

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I B I C I

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

**Evaluación de la capacidad
inmunomoduladora de antígenos de
Fasciola hepatica: Aplicación en la
inducción de mecanismos de protección**

Bioq. Daiana Pamela Celias

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI)-CONICET
Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina
2018

Evaluación de la capacidad
inmunomoduladora de antígenos de
Fasciola hepatica: Aplicación en la
inducción de mecanismos de protección

Bioq. Daiana Pamela Celias

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI)-CONICET
Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina
2018

DIRECTORA

Dra. Laura Cervi

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dr. Germán Gil

Dra. Mariana Maccioni

Dra. Alicia Torres

EVALUADOR EXTERNO

Dra. María Silvia Di Genaro

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Resumen	V
Summary	VIII
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 <i>Fasciola hepatica</i>	2
1.1.1 Fasciolosis	3
1.1.2 Daño tisular producido por <i>F. hepatica</i>	6
1.1.3 <i>F. hepatica</i> y su interacción con el sistema inmune	7
1.1.4 Catepsinas, las principales proteasas expresadas por <i>F. hepatica</i>	11
1.2 El inflamasoma	14
1.2.1 El inflamasoma NLRP3 en infecciones por helmintos	18
1.2.2 Catepsinas y el inflamasoma NLRP3	20
Capítulo 2: Objetivos	23
Capítulo 3: Materiales y métodos	25
3.1 Animales.....	26
3.2 Insumos y reactivos	26
3.3 Antígenos de <i>F. hepatica</i>	28
3.3.1 Producción de FhCL3 y rvFhCL3	28
3.3.2 Producción de extracto total (TE)	29
3.4 Ensayos enzimáticos	30
3.5 Preparación y cultivo de células dendríticas derivadas de medula ósea (CDs).....	30
3.6 Ensayo de viabilidad.....	31
3.7 Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).....	32
3.8 Determinación de Citoquinas.....	33

3.9 Citometría de Flujo	33
3.10 PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR).....	34
3.11 Microscopía Confocal	35
3.12 Efectos directos de FhCL3 en recombinantes de pro-IL-1 β e IL-1 β	36
3.13 Western Blot.....	36
3.14 Análisis Bioinformático.....	37
3.15 Cultivo alogénicos.....	38
3.16 Estudio de las respuestas T helper inducida por CDs tratadas con FhCL3 in vivo	38
3.17 Infección experimental con <i>Fasciola hepatica</i>	39
3.18 Análisis estadístico	40
Capítulo 4: Resultados	41
4.1 Propiedades bioquímicas de FhCL3	42
4.2. Viabilidad de CDs tratadas con FhCL3	43
4.2.1 FhCL3 induce una maduración parcial en CDs y liberación la síntesis de IL-1 β e IL-18	43
4.2.2 FhCL3 incrementa la expresión de pro-IL-1 β en CDs	47
4.2.3 La expresión de IL-1 β promovida por FhCL3 es independiente de la activación de NF- κ B	48
4.2.4 FhCL3 es captada por CDs y se localiza principalmente en el citoplasma de la célula	49
4.2.5 La producción de IL-1 β e IL-18 inducida por FhCL3 disminuyó en ausencia de NLRP3 y no requiere de la actividad de caspasas	51
4.2.6 FhCL3 sería capaz de interactuar físicamente con NLRP3.....	54
4.2.7 FhCL3 induce IL-1 β a través de la producción de ROS, el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal	57
4.3 FhCL3 es capaz de escindir pro-IL-1 β	60

4.4 FhCL3 condiciona a las CDs para promover IFN- γ e IL-13 en esplenocitos alogénicos	61
4.4.1 La capacidad aloestimuladora de las CDs-FhCL3 es dependiente de la activación de NLRP3	65
4.5 CDs-FhCL3 inducen la producción de IFN- γ e IL-13 <i>in vivo</i>	67
4.6 FhCL3 promueve una respuesta específica de IFN- γ en esplenocitos de animales infectados con <i>F. hepatica</i>	69
4.7 La inmunización de ratones con FhCL3-MPLA promueve el desarrollo de una respuesta mediada por IFN- γ	72
Capítulo 5: Discusión	74
Conclusiones	91
Producción científica.....	94
Bibliografía	95

ABREVIATURAS



APC	Alofococianina
APC-Cy7	Alofococianina cianina-7
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	Proteína adaptadora asociada a apoptosis
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CASP1/11	Caspasas 1/11
CD	Cúmulo “ <i>Cluster</i> ” de diferenciación
CDs	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CDs-FhCL3	Células dendríticas tratadas con FhCL3
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño tisular
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
DPI	Cloruro de difenilenodonio
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxi-succinil-leucilamido-4-guanidino butano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEA	Antígeno de endosomas tempranos
ELISA	Enzimoinmunoensayo en fase sólida
ET	Extracto total
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FhAE	Asparanginil endopeptidasas de <i>F. hepatica</i>
FhCB	Catepsina B de <i>F. hepatica</i>
FhCL1-5	Catepsinas L 1-5 de <i>F. hepatica</i>
FhGST	Glutación-S transferasa de <i>F. hepatica</i>
FhHDM	Molécula de defensa de <i>F. hepatica</i>

FhKTM	Inhibidor de proteasas tipo Kunitz de <i>F. hepatica</i>
FhLAP	Leucina aminopeptidasa de <i>F. hepatica</i>
FhPrx	Peroxirredoxina de <i>F. hepatica</i>
Fhmuc	Péptido tipo mucina de <i>F. hepatica</i>
FhTeg	Antígenos tegumentales de <i>F. hepatica</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H2DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
IFN	Interferón
IL-	Interleuquina
INF	Infectados
I κ B- α	Inhibidor de kappa B alfa
LAMP	Proteína de membrana asociada a lisosomas
LAPs	Leucin aminopeptidasas
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Dominio que contiene repeticiones ricas en leucina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MPLA	Monofosforil lípido A
Mtc	Metacercarias
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLRP3	Receptores tipo NOD que contienen un dominio de pirina
NO INF	No infectados
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución tampón de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorhidrato de peridinina

PES	Productos excreto-secretorios de <i>F. hepatica</i>
proIL-18	Precursor inactivo de IL-18
pro-IL-1 β	Precursor inactivo de IL-1 β
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PYD	Dominio pirina
RFU	Unidades de fluorescencia relativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rvFhCL3	Variante recombinante de FhCL3 con actividad enzimática reducida
SEA	Antígenos solubles de los huevos de <i>Schistosoma spp</i>
SFB	Suero bovino fetal
SYK	Tirosin-quinasa no asociada con el receptor
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T cooperadores
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tos-GPR-AMC	N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg 4-metil cumarina
TRIF	Adaptador que contiene dominio TIR inductor de IFN- β
TXNIP	Tiorredoxina
WT	Wild type

RESUMEN



La fasciolosis es una parasitosis causada por el helminto, *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*), clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida. Durante su migración en el hospedador definitivo, *F. hepatica* excreta-secreta numerosos productos, dentro de los cuales se encuentran enzimas pertenecientes a la familia de las catepsinas. Estas cisteín proteasas desempeñan un papel crítico en funciones vitales para la supervivencia del parásito, y a su vez modulan la respuesta inmune del hospedador. Una de las últimas proteasas de esta familia en ser descrita es Catepsina L3 (FhCL3). FhCL3 se expresa durante el estadio juvenil o invasivo del parásito, en el cual realiza el pasaje a través de la pared intestinal. Se ha reportado que FhCL3 presenta una importante actividad colagenolítica que podría facilitar la invasión del parásito a través de los tejidos del hospedador. Por esta razón, FhCL3 sería un factor esencial en el desarrollo de la patología. Sin embargo, no hay información respecto a la interacción de FhCL3 con el sistema inmune.

En el presente trabajo se estudió la capacidad de FhCL3 para modular la activación de las células presentadoras de antígenos por excelencia, las células dendríticas (CDs) y su influencia en la respuesta inmune adaptativa.

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que FhCL3 promueve la activación del inflammasoma NLRP3, en ausencia de otros estimuladores como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o activadores de NLRP3. Este fenómeno se evidencia por la secreción de cantidades significativas de interleuquina 1 beta (IL-1 β) e IL-18 y es dependiente tanto de la actividad enzimática de FhCL3, como de la presencia de NLRP3 e independiente de caspasas 1/11.

Además, se comprobó que en la producción de IL-1 β inducida por FhCL3, estarían involucrados tanto la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal. A pesar de la participación de estos eventos conocidos como segunda señal en la activación del NLRP3, este fenómeno ocurriría de manera no canónica, ya que es independiente de NF- κ B. Las características de FhCL3 de ser internalizada por las CDs, ubicarse en el citoplasma, su capacidad para escindir la proforma de IL-1 β y promover la maduración a su forma biológicamente activa, sugieren una actividad “*caspasa-like*” dentro de la célula.

A su vez, estas CDs condicionadas con FhCL3 presentaron un fenotipo semimaduro y una capacidad para polarizar la respuesta inmune adaptativa tanto *in vitro* como *in vivo*, hacia un patrón de expresión de citoquinas singular, caracterizado por la liberación de interferón gamma (IFN- γ) e IL-13.

Curiosamente, demostramos que FhCL3 participa en la inducción de una respuesta de IFN- γ durante la infección ya que esplenocitos de animales infectados produjeron niveles significativos de esta citoquina luego del reestímulo con esta proteína.

Estos resultados demuestran que FhCL3 tiene la habilidad de activar un componente clave de la inmunidad innata, el inflamasoma NLRP3 y a su vez favorecer el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que podría resultar protectora contra el parásito. Por lo tanto, FhCL3 podría ser utilizada en el desarrollo de estrategias terapéuticas para potenciar mecanismos que incrementen la inflamación con posibles aplicaciones en diversas patologías.

SUMMARY



Fasciolosis is an important parasitic infection caused by the helminth, *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*), classified by the World Health Organization WHO as a neglected tropical disease. During its migration in the host, *F. hepatica* excretes-secretes many products, among which are enzymes belonging to the family of cathepsins. These cysteine proteases play a key role in vital functions for the survival of the parasite and modulate the immune response. One of them that has been described is Cathepsin L3 (FhCL3). Significant levels of FhCL3 expression have been observed in newly excysted juvenile (NEJ), the first stage of life cycle in the definitive host, when the parasite crosses through the intestinal wall. It has been reported that FhCL3 has an important collagenolytic activity that could facilitate the invasion through the tissues of the host. For this reason, FhCL3 might be an essential virulence factor in the development of the pathology. However, there is no information about its interaction with the immune system.

In the present work we studied the ability of FhCL3 to modulate the activation of professional antigen presenting cells, dendritic cells (DCs) and their influence on the adaptive immune response.

The results obtained showed that FhCL3 promotes the activation of the NLRP3 inflammasome, in the absence of other stimulators such as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and/or NLRP3 activators. This effect is evidenced by the secretion of significant amounts of interleukin 1 beta (IL-1 β) and IL-18 and is dependent on FhCL3 enzymatic activity, the presence of NLRP3 and caspase1/11-independent.

In addition, it was found that reactive oxygen species (ROS) production, potassium efflux and lysosomal acidification are involved in IL-1 β production induced by FhCL3.

Despite this, the activation of NLRP3 would occur in a non-canonical pathway since it is NF- κ B-independent.

Given the ability of FhCL3 to be internalized by DCs, targeted to the cytoplasm and to cleave pro-IL-1 β , it suggests that FhCL3 would have a “*caspase-like activity*” undescribed so far.

In turn, FhCL3-conditionated DCs displayed a semimature phenotype and they have the ability to polarize the adaptive immune response both *in vitro* and *in vivo*, to a particular cytokine expression pattern, characterized by the release of interferon gamma (IFN- γ) and IL-13.

Interestingly, we demonstrated that FhCL3 is involved in the induction of an IFN- γ response during infection, since splenocytes from infected animals produced significant levels of this cytokine after re-stimulation with this protease.

These results indicate that FhCL3 has the ability to activate a key component of innate immunity, the NLRP3 inflammasome and promotes the development of an adaptive immune response that could be protective against *F. hepatica*. Therefore, FhCL3 could be used in the development of therapeutic strategies to enhance mechanisms that increase inflammation with possible applications in several pathologies.

CAPÍTULO 1: **INTRODUCCIÓN**



1.1 *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) es un platelminto trematodes, de la subclase *Digenea*, que infecta a mamíferos y es el agente causal de la fasciolosis, una helmintiasis que afecta principalmente al hígado del hospedador definitivo.

La infección con *F. hepatica* ocurre por la ingestión de la metacercaria, la forma infectante para el hombre y otros hospedadores definitivos, que usualmente se encuentra enquistada en plantas acuáticas como el berro. Una vez ingerida, continúa su paso por estómago y luego en intestino delgado, se desenquista emergiendo la larva juvenil, la cual penetra la pared del intestino delgado y migra a través de la cavidad abdominal hasta alcanzar el hígado. Alrededor de la sexta u octava semana las larvas juveniles ingresan al hígado, atravesando el parénquima hasta ubicarse en los conductos biliares, donde maduran a su estadio adulto y viven por años, típicamente entre 1-2 años en el ganado vacuno y hasta 20 años en el ganado ovino (1).

y global, y el rango de hospedadores más amplio de todos los helmintos. Anualmente, causa enormes pérdidas económicas en el ganado bovino y ovino, debido a una reducción en la producción de carne y leche, calidad de la lana y en la fertilidad en animales con altas cargas parasitarias (2). Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado que aproximadamente 2,4 millones de personas están infectadas en el mundo. Recientemente se la ha declarado como una enfermedad emergente en humanos con un aumento en el número de casos, especialmente en áreas de gran altitud como el Altiplano boliviano norte, la cual constituye una región hiperendémica (3-4). A su vez, se estima que más de 180 millones de personas, en todo el mundo, están riesgo de contraer la infección (5). Aun así, la enfermedad sigue entrando en la categoría de enfermedades desatendidas (6).

La virulencia del parásito está relacionada no solo con la eficacia con la que invade y migra a través de los tejidos del hospedador, si no también, con su capacidad para suprimir las respuestas inmunitarias protectoras que se desarrollan en mamíferos. El Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG) (2015) de la OMS, reportó a la fasciolosis, junto con otras helmintiasis producidas por trematodos de transmisión alimentaria (*Clonorchis*, *Opisthorchis* y *Paragonimus*), como importantes causas de discapacidad en humanos. Una carga parasitaria elevada puede producir malestar general y en ocasiones dolor agudo, sobre todo en la zona abdominal. Desde el momento en el que los gusanos adultos se albergan en los conductos biliares de mayor calibre y en la vesícula biliar, causan inflamación, fibrosis hepática, obstrucción, dolor cólico e ictericia e incluso

puede dar lugar a cirrosis y llevar a la muerte (6). Debido a esto, el desarrollo de una vacuna que pueda prevenir la infección, o al menos limitar el daño tisular, es urgente.

La distribución geográfica de la fasciolosis en humanos es cosmopolita. En América Latina, se ha descrito en Bolivia, Perú, Chile, Argentina, Ecuador, Cuba, Colombia entre otros. En los 2 primeros países con prevalencias tan altas como 65-92%. En Argentina se han reportado más de 100 casos de fasciolosis humana entre 2000 y 2010 (7).

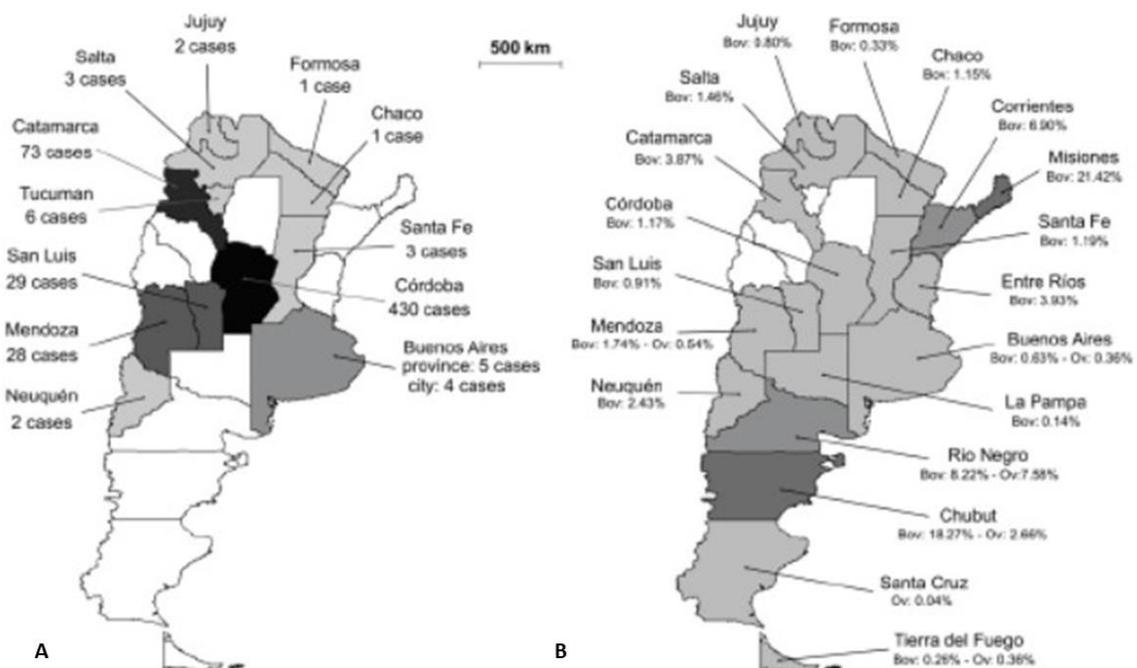


Figura 2. Distribución geográfica de la fasciolosis en Argentina. A) Infección por fasciolosis humana (número de casos), según las provincias; B) Distribución de la fasciolosis en el ganado bovino, incluidas las prevalencias provinciales. Datos proporcionados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) de mataderos ubicados en las distintas provincias período 2006-2009 (bov = bovinos; ov = ovinos). Adaptado de Roberto Mera y Sierra y col., 2011, (7).

