

Informe final publicable de proyecto

Macrófagos reguladores inducidos por la infección crónica con *Echinococcus granulosus*

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156234

31/01/2023

CASARAVILLA GÓMEZ, Cecilia (Responsable Técnico - Científico)

DÍAZ YACOBAZZO, Alvaro Juan (Investigador)

GREZZI SANTANGELO, Leticia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Los parásitos helmintos co-evolucionaron con el sistema inmune de los organismos a los que infectan, desarrollando mecanismos de inhibición de dicho sistema, para sobrevivir. Nuestro grupo estudia el modelo de la larva del cestodo *Echinococcus granulosus*. Nos interesa entender cómo el parásito establece infecciones crónicas altamente exitosas, creciendo hasta varios cm de diámetro sin que el sistema inmune reaccione en forma acorde. En este proyecto evaluamos la interacción del parásito con células clave en el inicio y regulación de la respuesta inmune: los macrófagos. Estas células, altamente plásticas, pueden dar un abanico amplio de respuestas de acuerdo a las señales que reciben: desde una respuesta inflamatoria y microbicida, que tiene como fin la eliminación del agente infeccioso, a una anti-inflamatoria, que tiene como fin el apagado de la inflamación y la reparación de los tejidos. Para estudiar los efectos del parásito sobre estas células utilizamos dos modelos en ratón: la infección experimental crónica, y la inyección de los ratones con los principales componentes que el parásito expone para la interacción con las células (los componentes de su cubierta externa, la capa laminar). Observamos que en ambos modelos se genera localmente un ambiente inmunosuprimido. Los macrófagos muestran características supresoras, y de hecho inhiben la respuesta de células altamente eficientes en el combate a los agentes infecciosos, como son los linfocitos T. Además, observamos la expansión de una población de linfocitos T inhibidores de la respuesta inmune, los linfocitos T reguladores. Los resultados indican que la capa laminar del parásito contribuiría en forma significativa a la inducción de todos estos efectos. La comprensión de los mecanismos por los cuales el parásito controla la inflamación será útil para aplicar dicho conocimiento al control de la inflamación asociada a otras patologías como el asma alérgico o enfermedades autoinmunes.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Inmunología

Palabras clave: macrófago / *Echinococcus granulosus* / PD-L1 /

Introducción

Los parásitos helmintos establecen generalmente infecciones crónicas y asintomáticas, al ser capaces de controlar la respuesta inmune de sus hospederos. Los diferentes helmintos desarrollaron diversas estrategias para lograr este control, centradas en la manipulación de los circuitos de regulación negativa propios del sistema inmune [1].

Echinococcus granulosus es el parásito helminto causante de la hidatidosis. Su estadio larvario, conocido como hidátide, infecta particularmente hígado y pulmón de ungulados domésticos, y establece infecciones crónicas altamente exitosas. Este parásito es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria que ocurre al inicio de la infección (en la que se observa infiltrado de macrófagos (M); y eosinófilos, entre otras células), para luego crecer de 1 a 5 centímetros de diámetro por año sin que se dispare una respuesta inmune acorde a su tamaño y persistencia [2][3][4], representando un ejemplo extremo de control de la respuesta inmune de su hospedero. Los mecanismos desarrollados por el parásito para lograr este control se conocen muy poco [5].

La hidátide es una estructura sub-esférica, llena de líquido y rodeada por una pared. La pared está formada por dos capas: una interna, llamada capa germinativa, que representa el tejido vivo del parásito y sintetiza los demás componentes de la estructura, y una externa, llamada capa laminar (LL, por laminated layer), gruesa y acelular. La LL, rica en mucinas, constituye la principal fuente de componentes expuestos para interactuar con el sistema inmune. En el interior de la hidátide se generan los protoescólices, que son estadios infectivos capaces de generar nuevas hidátides en el medio interno del hospedero infectado (infección secundaria). Esta última propiedad es la base del modelo de infección por *E. granulosus* que se estableció en el ratón como hospedero experimental, y que ha sido la principal herramienta para el estudio de esta infección [6][7], más allá de estudios histopatológicos que se han realizado en hospederos naturales.

Los mecanismos de evasión de helmintos suelen operar sobre células del sistema inmune innato, como M y células dendríticas, responsables de decodificar las señales de los patógenos e instrumentar la respuesta adaptativa. Varios trabajos sugieren la importancia de los M en la interacción con *E. granulosus*, por ejemplo, estudios histológicos han demostrado que estas células establecen un contacto íntimo con la superficie expuesta por la hidátide [8][9]. En cuanto a la función de los M en el contexto de la infección por este parásito, y particularmente durante la infección crónica, los reportes son escasos.

