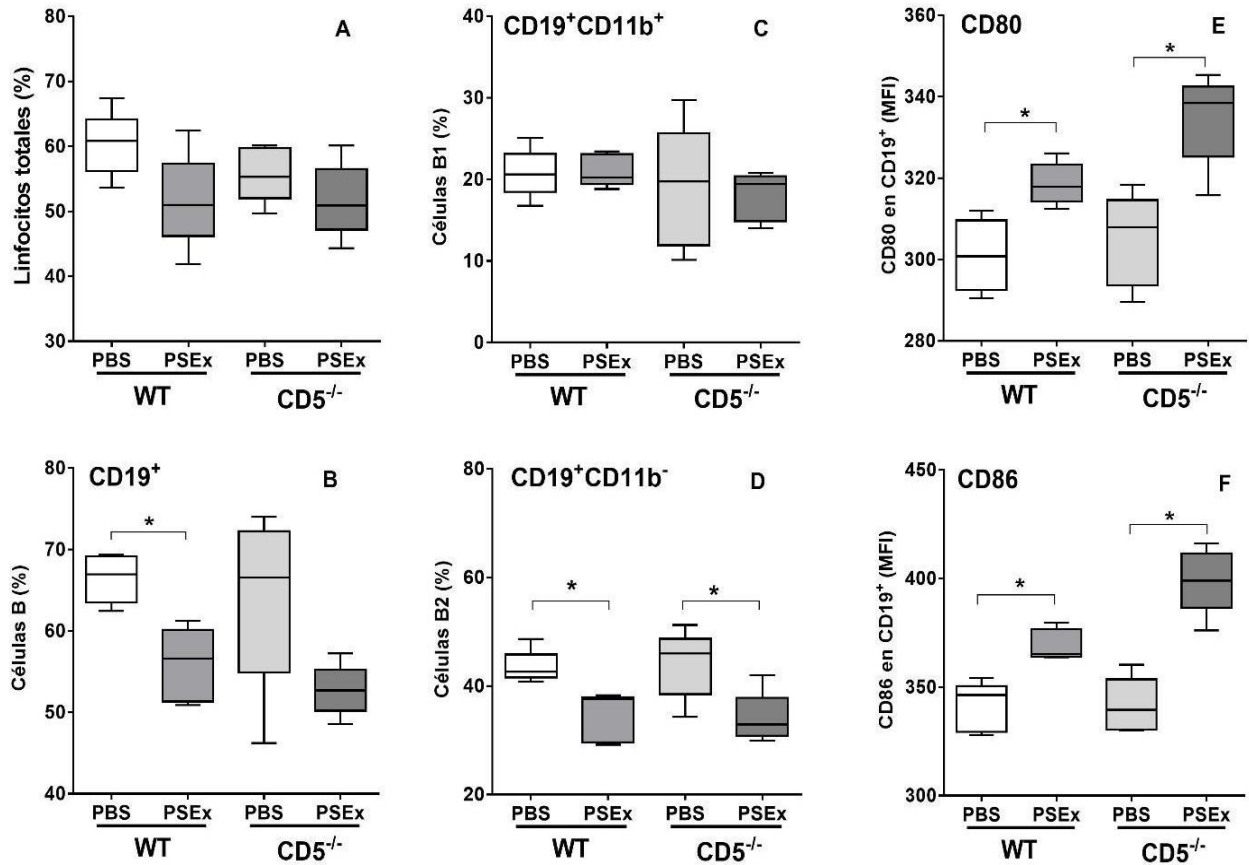


Figura 36. Fenotipo y expresión de marcadores de activación por células B peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT (n= 5/grupo), fueron inoculados con: (i) 50 µg/ratón de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en estas, mediante citometría de flujo, fue determinado: (A) células linfoides (%); (B) células CD19⁺ (%); (C) células CD19⁺CD11b⁺ (%); (D) células CD19⁺CD11b⁻ (%); (E) MFI CD80 en CD19⁺; y (F) MFI CD86 en CD19⁺. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; p < 0,05) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT.

Por otra parte, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la expresión de los marcadores de activación CD80 (Figura 36E) y CD86 (Figura 36F) sobre las células peritoneales CD19⁺ provenientes de ratones inoculados con PSEx, respecto a los inoculados con PBS, tanto en CD5-deficientes como sus en respectivos WT.

Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en los porcentajes de células CD19⁺CD11b⁺, en ninguno de los grupos experimentales (Figura 36C).

En suma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD5 afecta el porcentaje de células peritoneales CD19⁺ en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-administración (Figura 36B).

7.4.6. Análisis del fenotipo de las células peritoneales CD19⁺ en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx.

Los porcentajes de células B totales (CD19⁺), y el porcentaje de las sub-poblaciones B1 (CD19⁺CD11b⁺) y B2 (CD19⁺CD11b⁻) peritoneales de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx, así como los niveles de expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86 sobre estas células, fueron determinados por citometría de flujo (Figura 37). La estrategia de *gating* se muestran en el anexo 1. Al igual que en los anteriores ítems, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD6-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de los porcentajes de células peritoneales CD19⁺ (células B, Figura 37B), CD19⁺CD11b⁺ (células B1, Figura 37C) y CD19⁺CD11b⁻ (células B2, Figura 37D) en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx en comparación con lo observado en los ratones CD6-deficientes inoculados con PBS. De manera interesante, en los ratones WT no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de ninguna de estas 3 poblaciones linfoides peritoneales 48 h post-inoculación con PSEx (Figuras 37B, 37C y 37D).

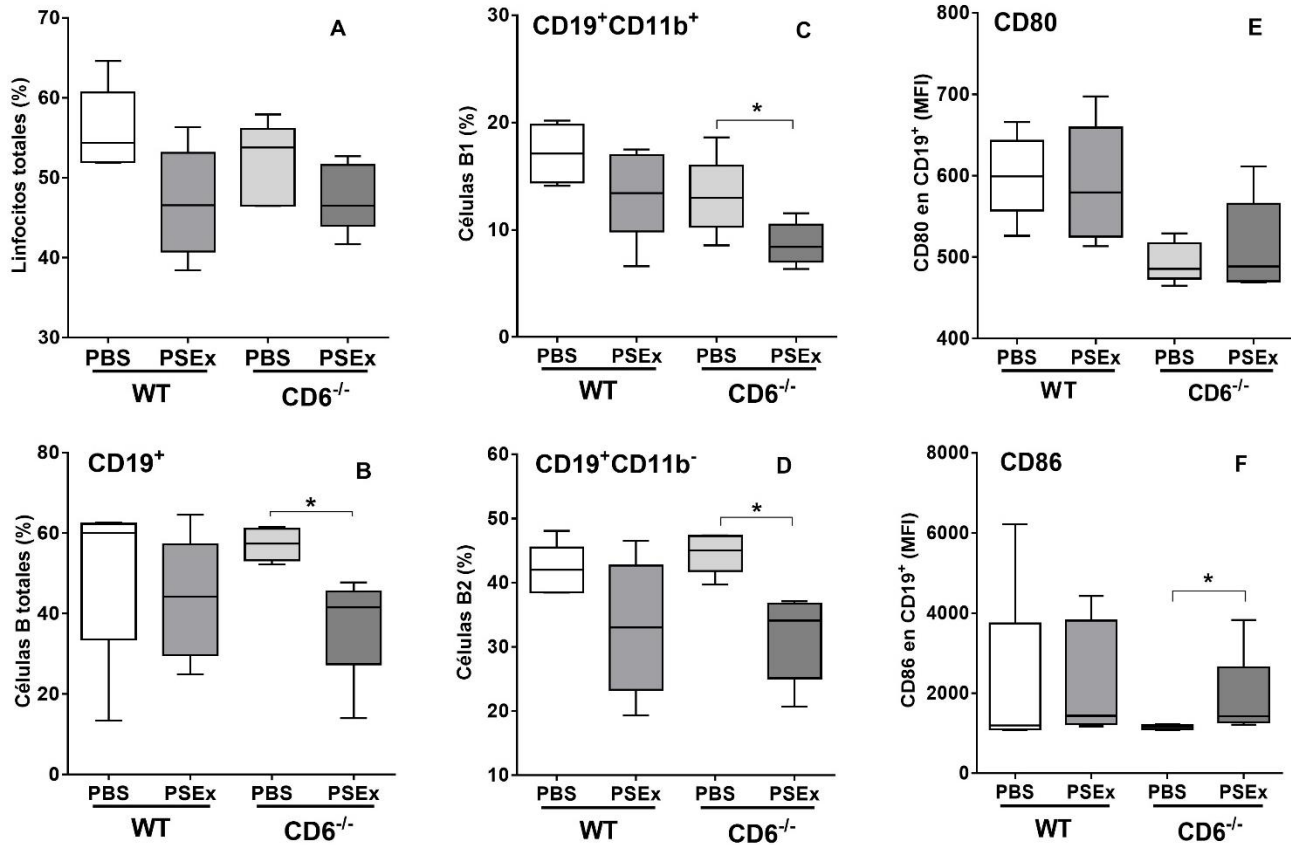


Figura 37. Fenotipo y expresión de marcadores de activación en células $CD19^+$ peritoneales de ratones $CD6$ -deficientes inoculados con PSEx. Ratones $CD6$ -deficientes y sus respectivos WT ($n = 5$ /grupo), fueron inoculados con: (i) $50 \mu\text{g}$ /ratón de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en estas, mediante citometría de flujo, fue determinado: (A) células linfoides (%); (B) células $CD19^+$ (%); (C) células $CD19^+CD11b^+$ (%); (D) células $CD19^+CD11b^-$ (%); (E) MFI $CD80$ en $CD19^+$; y (F) MFI $CD86$ en $CD19^+$. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones $CD6$ -deficientes y sus respectivos WT.

Por su parte, en los ratones $CD6$ -deficientes inoculados con PSEx se observó un aumento significativo en la expresión del marcador de activación $CD86$ sobre las células $CD19^+$, comparado con lo observado en los ratones $CD6$ -deficientes inoculados con PBS (Figura 37F). Sin embargo, no se detectaron cambios relevantes en los niveles de expresión del marcador $CD80$ sobre dichas células, en ninguno de los grupos experimentales (Figura 37E).

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de $CD6$ afecta el porcentaje de células $CD19^+$ (Figura 37B), $CD19^+CD11b^+$ (Figura 37C) y $CD19^+CD11b^-$ (Figura 37D),

así como el nivel de expresión del marcador de activación CD86 sobre las células CD19⁺ (Figura 37F) en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-inoculación.

7.4.7. Análisis del fenotipo de las células peritoneales F4/80⁺ en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx.

Los porcentajes de células peritoneales F4/80⁺ (monocitos/macrófagos), y el porcentaje de las subpoblaciones F4/80^{high} y F4/80^{low} en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx, así como los niveles de expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86 sobre estas células, fueron determinados por citometría de flujo (Figura 38). La estrategia de *gating* se muestran en el anexo 3. Análogamente a los anteriores ítems, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD5-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

En cuanto a los porcentajes de células F4/80⁺ (Figura 38B), F4/80^{low} (Figura 38D), y los niveles de expresión de CD86 sobre las mismas (Figura 38F) en ratones WT, los resultados mostraron que estos fueron significativamente mayores en el grupo inoculado con PSEx en comparación a lo observado en el grupo inoculado con PBS. Por el contrario, el porcentaje de células F4/80^{high} en los ratones WT mostró ser significativamente menor en el grupo inoculados con PSEx comparado con lo observado en el grupo inoculado con PBS (Figura 38C). De manera interesante, en los ratones CD5-deficientes no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros mencionados anteriormente (Figuras 38B, 38C, 38D y 38F).

Por su parte, la expresión del marcador CD80 sobre las células F4/80⁺ mostró un incremento significativo tras la inoculación con PSEx tanto en ratones WT como CD5-deficientes comparado con el grupo inoculado con PBS (Figura 38E).

Finalmente, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD5 afecta los porcentajes de células F4/80⁺ (Figuras 38B), F4/80^{high} (Figura 38C), F4/80^{low} (Figura 38D), así como los niveles de expresión de CD86 sobre dichas células (Figura 38F) en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-administración.

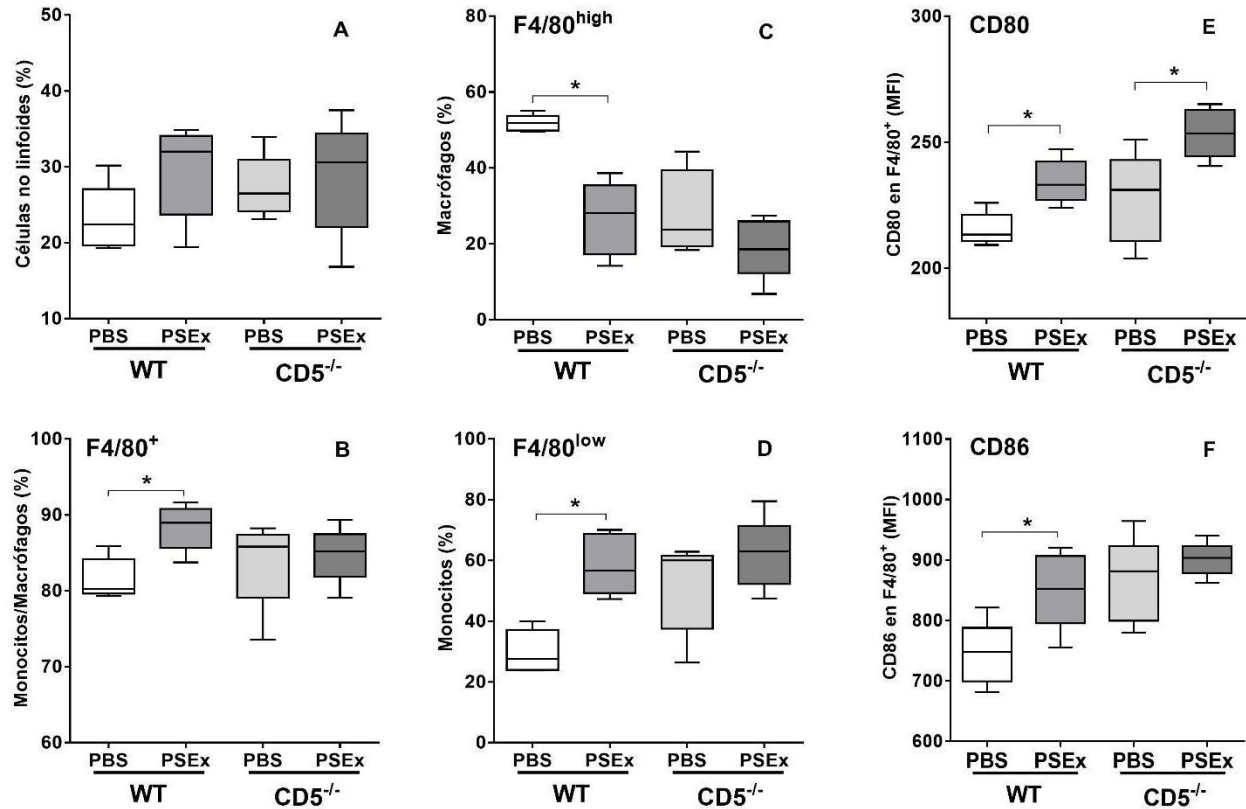


Figura 38. Fenotipo y expresión de marcadores de activación en células F4/80⁺ peritoneales de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT (n= 5/grupo), fueron inoculados con: (i) 50 µg/ratón de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en estas, mediante citometría de flujo, fue determinado: (A) células linfoides (%); (B) células F4/80⁺ (%); (C) células F4/80^{high} (%); (D) células F4/80^{low} (%); (E) MFI CD80 en F4/80⁺; y (F) MFI CD86 en F4/80⁺. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; p < 0,05) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.8. Análisis del fenotipo de las células peritoneales F4/80⁺ en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx.

El fenotipo y expresión de marcadores de activación en células peritoneales F4/80⁺ de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx, fue determinado por citometría de flujo (Figura 39). La estrategia de *gating* se muestran en el anexo 3. De manera análoga, se analizaron las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD6-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

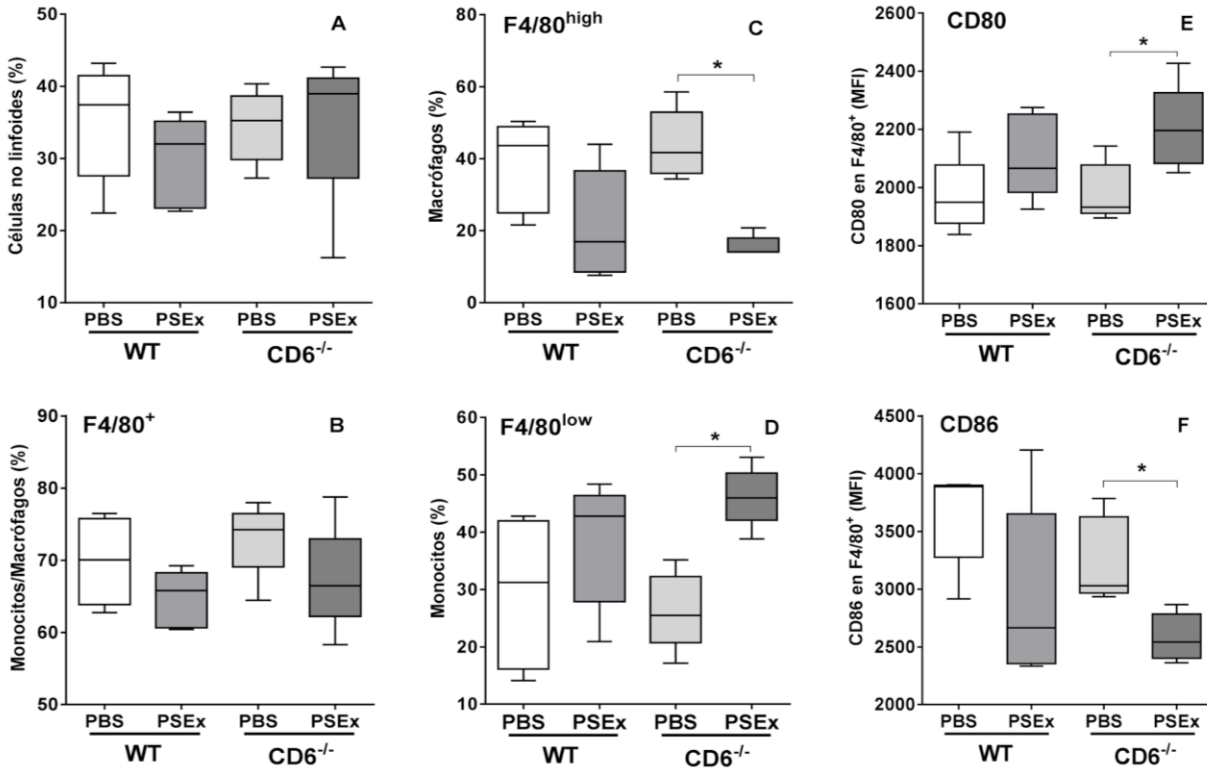


Figura 39. Fenotipo y expresión de marcadores de activación en células $F4/80^+$ peritoneales de ratones $CD6^-$ deficientes inoculados con PSEx. Ratones $CD6^-$ deficientes y sus respectivos WT ($n= 5$ /grupo), fueron inoculados con: (i) $50 \mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, las células de la cavidad peritoneal de cada individuo fueron recuperadas y en estas, mediante citometría de flujo, fue determinado: (A) células linfoides (%); (B) células $F4/80^+$ (%); (C) células $F4/80^{\text{high}}$ (%); (D) células $F4/80^{\text{low}}$ (%); (E) MFI CD80 en $F4/80^+$; y (F) MFI CD86 en $F4/80^+$. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones $CD6^-$ deficientes y sus respectivos WT.