La incidencia de la enfermedad está influenciada por factores abióticos, la temperatura y la humedad, que modulan la presencia y el desarrollo de los hospedadores intermediarios y del parásito dentro y fuera de éstos. También depende de una gran variedad de factores topográficos, biológicos y de manejo ganadero. Las altas

precipitaciones o el riego artificial en zonas con escasa pendiente o mal drenaje favorecen la acumulación de agua en el suelo. Cuando la temperatura oscila entre los 10°C y 30°C y hay suficiente humedad en el suelo se generan condiciones favorables para el establecimiento y el desarrollo de los caracoles de la familia *Lymnaeidae*, hospedadores intermediarios de *F. hepatica*. Muchos de los hospedadores definitivos son susceptibles a la infección, ya sea porque tienen una respuesta innata pobre o deficiente. A su vez, la elevada carga ganadera por hectárea contribuye al incremento de la cantidad de huevos liberados al medio ambiente (8-10).

1.1.2 Daño tisular producido por *F. hepatica*

Las alteraciones producidas por *F. hepatica* están estrechamente ligadas a su localización temporal en el hospedador definitivo. Se ha descrito en ovejas, que durante la etapa invasiva o prehepática las larvas juveniles penetran la pared del intestino y migran dentro de la cavidad peritoneal hasta la cápsula de Glisson, sin producir lesiones de importancia. En ese momento, los hospedadores no presentan signos clínicos y los hallazgos patológicos son raros, excepto por pequeños focos hemorrágicos en la cavidad peritoneal. No se observan cambios en la pared intestinal (11-13), lo que sugiere que el parásito se mueve rápidamente a través de este tejido y/o posee un mecanismo que suprime la activación inmune dentro del tejido. Sin embargo, los parásitos inducen un reclutamiento de células inmunes, dado que a medida que transcurre la infección, la composición celular del líquido peritoneal, es modificada. En el infiltrado se pueden observar un gran número de células inmunes como linfocitos, macrófagos y especialmente eosinófilos(12-13).

En la etapa hepática, los gusanos atraviesan el parénquima causando: ruptura de tejidos, formación de túneles, hemorragias y focos necróticos, para facilitar su migración y alimentación. Luego, los parásitos ingresan a los conductos biliares, donde continúan su crecimiento y desarrollo, causando hiperplasia. Este fenómeno es facilitado por la liberación de diferentes enzimas como las leucina aminopeptidasas (LAPs) (14). Las LAPs son capaces de hidrolizar prolina, en el extremo amino terminal de las proteínas blanco, (15-18), un componente esencial del colágeno, favoreciendo la hiperplasia, dilatación y finalmente fibrosis del colédoco causando a menudo, una colangitis (19).

En aquellos casos en los que se consume una gran cantidad de metacercarias en un periodo de tiempo corto, la migración masiva de las larvas juveniles provoca un cuadro agudo caracterizado generalmente por hemorragia abdominal, ascitis, anemia, hepatitis traumática con destrucción celular que lleva a insuficiencia hepática aguda y muerte en los casos más graves (20). Este cuadro se produce fundamentalmente en los ovinos, especialmente en corderos jóvenes, que son los más susceptibles (21).

1.1.3 *F. hepatica* y su interacción con el sistema inmune

F. hepatica expresa moléculas de distinta naturaleza que participan en la interacción parásito-hospedador y son capaces de ejercer diversos efectos en células del sistema inmune. Estos productos llamados excretos-secretos (PES) son componentes solubles o están presentes en vesículas extracelulares liberadas por el parásito, y pueden modular la respuesta inmune.

Se ha visto que tanto antígenos tegumentales (FhTeg) como los PES son reconocidos por células de la inmunidad innata como células dendríticas (CDs) y macrófagos. Estudios *in-vitro*, han demostrado que estas moléculas son capaces de suprimir la activación y maduración de CDs inducida por ligandos de TLR y promover la proliferación de los linfocitos T regulatorios (Treg), (22-24). Este efecto sería mediado por los receptores de lectinas tipo C lo cuales reconocen los glúcidos presentes en estos antígenos. Esta interacción causa la inhibición de la vía de la señalización de NF- κ B, favoreciendo la producción de TGF- β e IL-10 (23, 25). NF- κ B está compuesto por cinco miembros, p65 (también llamado RelA), RelB, c-Rel, p50 y p52, los que normalmente se encuentran en el citoplasma como un complejo inactivo asociado al inhibidor de la proteína κ B (I κ B). Éste último luego de estimulación con, por ejemplo, ligandos para TLRs, es fosforilado, ubiquitinado y degradado por el proteosoma. Algo similar ocurre con la subunidad p65, quien luego de ser activada y unirse a la secuencia de ADN blanco correspondiente, es poliubiquitinada y degradada por el proteosoma en el núcleo de la célula (26).

En los últimos años se ha buscado identificar dentro de los PES de *F. hepatica*, aquellas moléculas que tengan funciones inmunomoduladoras, para ser empleadas, eventualmente, en el desarrollo de vacunas que generen respuestas protectoras contra la infección. Se determinó que el 80% de las proteasas expresadas corresponden a la familia de las catepsinas L (27).

La cisteín proteasa más ampliamente estudiada en cuanto a su interacción con el sistema inmune es catepsina L1 (FhCL1). Se ha demostrado, en modelos murinos, que cuando es administrada por vía intraperitoneal se ubica en los endosomas tempranos

de los macrófagos, donde escinde o previene la expresión del receptor tipo Toll 3 (TLR-3) y bloquea la señalización de la vía de TRIF. La prevención o restricción de la activación mediada por TLR3/TLR4 puede ser un mecanismo por el cual *F. hepatica* controla el exceso de inflamación que podría resultar dañina para el parásito (28). Si bien este mecanismo aún no se ha demostrado en las CDs, se ha visto que FhCL1 y la glutatión-S transferasa (FhGST) inducen algunos mediadores proinflamatorios tales como IL-6, IL-12p40, la proteína 2 inflamatoria de macrófagos (MIP-2) y aumenta la expresión de CD40. Además, la exposición de estas células a FhCL1 y GST, afecta su capacidad para controlar las respuestas inmunitarias Th17 (22). Esta función inmunomoduladora depende de TLR4 y de la actividad enzimática de estas proteínas. Por el contrario, la capacidad de FhCL1 para inhibir respuestas inflamatorias se ha demostrado en un modelo de sepsis en ratón. La administración de FhCL1 antes de una dosis letal de LPS redujo la mortalidad de ratones, junto con los niveles de producción de citoquinas proinflamatorias (28-29).

Asimismo, otras proteínas que se encuentran presentes en los PES son la peroxirredoxina (FhPrx), la molécula de defensa del helminto (FhHDM), glutatión-S transferasa (FhGST), catepsina B (FhCB1-10), la proteína de unión a ácidos grasos (FhFABP) y la leucina aminopeptidasa (FhLAP), que también poseen propiedades inmunomoduladoras (30-34). Por ejemplo, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que FhPrx es responsable de activar alternativamente a los macrófagos hacia un perfil M2, evitando que respondan a estímulos inflamatorios clásicos, como LPS, y otorgándoles la capacidad de promover la diferenciación de las células T en un fenotipo Th2. Por otro lado, la FhHDM-1 es internalizada por los macrófagos y se ubica en los

endosomas donde es procesada proteolíticamente por catepsina L1 para liberar un péptido C-terminal de 34 residuos llamado FhHDM-1 p2 (35).

Se ha visto que FhHDM-1 previene la interacción del LPS con el complejo TLR4 / MD2 / CD14 e inhibe la ATPasa vacuolar. Esto causa un bloqueo en la acidificación endolisosomal que, a su vez, interfiere en la degradación de antígenos que serán presentados por el MHC Clase II e impide la activación del componente del inflammasoma NLRP3 (36-37).

De manera similar, FhFABP es una proteína antiinflamatoria capaz de suprimir la expresión de marcadores inflamatorios inducida por LPS in vivo e in vitro y la estimulación de TLRs en respuesta a múltiples ligandos bacterianos e induce la activación alternativa de los macrófagos (38).

Todos estos datos indican que los productos provenientes de *F. hepatica* ejercen, en su conjunto o de manera individual, un efecto inmunosupresor, que favorece la supervivencia del parásito en el hospedador. Sin embargo, dado la naturaleza diversa de estos productos (proteica, lipídica o glucídica) existen algunas excepciones. Se ha visto que ciertas moléculas aisladas son capaces de promover la activación del sistema inmune. Esto podría deberse a que las mismas utilizan diferentes vías de señalización para generar su efecto inmunológico. Por lo tanto, dilucidar cómo cada antígeno individual de *F. hepatica* afecta la modulación de la respuesta inmune podría resultar útil para el desarrollo de estrategias de defensa contra la fasciolosis o incluso otras helmintiasis.

1.1.4 Catepsinas, las principales proteasas expresadas por *F. hepatica*

Las catepsinas, son miembros de la familia de las cisteínas proteasas “tipo papaína”, que se expresan abundantemente en *F. hepatica*. (39-40) y son importantes factores de virulencia. Las catepsinas L son las principales proteasas expresadas en adultos de *F. hepatica* (32, 41-43), mientras que las catepsinas B se presentan predominantemente en estadio juvenil (44-45). Sin embargo, también se determinó que varias isoformas de catepsina L y B se expresan diferencialmente durante las etapas de desarrollo de *F. hepatica* (32-33, 46).

Las catepsinas L de *F. hepatica* se pueden clasificar en cinco grupos según su identidad de secuencia. Los grupos 1, 2 y 5 se asocian al estadio adulto, mientras que los grupos 3 y 4 se clasificaron como catepsinas L pertenecientes a la etapa juvenil (33, 46-47). Se han identificado dos proteasas de catepsina L juveniles en *F. hepatica*, FhCL3 y FhCL4 (48-49). Las catepsinas juveniles se diferencian de las proteasas específicas de un adulto, tanto en secuencia peptídica como en sus características bioquímicas y fisiológicas. En contraste con las enzimas encontradas en el gusano adulto, estas proteínas han sido menos estudiadas debido a que el proceso de obtención de las larvas juveniles es dificultoso, por lo cual es difícil de aislar ARNm y sustancias excreto-secretadas por las larvas para su posterior análisis.

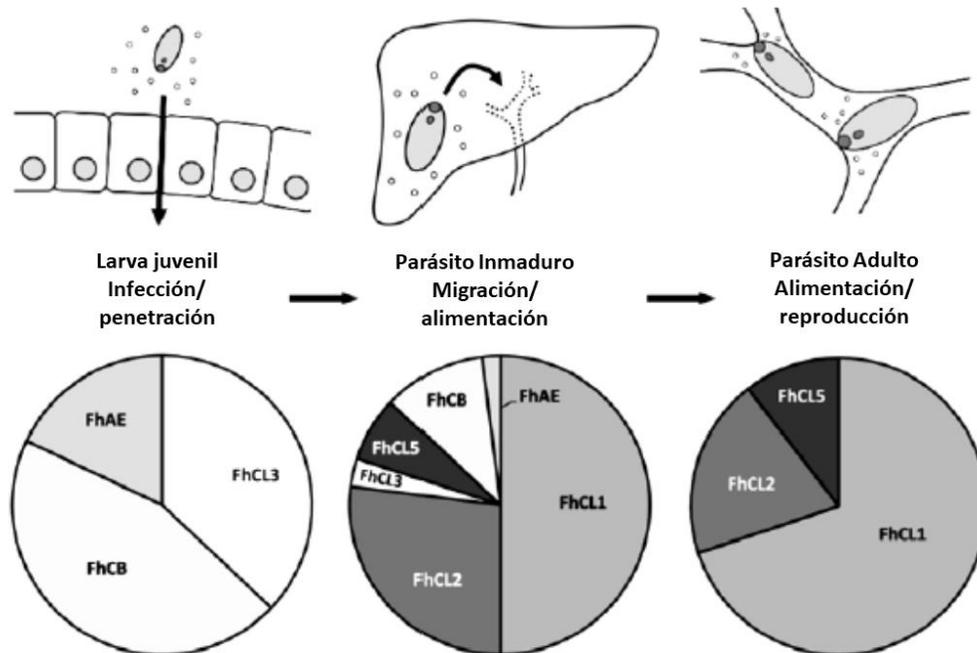


Figura 3. Expresión diferencial de catepsinas durante la infección del hospedador definitivo. Los gráficos de torta representan los niveles expresión de las diferentes proteasas, en los distintos estadios evolutivos del *F. hepatica* en el hospedador. FhAE: *F. hepatica* asparaginil endopeptidasas; FhCB: *F. hepatica* catepsinas B; FhCL1-5 *F. hepatica* catepsinas L1-5. Adaptado de Robinson y col 2008; Robinson y col. 2009, (32-33)

Aun así, se ha logrado determinar que FhCL3 junto con FhCB representan más del 80% de la actividad de proteasa detectable en la larva juvenil recién desenquistada. FhCL3, está presente en ventosas orales y ventrales, tegumento y los productos excreto-secretados por las larvas juveniles (50), posee además una actividad y estabilidad óptimas a pH neutro. En la base a datos del GenBank pueden encontrarse siete secuencias de ADNc de catepsina L3 de *F. hepatica*. Más recientemente fue clonado el ADNc de dos nuevas proteasas de catepsina L3, FhCL3-1 y FhCL3-2. Ratas y ovejas inmunizadas con recombinantes de estas proteínas, presentaron una respuesta inmune mediada por anticuerpos diferenciada dependiendo del clon de FhCL3 que era administrado (50).

Adicionalmente, se ha determinado, que estas peptidasas escinden sustratos con residuo de prolina, lo que permite que las catepsinas L digieran el colágeno, pero no inmunoglobulinas, y desempeñen un rol fundamental en la migración de los parásitos a través de los tejidos del huésped (35, 51-52). De hecho, el silenciamiento de catepsina L, empleando ARN de interferencia, en el estadio infectivo causa una reducción en la capacidad de penetración de las larvas juveniles a través de la pared intestinal (53).

La preferencia de FhCL3 por residuos prolina (más específicamente por la secuencia Gly-Pro-Xaa, donde Xaa es cualquier aminoácido), que le confiere esta actividad de tipo colagenasa única, se debe, en parte, a la presencia de un triptófano en la posición 67 (que no se encuentra en ninguna otra proteasa de tipo catepsina). A diferencia de lo que ocurre con, por ejemplo, FhCL1 que presenta el aminoácido leucina en dicha posición, lo cual se traduce en una mayor afinidad de FhCL1 por sustratos que contienen residuos hidrofóbicos, como es el caso de la hemoglobina. Por lo cual se asocia a FhCL1, entre otras catepsinas que presentan similares características en su secuencia, con funciones de alimentación del parásito en su estadio adulto (33).

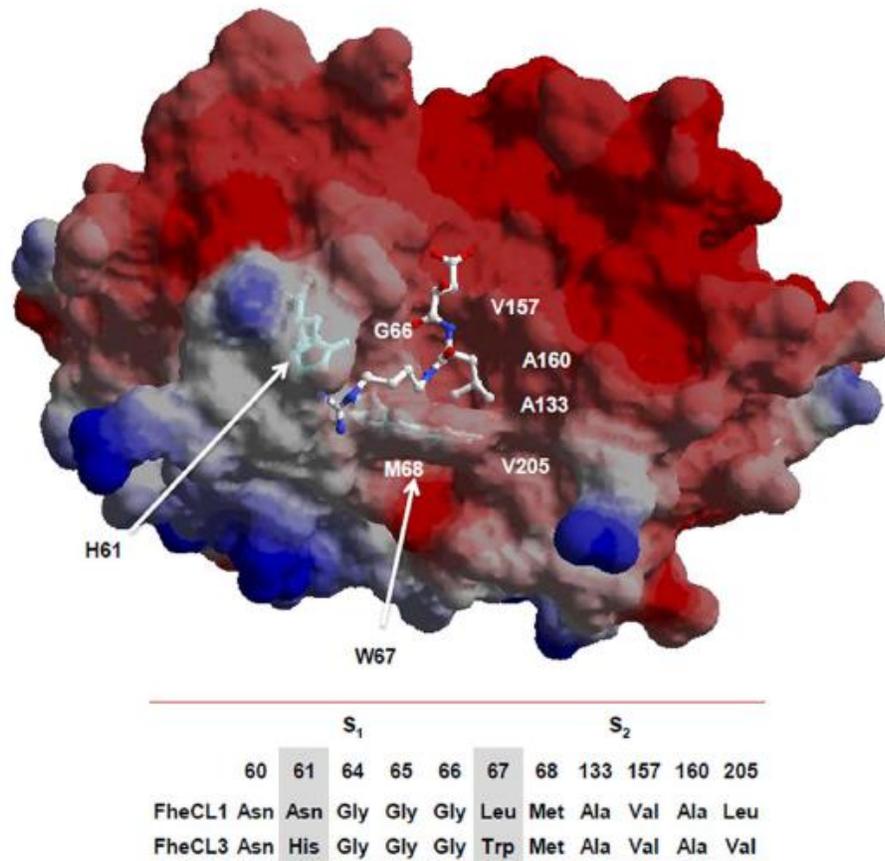


Figura 4. Modelo molecular de FhCL3 madura. El modelo muestra los subsitios S2 y S3 del sitio activo de FhCL3: histidina en la posición 61 (His61) y triptófano en la posición 67 (Trp67), son aminoácidos claves para la acción de FhCL3 sobre el colágeno. Se comparan además la secuencia de aminoácidos de los sitios activos de FhCL1 y FhCL3. Adaptado de Corvo I. y col 2013, (54).