Los M son células presentes en prácticamente todos los tejidos, donde cumplen funciones variadas tanto en el mantenimiento de la homeostasis como durante procesos infecciosos o de daño tisular [10]. De acuerdo a su ontogenia (origen embrionario o hematopoyético) y localización, los M desarrollan características fenotípicas heterogéneas y

funciones altamente específicas. En forma superpuesta a esta heterogeneidad, estas células cambian su fenotipo en respuesta a una gran diversidad de estímulos, lo que es determinante para la instrumentación de respuestas ajustadas a diferentes contextos de inflamación [11]. Así, durante una respuesta inflamatoria clásica (de tipo 1), por ejemplo en respuesta a agonistas de receptores Toll o IFN-gama, los M adoptan un fenotipo M1, caracterizado por la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alfa, IL-6, IL-1beta) y mediadores tóxicos como óxido nítrico, con alto potencial microbicida [12]. En una respuesta inflamatoria de tipo 2, como la que se observa frente a infecciones por helmintos, los M responden a IL-4/IL-13 proliferando y adoptando un fenotipo alternativamente activado, M2, con expresión de moléculas como CD206, Relm-alfa, Ym-1 y arginasa-1, y funciones centradas en la reparación de los tejidos (en concordancia con el gran daño tisular que generalmente generan las infecciones por estos patógenos) [11][13][14]. Más allá de la respuesta a IL-4/IL-13, los M pueden responder a una amplia diversidad de otros estímulos adoptando una gama de fenotipos anti-inflamatorios que se conocen como M2-like, que pueden compartir la expresión de algunas de las moléculas descritas para los M2, pero también expresar otros marcadores específicos y funciones particulares [14]. En particular, frente a algunas infecciones por parásitos helmintos y a tumores se ha observado la inducción de fenotipos M2-like que, además de expresar Relm-alfa, Ym-1 y arginasa-1, presentan altos niveles de las moléculas co-inhibidoras PD-L1 y PD-L2 en su superficie [15][16][17][18]. PD-L1 y PD-L2 son centrales en la regulación negativa del sistema inmune y el mantenimiento de la tolerancia periférica, inhibiendo las funciones efectoras de los linfocitos T al interactuar con su receptor en la superficie de estas células: PD-1. PD-L1 se expresa en diversos tipos celulares (tanto del sistema inmune como diversas células no hematopoyéticas). PD-L2 tiene una expresión más restringida al sistema inmune: M y células dendríticas. La expresión de estas moléculas en la periferia se ha visto relacionada con la inducción de linfocitos T reguladores, la inhibición de la proliferación y funciones efectoras de linfocitos T colaboradores que llegan a los tejidos (estado de hipo-respuesta), y en contextos de infecciones crónicas por virus, así como en cáncer, la inducción de un fenotipo de linfocito T exhausto, no funcional. Todos estos efectos son determinantes para el establecimiento de un ambiente favorable al patógeno (o el tumor) [19][20]. La presencia de M M2-like ha sido descrita en diversas infecciones por helmintos [21]. Las funciones propuestas para estas células en los diferentes contextos varía, desde efectores anti-parasitarios a supresores inmunes, por lo que es importante definir su función en cada sistema.

Previo al proyecto, en el contexto de la infección crónica experimental de ratones con *E. granulosus*, nuestro grupo observó la presencia de M M2-like, con expresión de los marcadores típicos de activación alternativa (Relm-alfa, Ym-1 y arginasa-1) sumada a la de PD-L1. Por lo tanto, nos propusimos caracterizar estas células, así como su función inmunoreguladora. A su vez el modelo de infección experiemetal brindaba la oportunidad de evaluar los efectos del bloqueo de las diferentes moléculas expresadas por los M a la funcionalidad de estas células y a la inducción de fenotipos reguladores, exhaustos o de hipo-respuesta en los linfocitos T. La comprensión de estos mecanismos podría ser explotada además en el futuro para tratar reacciones inflamatorias aberrantes, como las que ocurren en enfermedades autoinmunes o alergias.

En este proyecto nos enfocamos particularmente en el estudio del fenotipo M2-like observado y en la evaluación de las propiedades inmunosupresoras de estas células sobre la respuesta de los linfocitos T locales, determinando la contribución del eje PD-1:PD-L1, a dicha función.