En los resultados obtenidos se observó que en los ratones $CD6^-$ deficientes inoculados con PSEx el porcentaje de células $F4/80^{\text{high}}$ (Figura 39C) y el nivel de expresión de CD86 (Figura 39F) disminuyeron respecto a lo observado en ratones $CD6^-$ deficientes inoculados con PBS. Por el contrario, en los ratones $CD6^-$ deficientes inoculados con PSEx se observó que el porcentaje de células $F4/80^{\text{low}}$ (Figura 39D), así como el nivel de expresión de CD80 (Figura 39E) aumentaron respecto a lo observado en ratones $CD6^-$ deficientes inoculados con PBS. De manera interesante, en los ratones WT inoculados con PSEx no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros anteriores respecto a los ratones WT inoculados con PSEx (Figuras 39C, 39D, 39E, 39F).

Por otro lado, el análisis del porcentaje de células peritoneales $F4/80^+$ no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados (Figura 39B).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD6 afecta los porcentajes de células F4/80^{high} (Figura 39C) y F4/80^{low} (Figura 39D), así como los niveles de expresión de CD80 (Figura 39E) y CD86 (Figura 39F) en respuesta a la inoculación con PSEx, al menos 48 h post-administración.

7.4.9. Análisis de la respuesta peritoneal de anticuerpos específicos y poli-reactivos en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx.

La determinación de los títulos de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG, anti-DNP (poli-reactivos) y anti-PSEx (específicos) en exudados de cavidad peritoneal de ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx, fueron determinados mediante ELISA. El perfil de la respuesta de anticuerpos fue analizado en términos de polarización hacia respuestas poli-reactivas o hacia respuestas específicas. Por esta razón, en la Figura 40 se muestran los cocientes entre el título de anticuerpos anti-DNP y el título de anticuerpos anti-PSEx (anti-DNP/anti-PSEx). Al igual que en los anteriores ítems, centramos el análisis en las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD5-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas sólo en el caso de los anticuerpos IgG2b (Figura 40E). En efecto, el cociente entre los títulos de anticuerpos anti-DNP y anti-PSEx, mostró ser significativamente mayor en los ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx respecto a lo observado en ratones CD5-deficientes inoculados con PBS (Figura 40E). De manera interesante, en los ratones WT inoculados con PSEx no se observaron diferencias significativas en el cociente entre los títulos de anticuerpos anti-DNP y anti-PSEx respecto al grupo inoculado con PBS (Figura 40E).

En suma, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD5 afecta el perfil de la respuesta temprana de anticuerpos IgG2b tras la inoculación con PSEx, polarizándola hacia un perfil predominantemente poli-reactivo (Figura 40E).

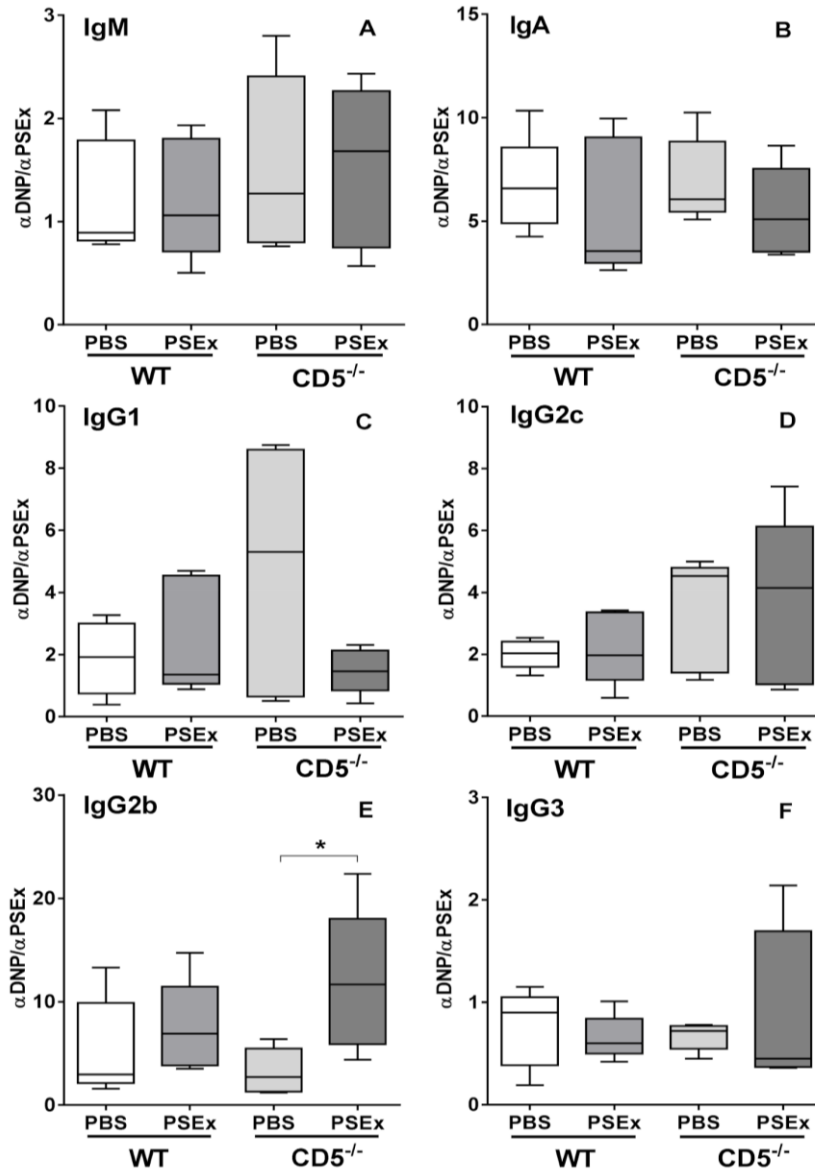


Figura 40. Respuesta de anticuerpos específicos o poli-reactivos en ratones CD5-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT ($n = 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, los exudados peritoneales fueron recuperados de cada individuo y el título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG de específicos (anti-PSEx) y el título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG poli-reactivos (anti-DNP), fueron determinados por ELISA. La figura muestra los valores correspondientes al cociente entre el título anti-DNP y el título anti-PSEx para (A) IgM, (B) IgA, (C) IgG1, (D) IgG2c, (E) IgG2b y (F) IgG3. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD5-deficientes y sus respectivos WT.

7.4.10. Análisis de la respuesta peritoneal de anticuerpos específicos y poli-reactivos en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx.

Al igual que se realizó para ratones CD5-deficientes en el ítem anterior, se determinaron los títulos de anticuerpos IgM, IgA, y sub-clases de IgG anti-DNP (poli-reactivos) y anti-PSEx (específicos) en exudados de cavidad peritoneal de ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx. También en forma análoga, el perfil de la respuesta de anticuerpos fue analizado en términos de polarización hacia respuestas poli-reactivas o hacia respuestas específicas. Por ello, en la Figura 41 se muestran los cocientes entre ambos títulos de anticuerpos (anti-DNP/anti-PSEx). Nuevamente, centramos el análisis en las diferencias existentes en el comportamiento frente a la inoculación con PSEx entre los grupos CD6-deficientes y sus grupos WT, cada uno de ellos respecto a sus controles inoculados con PBS.

En este caso, los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas sólo en el caso de los anticuerpos IgG2c (Figura 41D). En efecto, el cociente entre los títulos de anticuerpos anti-DNP y anti-PSEx, mostró ser significativamente menor en los ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx respecto a lo observado en ratones CD6-deficientes inoculados con PBS (Figura 41D). De manera interesante, en los ratones WT inoculados con PSEx no se observaron diferencias significativas en el cociente anti-DNP/anti-PSEx respecto al grupo inoculado con PBS (Figura 41D). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de CD6 afecta el perfil de la respuesta temprana de anticuerpos IgG2c tras la inoculación con PSEx, polarizándola hacia un perfil específico (Figura 41D).

En suma, los principales resultados que se desprenden de este capítulo con relación a la interacción física entre antígenos tegumentarios (PSEx) y células peritoneales murinas, destacan a las células B y monocitos/macrófagos por su unión específica y dosis-dependiente a alguno(s) de los ligandos parasitarios de rshCD5 y rshCD6. Por otro lado, resaltamos que la deficiencia del receptor CD6 expresado en membrana (pero no de CD5) afectó la interacción de PSEx con células B, mientras que tanto la ausencia de expresión de CD5 como de CD6 en membrana alteró dicha interacción sobre monocitos/macrófagos. En paralelo, y desde un punto de vista funcional, la ausencia de expresión de CD5 afectó a nivel peritoneal tanto el perfil de expresión de TNF- α , IL-17A e IL-10, así como la polarización de la respuesta de anticuerpos IgG2b frente a la inoculación con PSEx. Además, la proporción de sub-poblaciones de monocitos/macrófagos peritoneales, y sus niveles de activación, también se vio afectada tras la inoculación con PSEx en ausencia de expresión de CD5. Por su parte, la ausencia de expresión de CD6 afectó a nivel peritoneal tanto el perfil de la respuesta de anticuerpos IgG2c, así como la proporción de

sub-poblaciones de células B y monocitos/macrófagos, y sus niveles de activación, en respuesta a la inoculación con PSEx.

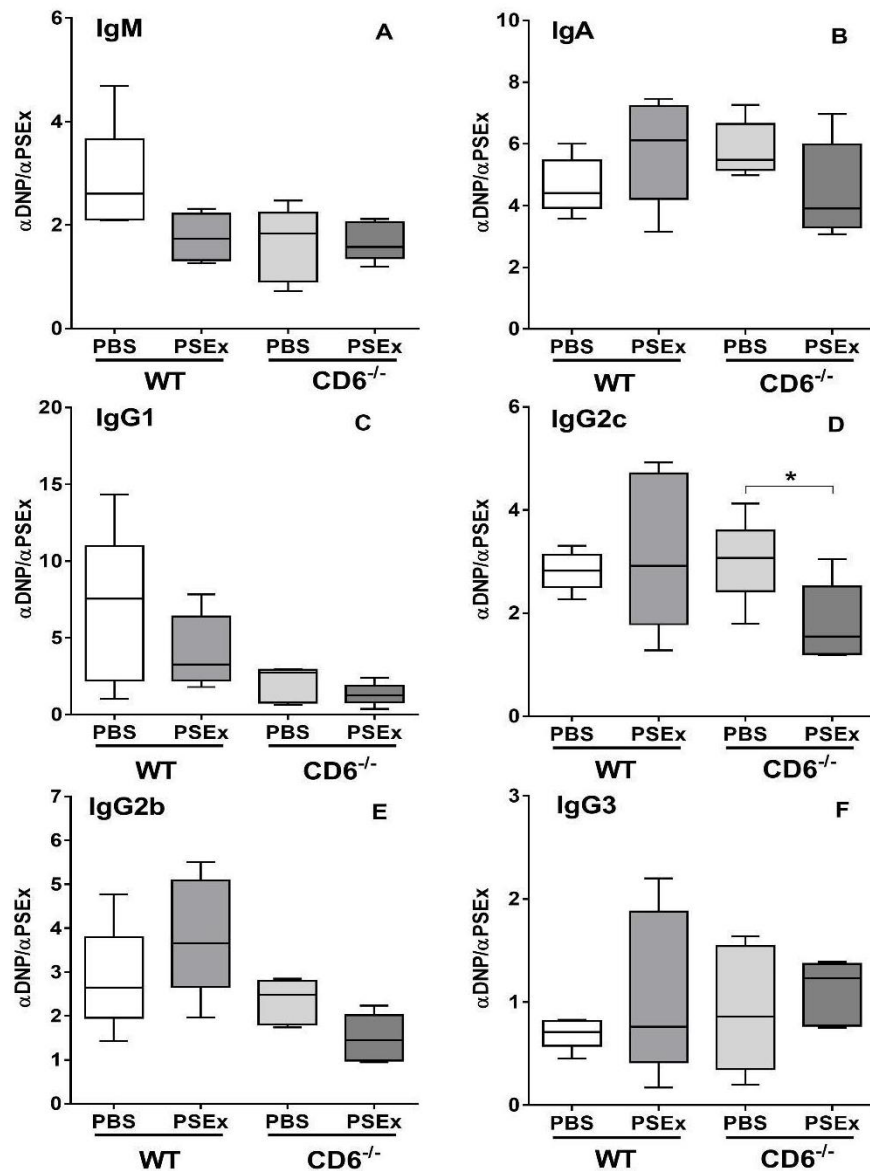


Figura 41. Respuesta de anticuerpos específicos o poli-reactivos en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx. Ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT ($n = 5/\text{grupo}$), fueron inoculados con: (i) 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de PSEx en PBS, o (ii) PBS estéril. A las 48 h post-inoculación, los exudados peritoneales fueron recuperados de cada individuo y el título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG específicos (anti-PSEx) y el título de anticuerpos IgM, IgA y subclases de IgG poli-reactivos (anti-DNP), fueron determinados por ELISA. La figura muestra los valores correspondientes al cociente entre el título anti-DNP y el título anti-PSEx para (A) IgM, (B) IgA, (C) IgG1, (D) IgG2c, (E) IgG2b y (F) IgG3. Los resultados se muestran en formato de “Caja y bigotes” (del inglés, Box and whiskers). (*): Diferencia significativa (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) entre grupos inoculados con PSEx y grupos control (PBS) para ratones CD6-deficientes y sus respectivos WT.

CAPÍTULO 4

8. DISCUSIÓN

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo mostraron que los ectodominios tanto de CD5 como de CD6, son capaces de unirse a PSC viables e íntegros, así como a componentes presentes en PSEx, de forma específica y dosis-dependiente; y que, además, ese reconocimiento es capaz de modular la producción de citoquinas *in vitro*. A su vez, se observó que la administración de las formas recombinantes de dichos receptores (rshCD5 y rshCD6) posee un interesante potencial profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. La relevancia de dichos resultados radica en que, por un lado, son pocos los receptores innatos, descritos hasta el momento, capaces de reconocer antígenos de parásitos helmintos [Paveley *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Tundup *et al.*, 2015; Ponichtera & Stadecker, 2015; Aldridge & O’Neill, 2016]; y por otro lado, los receptores CD5 y CD6 se expresan en linfocitos B1a, células que serían clave en el desarrollo de infecciones por helmintos al producir anticuerpos naturales poli-reactivos y actuar como células B con funciones reguladoras (Breg productoras de IL-10) [Fainboim & Geffner, 2011; Sun *et al.*, 2005; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; García-Luna *et al.*, 2021]. Dichas células se localizan preferentemente en cavidades serosas como la cavidad peritoneal [Fainboim & Geffner, 2011], detalle que es relevante ya que en el modelo de EQ secundaria, los PSC se inoculan por vía intraperitoneal en ratones inmunocompetentes [Heath, 1970]. Cabe destacar, además, que la expresión de estos receptores no está restringida solamente a las células B1a, sino que también son expresados en linfocitos T [Kamoun *et al.*, 1981; Martínez *et al.*, 2011], otra población peritoneal importante en dicho modelo de infección [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b; Baz *et al.*, 2006]. Todo ello nos sugiere que CD5 y/o CD6 cumplirían un papel relevante en el desarrollo de la EQ secundaria murina.

Como uno de los objetivos principales de la presente tesis, evaluamos posibles mecanismos involucrados en los fenómenos de protección reportados tras inoculación de las moléculas rshCD5 y rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria. En este sentido, se plantearon diferentes escenarios: (1) los receptores recombinantes podrían ejercer directamente alguna acción sobre el parásito; (2) los receptores podrían inducir una eventual acción inmuno-estimulante o inmuno-supresora sobre algún mecanismo efector de la respuesta del hospedero durante la infección; (3) los receptores solubles podrían

modular algún mecanismo de la respuesta inmune específica mediante el bloqueo de antígenos parasitarios; y/o (4) los receptores participan en más de uno de estos mecanismos a la vez.

En este sentido, se evaluó en primer lugar, la actividad antiparasitaria intrínseca de los receptores solubles mediante cultivos *in vitro* de PSC, enfrentados a distintas concentraciones de las moléculas rshCD5 o rshCD6. Los resultados mostraron que ambos receptores afectaron la viabilidad de los PSC, tanto en condiciones metabólicamente estresantes como no estresantes (Figura 6); por lo que, se podría sugerir que, al menos *in vitro*, las moléculas rshCD5 y rshCD6 tienen la capacidad intrínseca de inducir la muerte de un porcentaje significativo de PSC. Este hecho podría estar relacionado, por ejemplo, con una modulación metabólica o un efecto tóxico directo. Así, podría sugerirse, por ejemplo, que la interacción directa de rshCD5 y/o rshCD6 con PSC podría alterar su motilidad, su normal asimilación de nutrientes y/o sus mecanismos de detoxificación, de manera que la alteración de estas funciones reduciría significativamente la viabilidad de los PSC.