A pesar de estos antecedentes, que muestran la importancia de la expresión de FhCL3 en la larva juvenil y sus particulares características en cuanto a su secuencia y afinidad por el colágeno su efecto sobre el sistema inmune no ha sido completamente estudiado.

1.2 El inflammasoma

Los inflammasomas son complejos proteicos multiméricos que se ensamblan en el citosol después de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (de su sigla en

inglés: PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño tisular (de su sigla en inglés DAMPs) (55-57). Si bien existen numerosos tipos de inflamomas que presentan diferencias fundamentales entre sí, en general, los canónicos sirven como plataformas para reclutar el zimógeno inactivo procaspasa-1. La oligomerización de proteínas procaspasa-1 induce su activación auto-proteolítica a caspasa-1 activa. La caspasa-1 es una cisteín proteasa que escinde las formas precursoras pro-IL-1 β y pro-IL-18 y genera citoquinas biológicamente activas IL-1 β e IL-18, respectivamente. La caspasa-1 activa, también puede inducir una forma inflamatoria de muerte celular conocida como piroptosis.

Estos complejos macromoleculares están constituidos por un receptor NOD (NLR) o un receptor de AIM2 (ausente en melanoma 2), la proteína adaptadora ASC que contiene el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y la procaspasa-1, los cuales pueden ser activados dando lugar al procesamiento de las pro-interleuquinas inflamatorias a sus formas activas (58-59).

El inflamoma NLRP3, el más ampliamente estudiado, está presente principalmente en células inmunitarias como macrófagos, monocitos, CD4 y neutrófilos esplénicos (60). Este complejo es activado por una amplia gama de moléculas derivadas de patógenos, del propio hospedador y del entorno. El receptor NLRP3 está compuesto por un dominio pirina (PYD), un dominio central de oligomerización y unión al nucleótido (NOD o NAHCT) y un dominio que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR)(61).

La activación canónica del inflamoma NLRP3 ocurre en dos etapas (60-63). El primer paso implica una señal de “cebado” o iniciación en la que muchos PAMPs o DAMPs

son reconocidos por TLR, lo que lleva a la activación de la señalización mediada por el factor nuclear kappa B (NF- κ B), que a su vez regula la transcripción de componentes relacionados con el inflamasoma, incluyendo NLRP3, pro-IL1 β , y pro-IL-18 (64-66). El segundo consiste en la oligomerización de NLRP3 y su posterior ensamble con ASC y procaspasa-1. Esto promueve la transformación de procaspasa-1 a caspasa-1, así como la producción y secreción de IL-1 β e IL-18 maduras (63, 67-68). Se han propuesto tres modelos para describir el segundo paso de la activación del inflamasoma (69). En el primer modelo, el ATP extracelular interacciona con el receptor P2X7, lo cual promueve el eflujo de K⁺ a través de un hemicanal llamado panexina-1. Este proceso conduce a la activación y ensamblaje del inflamasoma NLRP3. El eflujo K⁺ es uno de los principales activadores del inflamasoma, mientras que el ATP extracelular y las toxinas formadoras de poros son los principales desencadenantes de la secreción de IL-1 β (70-72). Los flujos intracelulares de calcio relacionados con el retículo endoplasmático también pueden activar el inflamasoma (60, 73-74). En el segundo modelo, todos los PAMPs y DAMPs conocidos, incluidos los activadores mencionados anteriormente, desencadenan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez inducen el ensamble del inflamasoma. (75-77). En el tercer modelo, se cree que el ensamble y la activación del inflamasoma NLRP3 son desencadenados por irritantes ambientales (tales como silica, amianto, amiloide- β y aluminio) que forman estructuras cristalinas o particuladas cuando son internalizados por fagocitos. Estos agregados causan ruptura lisosomal y liberación de su contenido a través de un mecanismo mediado por catepsinas B. De acuerdo con este modelo, los

estímulos cristalinos como la sílice son los principales factores desencadenantes de la secreción de IL-1 β por el inflamasoma.

Se conocen además otros factores que pueden activar el inflamasoma. Estos incluyen: el daño mitocondrial o la disfunción causada por la sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ (78-80), la disrupción lisosomal (81-83), la disfunción autofágica (84-86) y tioredoxina (TXNIP) que interacciona con NLRP3 (87-88).

Todos los modelos suponen que NLRP3 no interactúa directamente con sus activadores, lo que explicaría su capacidad para “sensar” distintos tipos de estímulos.

Sin embargo, se ha reportado que el ADN mitocondrial oxidado funciona como un ligando NLRP3 que induce el ensamble y la activación del inflamasoma NLRP3 (89).

Por otro lado, algunos estudios indican que la cardiolipina, un lípido que se encuentra en la membrana bacteriana o en la membrana mitocondrial interna, funciona como ligando y activador de NLRP3. Además, fue demostrado que la proteasa catépsina B endógena es capaz de interactuar directamente con el dominio LRR de NLRP3, aunque su habilidad para activarlo no ha sido comprobada.

Estos estudios revelan que, a diferencia de otros receptores de la inmunidad innata, cuyos ligandos están bien establecidos, NLRP3, no tiene un único ligando estrictamente definido, con lo cual este receptor tendría una singular habilidad para “unir” moléculas de distinta naturaleza. Por lo tanto, se podría especular que aún quedan ligandos por ser identificados.

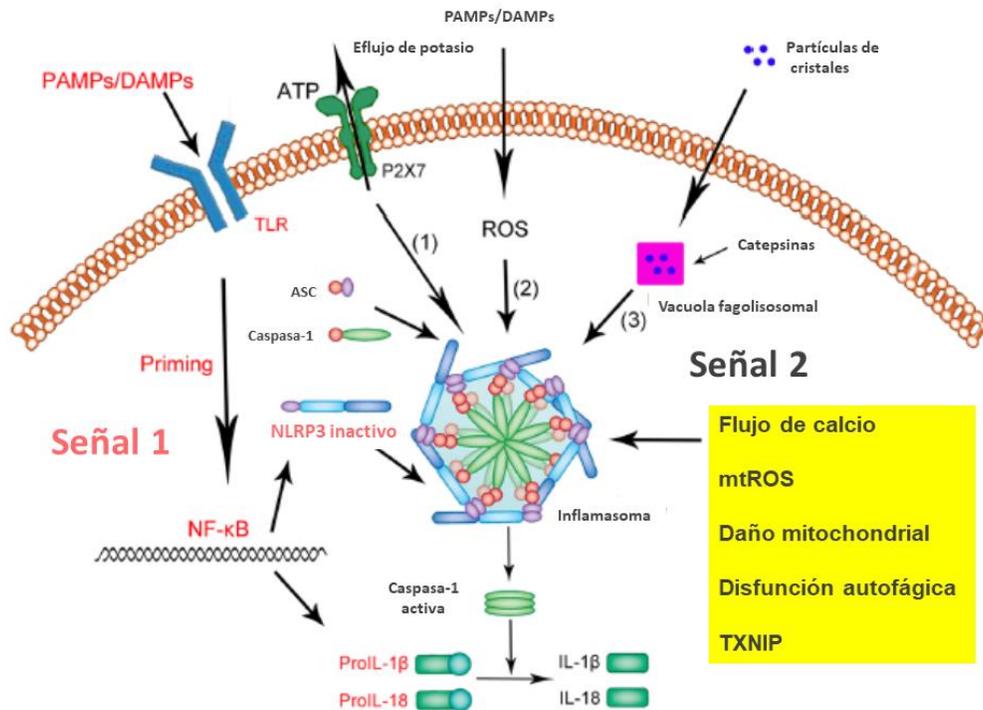


Figura 5. Activación del inflammasoma NLRP3: Modelo de las dos señales. Luego del contacto con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o con los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) con receptores de tipo Toll (TLR) se activa NF- κ B. En el núcleo, NF- κ B promueve la transcripción y traducción de las formas inactivas de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18 (Señal 1 o *cebado*, en rojo). Un estímulo posterior (Señal 2, en negro) activa el inflammasoma NLRP3 al promover la oligomerización del NLRP3 inactivo, la proteína adaptadora ASC y la procaspasa-1. Este complejo cataliza la conversión de procaspasa-1 en caspasa-1, lo que contribuye a la producción y secreción de las formas maduras de IL-1 β e IL-18. Se han propuesto tres modelos para describir el segundo paso de la activación del inflammasoma: **(1)** El ATP extracelular puede inducir el eflujo de potasio (K^+) mediante el receptor purinérgico P2X7, lo cual induce el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3. El flujo de calcio también está involucrado en este proceso. **(2)** Los PAMPs y DAMPs desencadenan la producción de ROS que promueven el ensamblaje y la activación del inflammasoma NLRP3. **(3)** La fagocitosis de estructuras cristalinas provocan la ruptura de los lisosomas y la liberación de su contenido, donde se encuentran presentes catepsinas B. Esto induce el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3. Además, otros factores y mecanismos han sido implicados en la activación del inflammasoma NLRP3, como el daño mitocondrial, la disfunción autofágica y la tiorredoxina que interactúa con NLRP3 (TXNIP). Adaptado de Shao B.Z., 2015, (90).

1.2.1 El inflammasoma NLRP3 en infecciones por helmintos

El inflammasoma NLRP3 puede activarse en respuesta a una amplia gama de estímulos ocasionados por bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, entre otras) (91-92), virus (adenovirus, influenza A, etc.) (93-95), protozoos (*Plasmodium*

spp., *leishmania spp.*, *toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi*)(96-99), hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus spp.*)(100-101), incluyendo toxinas como el lipopolisacárido (LPS) y ácidos nucleicos (91, 102). Cualquiera sea el origen del estímulo el resultado final es la maduración y liberación de IL-1 β y/o IL-18, dependiente de la vía NLRP3/ASC/caspasa-1. Estas citoquinas participan en el proceso inflamatorio para el control de las infecciones; por lo cual la activación del inflamasoma NLRP3 es crucial para la defensa del hospedador frente a los diversos agentes patógenos.

Sin embargo, se ha visto que una respuesta inflamatoria no siempre es benéfica e incluso, a veces, puede promover el desarrollo de una patología. Tal es el caso del paludismo, donde la producción de IL-1 β se asocia con complicaciones clínicas y con el desarrollo de malaria cerebral (103). Esto indica que el proceso inflamatorio debe ser finamente regulado. De hecho, la falla en el control de la inflamación se ha asociado a fenómenos inmunopatológicos.

En infecciones causadas por helmintos, la función del inflamasoma NLRP3, no ha sido del todo esclarecida. Así, por ejemplo, en el contexto de una infección con *Heligmosomoides polygyrus*, se ha observado un aumento en la secreción de IL-1 β , la cual controla el establecimiento de una exacerbada respuesta de tipo Th2, inhibiendo la producción de IL-25 e IL-33 (104). De manera similar se ha reportado que *Trichuris muris* es capaz de bloquear la respuesta Th2, dado que induce la expresión de IL-18 de manera dependiente de NLRP3, tanto en macrófagos co-cultivados con antígenos del parásito, como en ratones infectados (105). Estos hallazgos permiten asignar un nuevo rol tanto a IL-1 β como a IL-18, en el control de una exagerada repuesta Th2 la cual sería perjudicial para el parásito.

Por otro lado, también se ha demostrado que antígenos solubles de los huevos de *Schistosoma spp.* (SEA) promueven la formación y activación del inflammasoma NLRP3 en células estrelladas hepáticas de ratón. Este fenómeno sería mediado por SYK, dectina-1 y JNK y estimula el depósito de colágeno (106-107). En línea con esto, ha sido reportado que la ribonucleasa T2, omega-1, perteneciente al SEA mejora la secreción de IL-1 β inducida por ligandos de TLRs en CDs de manera dependiente de la vía NLRP3/ASC/caspasa-1 (108). Por el contrario, la molécula de defensa de helmintos (HDM-1) secretada por *F. hepatica*, inhibe la acidificación endolisosomal en macrófagos, lo que evita que NLRP3 sea activado por catepsina B (36). Este bloqueo en la activación de NLRP3 contribuye al desarrollo de una respuesta tipo Th2, que, en este caso, es beneficiosa para el parásito (36), ya que en fasciolosis a diferencia de las helmintiasis intestinales, la respuesta protectora para el huésped es de tipo Th1. Estos reportes sugieren que independientemente del mecanismo empleado por las diferentes moléculas provenientes de estos parásitos, el resultado final es un balance entre la respuesta inmune protectora del hospedador y el daño producido por el parásito, favoreciendo la supervivencia de ambos y por ende la cronicidad de la patología.

1.2.2 Catepsinas y el inflammasoma NLRP3

Como se mencionó anteriormente, la ruptura de la membrana lisosomal es uno de los tres mecanismos propuestos por los cuales, el inflammasoma NLRP3, un complejo intracelular, es capaz de sentir la presencia de partículas extracelulares. Se ha demostrado que las partículas como la sílica o el aluminio pueden causar la ruptura

lisosomal, que conduce a la liberación de cisteín proteasas lisosomales, al citosol (81). Entre estas proteasas se encuentra y ha sido principalmente estudiada, la catepsina B. Si bien, fue comprobado que esta enzima es capaz de activar NLRP3 e incluso interaccionar físicamente con este receptor, el mecanismo desarrollado durante este proceso, no está completamente dilucidado (109). De acuerdo con este modelo, la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por partículas exógenas, es bloqueada por el uso de inhibidores de la acidificación lisosomal e inhibidores de la catepsina B, dado que las catepsinas son óptimamente activas en condiciones ácidas. Sin embargo, el requerimiento de catepsina B en este proceso es controversial. Algunos estudios destacan que macrófagos deficientes en catepsinas B o L muestran un deterioro parcial en este tipo de respuesta (110), mientras que otros grupos de investigación han encontrado que la respuesta se mantiene intacta en las mismas células mutantes. Existe un estudio donde los autores demuestran que múltiples catepsinas (tanto B como L, C, S y X) promueven, no solo la secreción de IL-1 β , si no también, la síntesis de su forma precursora, pro-IL-1 β (111). Es interesante que otros reportes muestren que el inhibidor endógeno de catepsinas L, cistatina B, interactúa con catepsina L en el núcleo (112) y que ésta última puede desempeñar un papel en la activación de NF- κ B (113). Aún, más sorprendente es que la inhibición de cistatina B, mejora la expresión de pro-IL-1 β , pero no la de otras citoquinas dependientes de NF- κ B, como TNF- α (111), o incluso se ha observado una disminución en la expresión de IL-10, la cual regula transcripcionalmente la síntesis de IL-1 β (114).

A pesar de estos antecedentes que relacionan a catepsinas endógenas con la activación del inflamasoma, se desconoce si catepsinas exógenas como por ejemplo

FhCL3, podrían participar en este fenómeno. Esto, sumado a algunos reportes que muestran la participación de moléculas de helmintos en la modulación del inflamasoma NLRP3 y la síntesis y liberación de IL-1 β , sugieren que FhCL3 podría intervenir en este proceso.

CAPÍTULO 2: **OBJETIVOS**



General

Estudiar la capacidad moduladora de catepsina L3 de *Fasciola hepatica* sobre la activación de células dendríticas murinas y su influencia en la respuesta inmune adaptativa.

Específicos

1. Investigar el efecto de FhCL3 sobre la activación de las CDs.
2. Determinar si la actividad biológica de FhCL3 se relaciona con sus posibles propiedades inmunológicas.
3. Estudiar la capacidad de CDs condicionadas con FhCL3 para modular la respuesta inmune adaptativa.
4. Evaluar el impacto de los efectos inmunológicos causados por FhCL3 en un modelo de infección.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Animales

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de entre 8-10 semanas de edad adquiridos en la Universidad Nacional de La Plata. CASP1/11KO (B6N.129S2-Casp1^{tm1Flv}/J) y NLRP3KO (B6.129S6-Nlrp3^{tm1Bhk}), (background C57BL/6), fueron provistos por Jackson Laboratory (USA). Los ratones BALB/c fueron adquiridos en la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires, Argentina). Todos los animales que fueron utilizados en el presente trabajo de investigación fueron mantenidos en el bioterio y bajo las normas por las que se rige el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología – CIBICI – CONICET – CICUAL (nro. 2016-213) (115).