Metodología/diseño del estudio

En este proyecto se planteó como objetivo general estudiar los efectos de la infección experimental con *E. granulosus* sobre las poblaciones locales de monocitos y macrófagos (monocitos/M). Para ello, ratones C57BL/6 se inyectaron con protoescolices de *E. granulosus*. Los protoescolices son las larvas infectivas que se generan dentro de las hidátides con capacidad dual de desarrollarse a un gusano adulto cuando infectan el intestino de un hospedero definitivo, o a nuevas hidátides si se liberan en el medio interno de un hospedero intermediario (lo que se conoce como infección secundaria). En el modelo de infección de ratones, los protoescolices se inyectan en la cavidad peritoneal (2000 protoescolices por ratón), donde desarrollan hidátides al cabo de unas semanas [6]. Nuestros estudios se realizaron en la fase crónica de la infección (6-7 meses pos-infección, a menos que se indique lo contrario). Como control se utilizaron ratones inyectados con solución salina y mantenidos en iguales condiciones que los infectados. Una vez finalizada la infección, las células de la cavidad peritoneal se recuperaron mediante lavados peritoneales y se analizaron las poblaciones de monocitos/M mediante citometría de flujo o PCR en tiempo real. Asimismo se evaluó la expresión de PD-1 y otros receptores inhibitorios en los linfocitos T, así como la presencia de linfocitos T reguladores (FoxP3+). También se analizó el sobrenadante del primer lavado para cuantificar citoquinas inflamatorias o anti-inflamatorias por ELISA. En otros experimentos las células de la cavidad se cultivaron exvivo para estudiar los efectos de los M sobre la respuesta de los linfocitos T presentes en el mismo entorno (con o sin purificación previa de ambas poblaciones). En los experimentos de cultivo se estimuló policlonalmente a los linfocitos T (anti-CD3), y se estudió su respuesta en términos de proliferación (midiendo mediante

citometría de flujo la expresión de Ki67, proteína asociada al ciclo celular) y producción de citoquinas (ELISA del sobrenadante de cultivo). En estos sistemas se planteó determinar también la contribución del eje PD-1:PD-L1 (utilizando anticuerpos bloqueantes) a los efectos observados.

En suma, en este proyecto se planteó caracterizar el fenotipo de monocitos/M y estudiar su potencial de actuar como célula supresora del sistema inmune en este modelo experimental, evaluando la utilidad de estas células en el control de la respuesta de linfocitos T, y las señales involucradas en dicho control.

Finalmente, en el transcurso del proyecto muchas de las infecciones experimentales que se fueron realizando no fueron exitosas, lo que no permitía avanzar en forma adecuada para cumplir con los objetivos. Debido a esto, nos propusimos desarrollar un modelo de inyección de material parasitario, que imitara los efectos causados por la infección crónica y nos permitiera avanzar más rápido con el proyecto. Teniendo en cuenta nuestra experiencia previa con la capa laminar (LL, por laminated layer), y considerando:

- que la LL, compuesta por mucinas y depósitos de la sal cálcica del myo-inositolhexakisfosfato, es el componente parasitario más abundante expuesto para la interacción con el sistema inmune [22]
- que para poder crecer en diámetro, la hidátide libera material de la LL en forma de partículas [23] (por ser un material altamente insoluble en soluciones acuosas),
- que durante la infección, los componentes del sistema inmune se enfrentan a los componentes parasitarios en forma prolongada en el tiempo,

se decidió poner a punto un modelo en el que las células del sistema inmune se enfrentaran a una preparación de partículas de la LL (npLL, por partículas nativas de la LL), de forma persistente en el tiempo. Este trabajo lo llevó a cabo la estudiante Leticia Grezzi, como parte de un proyecto de iniciación a la investigación (CSIC) y su proyecto de doctorado. Leticia observó que luego de 5 o 10 inyecciones intraperitoneales de npLL (ratones C57BL6, inyecciones administradas 2 veces por semana durante 2,5 o 5 semanas, respectivamente) se observaban efectos equiparables a los observados hasta el momento luego de la infección crónica con el parásito. Una vez puesto a punto el modelo, se utilizó en paralelo al modelo de infección para caracterizar fenotipo y funcionalidad de los M.

Resultados, análisis y discusión

Las figuras correspondientes a los resultados detallados en esta sección se muestran en el archivo anexo.

Primeramente, se analizó con mayor profundidad las poblaciones de monocitos/M residentes o reclutados a la cavidad peritoneal durante la infección crónica por *E. granulosus*. Por un lado, se observó un aumento significativo en el número de células en la cavidad, y en particular de las diferentes poblaciones de monocitos/M de los ratones infectados respecto a los control (Figura 1). Dichas poblaciones se definieron como: Ly6CnegMHCIInegF4/80hi, los M residentes de la cavidad conocidos como LPM (large peritoneal macrophages), Ly6CnegMHCIIposF4/80neg, los M residentes conocidos como SPM (small peritoneal macrophages; vale aclarar que esta definición incluye en este grupo a las células dendríticas), Ly6ChiMHCIIneg, los monocitos reclutados desde la sangre, y Ly6ChiMHCIIpos, los monocitos reclutados, en vías de diferenciarse a SPM (Monocitos/SPM) (ver estrategia de definición de células en la Figura 2).