Esta sugerencia podría apoyarse en los resultados obtenidos de los análisis de interactomas para rshCD5 y/o rshCD6 con componentes presentes en PSEx recientemente reportados por nuestro grupo [Miles *et al.*, 2020b]. Si bien las primeras sugerencias de posibles ligandos parasitarios para rshCD5 y rshCD6 fueron reportados por nuestro grupo en 2018 [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018], más recientemente, Miles y cols. (2020) realizaron un estudio más profundo sobre este tema. En dicho trabajo, identificaron 20 ligandos parasitarios distintos: 8 compartidos por ambos receptores, 9 sólo para rshCD5 y 3 sólo para rshCD6 [Miles *et al.*, 2020b]. Entre los ligandos identificados se incluyen varias proteínas que cumplen funciones relevantes para el correcto desarrollo del parásito, y de manera interesante, algunas de ellas han sido reportadas previamente como potenciales moléculas protectoras contra *E. granulosus* s.l. u otros parásitos helmintos. Además, algunos de los ligandos fueron previamente sugeridos como candidatos vacunales y/o como dianas farmacológicas. Entre ellas se encuentran las proteínas 14-3-3, una familia de proteínas altamente conservada en eucariotas que participan en distintos eventos celulares básicos; como ser proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Estas han sido probadas con éxito como candidatos vacunales en diferentes ensayos preclínicos tanto contra *E. granulosus* s.l. como contra *E. multilocularis* [Siles-Lucas *et al.*, 2008]. También se identificaron las proteínas tegumentarias TegPs, las cuales suelen recubrir la superficie de muchos gusanos, y están generalmente involucradas en los procesos de absorción de iones, así como en mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero. En particular, se ha sugerido que las TegPs poseen funciones inmuno-moduladoras y/o inmunosupresoras

tanto en infecciones por *E. granulosus* s.l. [Ortona *et al.*, 2005] como por *E. multilocularis* [Zheng *et al.*, 2018]. Otro de los ligandos relevantes identificados por Miles y cols. (2020) fue la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, una enzima clave en el metabolismo de la glucosa, que ha sido reportada como una posible diana quimioterapéutica contra *E. granulosus* s.l. [Xiao *et al.*, 1994]. También las enzimas glucolíticas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fructosa-bifosfato aldolasa se encontraron dentro de los ligandos parasitarios para rshCD5 y/o rshCD6 [Miles *et al.*, 2020b]. De manera interesante, mientras la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ha mostrado ser capaz de inducir protección contra *E. multilocularis* en ratones inmunizados [Müller-Schollenberger *et al.*, 2001], la fructosa-bifosfato aldolasa, se ha reportado como un prometedor candidato vacunal contra la infección por *Onchocerca volvulus* [McCarthy *et al.*, 2002], *Schistosoma mansoni* [Saber *et al.*, 2013] y *Trichinella spiralis* [Yang *et al.*, 2019]. A su vez, a esta última enzima se le han asignado funciones no-glucolíticas en *E. granulosus* s.l. relacionadas con su unión a filamentos de actina F [Lorenzatto *et al.*, 2012]. En este sentido, el citoesqueleto de los helmintos parásitos posee una gran plasticidad que le confiere ventajas a la hora de ingresar, asentarse y desarrollarse dentro de sus hospederos. Por esto, los elementos que lo componen resultan ser interesantes dianas terapéuticas frente a diversas infecciones por parásitos helmintos [Kemp *et al.*, 1980; Skelly *et al.*, 1994]. Por último, también se identificó a la enzima glutatión-S-transferasa como ligando parasitario de rshCD5 y/o rshCD6; lo cual es relevante ya que se ha reportado que dicha enzima es capaz de inducir protección contra *E. granulosus* s.l. en ratones inmunizados con la misma [Zhu *et al.*, 2015]. Finalmente, y teniendo en cuenta las características de estos ligandos parasitarios, las propiedades antiparasitarias intrínsecas observadas para rshCD5 y/o rshCD6, podrían interpretarse como una consecuencia derivada del bloqueo de la funcionalidad de dichos ligandos por parte de estos receptores.

Por otro lado, y como se mencionó previamente, la cavidad peritoneal es el sitio anatómico donde se establece la EQ secundaria en el modelo murino de infección, y la misma es rica tanto en células B1a (que co-expresan los receptores CD5 y CD6) como en macrófagos. Estas poblaciones celulares peritoneales se caracterizan por presentar múltiples receptores con capacidad de reconocer estructuras de tipo PAMP [Fainboim & Geffner, 2011], algunos de los cuales interaccionan con componentes de parásitos helmintos. A saber; TLR4, TLR3 y TLR2 [Thomas *et al.*, 2003; Dissanayake *et al.*, 2004; Aksoy *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2011; Tundup *et al.*, 2015] y receptores *scavenger* de clase E, incluyendo Dectina-2 [Ritter *et al.*, 2010], el receptor de manosa CD206 [Paveley *et al.*, 2011; Kooij *et al.*, 2015; Aldridge & O’Neill, 2016], CLEC4F/CLECSF13 [Hsu *et al.*, 2013] y DC-SIGN/CD209a [Ponichtera & Stadecker, 2015]. Por este

motivo, en esta tesis analizamos la capacidad de los receptores CD5 y CD6, expresados en la membrana celular de poblaciones peritoneales, para reconocer antígenos de tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. (PSEx).

En esta línea, se analizó la interacción entre componentes presentes en la fracción PSEx y diferentes tipos celulares de la cavidad peritoneal de ratones normales, identificándose a las células CD19⁺ y a las células F4/80⁺ como aquellas con mayor capacidad de interacción, siendo esta específica y dosis-dependiente (Figuras 21 y 22). Es de interés destacar que, tanto las células peritoneales CD19⁺ (linfocitos B) como las células F4/80⁺ (monocitos/macrófagos) han mostrado papeles relevantes en el modelo murino de EQ secundaria. De hecho, se ha visto que los PSC de *E. granulosus* s.l. son susceptibles a la muerte por macrófagos activados [Jenkins *et al.*, 1990; Dematteis *et al.*, 2003] y, además, reportes más recientes de nuestro grupo han sugerido la existencia de una asociación entre un mayor número de macrófagos peritoneales y mecanismos de resistencia a la infección más eficientes [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Por su parte, los linfocitos B1 peritoneales desempeñarían un rol importante a favor de la supervivencia de *E. granulosus* s.l., ya que, por ejemplo, se ha visto que glicoconjugados de PSC (fracción E4⁺) inducen la secreción de IL-10 por parte de estas células favoreciendo el desarrollo temprano de respuestas de citoquinas de tipo Th-2. Además, estas mismas células secretarían anticuerpos policlonales no específicos contra el parásito en respuesta dichos glicoconjugados [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b].

Luego de haber determinado que los linfocitos B y los monocitos/macrófagos son los principales interactores celulares en cavidad peritoneal con componentes presentes en PSEx, se evaluamos si los ligandos parasitarios reconocidos por rshCD5 y/o rshCD6 estarían involucrados en dicha interacción. Los resultados obtenidos mostraron que dichos ligandos, aunque en forma parcial y algo diferente, participarían de la interacción entre PSEx y las células mencionadas (Figura 23). Como ya se ha mencionado, PSEx es una fracción molecularmente compleja enriquecida en antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. [Hernández & Nieto, 1994; Miles *et al.*, 2019], compuesta por al menos 1.218 proteínas parasitarias [Miles *et al.*, 2020b]; y como comentáramos previamente, 8 de ellas han sido identificadas como ligandos compartidos tanto para rshCD5 como para rshCD6, mientras que 9 y 3 serían ligandos específicos de rshCD5 y rshCD6, respectivamente [Miles *et al.*, 2020b]. En este sentido, nuestros resultados sugerirían que alguno(s) de estos ligandos, ya sean aquellos compartidos o los específicos, participarían de la interacción entre los linfocitos B y monocitos/macrófagos peritoneales con los componentes presentes en PSEx.

En paralelo, y trabajando con ratones CD5-deficientes y CD6-deficientes, se evaluó la relevancia que tendrían los receptores CD5 y CD6 expresados en membrana sobre la capacidad de interacción de los linfocitos B y monocitos/macrófagos peritoneales con antígenos presentes en PSEx. Los resultados mostraron que, por un lado, la ausencia en la expresión del receptor CD5 en membrana afectó solamente la unión a monocitos/macrófagos peritoneales (Figura 31A); mientras que, la deficiencia en la expresión de CD6 en membrana alteró la interacción de PSEx tanto con linfocitos B (Figura 30B) como con monocitos/macrófagos (Figura 31B). En este sentido, la diferencia observada en los niveles de unión a células B debido a la ausencia del receptor CD6 en su membrana, sería consistente con que la principal subpoblación de linfocitos B peritoneales corresponde a células B1a, las cuales se caracterizan por expresar CD6 en su membrana [Velasco-de-Andrés *et al.*, 2020b]. Sin embargo, esta explicación también debería aplicar para el estudio realizado sobre linfocitos B provenientes de ratones CD5-deficientes, ya que las células B1a peritoneales, co-expresan también este receptor [Velasco-de-Andrés *et al.*, 2020b]. Sin embargo, y de forma inesperada, nuestros resultados no mostraron que la ausencia de expresión de CD5 en membrana afecte la unión de componentes presentes en PSEx a linfocitos B peritoneales (Figura 30A), por lo que no podemos extraer mayores conclusiones al respecto, al menos con los resultados disponibles. Por su parte, se observaron diferencias en la capacidad de unión de componentes presentes en PSEx a monocitos/macrófagos peritoneales provenientes tanto de ratones CD5-deficientes como CD6-deficientes (Figura 31). Sin embargo, este hecho resultó inesperado a la vez que interesante, ya que los monocitos/macrófagos normales no expresan ni CD5 ni CD6 en su superficie. En este sentido, es sabido que los niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos, se afectan luego de interactuar con linfocitos T [Harding & Allison, 1993; Powers *et al.*, 1994; Doherty *et al.*, 1995]. En línea con estos resultados, se ha postulado que CD5 y/o CD6 actuarían como moléculas co-estimuladoras en células T maduras [Fenutría *et al.*, 2014; Consuegra-Fernández *et al.*, 2017], por lo que, la ausencia de estos receptores podría alterar, directa o indirectamente, la normal comunicación entre células T y macrófagos, afectando la expresión de diversos receptores en la superficie de estos últimos. Así, nuestros resultados sobre monocitos/macrófagos podrían deberse a fenómenos secundarios a la ausencia de expresión de CD5 o CD6 en otras células del sistema inmune. Si bien menos estudiados, estos fenómenos quizás pudieran extrapolarse también a las células B, en cuanto estas son un ejemplo de célula presentadora de antígenos al igual que los macrófagos.

El reconocimiento específico de las estructuras del parásito por los receptores CD5 y CD6 expresados en membrana podría tener consecuencias funcionales relevantes, ya que se ha demostrado la participación

de ambos receptores en la regulación fina de las respuestas de las células que los expresan (linfocitos T y, probablemente, B1a) [Cho *et al.*, 2018]. En este sentido, y como ya se ha comentado previamente, la cavidad peritoneal contiene células inmunes que expresan ambos receptores (células T y B1a) y que estarían involucradas en los mecanismos de respuesta contra infecciones por parásitos helmintos [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]. Además, aunque ambos receptores no presentan colas citoplasmáticas con actividades catalíticas intrínsecas, son capaces de inducir cascadas de señalización intracelular mediadas por MAPK luego de la unión de sus ectodominios a ligandos PAMPs [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009]. Es importante destacar que estos fenómenos de señalización intracelular han sido reportados hasta el momento sólo para PAMPs de origen bacteriano y fúngico, desconociéndose si la interacción con antígenos del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. podría inducir fenómenos similares.

Por ello, analizamos la influencia de la expresión de los receptores CD5 y CD6 sobre la respuesta inmune anti-parasitaria. Dada la compleja interacción hospedero-parásito que ocurre en el contexto del modelo de EQ secundaria, se realizaron inmunizaciones i.p. con PSEx en ratones *Cd5*^{-/-} y *Cd6*^{-/-}, así como sus respectivos controles WT. Así, la estrategia de análisis consistió en estudiar a las 48 horas post-inoculación los siguientes parámetros inmunológicos locales: (i) niveles de expresión de ARNm para citoquinas; (ii) fenotipo de los infiltrados celulares, y (iii) perfil de la respuesta de anticuerpos específicos y poli-reactivos. Los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de expresión de CD5, pero no de CD6, altera el perfil de expresión de ARNm, en respuesta a la inoculación con PSEx, tanto para citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-17A) (Figura 32) como anti-inflamatorias (IL-10) (Figura 33). De manera interesante, estas citoquinas han sido reportadas como actores relevantes en modelos de infección por parásitos helmintos. Por ejemplo, Artis *et al.* (1999) demostraron que el bloqueo *in vivo* de TNF- α en ratones normalmente resistentes a la infección por *Trichuris muris*, retrasa significativamente el tiempo de expulsión del gusano [Artis *et al.*, 1999]. A su vez, nuestro grupo ha asociado los niveles de expresión de TNF- α a nivel peritoneal, con fenómenos de resistencia frente a la infección por *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Por su parte, se reportó que el tratamiento *in vivo* con IL-17A recombinante, atenúa el crecimiento de quistes hidáticos, así como reduce la fibrosis hepática en el modelo de EQ secundaria murina [Labsi *et al.*, 2018]. Por otro lado, IL-10, entre otras funciones, es ampliamente reconocida como factor clave de inmuno-regulación en el modelo murino de EQ secundaria. Por ejemplo, se ha reportado que glicoconjugados derivados de PSC de *E. granulosus* s.l. (fracción E4⁺) inducen la secreción de altos niveles de IL-10 por parte de células peritoneales de ratones vírgenes [Dematteis *et al.*, 2001]. Además, se ha reportado una correlación positiva entre la inducción temprana de IL-10 y el rápido

aumento local de células Treg en el modelo murino de EQ secundaria, por lo que sería un marcador de susceptibilidad frente a la infección [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. La literatura existente sobre respuesta inmune frente a parásitos helmintos muestra que estos suelen inducir una respuesta altamente polarizada hacia el perfil de tipo Th2 [Jenkins & Allen, 2010]. Sin embargo, la inmunidad protectora contra cestodos parecería requerir de los mecanismos efectores típicamente asociados a las respuestas de tipo Th1 [Emery *et al.*, 1997; Rogan, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002; Dematteis *et al.*, 2003; Gottstein *et al.*, 2006; Baz *et al.*, 2006; Alonso-Trujillo *et al.*, 2007; Terrazas, 2008; Jenkins & Allen, 2010]. Así, en el caso de *E. granulosus* s.l., las respuestas de tipo Th2 estarían asociadas con susceptibilidad, tanto en modelos murinos de infección [Rogan, 1998; Dematteis *et al.*, 1999; 2003; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; 2016a; 2016b] como en pacientes [Hernández-Pomi *et al.*, 1997; Riganò *et al.*, 1999a; 1999b; 2001; 2004]. Por ello, y en base a nuestros resultados, podemos sugerir que la expresión de CD5 en membrana, pero no así de CD6, cumpliría un papel relevante en la respuesta temprana de citoquinas inducida por antígenos parasitarios; la cual influiría sobre la susceptibilidad/resistencia del hospedero a la infección.

Por otro lado, el análisis del fenotipo de los linfocitos B presentes en los infiltrados peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con PSEx, mostró que la ausencia de expresión de CD5 altera los efectos de la inmunización sobre los linfocitos B totales, respecto a lo que ocurre en sus controles WT (Figura 36B). Por otro lado, la ausencia de expresión de CD6, alteró las diversas subpoblaciones de células B estudiadas: células B totales, células B1 y células B2 (Figura 37). Asimismo, el perfil de activación (expresión de CD86) de los linfocitos B totales se vio alterado únicamente en ratones CD6-deficientes inoculados con PSEx (Figura 37F). El compartimiento de linfocitos B peritoneales está constituido por linfocitos B1 y B2, los cuales tienen varias diferencias funcionales [LeBien & Tedder, 2008]. Por ejemplo, las células B1 no suelen proliferar en respuesta al entrecruzamiento de su BCR, posiblemente debido a la expresión de co-receptores inhibidores como CD5 [Bikah *et al.*, 1996]; sin embargo, pueden responder a ciertos antígenos T-dependientes produciendo una mayor cantidad de anticuerpos [Taki *et al.*, 1992]. Además, la IgM natural derivada de células B1 parecería proporcionar una defensa inicial, mientras que la IgM inducida derivada de células B2 proporcionaría una protección adicional [Baumgarth *et al.*, 2015]. También se ha visto la existencia de diferentes poblaciones efectoras de linfocitos B, capaces de producir distintos perfiles de citoquinas dependiendo del microambiente presente al momento de su activación [Harris *et al.*, 2000]. Estas células B secretoras de citoquinas (como IL-4, IL-10 o IFN- γ), serían capaces de polarizar la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia perfiles de tipo Th1 o Th2 [Harris *et al.*, 2000]. Así, los linfocitos B no

sólo serían responsables de desencadenar respuestas de anticuerpos, sino que también regularían las respuestas inmunes frente a patógenos a través de la producción de citoquinas [Paciorkowski *et al.*, 2003]. En este sentido, las células B son, cada vez más, reconocidas como actores importantes durante las respuestas inmunes de tipo Th2 contra helmintos, tanto participando en la producción de anticuerpos protectores (en el intestino, por ejemplo), así como controlando las respuestas inflamatorias dañinas o participando de respuestas reguladoras (inducidas por los parásitos como mecanismo de evasión) [Harris & Gause *et al.*, 2011]. Por todo ello, nuestros resultados indicarían entonces que la expresión del receptor CD6, y en menor medida la de CD5, tendría un rol relevante en la respuesta de las células B peritoneales frente al estímulo con antígenos parasitarios; lo cual podría influir directa o indirectamente, sobre la resistencia/susceptibilidad del hospedero frente a la infección.

Por su parte, el análisis del fenotipo de los monocitos/macrófagos peritoneales de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes inoculados con PSEx mostró que la ausencia de expresión de cualquiera de los receptores altera el comportamiento, y el perfil de activación, de monocitos/macrófagos respecto a sus controles WT respectivos (Figuras 38 y 39). En las infecciones por helmintos, se ha sugerido que los macrófagos juegan papeles cruciales en la respuesta inmune, ya que pueden potenciar y modular la misma, y además ser células efectoras finales. En este sentido, se ha demostrado que el número de macrófagos aumenta en el tejido que rodea al helminto, ya sea a través del reclutamiento de precursores de la sangre, o a través de la proliferación de macrófagos residentes [Reyes & Terrazas, 2007; Rückerl & Allen, 2014; Nascimento *et al.*, 2014]; siendo las citoquinas M-CSF, IL-4 e IL-13, responsables de mediar estos fenómenos [Jenkins *et al.*, 2011; 2013]. Además, como mencionamos previamente, nuestro grupo reportó la relevancia que tiene el número de macrófagos peritoneales en los mecanismos de resistencia frente a la infección por *E. granulosus* s.l., probablemente afectando la producción local de óxido nítrico [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Por lo tanto, nuestros resultados sugerirían que tanto la expresión de CD5 como CD6 sería relevante en la respuesta de monocitos/macrófagos peritoneales frente al estímulo con antígenos parasitarios; lo cual sería clave a la hora de determinar la posible resistencia del hospedero frente a la infección.

Por último, analizamos el perfil de la respuesta de anticuerpos poli-reactivos (anti-DNP) y específicos (anti-PSEx), presentes en los exudados peritoneales de ratones CD5-deficientes y CD6-deficientes inmunizados con PSEx. Este análisis se centró en evidenciar la polarización hacia uno u otro perfil, por lo que se reportaron los cocientes entre sus títulos (anti-DNP/anti-PSEx). Los anticuerpos han mostrado

ser relevantes durante las respuestas inmunes en diversos modelos murinos de infecciones parasitarias [McCoy *et al.*, 2008; Gurish *et al.*, 2004; Blackwell & Else, 2001; Rajan, 2005; Marcet *et al.*, 2002; Inaba *et al.*, 2003a; 2003b; Herbert *et al.*, 2002; Ligas *et al.*, 2003]; y en particular, los anticuerpos naturales se caracterizan por su habitual poli-reactividad [Ehrenstein & Notley, 2010; Panda & Ding, 2015], que les confiere la capacidad de reconocer una amplia variedad de antígenos con baja afinidad [Notkins *et al.*, 2004; Dimitrov *et al.*, 2013]. De hecho, los anticuerpos poli-reactivos forman parte de la primera línea de defensa contra patógenos, pudiendo retrasar su propagación y/o aumentar su inmunogenicidad [Ochsenbein *et al.*, 1999; Ehrenstein & Notley, 2010]. En particular, nuestro grupo demostró, previamente, la existencia de una asociación entre los títulos de anticuerpos naturales IgG2b e IgG2c, y mecanismos de resistencia a la infección en el modelo de EQ secundaria murina, sugiriéndose así que estos anticuerpos serían capaces de mediar fenómenos anti-parasitarios relevantes [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que, por un lado, la ausencia de expresión de CD5 afecta el perfil de la respuesta de anticuerpos IgG2b tras inoculación con PSEx, polarizándola hacia un perfil predominantemente poli-reactivo (Figura 40E). Por el contrario, la ausencia de expresión de CD6 polariza la respuesta de anticuerpos IgG2c hacia un perfil mayoritariamente específico (Figura 41D). Así, nuestros resultados sugerirían que tanto la expresión en membrana de CD5 como CD6 sería relevante en la regulación de la polarización de la respuesta temprana de anticuerpos, frente al estímulo con antígenos parasitarios, al menos, a nivel local. Esta regulación sería de gran importancia para el hospedero, teniendo presente que las respuestas de anticuerpos poli-reactivos se asociarían con mecanismos de resistencia inmunológica tanto en hospederos experimentales como en pacientes [García-Luna *et al.*, 2021].