3.2 Insumos y reactivos

Se utilizaron anticuerpos comerciales de ELISA sándwich para la detección de IL-6 (Catálogo Nro. 555240, Lote: 2324756), IL-10 (Catálogo Nro. 555252, Lote: 2324786) IL12p70 (Catálogo Nro. 555256, Lote: 31119845), TNF (Catálogo Nro. 560410, Lote: 2428757), IL-4 (Catálogo Nro. 555243, Lote: 31119632) e IFN- γ (Catálogo Nro. 551866, Lote: 2356934) y los anticuerpos para citometría de flujo anti MHC-II PE, (anti- I-A/I-E, Catálogo Nro. 556999, Lote: 87256, dilución: 1/200), anti CD40 PE, (Catálogo Nro. 553368, Lote: 85456, dilución: 1/100), anti CD80 PE (Catálogo Nro. 553368, Lote: 87598, dilución: 1/100), anti CD86 PE (Catálogo Nro. 553689, Lote: 87578, dilución: 1/100), anti IFN- γ PE (Catálogo Nro. 554412, Lote: 6271702, dilución: 1/200), anti CD4 FITC (Catálogo Nro. 553046, Lote: 6272056, dilución: 1/400) y anti CD8 APC-Cy7 (Catálogo Nro. 561093, Lote: 6374020, dilución: 1/400) fueron obtenidos en Becton Dickinson (San Diego, California, USA). Mientras que los anticuerpos para el ELISA

sándwich para IL-1 β (Catálogo Nro. BMS6002, Lote: 147944016), IL-18 (Catálogo Nro. BMS618, Lote: 4335728) e IL-13 (Catálogo Nro. KMC2221, Lote: 4335745), la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA), (Catálogo Nro. D399), el marcador de peso molecular (Catálogo Nro. 26619), el MitoSOX TM Red (Catálogo Nro. M36008), el anticuerpo secundario anti conejo IgG (Alexa Fluor Plus 647, Catálogo Nro. A32733), el anti PYCARD (Catálogo Nro. PA5-50915, dilución: 1/1000), el anti NF-kB p65 (Catálogo Nro. 14-6731-81, dilución: 1/500), el recombinante murino de pro-IL-1 β (Pro-forma), (Catálogo Nro. 39-8114-65) y el kit de marcación de proteínas (Catálogo Nro. A30006) fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El kit de ELISA para el IFN- β (Catálogo Nro. 581309, Lote B211432), los anticuerpos anti CD11c (APC, Catálogo Nro. 581309, Lote B211432), anti MHC-I (anti H-2Kb/H-2Db, FITC, Catálogo Nro. 116505, Lote B212532, dilución: 1/200), anti CD3 (APC, Catálogo Nro. 100236, Lote B21479, dilución: 1/400) se adquirieron en BioLegend (San Diego, California, USA). El lipopolisacárido (LPS; *E. coli* cepa 0111:84, Catálogo Nro. L4005), adenosín-5'-trifosfato (ATP, Catálogo Nro. A2383), solución de tinción Hoechst (Catálogo Nro. 30358), el cloruro de difenilenodonio (DPI, Catálogo Nro. D2926) fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo anti EEA1 (marcador de endosomas tempranos, Catálogo Nro. ab2900, dilución: 1/1250) fue adquirido en Abcam (Cambridge, MA, USA). El Fluorsave fue obtenido en Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos anti I κ B- α (Catálogo Nro. 9242, dilución: 1/1000), anti β -Actina (Catálogo Nro. 4970, dilución: 1/500) y anti IL-1 β (Catálogo Nro. 9242, dilución: 1/2000) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Los kits de ELISA fueron empleados según el protocolo establecido por el fabricante. Mientras

que las diluciones de los anticuerpos para citometría de flujo y western blot, fueron establecidas en nuestro laboratorio.

Los anticuerpos anti IL-1 β /IL-1F2 (Catálogo Nro. AF-401-NA, Lote CGSM0307095, dilución: 1/1000), anti NLRP3/NALP3 (Catálogo Nro. MAB7578, Lote CGSM0217091, dilución: 1/500), anti LAMP-1/CD107a (Catálogo Nro. MAB4320, Lote CGSM0230781, dilución: 1/250) y anti rata IgG (NL557, Catálogo Nro. NL013, Lote: AAFN05, dilución: 1/1000) fueron adquiridos en R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti conejo IRDye 680RD y anti Ratón IRDye 680RD fueron obtenidos de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA).

3.3 Antígenos de *F. hepatica*

3.3.1 Producción de FhCL3 y rvFhCL3: La proenzima recombinante FhCL3 fue producida en los laboratorios del Dr. José Tort y la Dra. Ileana Corvo, en la levadura *Hansenula polymorpha* como se describió anteriormente (51, 116). Brevemente, levaduras transformadas se cultivaron en 500 ml de caldo BMGY a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 2-6, recuperadas por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos e incubadas en 50 ml de un medio mínimo tamponado (0,67% de base de nitrógeno de levadura, solución fosfato 0,1 M, pH 6,0; metanol al 1%) durante 36 horas a 30°C. Los sobrenadantes fueron colectados y concentrados 20-30 veces por ultrafiltración con una membrana de corte de 10 kDa. La proenzima fue activada autocatalíticamente a su forma madura por incubación durante 2 horas a 37°C en un buffer de citrato de sodio 0,1 M, pH 5,0, con DTT 2 mM y 2,5 mM EDTA, dializado contra PBS pH 7.3 y almacenado a -20°C. La concentración de proteína se evaluó mediante el método BCA

(117). La proporción de enzima funcionalmente activa fue determinada por titulación con el inhibidor E-64. La variante rvFhCL3 fue obtenida con el mismo protocolo utilizado para la producción FhCL3.

Los recombinantes fueron pasados por una columna conteniendo agarosa-polimixina B para remover las endotoxinas contaminantes. La carga de endotoxinas fue determinada mediante el test de Lisado de Amebocitos de Limulus (EndosafeTimes, Charles River, Laboratories, Wilmington, Delaware). Los niveles de endotoxinas fueron comparables o menores a los del medio de cultivo.

Las muestras de FhCL3 fueron analizadas por MALDI-TOF, en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM-UBA).

3.3.2 Producción de extracto total (ET): Gusanos adultos de *F. hepatica* obtenidos de hígados bovinos infectados con el parásito fueron lavados y luego desintegrados en un homogeneizador mecánico utilizando PBS, en una relación de 2 gusanos/ml. El ET obtenido se centrifugó a 12.000 g durante 45 minutos, a 4 °C. Luego el sobrenadante fue extraído y filtrado, antes de ser pasado por una columna conteniendo agarosa-polimixina B para retener las endotoxinas contaminantes. Luego el ET fue esterilizado por filtración y fraccionado en tubos eppendorf de 1.5 ml a -20°C. La carga de endotoxinas en ET fue determinada mediante el test de Lisado de Amebocitos de Limulus (EndosafeTimes, Charles River, Laboratories, Wilmington, Delaware). Los niveles de endotoxinas fueron comparables o menores a los del medio de cultivo.

3.4 Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática fue evaluada como se describe en (54). FhCL3 fue incubada con un péptido fluorogénico sintético, Tos-GPR-AMC, que actúa como sustrato de la misma. La enzima fue suspendida en un buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0, DTT 1mM y EDTA 1mM a 25°C. El sustrato fue añadido luego de 10 minutos de incubación de la enzima en el buffer de reacción. La actividad enzimática se monitoreo mediante la liberación del grupo fluorescente 7-amino-4-metil cumarina (AMC) a partir del sustrato Tos-GPR-AMC. La velocidad de escisión del sustrato se midió usando un lector de placas Biotek ELx800. Las mediciones de fluorescencia (RFU) se realizaron a intervalos de 60 segundos, durante 20 minutos.

3.5 Preparación y cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea (CDs)

CDs fueron obtenidas como previamente lo describió Imaba y col, 1992 (118). Brevemente, progenitores de médula ósea fueron aislados de tibia y fémur de ratones C57BL/6, CASP1/11KO y NLRP3KO y cultivados en RPMI 1640 con suero bovino fetal (SFB) 10%, 40 µg/ml de gentamicina, L-glutamina 2 mM y en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) de sobrenadantes de la línea celular J558 que contiene un plásmido que codifica para el GM-CSF. El medio de cultivo fue renovado al día 3 y 6. Al día 8 de cultivo, más del 70% de las células no adherentes colectadas expresaron MHC clase II y CD11c. CDs fueron tratadas con FhCL3 (10 µg/ml), rvFhCL3 (10 µg/ml), LPS (100 ng/ml) o ATP (5mM) o en algunos casos con más de un estímulo según se especifica en cada figura. En aquellos en los

cuales se empleó ATP, éste fue añadido los últimos 30 minutos. En todos los experimentos la estimulación fue durante 18 horas salvo aclaración en las figuras.

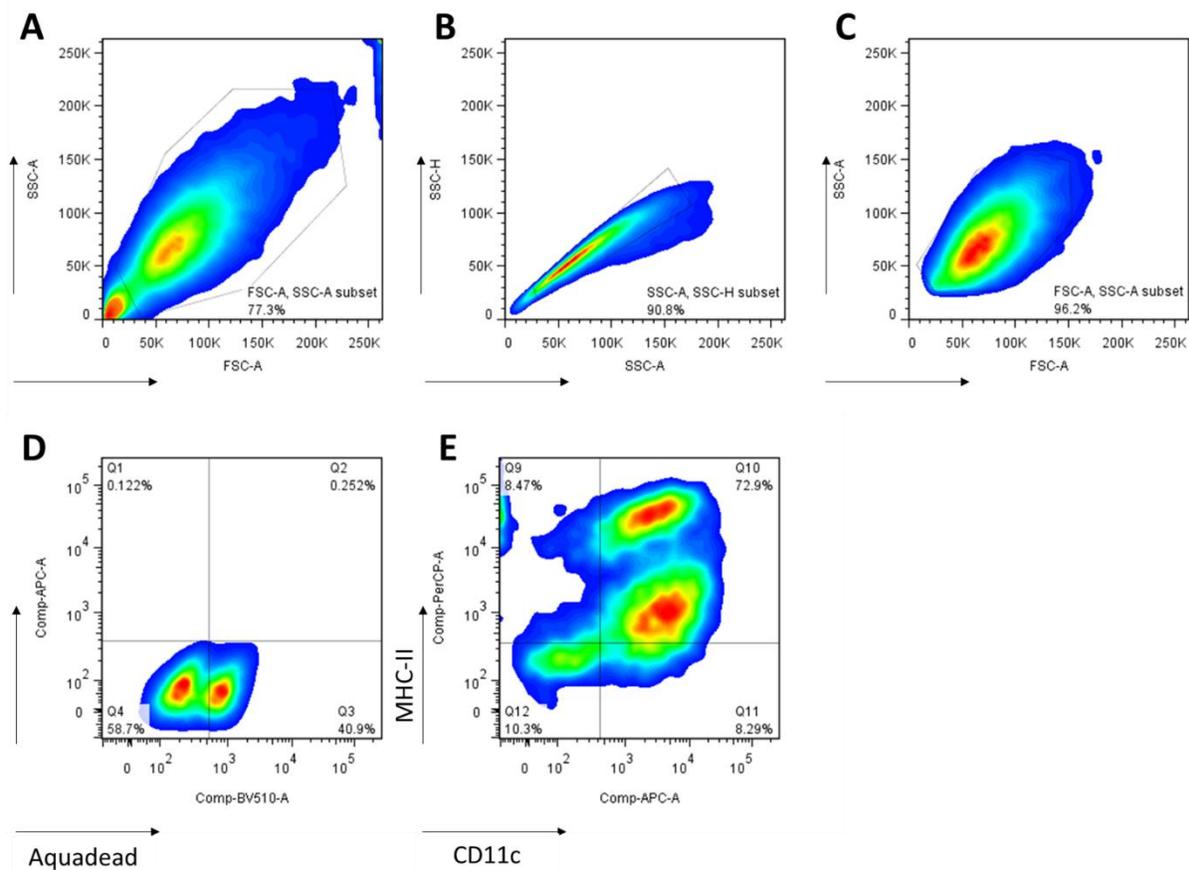


Figura 6. Estrategia de “gates” para el análisis de células dendríticas derivadas de médula ósea a través del software Flow Jo. (A) FSC-SSC > (B) Singletes > (C) FSC-SSC 2 > (D) Tinción Live/ Dead Aqua > (E) CD11c+; MHC-II+. Las CDs obtenidas de ratones C57BL/6 fueron recolectadas y marcadas con Aquadead para la discriminación entre células vivas y muertas, y con anti-CD11c (APC) y anti-MHC-II (PerCP) para la determinación del porcentaje de diferenciación.

3.6 Ensayo de viabilidad

Para determinar la viabilidad de las CDs se utilizó el ensayo de MTT añadiendo un volumen de solución bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazolio (MTT) a cada pocillo, incubando las células durante 4 h a 37°C. Las lecturas fueron realizadas a 570 nm. La densidad óptica de las CDs tratadas con medio solo se consideró como 100% de viabilidad celular.

3.7 Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)

La liberación de lactato deshidrogenasa se midió en el sobrenadante de cultivos de CDs utilizando el kit de ensayo colorimétrico de LDH (Wiener Lab) siguiendo el protocolo del fabricante y se expresó como unidades internacionales (I / U).

3.8 Determinación de Citoquinas

La detección de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-18, IFN- β , TNF, IFN- γ e IL-13 fue realizada en sobrenadantes de cultivos celulares utilizando la técnica de ELISA sándwich. Las placas de 96 pocillos, fondo plano fueron adquiridas en Greiner Bio-One (Catálogo Nro 675061). Cada placa fue sensibilizada con el anticuerpo de captura correspondiente a 4°C, durante toda la noche. A continuación, fueron lavadas e incubadas con PBS-Albumina 1% para bloquear los sitios de unión libres. Luego, de lavadas se incubaron con 25 μ l de los sobrenadantes de cada muestra problema o con los estándares recombinantes para cada placa, durante toda la noche. Posteriormente, cada placa fue lavada con PBS-Tween 20 e incubada durante 1 h con el correspondiente anticuerpo de captura marcado con biotina. Luego, las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Becton Dickinson, San Diego, California, USA), durante 1h. Finalmente, fue agregado el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), cuya naturaleza cromógena permitió leer la reacción a 490 nm en lector de microplacas. Las curvas de calibración, fueron construidas a partir de los estándares recombinantes de cada citoquina provistos en cada kit.

3.9 Citometría de Flujo

Las CDs fueron lavadas dos veces con PBS suplementado con SFB al 2% y luego resuspendidas en SFB-PBS al 10%. Luego las células fueron incubadas con los siguientes anticuerpos durante 30 min a 4 °C: APC-anti-CD11c, FITC-anti-H2Kb/H2Db (MHC-I), PE-anti-IA/IE (MHC-II), PE-anti-CD40, PE-anti-CD80 y PE-anti-CD86 (todos de Pharmingen, San Diego, CA). Para los experimentos que requirieron la determinación de ROS, CDs de cada condición fueron cosechadas a diferentes tiempos, e incubadas con anti CD11c y anti MHC-II. Posteriormente fueron lavadas 3 veces antes de ser incubadas con la sonda correspondiente. Para detectar los niveles de ROS citoplasmático (cROS), las células fueron incubadas con 20 μ M de la sonda H2DCFDA (FITC), durante 20 min at 37°C previo análisis por FACS. Para evaluar los niveles de ROS mitocondrial (mtROS), las células fueron incubadas con 5 μ M de la sonda MitoSOX, durante 15 min at 37°C previo análisis por FACS. Finalmente, todas las células fueron lavadas con solución fisiológica SBF 2%, y resuspendidas para ser analizadas a través del citómetro (FACS Canto II, BD Biosciences).

Se llevó a cabo la detección intracelular de IFN- γ y Foxp3 e identificación de poblaciones celulares en esplenocitos provenientes de cultivos alogénicos o de animales inyectados con CDs o infectados mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales marcados con fluoróforos (APC-anti-CD3, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD4, PE-Cy7-anti-CD25, PE-anti-IFN- γ , PE-anti-Foxp3).

Brevemente, luego del tiempo de cultivo, las células fueron expuestas a BD GolgiPlug (Inhibidor del transporte de proteínas, 1:1000, BD Pharmingen) durante las últimas 5 h

de cultivo, fueron cosechadas y fijadas con BD Cytifix™, tratadas con BD Cytifix/Cytoperm™ al 10% (ambos de BD Pharmingen) y teñidas con una concentración óptima para cada anticuerpo o con un apropiado control de isotipo (obtenidos en BD Biosciences, Biolegend). Las células fueron procesadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo 7.6.