Resultados previos mostraban que durante la infección crónica con *E. granulosus* se inducía en los LPM un fenotipo M2-like, con alta expresión de Relm-alfa, Ym-1, y el co-inhibidor PD-L1. Estos resultados se confirmaron al inicio del proyecto, determinándose además la inducción de un fenotipo semejante, menos acentuado, en SPM (Figura 3a). El análisis de la expresión de PD-L1 en LPM y SPM mostró un claro aumento tanto en el porcentaje de células positivas para el marcador en dichas poblaciones, como en su nivel de expresión relativa. Se determinó también una fuerte actividad de la arginasa-1 en extractos totales de células de ratones infectados (Figura 3b). Además, en el análisis surgió que los LPM provenientes de ratones infectados presentaban un aumento en la expresión del co-estimulador CD80 (Figura 3c). No se observó expresión de los marcadores CD206 ni CD163, que si aparecen en fenotipos M2-like en otros contextos.

En el sobrenadante del primer lavado peritoneal (realizado con un volumen pequeño) se evaluó la presencia de citoquinas relacionadas a la inflamación tipo 1 (IL-12p40/TNF-alfa/IL-1-beta/IL-6) y tipo 2 (IL-4/IL-5/IL-13), así como las producidas por linfocitos T efectoras Th1 (IFN-gama), Th2 (IL-4/IL-5/L-13) o Th17 (IL-17), y citoquinas anti-inflamatorias (IL-10/TGF-beta/IL-1RA). Únicamente se detectaron TGF-beta, IL-1RA, e IL-6 en los ratones infectados (ELISA).

También se evaluó por PCR en tiempo real la expresión de distintos marcadores que evidencian el fenotipo M2-like y el estado de activación de las células. Este estudio se hizo utilizando extractos enriquecidos en las poblaciones de monocitos/M, libres de las principales células "contaminantes": linfocitos B y T, y eosinófilos. Para preparar las muestras enriquecidas en monocitos/M, se optimizó un sistema de purificación utilizando perlas magnéticas unidas a estreptavidina en combinación con un cóctel de anticuerpos biotinilados anti-CD19, anti-TCR-beta y anti-SiglecF (para eliminar linfocitos B,

linfocitos T y eosinófilos, respectivamente). Se optimizaron las concentraciones de los anticuerpos necesarias para eliminar las células correspondientes. Las preparaciones finales contenían, además de la poblaciones de monocitos/M, células dendríticas. En la Figura 5 se muestran resultados representativos obtenidos luego de realizar un protocolo de purificación. El análisis de los extractos enriquecidos en monocitos/M confirmó la mayor expresión de los marcadores Relm-alfa, Ym-1, arginasa-1, y PD-L1 (Figura 6a) en ratones infectados. También se observó un leve aumento en la expresión del receptor CD206, y la metaloproteasa MMP9, no observándose cambios en CD80, CD86, o MHCII. En la figura se muestra que para la mayoría de los genes analizados las diferencias entre los ratones control e infectados no son estadísticamente significativas, sino que se aprecian como una tendencia. Esto puede deberse al bajo número de muestras analizadas para los ratones control, ya que para lograr purificar adecuadamente las células se tuvieron que realizar pools de lavados peritoneales de diferentes individuos. Como era esperado, el análisis por PCR en tiempo real de la expresión de citoquinas en los extractos enriquecidos en monocitos/M muestran que la IL-1Ra sería producida por estas células (o células dendríticas). También se observó un aumento en IL-6 e IL-1R2. Para el caso de TGF-beta, los resultados sugieren que serían otras células la que producen dicha citoquina, posiblemente linfocitos T reguladores (Treg) (Figura 6b). No se observaron diferencias para IL-10, TNF-alfa, e IL-23 (no mostrado).

Para llevar adelante el objetivo 2 se realizó una infección en la que los cambios en las poblaciones de la cavidad se analizaron a diferentes tiempos pos-infección (1.5, 3.5, 5 y 7 meses). Se observó que en la cavidad de ratones infectados el aumento en el número total de células ocurrió tempranamente (Figura 7), reflejo del aumento en los números de LPM y linfocitos B (1.5 meses pos-infección), que luego se mantuvieron. Otras células, como los linfocitos T, los SPM y los monocitos reclutados comenzaron a aumentar su número más tarde (luego de 3.5 o 5 meses), mientras que los eosinófilos fueron aumentando a lo largo de la infección.