En paralelo, también evaluamos el papel de los ligandos parasitarios de rshCD5 y/o rshCD6 en la respuesta inmune inducida tempranamente por antígenos parasitarios en ratones normales. Para ello, se realizaron inmunizaciones i.p. con PSEx tanto en ratones Balb/c como C57Bl/6 normales, junto a la administración exógena de rshCD5 o rshCD6. En línea con lo discutido previamente, se analizaron 48 horas p.i. los mismos parámetros inmunológicos locales (respuesta de citoquinas, fenotipo del infiltrado celular y respuesta de anticuerpos). Los resultados obtenidos para ambas cepas de ratones sólo mostraron variaciones importantes en la respuesta local de anticuerpos. La administración exógena de rshCD5 o rshCD6 polarizó la respuesta de anticuerpos IgG2a hacia un perfil poli-reactivo en ratones Balb/c (Figura 20D). En este sentido, es interesante destacar que hemos reportado recientemente que los niveles de anticuerpos poli-reactivos serían un marcador de resistencia frente a la infección por *E. granulosus* s.l.

[García-Luna *et al.*, 2021]; y en particular la inducción de anticuerpos del isotipo IgG2a sería un mecanismo anti-parasitario de relevancia contra PSC debido a su excelente capacidad activadora del sistema complemento [Ferreira *et al.*, 1992; Breijo *et al.*, 2008; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Por otro lado, en los ratones C57Bl/6 únicamente la administración exógena de rshCD5 modificó la respuesta de anticuerpos, polarizando los niveles de IgA hacia un perfil antígeno-específico (Figura 28B). Dentro de las funciones destacables de este isotipo de anticuerpos cabe mencionar su capacidad para neutralizar patógenos y moléculas tóxicas producidas por estos, así como de favorecer la degradación de patógenos mediante su acción opsonizante en colaboración con diversos granulocitos [Regueiro *et al.*, 2010]. Por lo tanto, nuestros resultados sugerirían que los ligandos parasitarios tanto de rshCD5 como de rshCD6 participarían principalmente de la polarización de la respuesta temprana de anticuerpos frente al estímulo con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. A su vez, la magnitud y el sentido de dicha polarización también dependerían del *background* genético de los ratones utilizados; lo cual resalta aún más la complejidad de la interacción hospedero-parásito.

Los resultados hasta aquí discutidos permitieron confirmar que los ligandos parasitarios de rshCD5 y rshCD6, así como la expresión en membrana de ambos receptores en el hospedero experimental, son relevantes para el desarrollo temprano de la respuesta inmune inducida ante el estímulo con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. A su vez, permitieron demostrar que tanto rshCD5 como rshCD6 presentan, al menos *in vitro*, actividad protoscolicida intrínseca. Por todo ello, y teniendo presente el reporte de protección inducida en el modelo murino de EQ secundaria mediante la administración exógena de rshCD5 y rshCD6 [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018], en la presente tesis evaluamos también la posible inmuno-modulación en ratones infectados debida a la administración de ambas moléculas. Para ello, inoculamos ratones Balb/c con PSC viables de *E. granulosus* s.l. a la vez que se les administró las moléculas rshCD5 o rshCD6 con el fin de analizar a los 7 días p.i. distintos parámetros de la respuesta inmune local y sistémica. Este estudio se realizó en ratones Balb/c por ser la cepa utilizada previamente en el reporte de protección [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]; y la ventana de tiempo elegida se debió a que, en la etapa de pre-enquistamiento, el parásito sería más susceptible a los mecanismos inmunes efectores desarrollados por el hospedero experimental [Richards *et al.*, 1983; Rogan *et al.*, 2015].

Los resultados más destacables obtenidos en relación con el perfil de citoquinas a nivel de bazo mostraron que la administración exógena de rshCD6 indujo un aumento significativo en los niveles de transcriptos para IL-6, durante la primera semana de infección por *E. granulosus* s.l. (Figura 7B). De

manera interesante, la IL-6 es una citoquina potenciadora de las respuestas pro-inflamatorias, las cuales en general han mostrado ser beneficiosas para el hospedero en el modelo de EQ secundaria [Baz *et al.*, 2006]. Además, IL-6 participaría también en la regulación de las respuestas Th17 [Ziegler & Buckner, 2009], que actuarían en detrimento del parásito [Labsi *et al.*, 2018]. En forma paralela, los resultados más destacados a nivel peritoneal mostraron que la administración exógena de rshCD5 indujo el aumento de los niveles de ARNm para IL-5 (Figura 10C). De manera interesante, los niveles de esta citoquina se han correlacionado con posibles mecanismos de protección en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b], probablemente mediante la inducción temprana de plasmocitos locales secretores de anticuerpos específicos contra el parásito [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a].

Por su parte, el análisis del fenotipo celular a nivel peritoneal mostró que la administración de rshCD5 indujo un aumento en el porcentaje de células B2. Este hecho podría relacionarse, al menos en parte, con los niveles aumentados de IL-5 previamente discutidos, ya que, esta citoquina podría potenciar fenómenos de migración de linfocitos B hacia la cavidad peritoneal, así como la proliferación local de los mismos, entre otros efectos [Fairfax *et al.*, 2008]. Asimismo, el aumento en el porcentaje de células B2 locales podría asociarse con algún mecanismo relacionado con la producción de anticuerpos contra antígenos parasitarios, ya sea en términos de cantidad y/o calidad, que podrían ejercer funciones anti-parasitarias eficientes [Harris & Gause *et al.*, 2011].

Otro de los resultados relevantes obtenidos del análisis del fenotipo celular a nivel peritoneal mostró que la administración exógena tanto de rshCD5 como de rshCD6, redujo el porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺ en ratones infectados (Figura 12C). Este resultado podría sugerir que la administración de estas moléculas regularía negativamente a las células Treg inducidas por el parásito en el sitio anatómico donde este es capaz de sobrevivir y desarrollarse. El aumento del número de linfocitos T CD4⁺ locales se ha descrito en varias infecciones por helmintos [Wang *et al.*, 2008; Hewitson *et al.*, 2009], incluida la infección por *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]; observándose que estos suelen suprimir activamente los efectos del sistema inmune de su hospedero mediante reclutamiento y/o inducción de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [Maizels & Yazdanbakhsh, 2008]. Este fenómeno se ha observado también en modelos de infección por *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a] y *E. multilocularis* [Mejri *et al.*, 2011]. En este sentido, las células T reguladoras estarían involucradas en la regulación negativa de las respuestas de tipo Th1, reduciendo las respuestas inflamatorias que dañarían tanto al parásito como a su hospedero en la primera semana de infección. Así, se favorecería indirectamente el

desarrollo de respuestas de tipo Th2 y, en última instancia, la sobrevida y el desarrollo del parásito [Baz *et al.*, 2006]. De esta forma, la reducción en el porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺ inducido por la administración de rshCD5 o rshCD6, favorecería al hospedero experimental al contrarrestar uno de los mecanismos de inmunosupresión inducidos por *E. granulosus* s.l. Sin embargo, es importante destacar que en nuestro análisis no se obtuvo información respecto al marcador Foxp3, por lo que cabría la posibilidad de que las células identificadas no correspondiesen necesariamente a células Treg.

El último resultado a destacar del análisis sobre el fenotipo celular en cavidad peritoneal corresponde a la disminución en el porcentaje de células F4/80⁺ inducido por la administración exógena de rshCD5 (Figura 13B). En este sentido, es ampliamente conocido que, frente a un estímulo inflamatorio en cavidad peritoneal, los macrófagos residentes tienden a emigrar dirigiéndose principalmente hacia el omento donde colaboran con el inicio (*priming*) de la respuesta adaptativa, así como en su amplificación [Cassado *et al.*, 2015]. Por lo tanto, la administración exógena de rshCD5 podría potenciar, en el contexto del desarrollo de la respuesta inmune temprana contra *E. granulosus* s.l., el inicio de la respuesta inmune adaptativa modificando, por lo tanto, su intensidad y/o cinética; lo cual resultaría beneficioso para la respuesta antiparasitaria global, al menos a nivel local.

Finalmente, se evaluó también la respuesta de anticuerpos poli-reactivos (anti-DNP) y específicos (anti-PSEx) a nivel local (exudado peritoneal) y sistémico (suero), como otro de los posibles parámetros inmunológicos modulados en ratones infectados y tratados con rshCD5 o rshCD6. De igual manera a lo realizado a lo largo de toda esta tesis, el análisis se centró en el cociente entre títulos anti-DNP/anti-PSEx como medida de la polarización de la respuesta de anticuerpos hacia un perfil específico o uno poli-reactivo. Los resultados obtenidos tanto a nivel sistémico (Figura 14) como local (Figura 15) no mostraron mayores variaciones en respuesta a la administración exógena de rshCD5 o rshCD6 en ratones infectados. Sin embargo, y dada la complejidad de la interacción hospedero-parásito, podría ser posible que, en este contexto, el uso de la respuesta de anticuerpos anti-PSEx para el cálculo del cociente entre anticuerpos poli-reactivos y específicos no hubiese sido la mejor opción, ya que estaríamos focalizándonos en una porción menor de la respuesta de anticuerpos específicos inducida frente al parásito completo. Por ello, consideramos que los resultados previamente discutidos en relación con el modelo de inoculación de PSEx en conjunto con rshCD5 o rshCD6 en ratones Balb/c nos permitirían sugerir que el tratamiento modularía la respuesta de anticuerpos específica contra componentes del tegumento. Así, la polarización observada de la respuesta IgG2a peritoneal hacia un perfil poli-reactivo en ratones Balb/c inoculados con PSEx junto

a rshCD5 o rshCD6 (Figura 20D), podría sugerir que estos anticuerpos inducirían cierto nivel de protección contra el parásito. En este sentido, hemos reportado recientemente que altos niveles de anticuerpos IgG2a poli-reactivos en cavidad peritoneal, correlacionarían con una mayor resistencia en el modelo murino de EQ secundaria [García-Luna *et al.*, 2021]. Así, el hecho que los tratamientos con rshCD5 o rshCD6 frente a la inoculación con PSEx favorezcan este tipo de respuestas poli-reactivas, podría ser uno de los mecanismos involucrados en la acción profiláctica previamente reportada [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2018]; ya que los anticuerpos IgG2a poseen la relación de activación/inhibición celular más alta basada en su unión preferencial a receptores Fcγ [Nimmerjahn & Ravetch, 2005; 2006]. Este hecho sería aún de mayor relevancia, teniendo presente que los PSCs de *E. granulosus* s.l. son susceptibles a la muerte por mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos [Jenkins *et al.*, 1990; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. A su vez, IgG2a es un isotipo de anticuerpos con excelente capacidad activadora del sistema complemento, el cual mediante su activación por vía clásica ha mostrado ser un mecanismo anti-parasitario de relevancia [Ferreira *et al.*, 1992; Breijo *et al.*, 2008; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Por lo tanto, no deberíamos descartar a la polarización de la respuesta de anticuerpos hacia un perfil poli-reactivo como uno de los mecanismos involucrados en la protección reportada en el modelo murino de EQ secundaria tras la administración exógena de rshCD5 y rshCD6. Por último, consideramos importante destacar que los resultados de esta tesis haciendo uso del modelo murino de EQ secundaria, se obtuvieron en momento puntual de la infección (día 7 p.i.), lo cual no permitió tener una visión dinámica del proceso infeccioso, haciendo que otras interpretaciones no discutidas aquí también pudiesen ser válidas.

En suma, los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis permitieron confirmar que los ligandos parasitarios para rshCD5 y rshCD6, así como la expresión en membrana de ambos receptores en el hospedero experimental, son relevantes para el desarrollo de la respuesta inmune temprana, inducida frente al estímulo con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. A su vez, permitieron demostrar que tanto rshCD5 como rshCD6 presentan, al menos *in vitro*, actividad protoscolicida intrínseca. Finalmente, los resultados obtenidos también permitieron sugerir que las moléculas rshCD5 y rshCD6, son capaces de inducir inmuno-modulación en el hospedero experimental infectado. Por lo tanto, y tomados en su conjunto, nuestros resultados indican que tanto los receptores CD5 y CD6, como sus ligandos parasitarios, cumplen funciones relevantes en la interacción hospedero-parásito, al menos en el modelo de infección por *E. granulosus* s.l.

Así, y a modo de integrar los principales resultados obtenidos, realizamos a continuación un esquema globalizador para interpretar los mismos (Figura 42). En este sentido, proponemos que el tratamiento con las moléculas rshCD5 y rshCD6 afectaría el desarrollo de los PSC inoculados en cavidad peritoneal, tanto de manera directa (actividad protoscolicida intrínseca), como indirectamente actuando sobre el hospedero infectado (actividad inmuno-moduladora). Respecto a este último aspecto, las moléculas rshCD5 y rshCD6 favorecerían las respuestas de anticuerpos principalmente de tipo poli-reactivo para los isotipos IgM, IgG2a/c e IgG2b; los cuales podrían desencadenar mecanismos anti-parasitarios efectivos como ser la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de Complemento (CDC). Además, algunos de los ligandos de rshCD5 y rshCD6 podrían interactuar con linfocitos B y monocitos/macrófagos peritoneales, los cuales son dos actores celulares de relevancia en el modelo de EQ secundaria, ya que serían capaces de influir sobre la respuesta local de citoquinas en beneficio del hospedero infectado. De esta manera, el balance de los mecanismos que involucrarían a los receptores CD5 y CD6, y/o sus ligandos parasitarios, redundaría en una menor proporción de PSC capaces de evadir el sistema inmune del hospedero y, en consecuencia, disminuyendo la probabilidad de establecer infecciones crónicas.

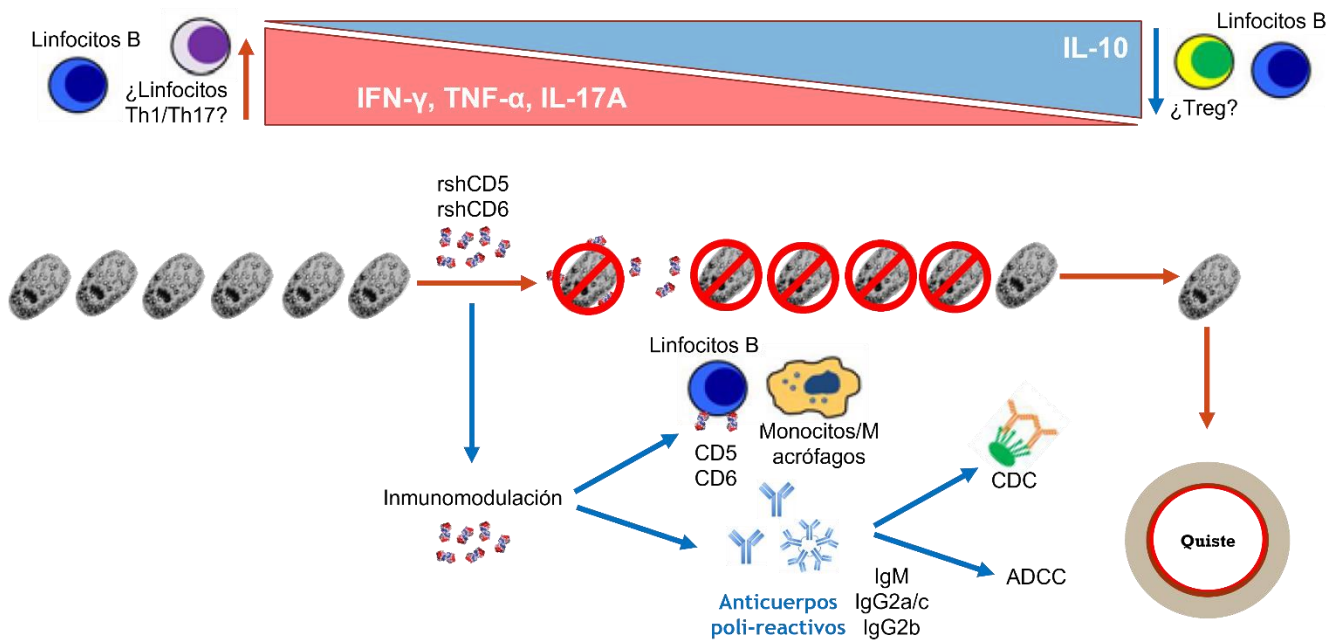


Figura 42. Esquema globalizador de los principales resultados obtenidos, proponiendo una posible interpretación de los mismos a la luz de la hipótesis de trabajo planteada en la presente tesis.

Por último, y como perspectivas de este trabajo, correspondería explorar la posible acción inmunoestimulante o inmuno-supresora inducida sobre algún efector (soluble o celular) de la respuesta del hospedero tras la administración de rshCD5 o rshCD6 en ausencia de infección. Asimismo, sería de interés profundizar en la dinámica (cinética) de la respuesta inmune en ratones infectados y tratados con rshCD5/rshCD6, ya que en la presente tesis los resultados obtenidos se focalizaron en un único punto temporal. Por otro lado, y para conocer a cabalidad la relevancia de los receptores CD5 y CD6 en la interacción hospedero-parásito, sería necesario analizar la susceptibilidad al modelo de EQ secundaria por parte de ratones CD5-deficientes o CD6-deficientes, así como en posibles cepas doble *knock-out* disponibles. Por su parte, y con relación a los ensayos de interacción física entre antígenos tegumentarios y células peritoneales murinas, podría resultar interesante realizar estudios análogos a los reportados en esta tesis, pero bloqueando la interacción ligando-receptor mediante el uso de anticuerpos neutralizantes. De esta forma, se minimizarían los potenciales efectos secundarios sobre otros receptores celulares, derivados de la ausencia de expresión de CD5 y CD6. Por último, y como perspectivas más generales, cabría evaluar tanto el potencial profiláctico/terapéutico de rshCD5/rshCD6 en otras helmintiasis, así como el papel de otros receptores *Scavenger* de la superfamilia RSRC en la interacción hospedero-parásito.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelraouf *et al.* (2015). Clinical and serological outcomes with different surgical approaches for human hepatic hydatidosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(5), 587–593. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0223-2015>
- Agudelo-Higuaita *et al.* (2016). Cystic Echinococcosis. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 518-523. <https://doi.org/10.1128/JCM.02420-15>
- Ait-Aissa *et al.* (2006). Alterations in interferon-gamma and nitric oxide levels in human echinococcosis. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 52(1), 65-70.
- Aksoy *et al.* (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), 277-283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411223200>
- Aldridge & O'Neill (2016). *Fasciola hepatica* tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner. *European journal of immunology*, 46(5), 1180-1192. <https://doi.org/10.1002/eji.201545905>
- Al-Ghoury *et al.* (2010). HLA class II alleles: susceptibility or resistance to cystic echinococcosis in Yemeni patients. *Parasitology research*, 107(2), 355-361. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1868-0>
- Allen & Maizels (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews. Immunology*, 11(6), 375-388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Alonso-Trujillo *et al.* (2007). Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology research*, 100(6), 1341-1350. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0424-4>
- Al-Qaoud & Abdel-Hafez (2008). The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis. *Parasitology research*, 102(6), 1151-1155. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0883-x>
- Álvarez-Rojas *et al.* (2014). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans-review of current knowledge. *International journal for parasitology*, 44(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>
- Amri *et al.* (2007). *In vitro* antihydatic action of IFN-gamma is dependent on the nitric oxide pathway. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 27(9), 781-787. <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0003>
- Amri *et al.* (2009). Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of *Echinococcus granulosus* to host immune response. *European cytokine network*, 20(2), 63-68. <https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0154>
- Amu *et al.* (2010). Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scandinavian journal of immunology*, 71(4), 275-282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02380.x>
- Araj *et al.* (1977). The host response in secondary hydatidosis of mice. I. Circulating antibodies. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 52(1), 23-30. <https://doi.org/10.1007/BF00380555>
- Artis *et al.* (1999). Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *The Journal of experimental medicine*, 190(7), 953-962. <https://doi.org/10.1084/jem.190.7.953>
- Aruffo *et al.* (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?. *Immunology today*, 18(10), 498-504. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(97\)01130-4](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)01130-4)
- Azab *et al.* (2004a). The evaluation of HLA-DRB1 antigens as susceptibility markers for unilocular cystic echinococcosis in Egyptian patients. *Parasitology research*, 92(6), 473-477. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1073-0>
- Azab *et al.* (2004b). Association of some HLA-DRB1 antigens with *Echinococcus granulosus* specific humoral immune response. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34(1), 183-196.