3.10 PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)

El ARN se extrajo de las CDs utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) basado en el método de Chomczynski y Sacchi como se describió previamente (119) y se llevó a cabo la retrotranscripción ADNc empleando el kit Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas-ThermoFisher Scientific). Los transcritos se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), en el equipo StepOnePlus™. Los siguientes primers fueron utilizados (todos los primers enumerados en la orientación 5' a 3'): *Il-1b* GCAACTGTTCTGAACTCAACT (*sense*) y ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT (*antisense*), *Actb* CGCCACCAGTTCGCCATGGA (*sense*) y TACAGCCCGGGGAGCATCGT (*antisense*). Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa LinRegPCR. Dicho programa determina y resta la fluorescencia de línea de base, establece una ventana de linealidad y luego utiliza el análisis de regresión lineal para ajustar una línea recta a través del conjunto de datos. A partir de la pendiente de esta línea se calcula la eficiencia de PCR de cada muestra individual, así como la media de la eficiencia de la PCR por amplicón y el valor de Cq

por muestra, que luego se utilizan para calcular la concentración inicial por muestra, expresada en unidades de fluorescencia arbitrarias. La expresión del gen de interés relativa al gen constitutivo, se normalizó al nivel de las CDs no estimuladas (120).

3.11 Microscopía Confocal

Los experimentos se llevaron a cabo sembrando 1×10^6 CDs en vidrios individuales “coverslips” en placas de 24 pocillos, incubando durante 30 minutos, 2, 4 o 18 horas con FhCL3 previamente teñida con Alexa Flour® 488, empleando el Microscale Protein Labeling Kit (Molecular Probes). Posterior al tratamiento, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,25% en PBS, bloqueadas durante 1 h en PBS (pH 7.4)-BSA fracción V (Fisher), luego incubadas con anticuerpos primarios anti EEA (antígeno presente en endosomas tempranos), anti LAMP-1/CD107a (proteína de membrana asociada a lisosomas), anti PYCARD y/o anti NLRP3/NALP3 por 1 h, lavadas y posteriormente incubadas con los anticuerpos secundarios producidos en cabra anti conejo conjugado con Alexa Flour® 647 o anti rata IgG NL557 durante 1 h a una dilución 1:1000. Los núcleos fueron teñidos con solución de tinción hoechst durante 15 minutos y las muestras fueron lavadas con PBS y montadas en cubreobjetos usando FluorSave (Merck Millipore). Las células fueron examinadas con un microscopio confocal (Olympus Flowview FV1200, Hamburg, Alemania) y las imágenes fueron capturadas a un aumento 60X y analizadas utilizando el software ImageJ. Se realizaron controles negativos con células sin marcar o utilizando los anticuerpos secundarios en ausencia de los anticuerpos primarios.

3.12 Efectos directos de FhCL3 en recombinantes de pro-IL-1 β e IL-1 β

Recombinantes murinos de pro-IL-1 β (10.000 pg/ml) e IL-1 β estándar (500 pg/ml) se incubaron por separado con FhCL3 (1 μ g/ml) o rvFhCL3 en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0, DTT 1mM y EDTA 1mM durante 2 h a 37°C. Las muestras se analizaron mediante ELISA sándwich y western blot, empleando anticuerpos que discriminen entre la proforma y la forma madura de IL-1 β .

3.13 Western Blot

Las CDs en las diferentes condiciones experimentales fueron lavadas y resuspendidas en Buffer RIPA (Triton X-100 1%), sodio dodecil sulfato (SDS 0.1%), coctel de inhibidor de proteasas (25X), (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e inhibidor de fosfatasa (10X) durante 20 min a 4°C. A continuación, todos los lisados fueron centrifugados 4°C, durante 10 min para llevar a cabo la separación proteica. Los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación fueron guardados a -80°C. La concentración de proteínas fue cuantificada usando la técnica de Bradford (105). Cada lisado de proteínas fue utilizado para preparar 40 μ g de proteína (por calle) resuspendidos en buffer de muestra-SDS, y calentados en baño seco durante 10 min a 100°C. Para llevar a cabo la separación de los extractos celulares, los lisados fueron sometidos a electroforesis en geles de SDS-10% Tris-glicina o SDS-10% Tris-tricina, a 150 V durante 1 h. La transferencia a nitrocelulosa se realizó a 100 V durante 3 h. Después de lavar 3 veces con buffer Tris-HCl 10 mM-NaCl 150 mM Tween-20 0.1% (TBS-t, pH 7,5), la membrana fue incubada en solución de bloqueo (TBS-t y leche descremada 5 %) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con

los anticuerpos, anti-NF-kBp65 (1/1000), anti I κ B- α (1/1000) y como control de carga anti β -actina (1/500). Luego de 3 lavados, cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1/15000) o anti IgG de conejo (1/15000) fluorescentes a temperatura ambiente durante 1 h.

Para los experimentos de digestión de pro-IL-1 β e IL-1 β libre de células, posterior a la incubación con FhCL3, las muestras fueron preparadas y corridas de igual forma que los lisados celulares. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti IL-1 β (1/1000) y anti pro-IL-1 β (1/1000) y revelados con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo como se describió anteriormente.

Tanto para los lisados celulares, como el sistema libre de células las imágenes de bandas fueron procesadas a través del Odyssey CLx con longitudes de onda de 780 y 820 nm. Las densitometrías y cuantificaciones fueron hechas con los programas ImageJ e ImageStudio.

3.14 Análisis bioinformático

Se realizó un análisis de acoplamiento proteína-proteína o “*docking*” entre las proteínas NLRP3 y FhCL3 con el software Patchdock (121). La proteína NLRP3 fue considerada como molécula receptora, y la proteína FhCL3 fue considerada como la molécula de ligando. Los resultados de las interacciones de acoplamiento de proteínas se visualizaron con el software Chimera. El análisis fue llevado a cabo en ARL Lab - Bioinformatics and Health Informatics, San Juan, Puerto Rico.

3.15 Cultivo alogénicos

CDs provenientes de animales wild type, CASP1/1KO o NLRP3KO (todos background C57BL/6), (2×10^4 células/pocillo) tratadas con FhCL3 o rvFhCL3 fueron incubadas con esplenocitos alogénicos de ratones BALB/c (2×10^5 células/pocillo) durante 4 días (a una relación 1:10, CDs/esplenocitos) en placas de 96 pocillos. Al día 4, los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados para la determinación de citoquinas por ELISA y las células fueron estudiadas por citometría de flujo.

3.16 Estudio de las respuestas T helper inducida por CDs tratadas con FhCL3 *in vivo*

CDs de ratones C57BL/6 fueron tratadas por 18 horas con medio, FhCL3 o LPS, luego fueron lavadas exhaustivamente y re-suspendidas en PBS 1X. Estas células (1×10^6) fueron inyectadas ip en un volumen final de 0,2 ml, utilizando al menos 4 animales por grupo experimental. A los 7 días los ratones fueron sacrificados, los ganglios linfáticos extraídos y procesados para obtener una suspensión células homogénea. Las células obtenidas fueron puestas en cultivo en placa de 96 pocillos en una concentración de 5×10^5 células/0,2ml en presencia de FhCL3 (10 μ g/ml) durante 48 horas. Luego los sobrenadantes fueron colectados y evaluados para la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-13 por la técnica de ELISA. Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

3.17 Infección experimental con *Fasciola hepatica*

Ratones C57BL/6 fueron infectados con 8-10 metacercarias (forma infectante del parásito) cada uno. Después de 21 días post-infección, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los bazos. Los esplenocitos fueron obtenidos y puestos en cultivo en placas de 96 pocillos 1×10^6 células/0,2ml durante 48 h en presencia de FhCL3 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas. Los sobrenadantes fueron evaluados para la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-13 y las células analizadas por citometría de flujo.

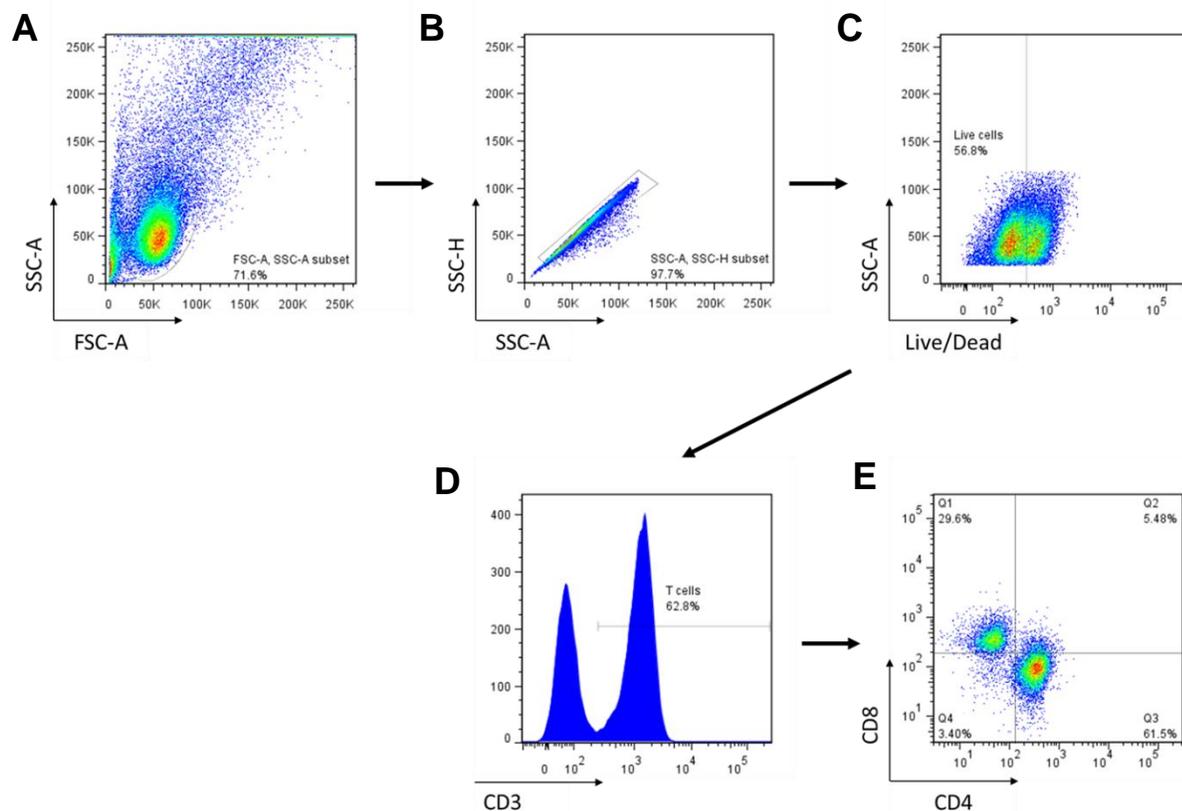


Figura 7. Estrategia de “gates” para el análisis de linfocitos T a través del software Flow Jo. (A) FSC-SSC > (B) Singletes > (C) Tinción Live/ Dead Aqua > (D) CD3-; CD3+ (E) CD4+; CD8+. Las esplenocitos cultivados fueron recolectados y marcados con Aquadead para discriminar entre células vivas y muertas, y con anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para la determinación del porcentaje de cada población celular.

3.18 Análisis estadístico

En los experimentos *in vitro*, para la detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo y determinación de poblaciones celulares, se emplearon tres a cuatro pocillos por cada grupo, con repetición de 3 a 5 cultivos. En los experimentos *in vivo*, se utilizaron entre 3-4 animales por grupo y se repitieron entre dos a tres veces. Los análisis estadísticos se realizaron de acuerdo al conjunto de datos estudiados. Para la comparación de 2 grupos se utilizó el test de Student. Cuando se analizaron más de 2 grupos se empleó el test de ANOVA (Tukey). Las diferencias con un valor de $p \leq 0.05$ fueron consideradas significativas. Los datos obtenidos se expresan como el promedio \pm DS. a través del software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software)..

CAPÍTULO 4: **RESULTADOS**



4.1 Propiedades bioquímicas de FhCL3

La catepsina L3 es una proteína recombinante enzimáticamente activa (longitud: 226 aa masa: 26.007 Da), homóloga a la expresada por *F. hepatica*, que fue obtenida como se describió previamente (51, 116). La actividad enzimática de FhCL3, fue detectada por un ensayo de fluorescencia usando el péptido fluorogénico sintético Tos-GPR-AMC que, al ser hidrolizado, libera el grupo fluorescente 7-amino-4-metil cumarina (AMC), (Figura 8 A). Una muestra representativa del recombinante fue analizando empleando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF. Se obtuvo un espectro que presentó dos picos que se corresponden con los pesos moleculares de 29 kDa y 38,6 kDa. Estos valores son similares a los esperados para la enzima madura y la proenzima, respectivamente, (Figura 8 B).

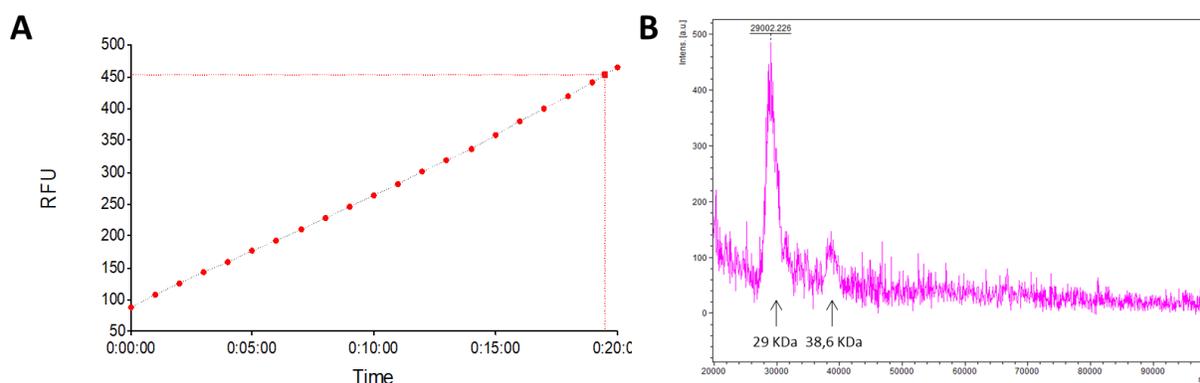


Figura 8. Características bioquímicas de la proteína recombinante FhCL3. (A) Determinación de la actividad de FhCL3 por hidrólisis de Tos-GPR-AMC. Las velocidades iniciales se midieron a intervalos de 60 segundos durante 20 min y se representaron como unidades de fluorescencia relativa (RFU). (B) Análisis espectrometría (MS MALDI-TOF) de FhCL3. El análisis del recombinante identifica dos picos que corresponden a 29 KDa y 38,6 KDa consistentes con la masa molecular de la enzima activa y la proenzima, respectivamente.

4.2. Viabilidad de CDs tratadas con FhCL3

Se determinó la viabilidad de las CDs en presencia de FhCL3, mediante el ensayo de MTT, la cual no se vio afectada a la concentración de trabajo utilizada (Figura 9 A). Además, se observó que la estimulación con FhCL3 no indujo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), lo cual indica que esta proteína no sería citotóxica para las CDs, a diferencia de los que ocurre con LPS/ATP, que incrementó significativamente los niveles de LDH, (Figura 9 B).

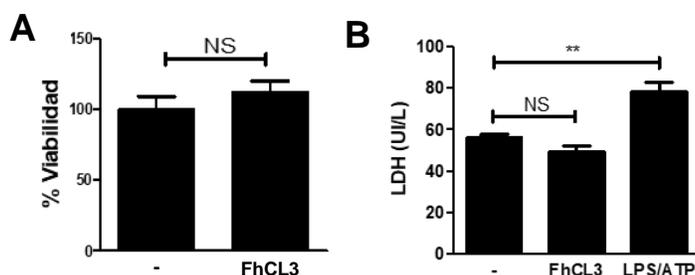


Figura 9. FhCL3 no afecta la viabilidad de CDs. CDs de ratones C57BL/6 se cultivaron con medio solo (-), FhCL3 (10 µg/ml) o LPS (10 µg/ml) durante 18 horas. En aquellos casos que se empleó LPS, ATP fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. **(A)** La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. **(B)** Los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) se determinaron en el sobrenadante del cultivo de CDs. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de Student para la comparación de dos grupos o el test de ANOVA-Tukey en aquellos casos en los cuales se trabajó con más de dos condiciones experimentales. Los resultados se presentan en gráficos de barras como medias ± DE y son representativos de tres experimentos. NS, diferencias no significativas.

4.2.1 FhCL3 induce una maduración parcial en CDs y promueve la liberación de IL-1β e IL-18

A los fines de estudiar la capacidad de FhCL3 para modular el estado de maduración de CDs, evaluamos los niveles de expresión de MHC-I, MHC-II y de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, en CDs tratadas con FhCL3 durante 18 h. Al cabo de este tiempo, observamos un incremento en la expresión de MHC-II en las CDs cultivadas con FhCL3, en ausencia de cambios en MHC-I y las moléculas

coestimuladoras: CD40, CD80 y CD86, en comparación con CDs no tratadas (Figura 10).