Al estudiar la inducción del fenotipo M2-like en los LPM, se observó que algunos marcadores se manifestaron temprano, como PD-L1, entre 1.5-3 meses pos-infección, incluso antes de que la infección se hiciera patente (entendiendo como infección patente a aquella que se revela con la observación de hidátides al ojo desnudo, aproximadamente luego de 5 meses pos-infección). Vale mencionar que al tiempo 3.5 meses existió una caída en la expresión de PD-L1. Al tratarse de un único experimento, y haberse observado un comportamiento similar en otros parámetros analizados, y que no siguen el patrón general, pensamos que pudo haber un problema experimental, y por ello no hicimos hincapié en este fenómeno. La producción de Relm-alfa y Ym-1, y la actividad de la arginasa-1 aumentó sostenidamente con el tiempo (Figura 8b). Un comportamiento similar se observó para TGF-beta e IL-1Ra (Figura 9).

En cuanto a los linfocitos T, la otra población de interés, se observó un aumento en el % de linfocitos Treg (FoxP3+) dentro de las células T CD4+ de la cavidad (Figura 10a y b). También dentro de los linfocitos T CD4+ efectores (CD44hiCD62Llo), se observó un aumento en el porcentaje de células PD-1+. Se determinó que el aumento en la expresión de FoxP3 y PD-1 ocurre en diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+. En contraposición, todas las poblaciones de linfocitos T CD4+, mostraban un aumento en la expresión de GITR (Figura 10b). No se observó que los linfocitos T locales presentaran características de un estado exhausto al no evidenciarse la expresión de los marcadores CTLA-4, LAG3 y 2B4. En relación a todos estos parámetros, no se determinó diferencia alguna entre las poblaciones de linfocitos T CD8+ de ratones infectados al comparar con las células de ratones control.

En cuanto al momento de manifestación de los cambios en los linfocitos T, tanto la expansión de los Treg como la expresión de PD-1 en los efectores, parecen ocurrir en forma temprana (la expresión de FoxP3 en a 1.5 meses pos-infección no pudo analizarse). En el caso de los linfocitos Treg, su porcentaje parece acentuarse a tiempos más largos (Figura 10a).

Como tercer objetivo se evaluó la función de los M inducidos en respuesta a la infección por *E. granulosus*, cultivando las células de la cavidad de ratones infectados o control. Se optimizaron dos tipos de ensayos:

1. cultivo de las células de la cavidad, luego de extraerlas por lavado peritoneal
2. co-cultivo de monocitos/M y linfocitos T CD4+, luego de extraerlos y purificarlos

En ambos ensayos, se evaluó la respuesta de los linfocitos T a un estímulo policlonal, el anticuerpo anti-CD3, en términos de proliferación y producción de citoquinas. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos tras optimizar la concentración de células y la dosis de anti-CD3 a utilizar (ensayos tipo 1). En cuanto a la proliferación se observó que los linfocitos T CD4+ de ratones infectados, sin estimular, proliferaban más que los de ratones control. Sin embargo, las mismas células tenían inhibida su respuesta proliferativa al estímulo con anti-CD3, indicando que la infección induce un estado de hiporrespuesta en estas células (Figura 12a). No se observaron efectos en la población de linfocitos CD8+. En cuanto a la producción de citoquinas, los linfocitos T de ratones infectados y estimulados con anti-CD3 responden con sesgo Th2/Th17,

al producir IL-5, típica de la respuesta Th2 que se induce frente a infecciones por parásitos helmintos, e IL-17 (Figura 12b). En cuanto a la producción de TGF-beta, se determinó que las células en cultivo siguen produciéndola, y que los niveles de la citoquina no cambian en respuesta al anti-CD3.

Para los ensayos de co-cultivo de monocitos/M y linfocitos T CD4+, se hicieron los lavados peritoneales, y por una cuestión de rendimiento, se realizó un pool de las células provenientes de los ratones infectados y otro de los ratones control, previo a la purificación. La suspensión de monocitos/M se preparó como se detalló previamente (ver Figura 5), mientras que la suspensión de linfocitos T CD4+ se preparó utilizando el kit Dynabead Untouched Mouse CD4 Cells (Invitrogen). La Figura 13 muestra los efectos de la infección sobre la proliferación de los linfocitos T y su respuesta en términos de citoquinas, observados en un único experimento realizado una vez optimizada la concentración de células. Los resultados siguen la misma tendencia que los mostrados en la Figura 12 (deberán repetirse para determinar significancia biológica).

Para el objetivo 4, realizando ensayos similares a los recién descritos, se planteó evaluar el papel de PD-L1 en los efectos observados. Se realizó un ensayo utilizando un anticuerpo bloqueante de PD-L1 (clona MIH5, cedida por el Dr. Louis Boon, Bioceros). Dicho anticuerpo (o su control isotópico en las condiciones control) se agregó al cultivo de células, previo a la estimulación con anti-CD3. No se observó ninguna alteración en los efectos sobre la respuesta de los linfocitos T (no mostrado). Más tarde, considerando que en ausencia de PD-L1, la interacción con PD-1 podría estar mediada por PD-L2 (tenemos datos preliminares de que este co-inhibidor se expresa en monocitos y SPM), se decidió cambiar el anticuerpo antagonista y continuar los ensayos utilizando un anticuerpo bloqueante de PD-1 (clona RMP1-14, cedida por el Dr. Boon, al igual que su control isotópico). Como el anticuerpo se recibió recientemente, dichos ensayos serán realizados próximamente por Leticia Grezzi, continuando con su proyecto de doctorado.