- Barr *et al.* (2007). TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European journal of immunology*, 37(11), 3040-3053. <https://doi.org/10.1002/eji.200636483>
- Baumgarth *et al.* (2015). Natural and induced B-1 cell immunity to infections raises questions of nature versus nurture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362, 188-199. <https://doi.org/10.1111/nyas.12804>
- Baz *et al.* (1995). Idiotypic modulation of the antibody response of mice to *Echinococcus granulosus* antigens. *Immunology*, 84(3), 350-354.
- Baz *et al.* (2006). Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Immunobiology*, 211(1-2), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.09.001>
- Baz *et al.* (2008). *Echinococcus granulosus*: induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection. *Experimental parasitology*, 119(4), 460-466. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.024>
- Beardsell & Howell (1984). Killing of *Taenia hydatigena* oncospheres by sheep neutrophils. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 70(3), 337-344. <https://doi.org/10.1007/BF00927820>
- Beyers *et al.* (1992). Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2945-2949. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2945>
- Bikah *et al.* (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5294), 1906-1909. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1906>
- Bikker *et al.* (2004). Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 47699-47703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406095200>
- Blackwell & Else (2001). B cells and antibodies are required for resistance to the parasitic gastrointestinal nematode *Trichuris muris*. *Infection and immunity*, 69(6), 3860-3868. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3860-3868.2001>
- Bogdan *et al.* (1996). Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. *Current opinion in immunology*, 8(4), 517-525. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(96\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(96)80040-9)
- Bowdish & Gordon (2009). Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function. *Immunological reviews*, 227(1), 19-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00728.x>
- Boyce *et al.* (2003). Mast cells: beyond IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(1), 24-33. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.60>
- Brännström *et al.* (2002). Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(5), 1462-1469. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6378>
- Breijo *et al.* (1998). *Echinococcus granulosus*: an intraperitoneal diffusion chamber model of secondary infection in mice. *Experimental parasitology*, 90(3), 270-276. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4338>
- Breijo *et al.* (2008). *Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Experimental parasitology*, 118(2), 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.07.014>
- Breijo *et al.* (2011). An insect growth inhibitor-lufenuron-enhances albendazole activity against hydatid cyst. *Veterinary parasitology*, 181(2-4), 341-344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.011>
- Brunetti & Junghanss (2009). Update on cystic hydatid disease. *Current opinion in infectious diseases*, 22(5), 497-502. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328330331c>
- Brunetti *et al.* (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta tropica*, 114(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.001>

- Brunetti *et al.* (2016). Application of Ultrasonography in the Diagnosis of Infectious Diseases in Resource-Limited Settings. *Current infectious disease reports*, 18(2), 6. <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0512-7>
- Budke *et al.* (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerging infectious diseases*, 12(2), 296-303. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050499>
- Burgu *et al.* (2007). Effects of immunization with purified specific proteins on the formation of secondary hydatid cysts in mice. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 114(9), 349-353.
- Caldas *et al.* (2008). Human schistosomiasis *mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta tropica*, 108(2-3), 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.027>
- Carmo *et al.* (1999). CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 163(8), 4238-4245.
- Caron *et al.* (2005). Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 175(3), 1551-1557. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1551>
- Carrasco *et al.* (2014). A role for scavenger-like lymphocyte receptor CD6 in HIV-1 viral infection. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 30(S1): A49-A50 (abstract).
- Casado *et al.* (2001). Combined praziquantel and albendazole chemoprophylaxis in experimental hydatidosis. *Parasitology research*, 87(9), 787-789. <https://doi.org/10.1007/s004360100443>
- Casadó-Llombart *et al.* (2021). Contribution of Evolutionary Selected Immune Gene Polymorphism to Immune-Related Disorders: The Case of Lymphocyte Scavenger Receptors CD5 and CD6. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5315. <https://doi.org/10.3390/ijms22105315>
- Cassado *et al.* (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Frontiers in immunology*, 6, 225. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>
- Castro (1996). *Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Ceballos *et al.* (2010). Chemoprophylactic activity of flubendazole in cystic echinococcosis. *Chemotherapy*, 56(5), 386-392. <https://doi.org/10.1159/000316827>
- Chappell *et al.* (2015). Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure* (London, England: 1993), 23(8), 1426-1436. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.05.019>
- Cho *et al.* (2018). TCR tuning of T cell subsets. *Immunological reviews*, 283(1), 129-137. <https://doi.org/10.1111/immr.12646>
- Consuegra-Fernández *et al.* (2017). Relevance of CD6-Mediated Interactions in the Regulation of Peripheral T-Cell Responses and Tolerance. *Frontiers in immunology*, 8, 594. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00594>
- Craig (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite immunology*, 8(2), 171-188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1986.tb00843.x>
- Craig (1997). *Echinococcus granulosus*: immunodiagnosis and vaccination, a perspective. *Parassitologia*, 39(4), 345-347.
- Craig *et al.* (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(6), 385-394. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70134-2)
- Cucher *et al.* (2013). *Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice. *Veterinary parasitology*, 193(1-3), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.027>
- Cucher *et al.* (2015). High-throughput characterization of *Echinococcus spp.* metacestode miRNomes. *International journal for parasitology*, 45(4), 253-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.003>

Cumino *et al.* (2012). *Echinococcus granulosus* tegumental enzymes as *in vitro* markers of pharmacological damage: a biochemical and molecular approach. *Parasitology international*, 61(4), 579-585. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.05.007>

Daeki *et al.* (2000). IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 94(4), 319-328. <https://doi.org/10.1080/00034983.2000.11813546>

Dematteis *et al.* (1999). Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite immunology*, 21(1), 19-26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00198.x>

Dematteis *et al.* (2001). Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite immunology*, 23(1), 1-9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00346.x>

Dematteis *et al.* (2003). Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Parasite immunology*, 25(4), 189-197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00620.x>

Dempster *et al.* (1991). *Echinococcus granulosus*: development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *International journal for parasitology*, 21(5), 549-554. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90059-g](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90059-g)

Dempster *et al.* (1992). *Echinococcus granulosus*: use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response. *International journal for parasitology*, 22(4), 435-441. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90144-a](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90144-a)

Denegri *et al.* (1995). [13C]-nuclear magnetic resonance spectral profiles of serum from normal and *Echinococcus granulosus*-infected mice: a kinetic study. *Parasitology research*, 81(2), 170-172. <https://doi.org/10.1007/BF00931626>

Dessaint *et al.* (1975). Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology*, 29(5), 813-823.

Díaz & Allen (2007). Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *European journal of immunology*, 37(12), 3319-3326. <https://doi.org/10.1002/eji.200737765>

Dimitrov *et al.* (2013). Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 191(3), 993-999. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300880>

Dissanayake *et al.* (2004). *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naïve murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). *Molecular immunology*, 41(4), 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.020>

Doherty (1995). T-cell regulation of macrophage function. *Current opinion in immunology*, 7(3), 400-404. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80117-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80117-0)

Ehrenstein & Notley (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature reviews. Immunology*, 10(11), 778-786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>

Emery *et al.* (1997). Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in A/J mice: delayed metacestode development is associated with Th1 cytokine production. *Parasite immunology*, 19(11), 493-503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-162.x>

Etges & Muller (1998). Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany), 76(6), 372-390. <https://doi.org/10.1007/s001090050230>

- Fabrick *et al.* (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, 113(4), 887-892. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167064>
- Fainboim, Geffner. 2011. *Introducción a la Inmunología Humana*. Editorial Médica Panamericana S.A.C.F. (Buenos Aires, Argentina).
- Fairfax *et al.* (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Seminars in immunology*, 20(1), 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.002>
- Fenutría *et al.* (2014). Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PloS one*, 9(1), e84895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084895>
- Ferragut & Nieto (1996). Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation. *Parasite immunology*, 18(8), 393-402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-125.x>
- Ferragut *et al.* (1998). Relevance of circulating antigen detection to follow-up experimental and human cystic hydatid infections. *Parasite immunology*, 20(11), 541-549. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00177.x>
- Ferreira *et al.* (1992). *Echinococcus granulosus*: study of the *in vitro* complement activation by protoscolexes by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane. *Experimental parasitology*, 75(3), 259-268. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90211-r](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90211-r)
- Filbey *et al.* (2014). Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection. *Immunology and cell biology*, 92(5), 436-448. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.109>
- Freeman *et al.* (1990). An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(22), 8810-8814. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.8810>
- García-Luna *et al.* (2021). Polyreactive antibodies as potential humoral biomarkers of host resistance to cystic echinococcosis. *Parasite immunology*, 43(3), e12802. <https://doi.org/10.1111/pim.12802>
- Gavidia *et al.* (2008). Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerging infectious diseases*, 14(2), 260-266. <https://doi.org/10.3201/eid1402.061101>
- Gimferrer *et al.* (2003). The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(10), 8564-8571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209591200>
- Gimferrer *et al.* (2004). Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(4), 2262-2270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2262>
- Gottstein *et al.* (2006). Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitology international*, 55 Suppl, S45-S49. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.006>
- Gough & Gordon (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and infection*, 2(3), 305-311. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00297-5)
- Gunti & Notkins (2015). Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *The Journal of infectious diseases*, 212 Suppl 1(Suppl 1), S42-S46. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu512>
- Gurish *et al.* (2004). IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(2), 1139-1145. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1139>
- Haralabidis *et al.* (1995). Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis. *Parasite immunology*, 17(12), 625-630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1995.tb01008.x>
- Harding & Allison (1993). CD28-B7 interactions allow the induction of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *The Journal of experimental medicine*, 177(6), 1791-1796. <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1791>

- Harris & Gause (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends in immunology*, 32(2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.11.005>
- Harris *et al.* (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature immunology*, 1(6), 475-482. <https://doi.org/10.1038/82717>
- Harvey *et al.* (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*, edn (Lippincott Williams & Wilkins).
- Hashemitabar *et al.* (2005). Trials to induce protective immunity in mice and sheep by application of protoscolex and hydatid fluid antigen or whole body antigen of *Echinococcus granulosus*. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 52(5), 243-245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00847.x>
- Heath & Lawrence (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite immunology*, 18(7), 347-357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-114.x>
- Heath (1970). The development of *Echinococcus granulosus* larvae in laboratory animals. *Parasitology*, 60(3), 449-456. <https://doi.org/10.1017/s0031182000078252>
- Heath *et al.* (1981). Resistance to *Echinococcus granulosus* infection in lambs. *The Journal of parasitology*, 67(6), 797-799.
- Herbert *et al.* (2002). The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite immunology*, 24(2), 95-101. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00441.x>
- Hernández & Nieto (1994). Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis. *Parasite immunology*, 16(10), 537-544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00308.x>
- Hernández *et al.* (2005). Cystic echinococcosis: analysis of the serological profile related to the risk factors in individuals without ultrasound liver changes living in an endemic area of Tacuarembó, Uruguay. *Parasitology*, 130(Pt 4), 455-460. <https://doi.org/10.1017/s0031182004006717>
- Hernández-Pomi *et al.* (1997). Analysis of cytokine and specific antibody profiles in hydatid patients with primary infection and relapse of disease. *Parasite immunology*, 19(12), 553-561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-173.x>
- Hewitson *et al.* (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- Hoffmann *et al.* (2000). *Litomosoides sigmodontis* in mice: reappraisal of an old model for filarial research. *Parasitology today (Personal ed.)*, 16(9), 387-389. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01738-5](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01738-5)
- Horton (1997). Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta tropica*, 64(1-2), 79-93. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(96\)00640-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(96)00640-7)
- Horton (2003). Albendazole for the treatment of echinococcosis. *Fundamental & clinical pharmacology*, 17(2), 205-212. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00171.x>
- Hotez *et al.* (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1311-1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- Hotez *et al.* (2010). Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nature reviews. Microbiology*, 8(11), 814-826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2438>
- Hotez *et al.* (2011). Integrating neglected tropical diseases into AIDS, tuberculosis, and malaria control. *The New England journal of medicine*, 364(22), 2086-2089. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1014637>
- Hsu *et al.* (2013). The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Molecular and biochemical parasitology*, 192(1-2), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.12.001>

- Hüttner *et al.* (2008). Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. International journal for parasitology, 38(7), 861-868. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.013>
- Inaba *et al.* (2003a). Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. Parasitology, 126(Pt 6), 591-598. <https://doi.org/10.1017/s003118200300310x>
- Inaba *et al.* (2003b). Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. The Journal of veterinary medical science, 65(11), 1227-1231. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.1227>
- Jenkins & Allen (2010). Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010, 262609. <https://doi.org/10.1155/2010/262609>
- Jenkins *et al.* (1990). Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Mesocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. Parasitology, 100 Pt 2, 309-315. <https://doi.org/10.1017/s0031182000061321>
- Jenkins *et al.* (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. Science (New York, N.Y.), 332(6035), 1284-1288. <https://doi.org/10.1126/science.1204351>
- Jenkins *et al.* (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. The Journal of experimental medicine, 210(11), 2477-2491. <https://doi.org/10.1084/jem.20121999>
- Junghanss *et al.* (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. The American journal of tropical medicine and hygiene, 79(3), 301-311.
- Kamoun *et al.* (1981). A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 127(3), 987-991.
- Kemp *et al.* (1980). Tegument-associated antigen modulation by adult male *Schistosoma mansoni*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 124(2), 806-811.
- Khabiri *et al.* (2006). Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. Parasite immunology, 28(8), 357-362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00837.x>
- Kiper *et al.* (2010). TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in childhood cystic echinococcosis. Parasitology international, 59(2), 283-285. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.02.012>
- Kooij *et al.* (2015). *Trichuris suis* induces human non-classical patrolling monocytes via the mannose receptor and PKC: implications for multiple sclerosis. Acta neuropathologica communications, 3, 45. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0223-1>
- Koyasu *et al.* (2010). Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. Advances in immunology, 108, 21-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00002-1>
- Labsi *et al.* (2018). *In vivo* treatment with IL-17A attenuates hydatid cyst growth and liver fibrogenesis in an experimental model of echinococcosis. Acta tropica, 181, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.014>
- Lamproulou *et al.* (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 180(7), 4763-4773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4763>
- Lankester *et al.* (1994). CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. European journal of immunology, 24(4), 812-816. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240406>
- Launois *et al.* (1998). Setting in motion the immune mechanisms underlying genetically determined resistance and susceptibility to infection with *Leishmania major*. Parasite immunology, 20(5), 223-230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00153.x>

- LeBien & Tedder (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lecomte *et al.* (1996). Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics*, 44(5), 385-390. <https://doi.org/10.1007/BF02602784>
- Li *et al.* (2003). A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *The Journal of infectious diseases*, 188(12), 1951-1960. <https://doi.org/10.1086/379976>
- Ligas *et al.* (2003). Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and immunity*, 71(12), 6835-6843. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6835-6843.2003>
- Lightowers (2010). Fact or hypothesis: concomitant immunity in taeniid cestode infections. *Parasite immunology*, 32(8), 582-589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01227.x>
- Lissandrin *et al.* (2016). Factors Influencing the Serological Response in Hepatic *Echinococcus granulosus* Infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(1), 166-171. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0219>
- Little *et al.* (1988). Recurrence of hydatid disease. *World journal of surgery*, 12(5), 700-704. <https://doi.org/10.1007/BF01655892>
- Liu *et al.* (1992). Examination of murine antibody response to secondary hydatidosis using ELISA and immunoelectrophoresis. *Parasite immunology*, 14(3), 239-248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1992.tb00465.x>
- Liu *et al.* (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7048-7053. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601554103>
- Livak & Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenzatto *et al.* (2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene*, 506(1), 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.046>
- Lozano *et al.* (2000). CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Critical reviews in immunology*, 20(4), 347-358.
- Lymbery *et al.* (2015). *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedicus*. What's in a name?. *Trends in parasitology*, 31(1), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.003>
- Macaulay *et al.* (1997). Antigen-specific B cells preferentially induce CD4⁺ T cells to produce IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(9), 4171-4179.
- Macdonald *et al.* (2002). Immunology of parasitic helminth infections. *Infection and immunity*, 70(2), 427-433. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.427-433.2002>
- Maizels & Yazdanbakhsh (2008). T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases. *Chemical immunology and allergy*, 94, 112-123. <https://doi.org/10.1159/000154944>
- Mamuti *et al.* (2002). Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic Echinococcosis in humans. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(3), 573-576. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.3.573-576.2002>
- Mandal & Mandal (2012). Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(4), 253-260. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60035-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60035-2)

- Manzano-Román *et al.* (2015). Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future?. *BioMed research international*, 2015, 428205. <https://doi.org/10.1155/2015/428205>
- Marcet *et al.* (2002). Passive protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES-78 MoAb). *Parasite immunology*, 24(2), 103-108. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00443.x>
- Martínez *et al.* (2011). The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacological reviews*, 63(4), 967-1000. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004523>
- Martínez *et al.* (2014). The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression. *Cellular & molecular immunology*, 11(4), 343-354. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.12>
- Martínez-Florensa *et al.* (2014). Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6. *The Journal of infectious diseases*, 209(7), 1077-1086. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit624>
- Martínez-Florensa *et al.* (2016). Protective Effects of Human and Mouse Soluble Scavenger-Like CD6 Lymphocyte Receptor in a Lethal Model of Polymicrobial Sepsis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1), e01391-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01391-16>
- Mayer *et al.* (1990). Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *Journal of neuroimmunology*, 29(1-3), 193-202. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90162-g](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90162-g)
- McCarthy *et al.* (2002). *Onchocerca volvulus* glycolytic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a target for a protective immune response in humans. *Infection and immunity*, 70(2), 851-858. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.851-858.2002>
- McCoy *et al.* (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell host & microbe*, 4(4), 362-373. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.014>
- McManus & Thompson (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in parasitology*, 18(10), 452-457. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02358-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02358-9)
- McManus & Thompson (2003). Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127 Suppl, S37-S51. <https://doi.org/10.1017/s0031182003003524>
- McManus (2013). Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*, 140(13), 1617-1623. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000802>
- McSorley & Loukas (2010). The immunology of human hookworm infections. *Parasite immunology*, 32(8), 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01224.x>
- Medzhitov (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819-826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mejri *et al.* (2011). Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cell development. *Parasitology international*, 60(1), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.002>
- Mezioug & Touil-Boukoffa (2012). Interleukin-17A correlates with interleukin-6 production in human cystic echinococcosis: a possible involvement of IL-17A in immunoprotection against *Echinococcus granulosus* infection. *European cytokine network*, 23(3), 112-119. <https://doi.org/10.1684/ecn.2012.0314>
- Miles *et al.* (2019). Combining proteomics and bioinformatics to explore novel tegumental antigens as vaccine candidates against *Echinococcus granulosus* infection. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 15320-15336. <https://doi.org/10.1002/jcb.28799>
- Miles *et al.* (2020a). Linking murine resistance to secondary cystic echinococcosis with antibody responses targeting *Echinococcus granulosus* tegumental antigens. *Immunobiology*, 225(3), 151916. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151916>

Miles *et al.* (2020b). Interactome analysis of CD5 and CD6 ectodomains with tegumental antigens from the helminth parasite *Echinococcus granulosus sensu lato*. International journal of biological macromolecules, 164, 3718-3728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.219>

Morel *et al.* (1988). Surgical treatment of hydatid disease of the liver: a survey of 69 patients. Surgery, 104(5), 859-862.