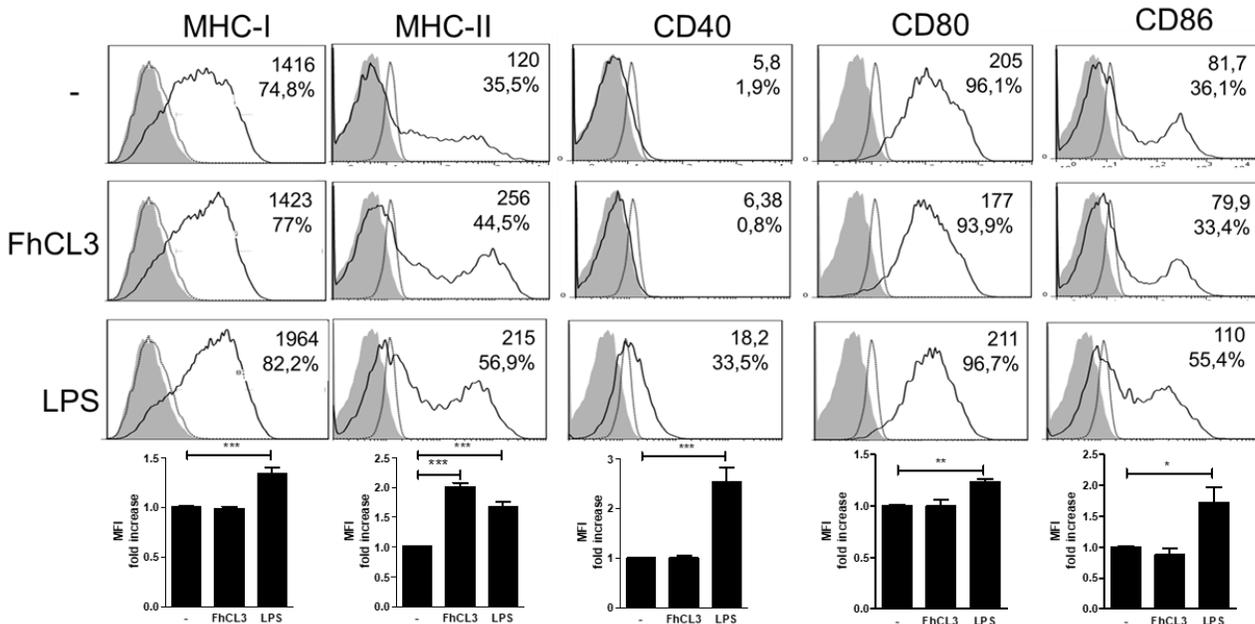


Figura 10. Fenotipo de CDs estimuladas con FhCL3. CDs fueron cultivadas con medio solo (-), FhCL3 (10 μ g/ml) o LPS (1 μ g/ml) durante 18 h. La expresión MHC-I, MHC-II y las moléculas coestimuladoras: CD40, CD80 y CD86, se analizó mediante citometría de flujo, en la población de células CD11c +. Los valores en los histogramas representan la intensidad fluorescente media (MFI) y los porcentajes de expresión de cada molécula. Cada histograma corresponde a un experimento representativo. Los gráficos de barras muestran las veces de incremento, respecto al control, CDs no estimuladas, (*fold increase*). Se representa la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Mediante la técnica de ELISA, se determinó que FhCL3 no induce la producción de IL-6, IL-12p70, IFN- β , IL-10 y TNF. Además, dado que ha sido reportado que otras moléculas derivadas de helmintos son capaces de inducir la liberación de IL-1 β e IL-18, nos interesó estudiar si FhCL3 podría promover el mismo fenómeno. Cuando se llevó a cabo la detección de estas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos, encontramos que CDs tratadas con FhCL3 producen altos niveles tanto de IL-1 β como de IL-18 (Figura 11).

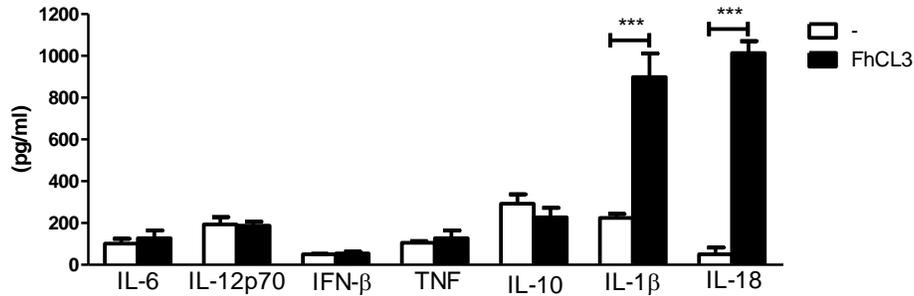


Figura 11. FhCL3 induce la secreción de IL-1β e IL-18 en CDs. CDs se cultivaron con medio solo (-) o con FhCL3 (10 μg/ml) durante 18 h. Los niveles de IL-6, IL-12p70, IFN- β, IL-10, TNF, IL-1β e IL-18 se evaluaron mediante la técnica de ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de Student y muestran la media ± DE de 4 pocillos por grupo. *** $p \leq 0.001$.

IL-1β e IL-18 son citoquinas dependientes de la activación del inflamasoma, el cual es activado clásicamente por dos señales o estímulos: la señal 1 o de *cebado*, mediada por la estimulación de los PRRs a través de los PAMPs o los DAMPs; esto resulta en la activación de NF-κB que induce la expresión de la pro-IL-1β y genes asociados a las proteínas del inflamasoma. Mientras que, la señal-2 está dada por el eflujo de potasio sensible a ATP, la desintegración lisosomal o la generación de ROS; esta señal es requerida para el ensamble del inflamasoma, lo que promueve la maduración proteolítica de IL-1β e IL-18 por la enzima caspasa-1(90).

Sorprendentemente, la producción de IL-1β e IL-18 inducida por FhCL3 no requirió una señal de *cebado*, como la estimulación previa con un ligando de TLR; ni de un estímulo posterior como ATP, ya que la sola presencia de FhCL3 fue suficiente para promover la producción de IL-1β e IL-18, la que no fue modificada por la presencia de alguna otra señal (LPS ó ATP), (Figura 12).

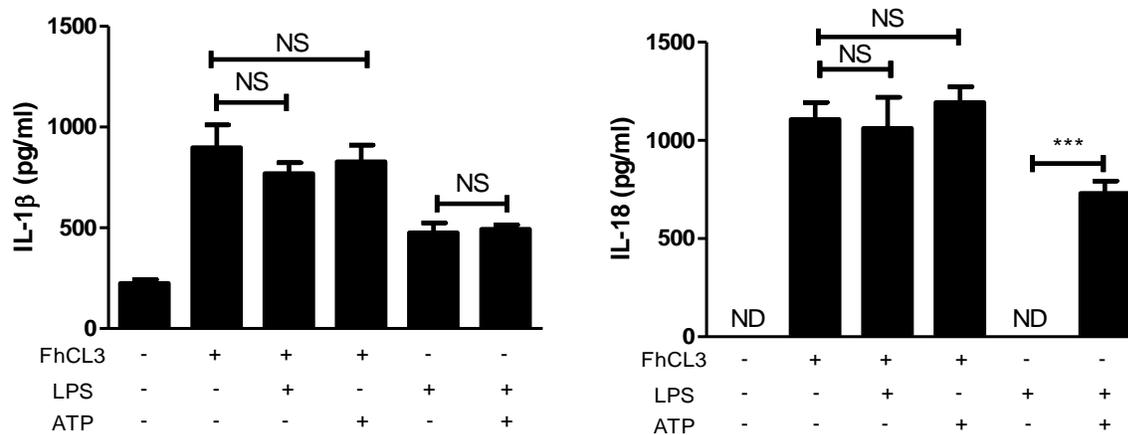


Figura 12. FhCL3 promueve la liberación de IL-1 β e IL-18 en ausencia de otras señales involucradas en la activación del inflammasoma. CDs fueron tratadas con medio solo (-), FhCL3 (10 μ g/ml) y/o LPS (1 μ g/ml) durante 18 h. En aquellos casos en los que se utilizó ATP (5mM), éste fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. Las concentraciones de IL-1 β e IL-18 en los sobrenadantes de cultivo, se determinaron empleando la técnica de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Tukey. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 4 pocillos por grupo. ND, cantidades no detectables; NS, diferencias no significativas; *** $p \leq 0.001$.

Por otro lado, la actividad de cisteína proteasa de FhCL3 resultó esencial para la producción tanto de IL-1 β como de IL-18, ya que la variante de FhCL3 (rvFhCL3), que posee una actividad de proteasa reducida (54), como resultado de un cambio de aminoácidos de su sitio activo, fue incapaz de inducir la producción de estas citoquinas (Figura 13). Estos resultados sugieren que FhCL3 estaría promoviendo la activación del inflammasoma de manera dependiente de su actividad enzimática, en CDs.

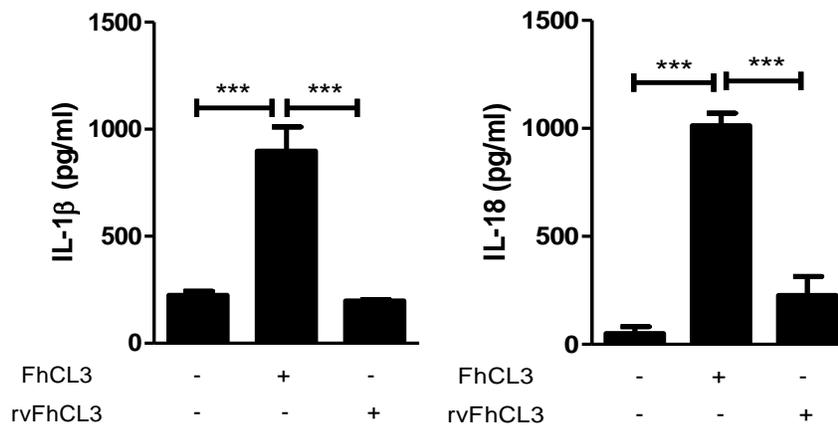


Figura 13. La actividad enzimática de FhCL3 es necesaria para promover la producción de IL-1β e IL-18 en CDs. CDs fueron tratadas con medio solo (-), FhCL3 (10 µg/ml) o rvFhCL3 (10 µg/ml) durante 18 h. Los niveles de IL-1β e IL-18 en los sobrenadantes de cultivo fueron cuantificados mediante el test de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Tukey. Los gráficos de barras representan la media ± DE de 3 pocillos por grupo. *** $p \leq 0.001$.

4.2.2 FhCL3 incrementa la expresión de pro-IL-1β en CDs

La síntesis de pro-IL-1β es un paso clave en la activación del inflamasoma. La escisión de esta citoquina permite la liberación de IL-1β biológicamente activa. Como se describió previamente, en el modelo clásico del inflamasoma se plantea que se requieren dos señales que den lugar a la síntesis y procesamiento de IL-1β. Sin embargo, se ha visto, que esto está sujeto al tipo celular e incluso la especie de la cual provienen las células. Por ejemplo, algunos reportes indican que tanto macrófagos como las células THP1 requieren de dos señales para secretar IL-1β; mientras que otros estudios indican que los monocitos son capaces de liberar IL-1β luego de la estimulación simple con un ligando de TLR (122). Por este motivo, se decidió evaluar la expresión del gen que codifica para pro-IL-1β por PCR cuantitativa a las 2 y 4 horas de cultivo con FhCL3. Se pudo determinar que, CDs estimuladas con FhCL3 mostraron

una incrementada expresión del gen que codifica para la proforma de IL-1 β comparada con la expresión basal del mismo en el control no estimulado (Figura 14).

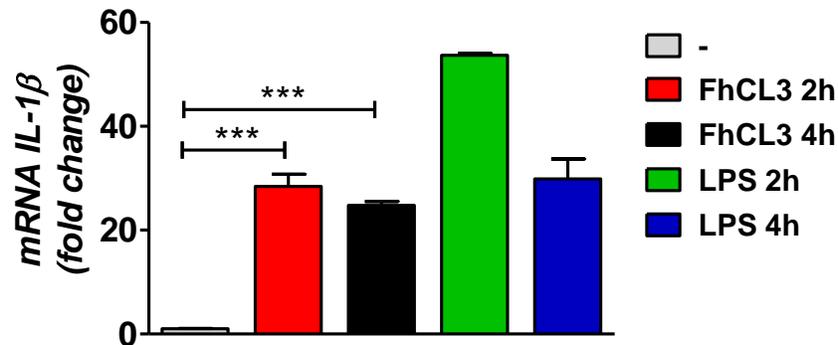


Figura 14. FhCL3 incrementa la expresión de pro-IL-1 β en CDs. La expresión de pro-IL-1 β fue cuantificada por PCR en tiempo real en CDs estimuladas con FhCL3 (10 μ /ml) durante 4 h usando CDs sin estímulo como control. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de Student. El gráfico de barras muestra las veces de cambio, respecto al control, CDs no estimuladas (*fold change*). Se representa la media \pm DE de 3 experimentos independientes. *** $p \leq 0.001$.

4.2.3 La expresión de IL-1 β promovida por FhCL3 es independiente de la activación de NF- κ B

Dado que NF- κ B es un factor de transcripción necesario para la síntesis de pro-IL-1 β , nos preguntamos si FhCL3 promueve su activación en CDs. Mediante western blot determinamos los niveles de expresión de p65, que forma parte del complejo NF- κ B, el cual luego de ser activado induce la transcripción de ciertos genes, entre ellos, el de IL-1 β , para luego ser degradado. Además, evaluamos la proteína inhibidora de NF- κ B, I κ B- α , cuya degradación indica la activación de NF- κ B.

Observamos que CDs cultivadas con FhCL3, no muestran una degradación en las bandas correspondientes a p65 e I κ B- α luego de 10 y 30 minutos de estimulación, a diferencia de lo que ocurre en CDs tratadas con LPS durante los mismos periodos de tiempo. Este resultado indica que la activación del inflammasoma promovida por FhCL3 sería por una vía no canónica, ya que es independiente de NF- κ B (Figura 15).

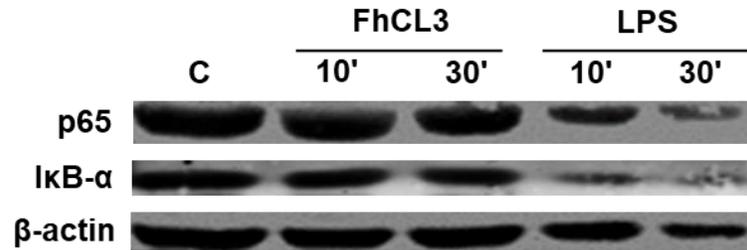


Figura 15. FhCL3 no induce la activación NF- κ B. La activación de NF- κ B fue evaluada mediante la degradación de p65 e I κ B- α . CDs fueron tratadas durante 10 o 30 min. con FhCL3 o LPS. Mediante la técnica de western blot se analizó las cantidades totales de las proteínas p65 e I κ B- α presente en los lisados celulares, utilizando como control de carga β -actina. El gráfico es representativo de 2 experimentos independientes.

4.2.4 FhCL3 es captada por CDs y se localiza principalmente en el citoplasma de la célula

Dada la localización citoplasmática de los principales componentes del inflammasoma, nos preguntamos si FhCL3 es internalizada por las CDs y cuál sería su distribución dentro de las mismas.

Para determinar su ubicación (ya sea intracelular o extracelular), FhCL3 fue marcada con un fluorocromo, Alexa 488, e incubada con CDs por diferentes períodos de tiempo. FhCL3 marcada es captada por las CDs y presenta una débil colocalización con EEA y LAMP, antígenos presentes en endosomas tempranos y lisosomas, respectivamente, (Figura 16 A, B y C). A su vez, se pudo observar que las CDs incubadas con la enzima marcada, presentan un puntillado fluorescente intenso en el compartimento citosólico, lo que indicaría que FhCL3 se ubica mayoritariamente en el citoplasma de las CDs. Estos resultados fueron corroborados, mediante una recopilación de imágenes en el plano z (*z-stack*), que contiene información de la profundidad de toda la célula con una alta resolución espacial (Figura 16 A). Para estos experimentos se realizaron los siguientes controles: por un lado, corroboró que el espectro de emisión del fluorocromo

utilizado para marcar FhCL3, Alexa fluor 488, no sufre modificaciones cuando es conjugado la proteína. Por otro lado, CDs fueron incubadas con una solución conteniendo Alexa Fluor 488 y se comprobó la ausencia de fluorescencia verde en estas células, indicando que el ingreso de FhCL3 marcada, no se debería a la presencia del fluorocromo.