Finalmente, para los objetivos 5 y 6, se planteó inyectar ratones infectados y control con el anticuerpo anti-PD-L1 en una ventana de tiempo que se superpusiera con la de manifestación del fenotipo de M inducido por la infección. Como la manifestación plena del fenotipo se observó avanzada la infección, eso significaba utilizar el anticuerpo durante un periodo muy largo, incompatible con las cantidades disponibles de anti-PD-L1. Por ello, para este punto solo se realizaron estudios utilizando los modelos de inyecciones repetidas de npLL (ver más abajo) y el anticuerpo anti-PD-1 recientemente obtenido.

En las Figuras 14 a 19 se muestran los resultados obtenidos utilizando los modelos de 5 o 10 inyecciones de npLL, siguiendo los mismos objetivos planteados en el proyecto para el modelo de infección experimental (excepto el objetivo 2). Como puede observarse estos modelos reproducen fielmente los resultados del modelo de infección. En los cultivos ex vivo el estado de hipo-respuesta de los linfocitos T frente al anti-CD3 se reproduce, aunque al analizarse únicamente dos experimentos la diferencia con los ratones control no llega a ser significativa, sino que se visualiza como una tendencia (Figura 19).

Finalmente, al realizarse un experimento de 5 inyecciones de npLL en las que en las últimas 3 se co-administró el anticuerpo anti-PD-1 (o su control isotópico), se observó una tendencia sutil a revertirse la hipo-respuesta proliferativa de los linfocitos T (Figura 20). Pensamos que este efecto, podría reforzarse co-administrando el anticuerpo en las 5 inyecciones, lo que será evaluado a la brevedad. En la Figura 21 se observa que el tratamiento con anti-PD-1 también afectaría la producción local de citoquinas anti-inflamatorias: TGF-beta e IL-1Ra. Estos resultados preliminares pero promisorios, sugieren que el eje de PD-1 estaría contribuyendo fuertemente al establecimiento de la inmunosupresión inducida en respuesta al parásito. Seguiremos caracterizando este fenómeno en el contexto del doctorado de Leticia Grezzi.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados globales obtenidos en nuestro estudio muestran una inhibición de la respuesta inmune en el ambiente en el que se establece la infección crónica por la hidátide de *E. granulosus*, verificando que este parásito, así como otros helmintos, despliega mecanismos de evasión del sistema inmune para favorecer su supervivencia. Los resultados indican además que la cubierta más externa de la hidátide, la LL, contribuiría mayoritariamente a la inducción de estos efectos, ya que la inyección repetida de una preparación particulada de este material (npLL), reproduce fielmente el estado local de inmunosupresión.

Resultados previos al proyecto indicaban que durante la infección los LPM presentaban un fenotipo M2-like con alta expresión de PD-L1, sugiriendo funciones supresoras. A lo largo del proyecto confirmamos que no solo estas células, sino también la otra población de M residentes de la cavidad, los SPM, presentan este fenotipo, evidenciándose su potencial inmunosupresor en términos de un mayor porcentaje de células PD-L1+ y mayor nivel de expresión relativa del marcador, en comparación con las células provenientes de ratones control. Estos LPM y SPM podrían estar involucradas en la presentación de antígenos a linfocitos T efectoros (colaboradores) que llegan a la cavidad, y en presencia de señales como PD-L1 inhibirían la respuesta de los mismos o estimular la de linfocitos Treg. La presencia de mediadores solubles anti-

inflamatorios, producidos por monocitos/M o por otras células, podrían sumar a la inhibición de los linfocitos T. En este sentido, determinamos la producción local de una de las principales citoquinas anti-inflamatorias que inhibe la respuesta de los linfocitos T: TGF-beta. Los resultados de PCR en tiempo real de la expresión de TGF-beta en las preparaciones de monocitos/M purificados, sugieren que esta citoquina no sería producida por los mismos; otra fuente podría ser la de los propios linfocitos Treg que observamos que aumentan su porcentaje en la cavidad de los ratones infectados. Observamos efectos similares tras la inyección repetida de npLL.