Moro *et al.* (2008). Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a peri-urban population of Peru. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102(1), 75-78. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.010>

Mottaghian & Saidi (1978). Postoperative recurrence of hydatid disease. The British journal of surgery, 65(4), 237-242. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800650407>

Mourglia-Ettlin *et al.* (2011a). Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior. PLoS neglected tropical diseases, 5(8), e1293. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001293>

Mourglia-Ettlin *et al.* (2011b). *Echinococcus granulosus* glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into antibody-secreting cells and cytokine production. Parasite immunology, 33(11), 621-631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01326.x>

Mourglia-Ettlin *et al.* (2016a). Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice. Immunobiology, 221(1), 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.016>

Mourglia-Ettlin *et al.* (2016b). Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses. Immunobiology, 221(3), 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.012>

Mourglia-Ettlin *et al.* (2018). The ectodomains of the lymphocyte scavenger receptors CD5 and CD6 interact with tegumental antigens from *Echinococcus granulosus sensu lato* and protect mice against secondary cystic echinococcosis. PLoS neglected tropical diseases, 12(11), e0006891. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006891>

Müller-Schollenberger *et al.* (2001). Immunisation with Salmonella typhimurium-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. International journal for parasitology, 31(13), 1441-1449. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00244-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00244-2)

Nahmias *et al.* (1991). High prevalence of human hydatid disease (echinococcosis) in communities in northern Israel: epidemiologic studies in the town of Yirka. Acta tropica, 50(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(91\)90067-t](https://doi.org/10.1016/0001-706x(91)90067-t)

Naik *et al.* (2016). Detection of serum cytokines before and after pharmacological and surgical treatment in patients with cystic echinococcosis. Journal of helminthology, 90(1), 91-95. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000085>

Nakao *et al.* (2010). State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 10(4), 444-452. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.01.011>

Nakao *et al.* (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). International journal for parasitology, 43(12-13), 1017-1029. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002>

Nascimento *et al.* (2014). Ly6C^{hi} monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis. PLoS pathogens, 10(8), e1004282. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004282>

- Neill & McKenzie (2011). Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion. *Trends in parasitology*, 27(5), 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.001>
- Nimmerjahn & Ravetch (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5753), 1510-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1118948>
- Nimmerjahn & Ravetch (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
- Notkins *et al.* (2004). Polyreactivity of antibody molecules. *Trends in immunology*, 25(4), 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.004>
- Ochsenbein *et al.* (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5447), 2156-2159. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2156>
- Orta-Mascaró, *et al.* (2016). CD6 modulates thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 213(8), 1387-1397. <https://doi.org/10.1084/jem.20151785>
- Ortona *et al.* (2005). Screening of an *Echinococcus granulosus* cDNA library with IgG4 from patients with cystic echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape. *Clinical and experimental immunology*, 142(3), 528-538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02939.x>
- Paciorkowski *et al.* (2003). Primed peritoneal B lymphocytes are sufficient to transfer protection against *Brugia pahangi* infection in mice. *Infection and immunity*, 71(3), 1370-1378. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1370-1378.2003>
- Padilla *et al.* (2000). Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics*, 51(12), 993-1001. <https://doi.org/10.1007/s002510000235>
- Panda & Ding (2015). Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(1), 13-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400844>
- Pang *et al.* (2018). Radical versus conservative surgical treatment of liver hydatid cysts: a meta-analysis. *Frontiers of medicine*, 12(3), 350-359. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0559-y>
- Paveley *et al.* (2011). The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production. *International journal for parasitology*, 41(13-14), 1335-1345. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.005>
- Pearce *et al.* (2004). Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological reviews*, 201, 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00187.x>
- Pennoit-De Cooman *et al.* (1974). Experimental secondary echinococcosis of *Echinococcus granulosus*. V. Quantitative aspects of the infection rate. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 25(3), 338-344.
- Piccoli *et al.* (2014). Long-term sonographic and serological follow-up of inactive echinococcal cysts of the liver: hints for a "watch-and-wait" approach. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8), e3057. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003057>
- Pinon *et al.* (1987). Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by enzyme-linked immuno-filtration assay. *European journal of clinical microbiology*, 6(3), 291-295. <https://doi.org/10.1007/BF02017615>
- Ponichtera & Stadecker (2015). Dendritic cell expression of the C-type lectin receptor CD209a: A novel innate parasite-sensing mechanism inducing Th17 cells that drive severe immunopathology in murine schistosome infection. *Experimental parasitology*, 158, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.006>
- Powers *et al.* (1994). Expression and functional analysis of murine B7 delineated by a novel monoclonal antibody. *Cellular immunology*, 153(2), 298-311. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1030>

PrabhuDas *et al.* (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 198(10), 3775-3789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>

Rajan (2005). Natural course of lymphatic filariasis: insights from epidemiology, experimental human infections, and clinical observations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(6), 995-998.

Regueiro *et al.* (2010). Los anticuerpos: ligandos y receptores. In *Inmunología. Biología Y Patología Del Sistema Inmune*, pp. 39-48.

Resnick *et al.* (1996). Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain. *The Journal of biological chemistry*, 271(43), 26924-26930. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26924>

Reyes & Terrazas (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite immunology*, 29(12), 609-619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00973.x>

Reyes *et al.* (2011). TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1323-1333. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1323>

Richards *et al.* (1983). *Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts. *Parasitology*, 86 (Pt 3), 407-417. <https://doi.org/10.1017/s0031182000050605>

Riganò *et al.* (1995a). *In vitro* production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. *Clinical and experimental immunology*, 99(3), 433-439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb05569.x>

Riganò *et al.* (1995b). Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clinical and experimental immunology*, 102(2), 281-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03778.x>

Riganò *et al.* (1996). Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clinical and experimental immunology*, 105(3), 456-459. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-796.x>

Riganò *et al.* (1999a). Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clinical and experimental immunology*, 115(3), 503-507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00843.x>

Riganò *et al.* (1999b). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis. *Clinical and experimental immunology*, 118(1), 95-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.01021.x>

Riganò *et al.* (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infection and immunity*, 69(1), 288-296. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.288-296.2001>

Riganò *et al.* (2004). *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. *Parasite immunology*, 26(1), 45-52. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00682.x>

Riley *et al.* (1984). Immune response to *Echinococcus granulosus*: histological and immunocytochemical observations. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 78(3), 210-212. <https://doi.org/10.1080/00034983.1984.11811803>

Rinaldi *et al.* (2014). Medical treatment versus "Watch and Wait" in the clinical management of CE3b echinococcal cysts of the liver. *BMC infectious diseases*, 14, 492. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-492>

Ritter *et al.* (2010). *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20459-20464. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010337107>

Rodríguez-Sosa *et al.* (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(7), 3135-3139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3135>

Rogan (1998). T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice. *Parasite immunology*, 20(11), 527-533. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00180.x>

Rogan *et al.* (1992). *In vitro* killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. *Acta tropica*, 51(3-4), 291-296. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90047-2](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90047-2)

Rogan *et al.* (2015). Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple?. *Parasite immunology*, 37(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/pim.12149>

Rosenzvit *et al.* (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, 118 (Pt 5), 523-530. <https://doi.org/10.1017/s0031182099004035>

Rückerl & Allen (2014). Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunological reviews*, 262(1), 113-133. <https://doi.org/10.1111/imr.12221>

Ryan *et al.* (2019). In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases E-Book*. Elsevier Health Sciences, 10 Ed., ISBN 0323625509, 9780323625500; Cap 132, Pag 947

Saber *et al.* (2013). Protective and anti-pathology effects of Sm fructose-1,6-bisphosphate aldolase-based DNA vaccine against *Schistosoma mansoni* by changing route of injection. *The Korean journal of parasitology*, 51(2), 155-163. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.2.155>

Saimot (2001). Medical treatment of liver hydatidosis. *World journal of surgery*, 25(1), 15-20. <https://doi.org/10.1007/s002680020003>

Sanjurjo *et al.* (2015). AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *Journal of leukocyte biology*, 98(2), 173-184. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0215-074R>

Sarhan *et al.* (2012). Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *Journal of virology*, 86(7), 3723-3735. <https://doi.org/10.1128/JVI.06956-11>

Sarrias *et al.* (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Critical reviews in immunology*, 24(1), 1-37. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v24.i1.10>

Sarrias *et al.* (2005). A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280(42), 35391-35398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505042200>

Sarrias *et al.* (2007). CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), 11724-11729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702815104>

Schiller (1996). Complications of *Echinococcus* cyst rupture. A study of 30 cases. *JAMA*, 195(3), 220-222.

Severi *et al.* (1997). Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity. *Parasite immunology*, 19(12), 545-552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-172.x>

Shan *et al.* (2011). Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases, 29(2), 111-116.

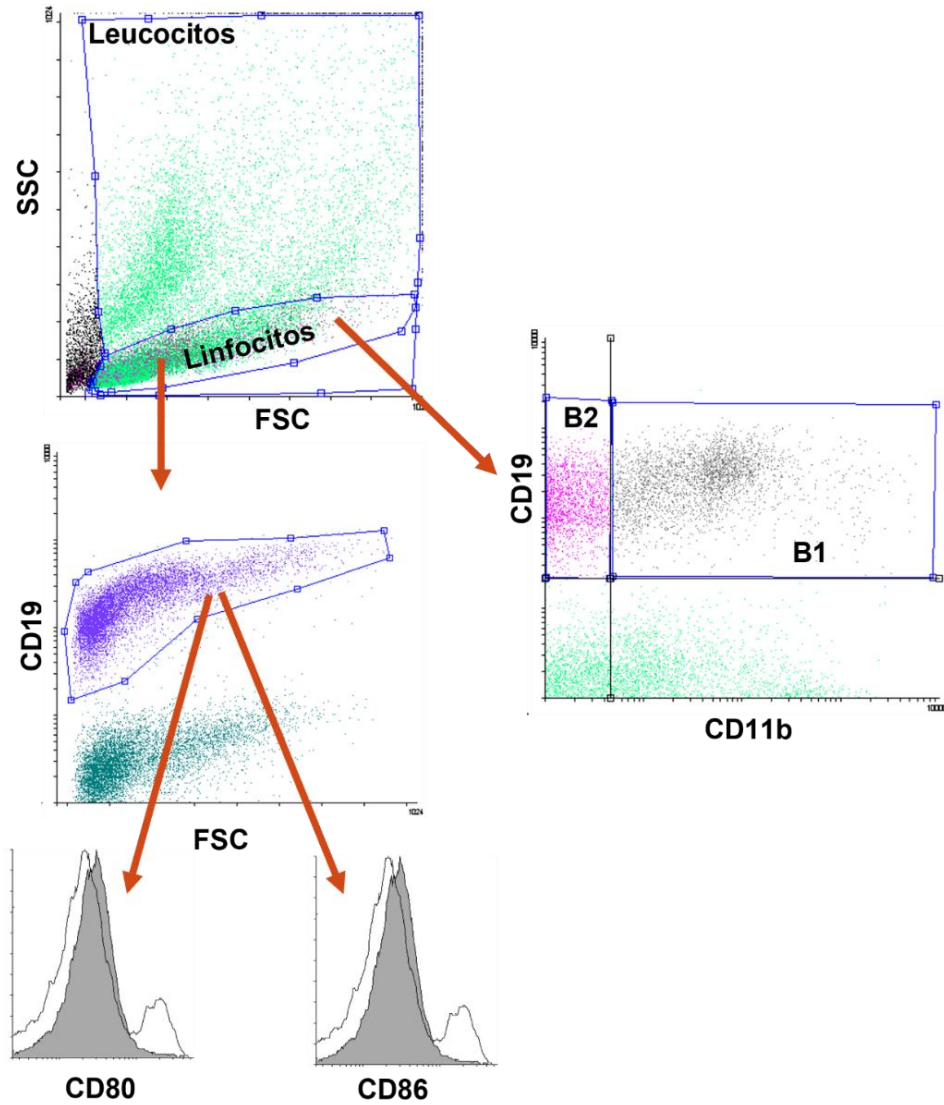
Siles-Lucas & Hemphill (2002). Cestode parasites: application of *in vivo* and *in vitro* models for studies on the host-parasite relationship. *Advances in parasitology*, 51, 133-230. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(02\)51005-8](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(02)51005-8)

- Siles-Lucas *et al.* (2008). 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Experimental parasitology*, 119(4), 516-523. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.009>
- Siracusano *et al.* (2009). Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009, 474368. <https://doi.org/10.1155/2009/474368>
- Skelly *et al.* (1994). Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry*, 269(6), 4247-4253.
- Smyth & Davies (1974). *In vitro* culture of the strobilar state of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *International journal for parasitology*, 4(6), 631-644. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(74\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(74)90028-9)
- Sterla *et al.* (1999). *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. *Parasite immunology*, 21(1), 27-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00197.x>
- Stojkovic *et al.* (2009). Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(9), e524. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000524>
- Sun *et al.* (2005). Upon TLR9 signaling, CD5⁺ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity*, 22(4), 467-477. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.008>
- Taki *et al.* (1992). T cell-dependent antibody production by Ly-1 B cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651, 328-335. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb24632.x>
- Tamarozzi *et al.* (2016). The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite immunology*, 38(3), 170-181. <https://doi.org/10.1111/pim.12301>
- Tarakhovsky *et al.* (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), 535-537. <https://doi.org/10.1126/science.7542801>
- Taylor *et al.* (2012). T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends in immunology*, 33(4), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.01.001>
- Teggi *et al.* (1993). Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(8), 1679-1684. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1679>
- Terrazas (2008). The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(5), 383-392. <https://doi.org/10.2174/156802608783790848>
- Thomas *et al.* (2003). Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(11), 5837-5841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5837>
- Thompson (1995). In *Echinococcus and Hydatid Disease*, Eds. Thompson and Lymbery. Oxford: CAB International, UK; 1995: 1-50
- Thompson (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental parasitology*, 119(4), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
- Todorov *et al.* (1992). Chemotherapy of human cystic echinococcosis: comparative efficacy of mebendazole and albendazole. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 86(1), 59-66. <https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812631>
- Touil-Boukoffa *et al.* (1997). Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 17(4), 211-217. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.211>