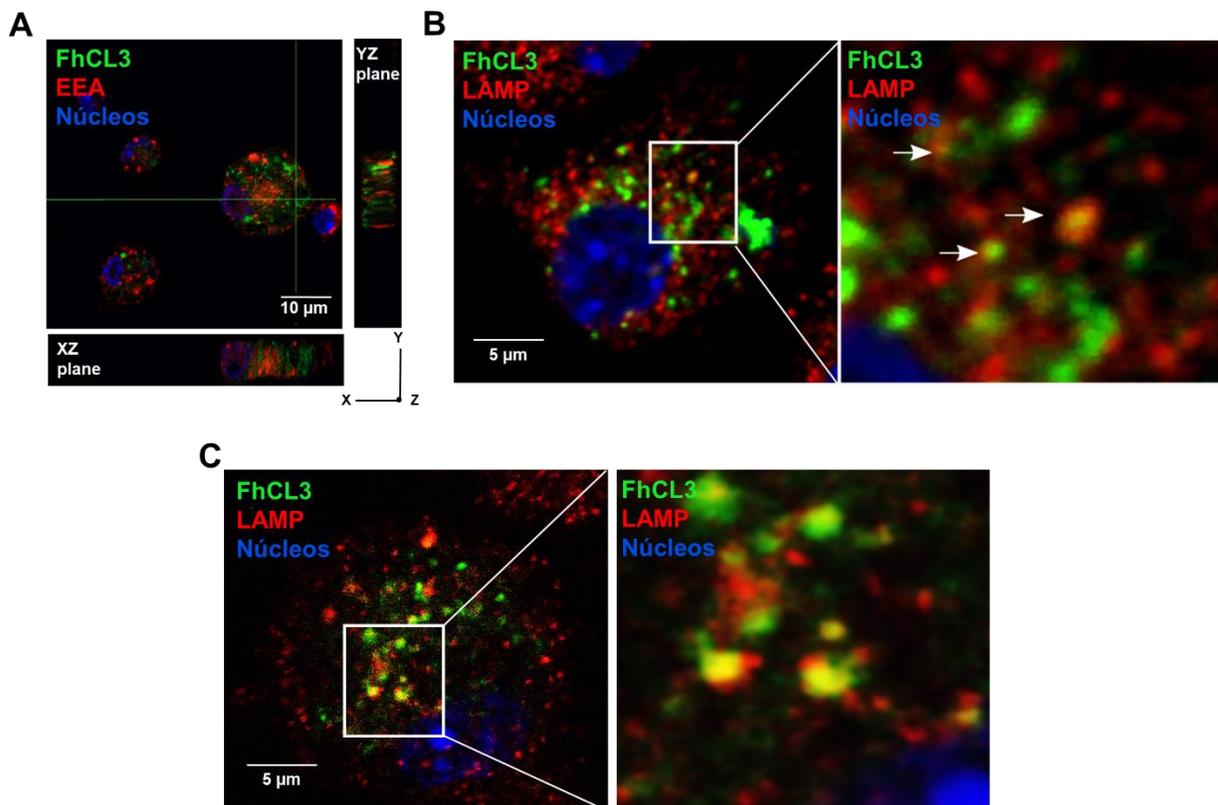


Figura 16. Ubicación intracelular de FhCL3, analizada por microscopia confocal láser de barrido.

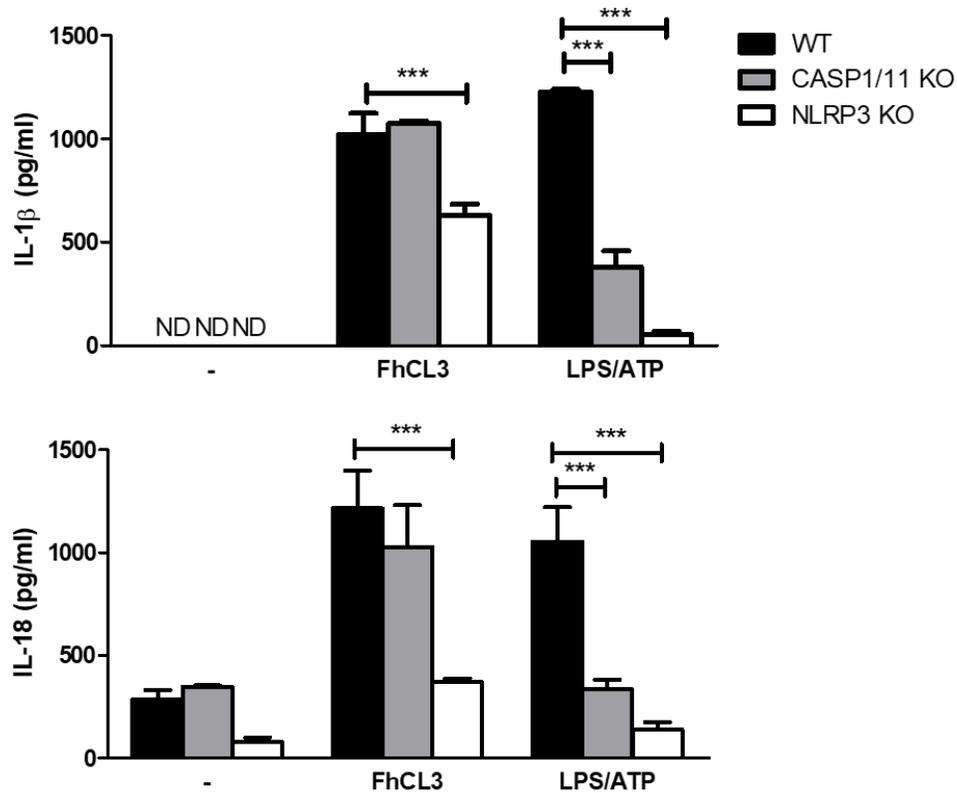
(A) CDs fueron incubadas durante 30 min con FhCL3 marcada con Alexa Fluor®488 y teñidas con un anticuerpo anti-EEA-1 para evaluar la colocalización con endosomas tempranos (rojo). Se representan proyecciones ortogonales de z-stacks. Los planos XZ e YZ muestran la altura y el ancho, y la altura y la longitud de la célula, respectivamente. La barra de escala es de 10 micras. **(B) y (C)** CDs cultivadas en presencia de FhCL3 marcada, por 4 h (B) o 18 h (C) fueron teñidas con un anticuerpo anti-LAMP (lisosomas, en rojo). La barra de escala es de 5 micras. A la derecha de los paneles B y C, se muestra en mayor aumento el área seleccionada. Los núcleos fueron teñidos utilizando el colorante Hoechst (azul).

4.2.5 La producción de IL-1 β e IL-18 inducida por FhCL3 disminuyó en ausencia de NLRP3 y no requiere de la actividad de caspasas

Teniendo en cuenta que el complejo multiproteico que constituye el inflamasoma es un el mediador clave para la formación de IL-1 β e IL-18 biológicamente activas, decidimos estudiar la participación de sus principales componentes en nuestro modelo. Para ello CDs provenientes de médula ósea de ratones deficientes en: caspasas 1 y 11(CASP1/11 KO), el receptor NLRP3 (NLRP3 KO) o de ratones *wild type* (WT), como control, fueron cultivadas con medio sólo, FhCL3 o LPS/ATP durante 18 h y se cuantificaron los niveles de IL-1 β e IL-18 en sobrenadantes de cultivo. Se determinó que en ausencia de caspasa, la producción de IL-1 β e IL-18 promovida por FhCL3, no fue modificada con respecto al control. Mientras que las células deficientes en NLRP3 tratadas con FhCL3, produjeron menores concentraciones de IL-1 β e IL-18 en comparación con las CDs provenientes de animales controles normales (WT), (Figura 17 A).

Por otro lado, ha sido reportado que otras caspasas, como caspasa 8, intervienen en la síntesis y liberación de IL-1 β . Para evaluar la participación de otras caspasas además de las 1/11 en el fenómeno causado por la estimulación con FhCL3, CDs de ratones WT fueron pretratadas con un inhibidor de pan caspasas (z-VAD-FMK) para luego ser incubadas con FhCL3. Como se puede observar en la figura 17 B, la producción de IL-1 β inducida por FhCL3, no se vio afectada por la inhibición de caspasas, a diferencia de lo que ocurre con el grupo control, CDs estimuladas con LPS/ATP. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la secreción de IL-1 β promovida por FhCL3 en CDs, es completamente independiente de la actividad de caspasas (Figura 17 B).

A



B

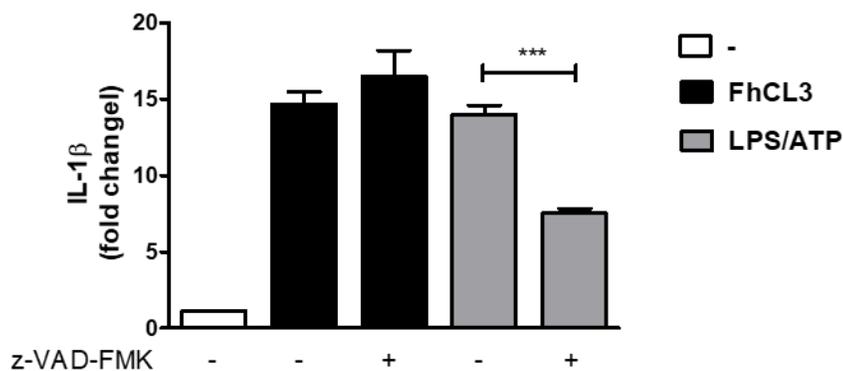


Figura 17. La producción de IL-1 β e IL-18 inducida por FhCL3 en CDs, es parcialmente dependiente de NLRP3 e independiente de la actividad de caspasas. (A) CDs provenientes de ratones WT, CASP1/11KO o NLRP3KO se cultivaron con medio solo (-), FhCL3 o LPS/ATP durante 18 h. En aquellos casos en los que se estimuló con ATP, éste fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. **(B)** CDs provenientes de ratones WT fueron pretratadas con el inhibidor de pan caspasa y posteriormente estimuladas con FhCL3 o LPS/ATP por 18 h. En aquellos casos en los que se estimuló con ATP, éste fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. La producción de IL-1 β e IL-18 fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Bonferroni. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 4 pocillos por grupo. *** $p < 0.001$; ND; no detectable.

Por otro lado, para asegurarnos que las células deficientes en CASP1/11 y NLRP3, no tuvieran afectadas otras vías de señalización, estudiamos la producción de otras citoquinas independientes del ensamble y activación del inflamasoma, como lo son TNF e IL-12p70. Pudimos observar que la secreción de estas citoquinas, promovida por la estimulación con LPS/ATP, fue similar a CDs provenientes de animales WT, CASP1/11KO o NLRP3KO (Figura 18).

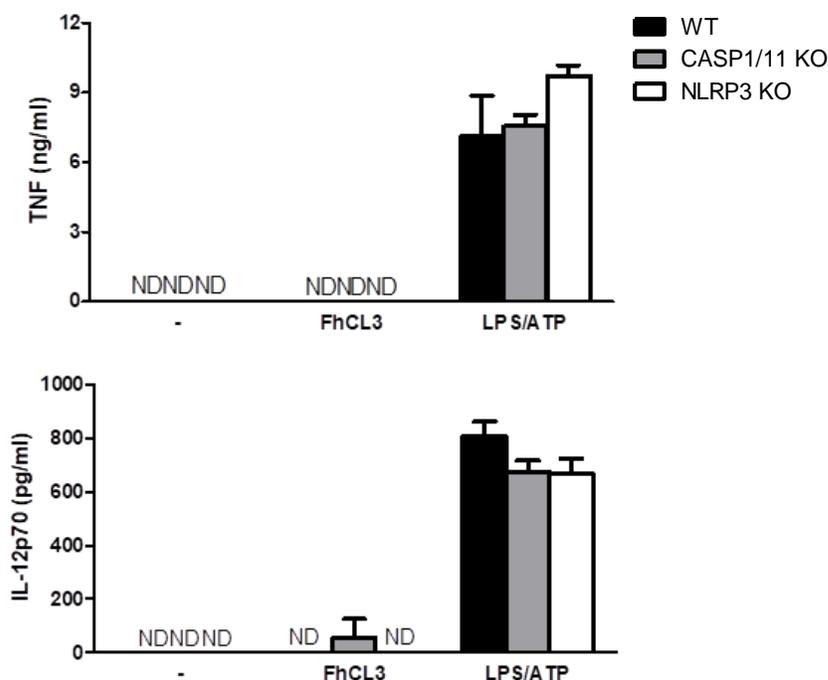


Figura 18. CDs de ratones CASP1/11 o NLRP3KO son activadas normalmente en vías de señalización independientes del inflamasoma. CDs provenientes de ratones WT, CASP1/11KO o NLRP3KO se cultivaron con medio solo (-), FhCL3 o LPS/ATP durante 18 h. En aquellos casos en los que se estimuló con ATP, éste fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. La producción de TNF e IL-12p70 fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Bonferroni. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 4 pocillos por grupo. ND, no detectable.

4.2.6 FhCL3 sería capaz de interactuar físicamente con NLRP3

Teniendo en cuenta nuestros resultados expuestos más arriba, que indican la participación del receptor NLRP3, en la secreción de IL-1 β e IL-18 inducida por FhCL3, nos interesó evaluar si existiría de una activación del inflamasoma NLRP3 caracterizado por la formación de *specks* o agregados compuestos por la oligomerización de NLRP3, con la proteína adaptadora ASC. Ha sido descrito que durante un estado de reposo o no estimulación de las células, ASC se localiza en el núcleo y luego de ciertos estímulos se redistribuye al citosol donde puede interactuar con NLRP3 y formar *specks* (125) Mediante microscopía confocal, pudimos determinar que la estimulación con FhCL3 no promueve la formación de *specks*, a diferencia de lo que ocurre luego del tratamiento con LPS/ATP, donde se observan agregados citoplasmáticos (Figura 19). Estas observaciones sugieren que ASC no mediaría el efecto de FhCL3 sobre las CDs.

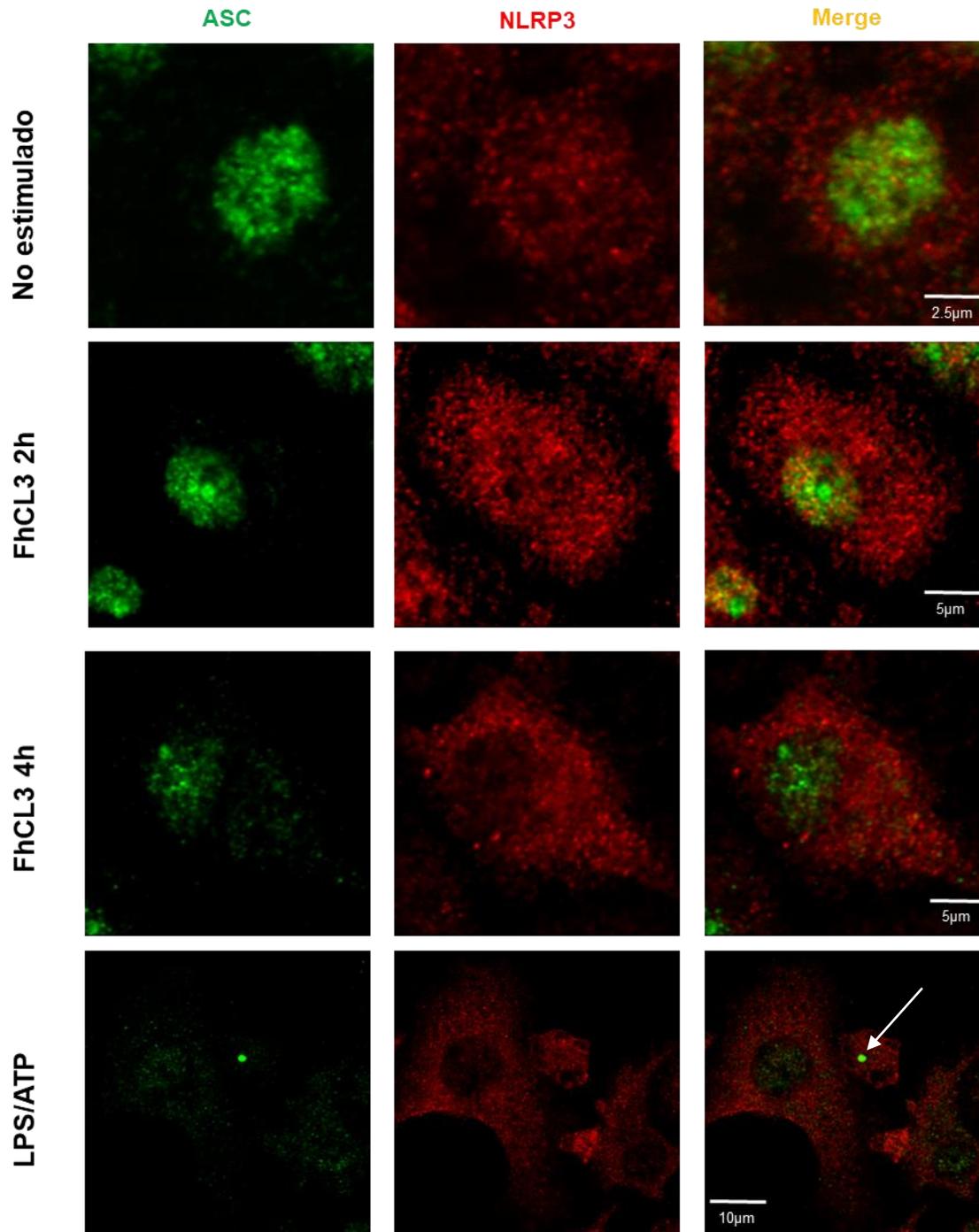


Figura 19. FhCL3 no promueve la formación de *specks* en CDs. Las CDs estimuladas con medio, FhCL3 (2 o 4h) o LPS/ATP durante 4 h. Luego de ser lavadas con PBS, fijadas y permeabilizadas, las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti-PYCARD y anti-NALP3, para visualizar ASC y NLRP3, respectivamente. Para revelar se emplearon anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647. La flecha indica la formación de un agregado, luego de la estimulación con LPS/ATP. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Olympus FV1200. Se indica la barra de escala en cada panel.

Trabajos previos reportan que otras proteasas, como catepsina B, pueden interactuar directamente con NLRP3. Para investigar si esto ocurría en las CDs tratadas FhCL3, se realizó un análisis bioinformático de acoplamiento de proteínas o *docking*. Este análisis reveló, que tanto FhCL3 como NLRP3 poseen residuos de aminoácidos que podrían ser capaces de interactuar entre sí (Figura 20 A, B y C). Este resultado sugiere que FhCL3 sería capaz de interactuar física y directamente con NLRP3, sin el requerimiento de un intermediario o proteína adaptadora, a diferencia de lo que ocurre con caspasa 1. De cualquier manera, estos hallazgos deberían ser corroborados con experimentos que demuestren la interacción física de ambas proteínas.