También en la cavidad peritoneal de ratones infectados o inyectados con npLL observamos una fuerte presencia de IL-1Ra, una citoquina producida por monocitos, M, y células dendríticas, que se une con alta afinidad al receptor de la IL-1beta, IL-1R1, compitiendo con ella e inhibiendo sus efectos pro-inflamatorios [24]. El análisis de las células por PCR en tiempo real también reveló el aumento en la expresión de otro regulador negativo de la IL-1beta, IL-1R2, un receptor que actúa como sumidero de IL-1beta, entre otros efectos inhibidores de la acción de esta citoquina fuertemente pro-inflamatoria. Trabajo previo del grupo había mostrado que otra preparación de partículas de LL, a la que llamamos pLL (npLL despojada de los depósitos de calcio del myo-inositolhexakisfosfato) activa el inflamasoma, y en presencia de agonistas de receptores Toll induce la secreción de IL-1beta en células dendríticas y macrófagos [25]. Sin embargo, la IL-1beta que se producía en presencia de dichos agonistas y el material parasitario, tanto en experimentos in vitro como in vivo, no inducía los cambios esperados en el fenotipo de las células. La determinación en este proyecto de que la LL induce de la expresión de inhibidores de la acción de IL-1beta podría explicar, al menos en parte, este fenómeno.

La observación de un aumento en la cantidad de linfocitos T CD4+ que son PD-1+ en la cavidad de ratones infectados, sugiere que estas células podrían ser blanco de los LPM y SPM que presentan un aumento en la expresión de PD-L1, viendo inhibida su respuesta. Nuestros resultados preliminares de ensayos de cultivo de las células peritoneales exvivo (en el modelo de inyecciones múltiples) sugieren que el eje de PD-1 podría estar involucrado en algunos de los efectos de inhibición ejercidos sobre los linfocitos T (respuesta de proliferación, y capacidad local de secreción de citoquinas). Por otro lado, la ausencia en la cavidad de citoquinas representativas de las respuestas Th1, Th2 o Th17 (IFN-gama, IL-5 o IL-13, e IL-17, respectivamente), estaría apoyando la idea de que los linfocitos T efectores locales no están respondiendo en forma acorde a la infección. De todos modos, a diferencia de lo que ocurre con otros contextos en los que existe estimulación persistente de los linfocitos T, no determinamos la adopción de un fenotipo exhausto por estas células, típicamente observado en infecciones virales crónicas o durante el desarrollo de un tumor [19, 20].

En cuanto al momento de manifestación de los diferentes efectos locales a lo largo del tiempo de infección, determinamos que algunas características del fenotipo M2-like aparecen temprano, pero el fenotipo termina de establecerse más tarde, acentuándose la expresión de los diferentes marcadores. La manifestación temprana habría habilitado el trabajo con tiempos de infección más cortos. Sin embargo, el hecho de que solo luego de 5 meses podamos verificar la presencia del parásito al ojo desnudo, así como determinar la carga parasitaria, y la constatación de que a medida que pasa el tiempo el fenotipo M2-like se hace más acentuado, determinó que durante todo el proyecto finalizáramos los experimentos a partir de los 5 meses pos-infección (y no más de 7 meses).

Los ensayos de cultivo exvivo de las células de la cavidad peritoneal, cultivadas directamente o luego de ser purificados los monocitos/M y los linfocitos T CD4+, indican que a pesar que los linfocitos T CD4+ provenientes de ratones infectados (o inyectados con npLL) tienen un mayor nivel de proliferación basal, su respuesta al estímulo policlonal anti-CD3 se encuentra suprimida, revelando que su capacidad de respuesta esta diezmada en el contexto de la infección (o inyección con npLL). Los resultados preliminares de los ensayos de inyección de npLL en los que se bloquea PD-1, sugieren que este eje estaría contribuyendo al estado de hipo-respuesta. Por otro lado, los linfocitos T en cultivo responden al anti-CD3 produciendo citoquinas tipo Th2 (IL-5) y Th17 (Th17). En trabajos previos habíamos observado el mismo sesgo de respuesta en experimentos de infección en los que se extraía el bazo de ratones infectados y control, y se re-estimulaban los esplenocitos con pLL (tesis de Maestría de Yamila Martínez, [26]). La respuesta Th2 es típicamente inducida en las infecciones por helmintos, y en los últimos años se ha determinado que también la inducción de una respuesta Th17 es importante en este tipo de infecciones para controlarlas [27]. La respuesta Th17 se asocia al reclutamiento de neutrófilos, fenómeno que se observa en ambos modelos experimentales (resultados no mostrados).