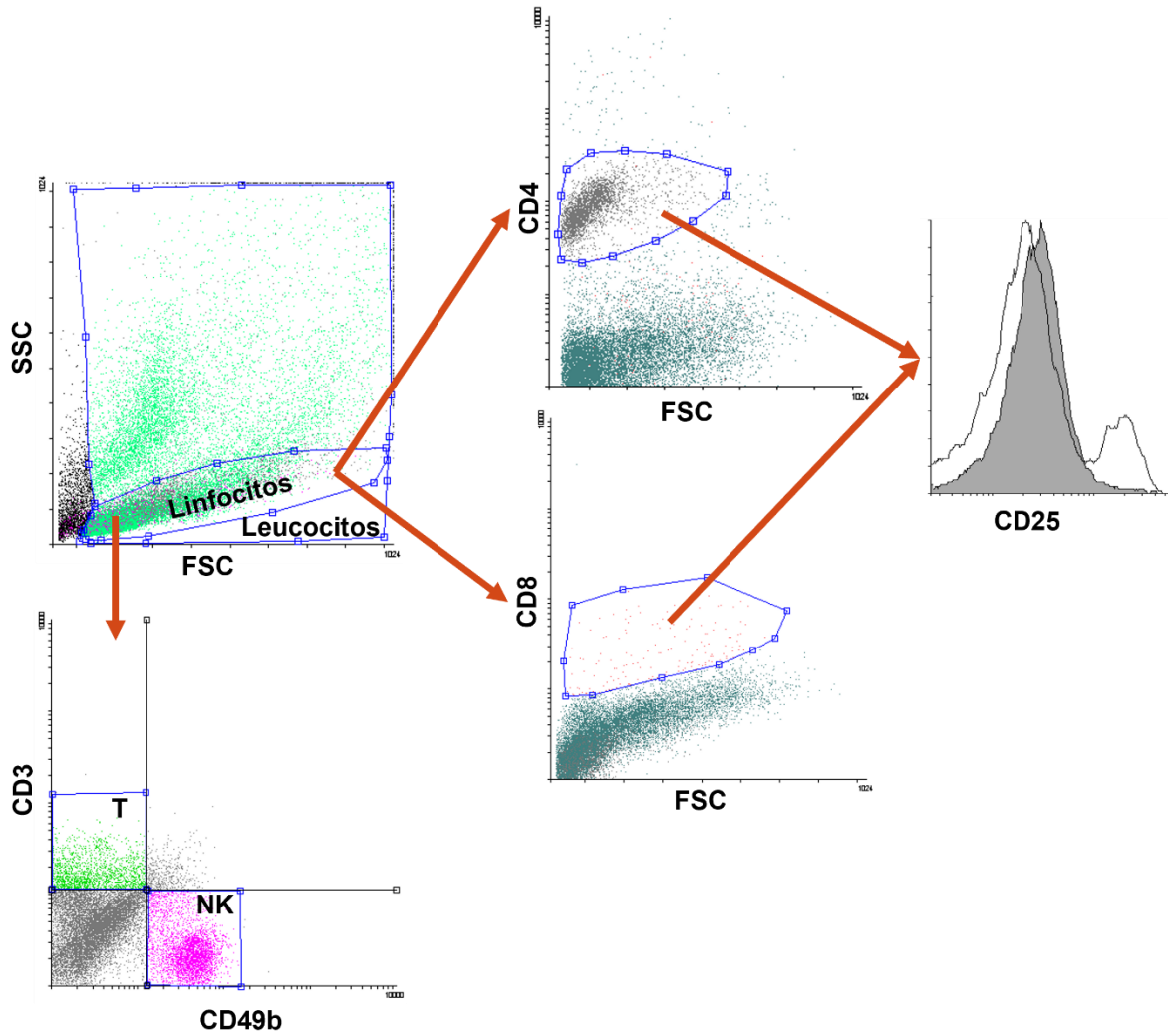
- Tsaroucha *et al.* (2005). Hydatid disease of the abdomen and other locations. *World journal of surgery*, 29(9), 1161-1165. <https://doi.org/10.1007/s00268-005-7775-3>
- Tundup *et al.* (2015). A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFPIII Drives Anti-Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway. *PloS one*, 10(9), e0137495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137495>
- Urrea-Paris *et al.* (2001). Chemoprophylactic praziquantel treatment in experimental hydatidosis. *Parasitology research*, 87(6), 510-512. <https://doi.org/10.1007/s004360100390>
- Velasco-de Andrés *et al.* (2021). The lymphocyte scavenger receptor CD5 plays a nonredundant role in fungal infection. *Cellular & molecular immunology*, 18(2), 498-500. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0434-7>
- Velasco-de-Andrés *et al.* (2020a). The Lymphocytic Scavenger Receptor CD5 Shows Therapeutic Potential in Mouse Models of Fungal Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(1), e01103-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-20>
- Velasco-de-Andrés *et al.* (2020b). Soluble CD5 and CD6: Lymphocytic Class I Scavenger Receptors as Immunotherapeutic Agents. *Cells*, 9(12), 2589. <https://doi.org/10.3390/cells9122589>
- Velasco-Tirado *et al.* (2017). Recurrence of cystic echinococcosis in an endemic area: a retrospective study. *BMC infectious diseases*, 17(1), 455. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2556-9>
- Velupillai & Harn (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 18-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.18>
- Velupillai & Harn (1996). Interleukin-12 and -10 and gamma interferon regulate polyclonal and ligand-specific expansion of murine B-1 cells. *Infection and immunity*, 64(11), 4557-4560. <https://doi.org/10.1128/iai.64.11.4557-4560.1996>
- Vera *et al.* (2009). The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1506-1511. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805846106>
- Wang *et al.* (2008). Helminth infections and intestinal inflammation. *World journal of gastroenterology*, 14(33), 5125-5132. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5125>
- Wen & Craig (1994). Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 51(6), 741-748. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.741>
- Wilson *et al.* (2010). Helminth-induced CD19⁺CD23^{hi} B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *European journal of immunology*, 40(6), 1682-1696. <https://doi.org/10.1002/eji.200939721>
- Wiria *et al.* (2012). Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe?. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 889-901. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0358-0>
- Wright & Bickle (2005). Immune responses following experimental human hookworm infection. *Clinical and experimental immunology*, 142(2), 398-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02945.x>
- Xiao *et al.* (1994). Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on fumarate hydratase, pyruvate kinase, and phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*, 15(1), 69-72.
- Xiao *et al.* (2005). *Echinococcus shiquicus n. sp.*, a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International journal for parasitology*, 35(6), 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.003>
- Yalcin *et al.* (2010). The role of human leucocyte antigens in children with hydatid disease: their association with clinical condition and prognosis. *Parasitology research*, 106(4), 795-800. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1719-z>

- Yanaba *et al.* (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 182(12), 7459-7472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900270>
- Yang *et al.* (2006). Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui Autonomous Region, China. *Bulletin of the World Health Organization*, 84(9), 714-721. <https://doi.org/10.2471/blt.05.025718>
- Yang *et al.* (2012). Immunogenetics of human echinococcosis. *Trends in parasitology*, 28(10), 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.001>
- Yang *et al.* (2019). Molecular Characterization of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase From *Trichinella spiralis* and Its Potential in Inducing Immune Protection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 122. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00122>
- Zani *et al.* (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*, 4(2), 178–201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>
- Zeghir-Bouteldja *et al.* (2013). Comparative study of nitric oxide (NO) production during human hydatidosis: relationship with cystic fluid fertility. *Parasitology research*, 112(2), 649-654. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3181-6>
- Zhang *et al.* (2001). Further studies on an intermediate host murine model showing that a primary *Echinococcus granulosus* infection is protective against subsequent oncospherical challenge. *Parasitology international*, 50(4), 279-283. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(01\)00086-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(01)00086-1)
- Zhang *et al.* (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical microbiology reviews*, 16(1), 18-36. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.18-36.2003>
- Zhang *et al.* (2012). Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 101895. <https://doi.org/10.1155/2012/101895>
- Zheng *et al.* (2018). Identification of emu-TegP11, an EF-hand domain-containing tegumental protein of *Echinococcus multilocularis*. *Veterinary parasitology*, 255, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.04.006>
- Zhu *et al.* (2015). Mechanism of protective immunity by vaccination with recombinant *Echinococcus granulosus* glutathione S-transferase (Chinese strain) in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 10(3), 1127-1132. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2582>
- Ziegler & Buckner (2009). FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes and infection*, 11(5), 594-598. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.002>
- Zimmerman *et al.* (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*, 107(8), 3212-3220. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3881>

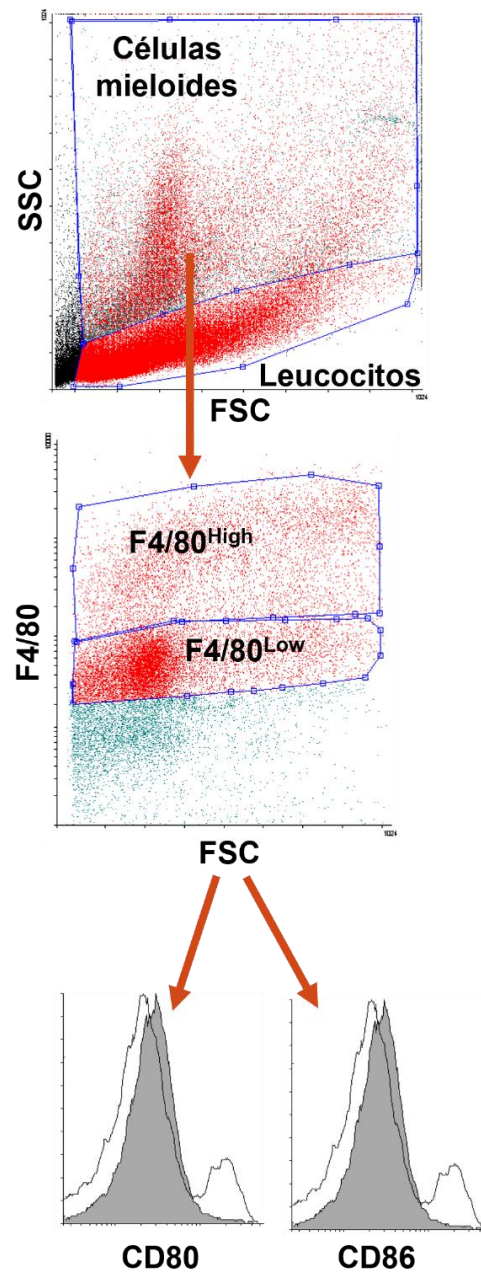
Anexo 1. Citometría de Flujo: Estrategia de *gating* para células B.



Anexo 2. Citometría de Flujo: Estrategias de *gating* para células T y NK.



Anexo 3. Citometría de Flujo: Estrategia de *gating* para monocitos/macrófagos.



Anexo 4. Artículo de primer autor publicado en una revista internacional arbitrada.



Polyreactive antibodies as potential humoral biomarkers of host resistance to cystic echinococcosis

Joaquín García-Luna | Javier Magnone | Sebastián Miles | Camila López-Santurio | Sylvia Dematteis | Gustavo Mourglia-Ettlin

Área Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Gustavo Mourglia-Ettlin, Área Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Email: gmourglia@higiene.edu.uy

Funding information

The present work derives from a research grant supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) from Uruguay (grant code: FCE-1-2017-1-135537). CSIC (Universidad de la República, Uruguay) and PEDECIBA-Química (Uruguay) also contributed with general financial support.

Abstract

Polyreactive antibodies (pAb) bind to a broad range of unrelated structures, providing hosts with functional components able to rapidly recognize and protect against different pathogens. However, their roles against helminth parasites are still unexplored. Here, pAb profiles were analysed in cystic echinococcosis (CE), a zoonosis caused by the cestode *Echinococcus granulosus sensu lato*. Levels of anti-DNP (2,4-dinitrophenyl-hapten) antibodies were measured as a surrogate parameter of pAb in different biological settings. Firstly, levels of serum and peritoneal pAb were measured during early experimental secondary CE, using both high (Balb/c) and low (C57Bl/6) susceptible mouse strains. Serum pAb mostly differed in normal mice, being pAb levels of IgG subclasses with poor anti-parasite activities predominant in Balb/c animals. Conversely, peritoneal pAb isotypes/subclasses with efficient anti-parasite activities predominated in normal and infected C57Bl/6 mice. Secondly, sera from potentially resistant patients, susceptible individuals and healthy donors were analysed, showing higher pAb levels of the IgA and IgG—particularly IgG1— isotypes in potentially resistant individuals compared to control groups. Finally, since remarkable differences were observed in pAb profiles according to the intrinsic host susceptibility to the infection, we proposed here that pAb might be considered as potential humoral biomarkers for host resistance to CE.

KEYWORDS

biomarkers, cystic echinococcosis, *Echinococcus granulosus*, polyreactive antibodies, resistance

1 | INTRODUCTION

Cystic echinococcosis (CE) is a cosmopolitan zoonosis caused by the larval stage of the cestode parasite *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.). Primary CE occurs in intermediate hosts (ungulates, accidentally humans) after ingestion of oncosphere-containing eggs, which develop into metacestodes (hydatid cysts) mainly in the host liver and lungs. Secondary CE occurs after spillage of protoscoleces from a fertile cyst within an infected intermediate host, since protoscoleces' developmental plasticity allows them to become new cysts

within intermediate hosts or adult worms if ingested by definitive hosts (usually dogs).¹

Human studies on CE susceptibility/resistance are scarce,²⁻⁴ although immune responses and host immunogenetics were suggested to determine the infection outcome.^{5,6} Accordingly, studies performed in individuals seropositive for CE, but ultrasound normal, reported a unique antibody profile potentially associated with host resistance.⁷ Additionally, mouse strains showing differences in susceptibility to secondary CE exhibited distinct parasite-specific immune responses.⁸⁻¹⁰

Polyreactive antibodies (pAb) are a major component of the natural antibody repertoire characterized by their low-affinity binding to a wide variety of self and nonself structurally unrelated antigens.^{11,12} Generally, pAb have been suggested as a first-line defence against infections, since their binding may delay pathogens' propagation and/or increase their immunogenicity through antibody targeting.^{13,14} Functional studies have revealed that the broad anti-bacterial activity of normal serum largely depends on pAb which bind to most bacteria, fix complement and enhance phagocytosis.¹⁵ Also, certain viral infections induce high levels of pAb, playing either beneficial or detrimental roles.¹⁶ However, reports on pAb in parasite infections are lacking. Therefore, we here described pAb profiles in CE as a contribution to the understanding of host resistance.

2 | MATERIALS AND METHODS

Animal experiments were performed in compliance with CHEA (Universidad de la República, UdelaR), and the Ethics Committee of Facultad de Química (UdelaR) approved the protocols (codes: 101900-001065-11 and 101900-001480-14). Protoscoleces were obtained from fertile bovine hydatid cysts from local abattoirs following own previously published protocols.⁸ Female Balb/c and C57Bl/6 mice (6–8 weeks old) were obtained from DILAVE (Uruguay) and housed at Instituto de Higiene (UdelaR). Experimental infections were performed through i.p. inoculation of mice ($n = 15$ per strain) with 2000 viable protoscoleces in 200 μ L of sterile PBS. Mice ($n = 5$ per strain and time point) were bled at 0 (pre-infection), 7 and 21 days p.i., and after euthanasia, peritoneal lavages were performed with 1 mL of sterile PBS. Sera and cells-free peritoneal lavages were stored at -80°C until use.⁸

Human samples from an own serum bank obtained according to Ethics Statements described in¹⁷ were clustered into three groups: (a) ultrasound normal (UN) individuals, (b) CE patients and (c) healthy donors (HD), according to demographic data described in.⁷ UN individuals (12 females and 12 males) were seropositive to *E granulosus* s.l. antigens but negative for CE through imaging studies (sonography and X-rays) during a follow-up period of 2 years, while CE patients (11 females and 10 males) were surgically confirmed cases with positive serological results, and HD individuals (13 females and 13 males) were healthy people seronegative and unsuspected for CE through sonography.^{7,17} No relevant differences were reported among groups according to age (median: range; in years old): UN (30: 9–60), CE (43: 12–78) and HD (31: 11–71), as described in.⁷

Anti-DNP antibodies were measured by ELISA according to,¹⁸ using appropriate peroxidase-labelled conjugates, TMB plus H_2O_2 as enzyme substrate, and recording absorbance values at 450 nm. In all cases, statistical analyses were performed using nonparametric Mann-Whitney *U* test (significance, $P < .05$).

3 | RESULTS

Measuring pAb in biological samples requires particular approaches since they do not exhibit homogenous binding and affinity patterns.

To overcome this issue, levels of DNP-specific antibodies have been reported as a reliable pAb index.¹⁸ To explore the potential role of pAb in *E granulosus* s.l. infection, we firstly characterized anti-DNP antibodies during early infection in Balb/c and C57Bl/6 mice, which exhibit high and low permissiveness to experimental secondary CE, respectively.⁸ Results in Figure 1 show serum pAb levels. Uninfected Balb/c mice exhibited higher levels of anti-DNP IgA, IgG1 and IgG3 antibodies than C57Bl/6 mice (3, 5 and 16 times higher, respectively). Regarding induced anti-DNP IgM and IgA, both strains showed similar behaviours. However, the production kinetics of IgG1 and IgG3 was faster in C57Bl/6 mice, and although IgG2a/c antibodies did not show a significant increase in any strain, C57Bl/6 animals reached roughly 3 times higher levels than Balb/c mice at day 21 p.i. (Figure 1). Results in Figure 2 show remarkable differences in peritoneal pAb. While normal C57Bl/6 mice showed higher levels of anti-DNP IgG2a/c and IgG2b antibodies than Balb/c animals (8 times higher in both cases), the contrary was observed regarding IgG3 antibodies (but only 2 times higher). Anti-DNP-induced peritoneal antibodies showed similar production kinetics in both strains for IgM, IgA and most IgG subclasses, although significantly higher levels of IgM (3 times higher) were detected 7 days p.i. in C57Bl/6 mice (Figure 2).

Then, we characterized anti-DNP antibodies in human sera from potentially resistant patients (UN), susceptible individuals (CE) and healthy donors (HD).⁷ Results in Figure 3 show that UN individuals exhibited significantly higher levels of anti-DNP IgA than any other group (3 times higher), while showing significantly lower levels of anti-DNP IgM (9 times lower). Additionally, levels of anti-DNP IgG1 antibodies predominated in UN individuals over HD persons, while IgG4 antibodies were shown to predominate in HD individuals over UN and CE groups. No significant differences were observed for neither polyreactive IgG2 nor IgG3 antibodies (Figure 3).

4 | DISCUSSION

In helminthiasis, antibody-mediated protective immunity is not a universal phenomenon,¹⁹ and their immunological relevance in CE is still a matter of debate. Although pAb play relevant roles in several infectious diseases, no reports are available on their roles in helminth infections. In order to contribute to the understanding of their potential roles in *E granulosus* s.l. infection, we analysed here the profile of pAb in different CE settings.

In the murine model of secondary CE, infection develops firstly with a strong control of local inflammation (pre-encystment phase), followed by the action of mostly inefficient anti-parasite immune effectors (post-encystment phase).^{20,21} In this regard, local (peritoneal cavity) and systemic (serum) antibody responses in infected Balb/c and C57Bl/6 mice were associated with their differences in permissiveness to secondary CE.^{8,10} Accordingly, our results on serum (Figure 1) and peritoneal (Figure 2) pAb from both strains were in line with such reports. Protective roles of natural antibodies have been described in numerous infections;^{14,22} however, their functions not only depend on the ability to recognize pathogens but also on

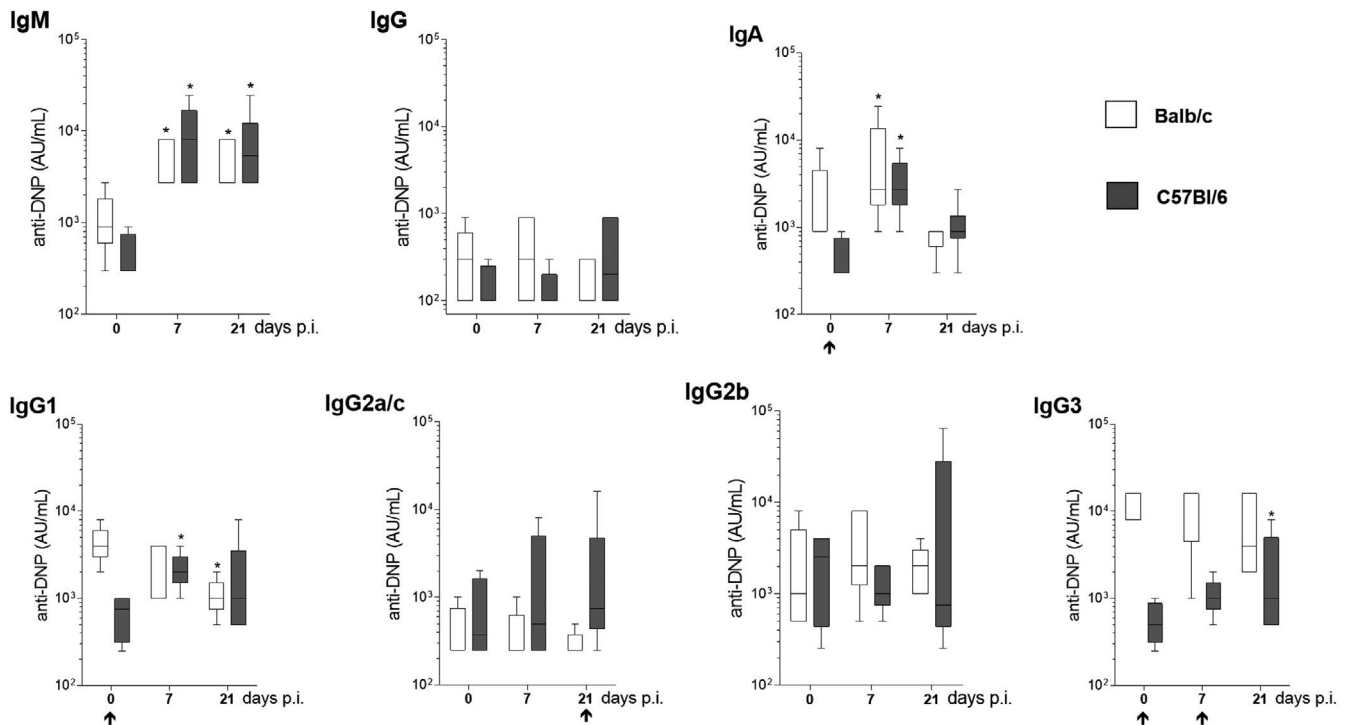


FIGURE 1 Serum pAb profiles in early murine secondary CE. Balb/c and C57Bl/6 mice were inoculated i.p. with 2000 viable protoscolexes, and bled at 0 (pre-infection), 7, and 21 days p.i. Sera were obtained by regular means and stored at -80°C until use. Serum levels of anti-DNP antibodies were measured by ELISA using appropriate peroxidase-labelled mouse (isotype/subclass) antibodies. Results are shown in box-and-whiskers style. Statistical significance (nonparametric Mann-Whitney U test; $P < .05$) between strains is indicated by arrows (\uparrow), and between normal and infected mice within a strain by asterisks (*)