La optimización de los modelos de inyección repetida de npLL (5 o 10 inyecciones), fue un hito para el desarrollo del proyecto, ya que se observaron resultados que llamativamente se asemejaban mucho a los de la infección experimental, tanto en términos del fenotipo inducido en los monocitos/M, los efectos sobre los componentes de la inmunidad adaptativa

(linfocitos Treg y T efectores) y la inducción del entorno general de inmunosupresión, con presencia de los mismos actores: TGF-beta, IL-1Ra. Así mismo los ensayos de cultivo de las células peritoneales demostraron el mismo estado de hiporrespuesta proliferativa en los linfocitos T, así como la misma respuesta de las células en términos de producción de citoquinas. La implementación de estos modelos conlleva una serie de ventajas asociadas a la independización del trabajo basado en la infección experimental, que implica tiempos más largos, requiere conseguir parásitos viables para infectar, y no todas las veces las infecciones son productivas. Por otro lado, catapulta a la capa laminar del parásito como un contribuidor clave en la inducción de la inmunosupresión. La practicidad de estos modelos, en cuanto a que son más cortos y siempre productivos (en contraposición con los ensayos de infección, que muchas veces fallan y la falla se manifiesta luego de tener varios meses los ratones en el laboratorio), impacta directamente en la posibilidad de acercarnos a dilucidar los mecanismos por los cuales el parásito evade el sistema inmune. También nos permite trabajar con un material más definido desde el punto de vista de su composición. Por último, utilizar estos modelos en los que se induce este ambiente fuertemente suprimido semejante al que se desarrolla en respuesta a la infección, nos permitirá evaluar la posibilidad de que estos efectos afecten la respuesta frente a la inmunización con otros antígenos (tolerogénesis) y/o logren suprimir el desarrollo de enfermedades causadas por respuesta inflamatorias patológicas, como las que se generan durante el asma alérgico u otras enfermedades autoinmunes.

Referencias bibliográficas

1. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.007
2. Díaz A, et al. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: Immunology. *Trends Parasitol*. 2011;27(6):264-273. doi:10.1016/j.pt.2011.01.008
3. Breijó M, et al. *Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp Parasitol*. 2008;118(2):188-196. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.014
4. Mufarrij A, et al. Comparative histopathological study in the hepatic and pulmonary human hydatidosis. *Helminthologia*. 1990;27:279-290.
5. Díaz A, et al. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2015;doi:10.1111/pim.12282.
6. Heath DD. The development of *Echinococcus granulosus* larvae in laboratory animals. *Parasitology*. 1970;60(3):449-456.
7. Mourglia-Ettlin G, et al. Early peritoneal immune response during *echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0001293
8. Richards KS, et al. *Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of the laminated layer, including changes on incubating cysts in various media. *Parasitology*. 1983;86 (Pt 3):399-405.
9. Irigoín F. myo-inositolhexakifosfato en la interfase hospedador-parásito en la hidatidosis. 2002.
10. Wynn TA, et al. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013. doi:10.1038/nature12034
11. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi:10.12703/P6-13
12. Cassado A dos A, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One*. 2011;6(7):e22141. doi:10.1371/journal.pone.0022141
13. Rückerl D, Allen JE. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol Rev*. 2014;262(1):113-133. doi:10.1111/imr.12221
14. Krzyszczyk P, et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol*. 2018. doi:10.3389/fphys.2018.00419
15. Huber S, et al. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood*. 2010;116(17):3311-3320. doi:10.1182/blood-2010-02-271981
16. Terrazas LI, et al. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol*. 2005;35(13):1349-1358. doi:10.1016/j.ijpara.2005.06.003
17. Smith P, et al. *Schistosoma mansoni* Worms Induce Anergy of T Cells via Selective Up-Regulation of Programmed Death Ligand 1 on Macrophages. *J Immunol*. 2014. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1240
18. Poh AR, Ernst M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol*. 2018. doi:10.3389/fonc.2018.00049
19. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018. doi:10.1038/nri.2017.108
20. Bardhan K, et al. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol*. 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00550.
21. Jenkins SJ, Allen JE. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010. doi:10.1155/2010/262609
22. Díaz A, et al. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol*. 2011;27(5):204-213. doi:10.1016/j.pt.2010.12.012
23. Grimm J, et al. Immunohistological detection of small particles of *echinococcus multilocularis* and *echinococcus granulosus* in lymph nodes is associated with enlarged lymph nodes in alveolar and cystic echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(12):1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0008921
24. Palomo et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015. 76 (1): 25-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.06.017>.
25. Casaravilla et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome by Particles from the *Echinococcus granulosus* Laminated Layer. *Infect Immun*. 2020 19;88(9):e00190-20. doi: 10.1128/IAI.00190-26. Y. Martínez. Estudios sobre el condicionamiento de células dendríticas por la larva de *Echinococcus granulosus* s. l. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA Biología. Tutores: Dres. Cecilia Casaravilla y Álvaro Díaz.

27. Allen et al. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*. 2015. 34:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.001>

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)