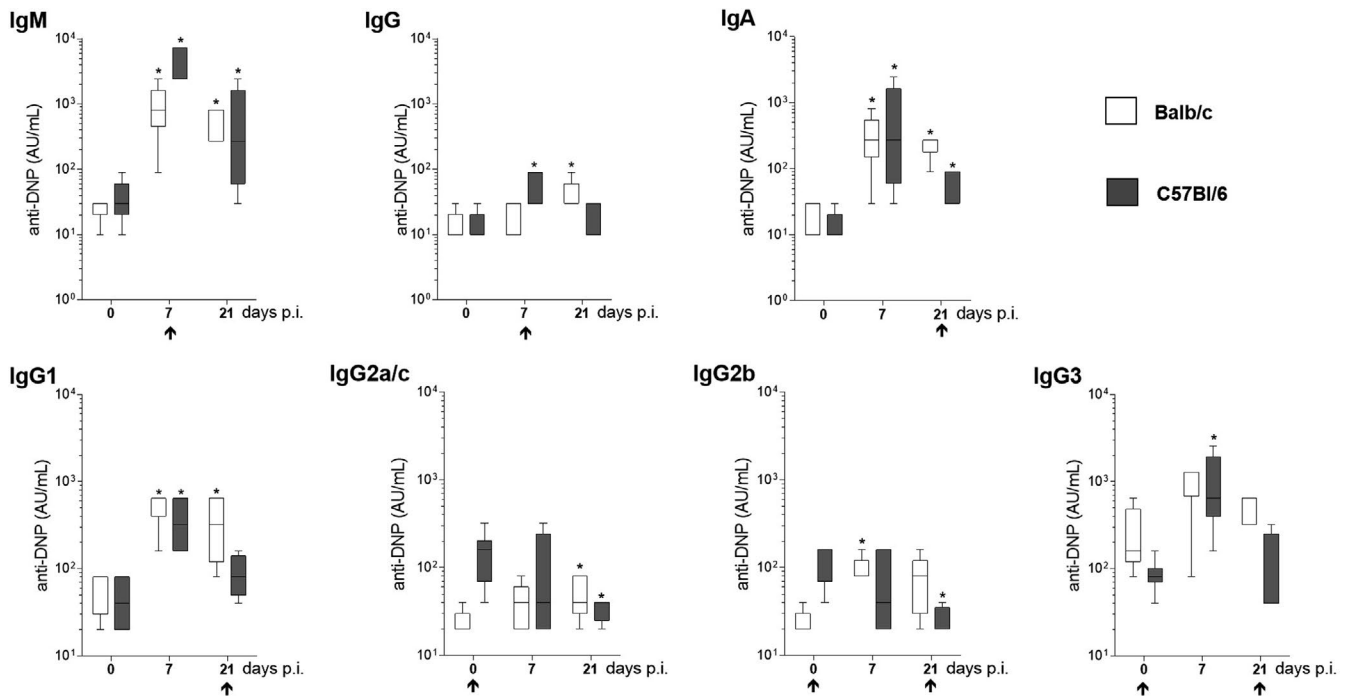


FIGURE 2 Peritoneal pAb profiles in early murine secondary CE. Balb/c and C57Bl/6 mice were inoculated i.p. with 2000 viable protoscolexes, and euthanized at 0 (pre-infection), 7 and 21 days p.i., and their peritoneal cavities were washed with 1 mL of sterile PBS. Cells-free peritoneal lavages were stored at -80°C until use. Peritoneal levels of anti-DNP antibodies were measured by ELISA using appropriate peroxidase-labelled anti-mouse (isotype/subclass) antibodies. Results are shown in box-and-whiskers style. Statistical significance (nonparametric Mann-Whitney U test; $P < .05$) between strains is indicated by arrows (\uparrow), and between normal and infected mice within a strain by asterisks (*)

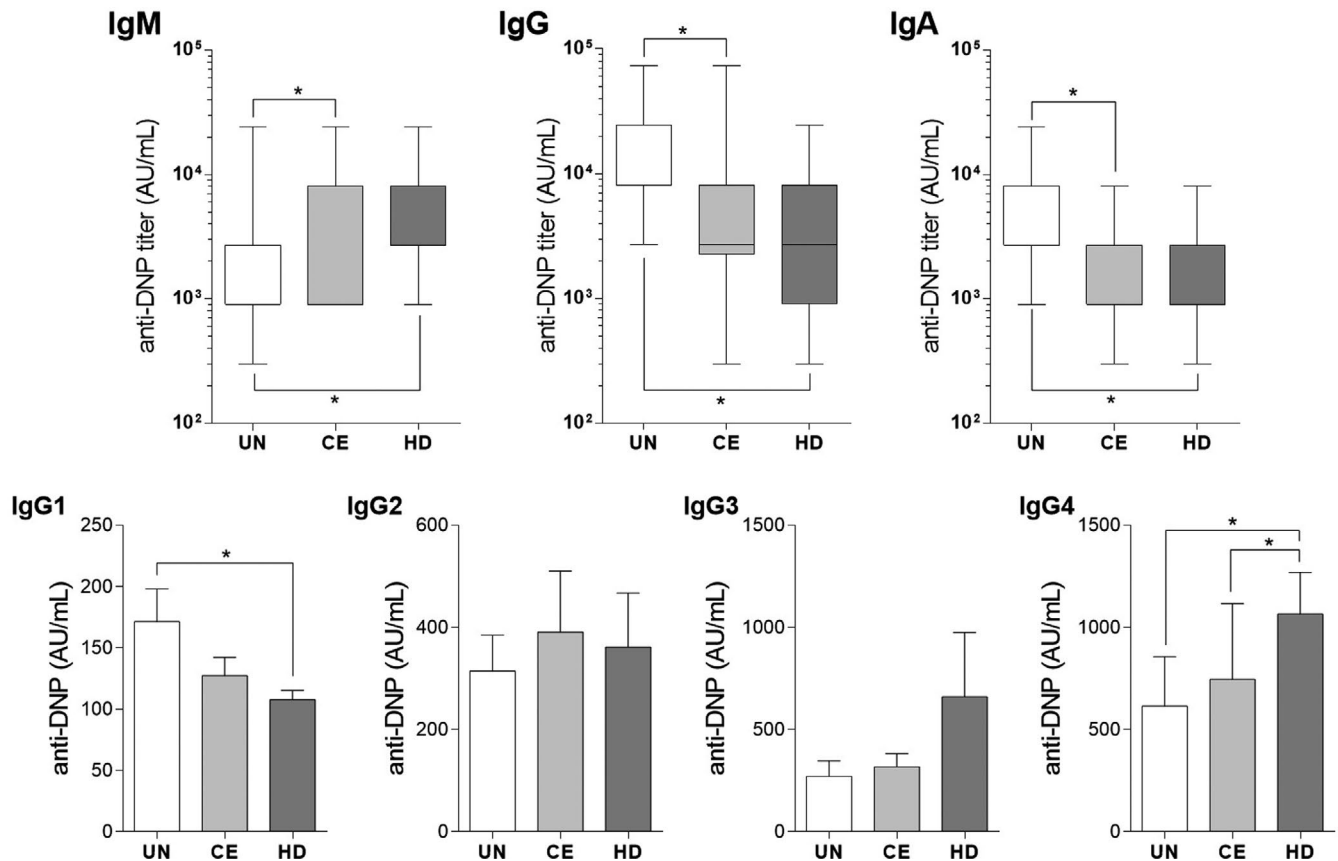


FIGURE 3 Characterization of pAb profiles in human samples. Human serum samples were clustered into three groups: (a) UN individuals (seropositive to *E. granulosus* s.l. antigens but negative for CE through image studies during a follow-up period of 2 y), (b) CE patients (surgically confirmed cases with positive serological results) and (c) healthy donors (HD, healthy people seronegative and nonsuspected for CE through sonography). Levels of anti-DNP antibodies were measured by ELISA using appropriate peroxidase-labelled anti-human (isotype/subclass) antibodies. For visualization purposes only, results of antibody isotypes and IgG subclasses are shown in box-and-whiskers and mean + SEM styles, respectively. In any case, statistical significance ($P < .05$) between groups is indicated by asterisks (*) and was assessed through nonparametric Mann-Whitney *U* test

the infection site. In secondary CE, protoscoleces are intraperitoneally inoculated into mice, and therefore, the natural antibodies able to interact with the parasite are those pre-existing locally. Normal C57Bl/6 mice showed higher levels of peritoneal anti-DNP IgG2a/c and IgG2b antibodies (Figure 2), which are excellent complement activators, and exhibit the highest cellular activation/inhibition ratio based on their preferential binding to FcγRs.^{23,24} *E. granulosus* s.l. protoscoleces were shown susceptible to the killing by either activated macrophages^{25,26} or the complement system.²⁷⁻²⁹ Therefore, high levels of pre-existing peritoneal IgG2a/c and IgG2b pAb might correlate with the lower susceptibility of C57Bl/6 mice to secondary CE. Besides, pAb have been also shown to be induced upon different microbial challenges.^{16,30} In this regard, production kinetics of induced anti-DNP antibodies were generally faster in C57Bl/6 mice, either systemically (Figure 1) and locally (Figure 2). Additionally, isotypes/subclasses with excellent anti-protoscoleces activities, like IgM and IgG2a/c, reached higher levels in infected C57Bl/6 mice, suggesting also a potential correlate with their lower susceptibility to secondary CE.

Regarding human CE, early studies indicated a sequential switch from a predominance of specific IgG1 to IgG4 antibodies with disease progression.^{31,32} Also, albendazole-treated patients showing good therapeutic/clinical response exhibited significantly lower IgG4 levels than poor/nonresponders, while the opposite trend was observed for IgG1 levels.^{33,34} Similar results were reported considering the disease as progressive vs. stable.^{35,36} Our results on pAb in UN individuals were in accordance with the above-mentioned reports, since the UN group exhibited high levels of anti-DNP IgG1, while showing low levels of IgG4 (Figure 3). Interestingly, our results may seem to be at least controversial regarding polyreactive IgM since it has been generally shown to provide early protection against pathogens^{14,22,37} while UN individuals showed the lowest anti-DNP IgM levels (Figure 3). *E. granulosus* s.l. has been suggested to be more susceptible to immune effectors during early infection,²⁰ when oncospheres are susceptible to complement-dependent killing by different intermediate hosts,³⁸⁻⁴⁰ including humans.⁴¹ Therefore, low levels of anti-DNP IgM antibodies in UN individuals would either reflect its potential consumption in a previous parasite exposure or

just be due to isotype switching towards IgG/IgA as reported in other diseases, mainly viral infections.¹⁶

In conclusion, our results expanded to helminth parasites, a previously unexplored group of pathogens, the general roles attributed to pAb as relevant immune effectors in infectious diseases. Remarkable differences in pAb profiles were reported here according to the intrinsic susceptibility to CE in murine models and in humans. Therefore, we proposed pAb levels as a potential humoral biomarker for host resistance to *E granulosus* s.l. infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to CSIC (Universidad de la República, Uruguay), PEDECIBA-Química (Uruguay) and ANII (Uruguay) for their general financial support. JG-L and SM are recipients of scholar fellowships from ANII (Uruguay) and CAP (Universidad de la República, Uruguay), respectively.

CONFLICT OF INTEREST

None.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JG-L, JM and SM performed experiments, analysed and interpreted data, and contributed to the writing of the manuscript. CL-S performed experiments, analysed and interpreted data. SD provided human serum samples and contributed to the writing of the manuscript. GM-E designed the study, obtained mouse samples, coordinated and supervised the project, contributed to the interpretation of the results, and wrote the manuscript. All authors discussed the results and approved the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Sylvia Dematteis  <https://orcid.org/0000-0002-2144-2444>

Gustavo Mourglia-Ettlin  <https://orcid.org/0000-0002-2418-2908>

REFERENCES

1. Thompson RC. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*. 2008;119(4):439-446. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
2. Kiper N, Gerçeker F, Utine E, et al. TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in childhood cystic echinococcosis. *Parasitol Int*. 2010;59(2):283-285. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.02.012>
3. Yalcin E, Kiper N, Tan C, et al. The role of human leucocyte antigens in children with hydatid disease: their association with clinical condition and prognosis. *Parasitol Res*. 2010;106(4):795-800. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1719-z>
4. Azab ME, Bishara SA, Ramzy RM, Oteifa NM, El-Hoseiny LM, Ahmed MA. The evaluation of HLA-DRB1 antigens as susceptibility markers for unilocular cystic echinococcosis in Egyptian patients. *Parasitol Res*. 2004;92(6):473-477. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1073-0>
5. Yang Y, Ellis MK, McManus DP. Immunogenetics of human echinococcosis. *Trends Parasitol*. 2012;28(10):447-454. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.001>
6. Azab ME, Bishara SA, Helmy H, et al. Association of some HLA-DRB1 antigens with *Echinococcus granulosus* specific humoral immune response. *J Egypt Soc Parasitol*. 2004;34(1):183-196.
7. Mourglia-Ettlin G, Miles S, Hernández A, Dematteis S. Antibody profiling in ultrasound normal individuals with positive serology for cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(2):93-100. <https://doi.org/10.1111/pim.12302>
8. Mourglia-Ettlin G, Cucher M, Arbildi P, Rosenzvit M, Dematteis S. Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice. *Immunobiology*. 2016;221(1):103-115. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.016>
9. Mourglia-Ettlin G, Merlino A, Capurro R, Dematteis S. Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: associations between mouse strains and early peritoneal immune responses. *Immunobiology*. 2016;221(3):418-426. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.012>
10. Miles S, Magnone J, Cyrklaff M, et al. Linking murine resistance to secondary cystic echinococcosis with antibody responses targeting *Echinococcus granulosus* tegumental antigens. *Immunobiology*. 2020;225(3):1519-16. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151916>
11. Notkins AL. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol*. 2004;25(4):174-179. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.004>
12. Dimitrov JD, Planchais C, Roumenina LT, Vassilev TL, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis. *J Immunol*. 2013;191(3):993-999. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300880>
13. Ochsenein AF, Fehr T, Lutz C, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999;286(5447):2156-2159. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2156>
14. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):778-786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>
15. Zhou ZH, Zhang Y, Hu YF, Wahl LM, Cisar JO, Notkins AL. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe*. 2007;1(1):51-61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.01.002>
16. Warter L, Appanna R, Fink K. Human poly- and cross-reactive anti-viral antibodies and their impact on protection and pathology. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):148-161. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8268-8>
17. Hernández A, Cardozo G, Dematteis S, et al. Cystic echinococcosis: analysis of the serological profile related to the risk factors in individuals without ultrasound liver changes living in an endemic area of Tacuarembó, Uruguay. *Parasitology*. 2005;130(Pt 4):455-460. <https://doi.org/10.1017/s0031182004006717>
18. Gunti S, Notkins AL. Polyreactive antibodies: function and quantification. *J Infect Dis*. 2015;212(suppl 1):S42-S46. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu512>
19. Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol*. 2011;32(2):80-88. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.11.005>
20. Rogan MT, Bodell AJ, Craig PS. Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple? *Parasite Immunol*. 2015;37(1):1-9. <https://doi.org/10.1111/pim.12149>
21. Tamarozzi F, Mariconti M, Neumayr A, Brunetti E. The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(3):170-181. <https://doi.org/10.1111/pim.12301>
22. Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2015;194(1):13-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400844>

23. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*. 2005;310(5753):1510-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1118948>
24. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006;24(1):19-28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
25. Jenkins P, Dixon JB, Rakha NK, Carter SD. Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Mesocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. *Parasitology*. 1990;100(Pt 2):309-315. <https://doi.org/10.1017/s003118200061321>
26. Dematteis S, Rottenberg M, Baz A. Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol*. 2003;25(4):189-197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00620.x>
27. Ferreira AM, Trecu T, Reisin I. *Echinococcus granulosus*: study of the in vitro complement activation by protoscolexes by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane. *Exp Parasitol*. 1992;75(3):259-268. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90211-r](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90211-r)
28. Ferreira AM, Breijo M, Sim RB, Nieto A. Contribution of C5-mediated mechanisms to host defence against *Echinococcus granulosus* hydatid infection. *Parasite Immunol*. 2000;22(9):445-453. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00323.x>
29. Breijo M, Anesetti G, Martínez L, Sim RB, Ferreira AM. *Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp Parasitol*. 2008;118(2):188-196. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.07.014>
30. Gunti S, Messer RJ, Xu C, et al. Stimulation of Toll-Like Receptors profoundly influences the titer of polyreactive antibodies in the circulation. *Sci Rep*. 2015;5:15066. <https://doi.org/10.1038/srep15066>
31. Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Trop*. 1997;64(1-2):53-63. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(96\)00637-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(96)00637-7)
32. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:639362. <https://doi.org/10.1155/2012/639362>
33. Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, et al. Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(2):281-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03778.x>
34. Riganò R, Profumo E, Di Felice G, Ortona E, Teggi A, Siracusano A. In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. *Clin Exp Immunol*. 1995;99(3):433-439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb05569.x>
35. Daeki AO, Craig PS, Shambesh MK. IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94(4):319-328. <https://doi.org/10.1080/00034983.2000.11813546>
36. Riganò R, Ioppolo S, Ortona E, et al. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin Exp Immunol*. 2002;129(3):485-492. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01925.x>
37. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):347-362. <https://doi.org/10.1007/s00281-004-0182-2>
38. Heath DD, Holcman B, Shaw RJ. *Echinococcus granulosus*: the mechanism of oncosphere lysis by sheep complement and antibody. *Int J Parasitol*. 1994;24(7):929-935. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90156-2)
39. Heath DD, Lawrence SB. Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunol*. 1996;18(7):347-357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-114.x>
40. Lightowers MW, Heath DD. Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* infection in animal intermediate hosts. *Parassitologia*. 2004;46(1-2):27-31.
41. Rogan MT, Craig PS, Zehyle E, Masinde G, Wen H, Zhou P. In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. *Acta Trop*. 1992;51(3-4):291-296. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90047-2](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90047-2)

How to cite this article: García-Luna J, Magnone J, Miles S, López-Santurio C, Dematteis S, Mourglia-Ettlin G. Polyreactive antibodies as potential humoral biomarkers of host resistance to cystic echinococcosis. *J Prod Innov Manag*. 2020;00:e12802. <https://doi.org/10.1111/pim.12802>