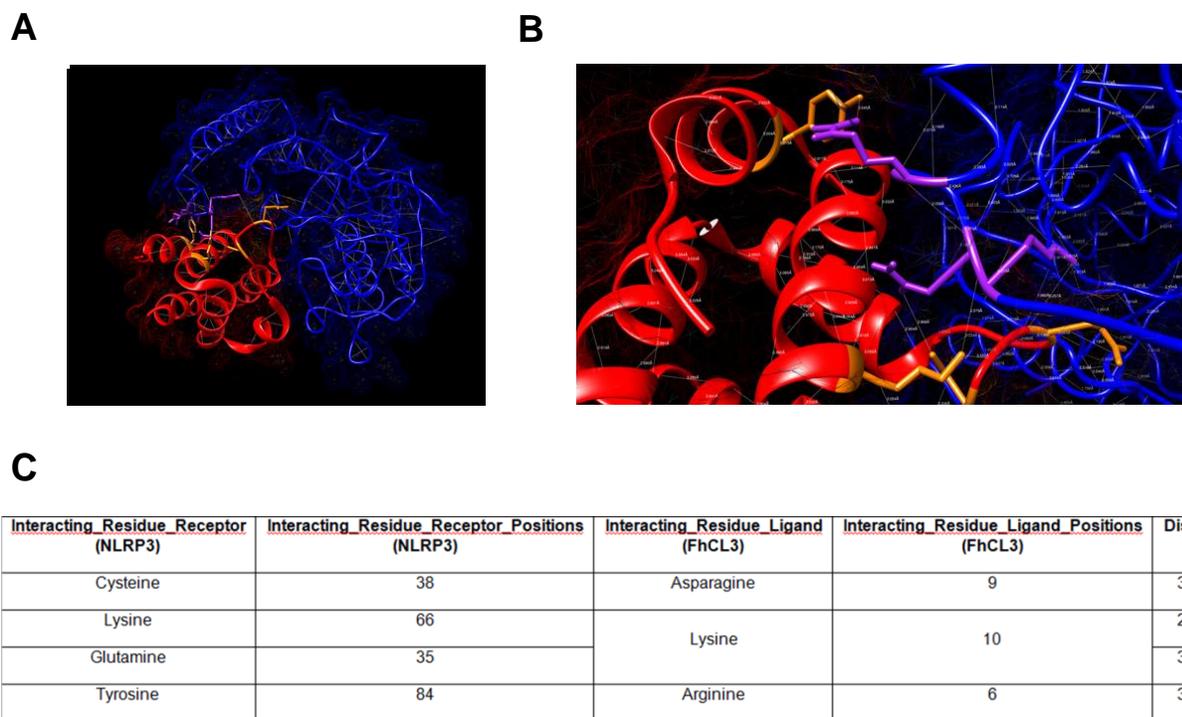


Figura 20. Acoplamiento o interacción entre FhCL3 y NLRP3. **(A)** Visualización de las estructuras cristalinas de NLRP3 (rojo) y FhCL3 (azul). **(B)** Amplificación del sitio de más alta probabilidad de interacción entre las proteínas. En primer plano se observan los residuos en color naranja pertenecientes a NLRP3, que podrían interactuar con FhCL3. Mientras que los residuos en púrpura, presentes en la estructura de FhCL3, son residuos que participarían del acoplamiento. **(C)** Se detallan las posiciones de los aminoácidos con mayor probabilidad de interacción física, presentes en cada molécula y las distancias aproximadas entre sí, en angstroms (Å).

4.2.7 FhCL3 induce IL-1 β a través de la producción de ROS, el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal

Dado que la producción de ROS es uno de los eventos involucrados en la activación del inflamasoma, decidimos evaluar su participación en este contexto. Para ello CDs fueron tratadas con FhCL3 o LPS durante 4 o 18 horas. En aquellos casos en los que se utilizó LPS, el ATP fue añadido los últimos 30 minutos de cultivo. Luego de este tiempo se determinó la expresión de ROS citoplasmático (cROS) y ROS mitocondrial (mtROS) por citometría de flujo, utilizando diferentes sondas fluorescentes. Como se puede observar en la figura 19 la estimulación con FhCL3 induce un aumento en la producción de ROS tanto mitocondrial como citoplasmático, respecto al control no estimulado. El incremento de mtROS fue observado a tiempos más tempranos en comparación con el cROS; esta tendencia fue similar tanto en células tratadas con FhCL3, como en las CDs tratadas con LPS/ATP (Figura 21).

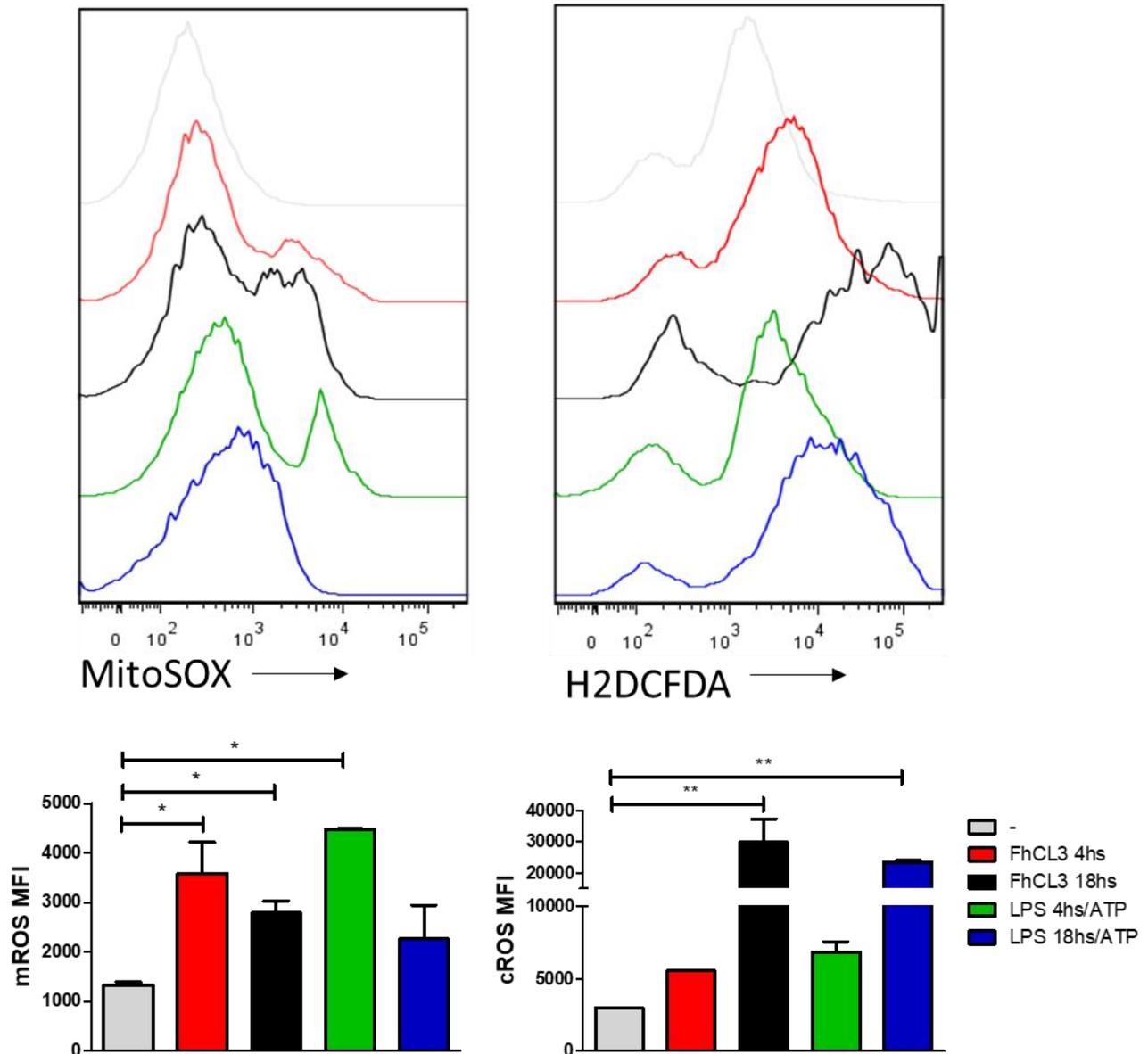


Figura 21. FhCL3 promueve la expresión de ROS mitocondrial y citoplasmático en CDs. Las CDs fueron tratadas con medio solo (-), FhCL3 o LPS/ATP durante 4 o 18 h. Al cabo del tiempo de cultivo las CDs fueron recolectadas para su marcación con anti-CD11c e incubadas con la sonda MitoSOX (5 μ M) o con la sonda H2DCFDA (20 μ M) durante 20 min. a 37°C para la determinación de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales (mROS) o citoplasmáticas (cROS), respectivamente. Los resultados son expresados como intensidad media de fluorescencia (MFI) utilizando el software FlowJo. Los histogramas son representativos de 4 replicados. Las barras representan la media \pm DE correspondiente. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. *p < 0.05; **p < 0.01.

Para investigar si la producción de IL-1 β inducida por FhCL3 es mediada por ROS, utilizamos un inhibidor de NADPH oxidasa, la cual es la principal enzima responsable

de la expresión de ROS en las células. Células dendríticas fueron pre-tratadas con el inhibidor de NADPH oxidasa (DPI) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con medio, FhCL3 o LPS/ATP. Como se muestra en la figura 22 la inhibición en la formación de ROS, redujo drásticamente los niveles de IL-1 β secretados por CDs tratadas con FhCL3. Estos resultados, sugieren que la síntesis de ROS promovida por FhCL3, es necesaria para la producción de IL-1 β en CDs.

Además, dado que otras señales involucradas en la activación de NLRP3 son el eflujo de potasio y la acidificación endolisosomal, nos preguntamos si estos procesos serían necesarios para que FhCL3 promueva la liberación de IL-1 β , en CDs. Para ello por un lado las CDs fueron pretratadas con KCl (123) con el objetivo de bloquear los canales de potasio, y por otro lado las CDs fueron previamente incubadas con cloroquina para inhibir la acidificación endolisosomal. Se comprobó que, la producción de IL-1 β inducida por FhCL3, se vio drásticamente reducida ante la inhibición tanto del eflujo de potasio como la acidificación endolisosomal (Figura 22).

Estos resultados sugieren que tres de los eventos propuestos por el modelo clásico de activación del inflamasoma NLRP3 son requeridos para que FhCL3 induzca la producción de IL-1 β y su posterior liberación al medio extracelular.

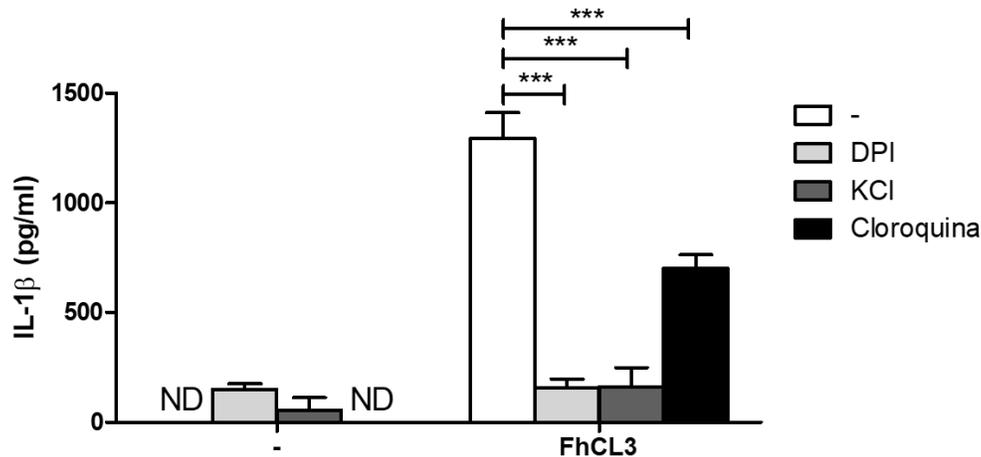


Figura 22. La secreción de IL-1 β promovida por FhCL3, es mediada por ROS, el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal. Las CDs fueron pretratadas o no con DPI (100 μ M), KCl (60 mM) o cloroquina (50 μ M) por 30 minutos. A continuación, estas células fueron incubadas con medio solo (-) o FhCL3 18 h. La concentración de IL-1 β fue determinada mediante la técnica de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Bonferroni. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 4 pocillos por grupo. ND, no detectable; ***p < 0.001.

4.3 FhCL3 es capaz de escindir pro-IL-1 β

Ha sido demostrado que algunas proteasas, como la elastasa de neutrófilos, procesan pro-IL-1 β a su forma madura IL-1 β activa, *in vitro* (124). Dado que nuestros resultados muestran que las caspasas no participan en la activación del inflamasoma inducida por FhCL3, nos preguntamos si FhCL3 por si misma sería capaz de escindir a la proforma inactiva de IL-1 β . Para ello, en un ensayo libre de células, un recombinante murino de pro-IL-1 β se incubó con FhCL3 o rvFhCL3 durante 2 horas. Al cabo de ese tiempo, se detectó la formación de IL-1 β madura, por la técnica de ELISA (utilizando un kit que distingue la proforma de la forma madura para IL-1 β), (Figura 23 A). En contraste, la rvFhCL3 no fue capaz de generar la IL-1 β . Estos resultados fueron corroborados por la técnica de western blot, en donde pudimos detectar la presencia de una banda que corresponde al peso molecular de IL-1 β biológicamente activa, cuando pro-IL-1 β fue

tratada con FhCL3. Interesantemente, FhCL3 no degrada el recombinante de IL-1 β , lo cual indicaría que escinde a pro-IL-1 β de manera específica (Figura 23 B).

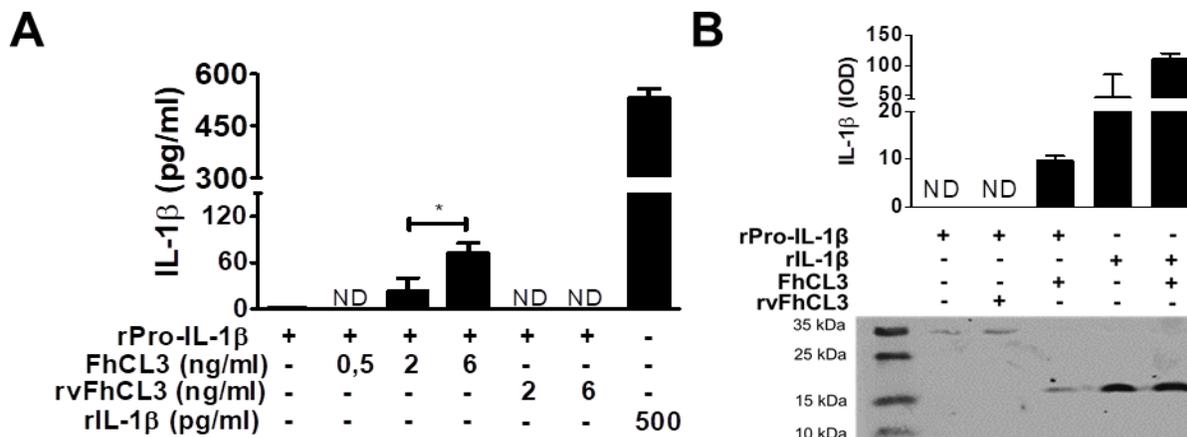


Figura 23. FhCL3 es capaz de escindir específicamente a pro-IL-1 β en un sistema libre de células. (A) Un recombinante de pro-IL-1 β murino (rPro-IL-1 β) fue expuesto a concentraciones crecientes de FhCL3 o rvFhCL3 (0,5, 2 y 6 ng /ml) en una solución de fosfato de sodio 0,1 M pH 6, durante 2 h. Además, se utilizó como control positivo un recombinante de IL-1 β madura (rIL-1 β). Los niveles de IL-1 β se cuantificaron mediante ELISA. El gráfico de barras muestra la media \pm DE de 3 pocillos por grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. ND, no detectable; * $p \leq 0.05$. (B) La membrana muestra el resultado de la incubación de pro-IL-1 β o IL-1 β con FhCL3 o rvFhCL3 (1 μ g/ml). Como controles se corrieron rIL-1 β (17 kDa) y rPro-IL-1 β (37 kDa). El gráfico de barras representa el análisis de densitometría de IL-1 β (17 kDa) de dos experimentos con resultados similares. Se muestra la media \pm DE. ND, no detectable.

4.4 FhCL3 condiciona a las CD4 para promover IFN- γ e IL-13 en esplenocitos alogénicos

Para profundizar el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de FhCL3 sobre CD4, se investigó, la capacidad de las CD4 tratadas con FhCL3 para modular la respuesta inmune adaptativa.

Con este fin, se realizaron experimentos donde se co-cultivaron CD4 con esplenocitos alogénicos (es decir, de una misma especie, pero diferentes genéticamente). Los linfocitos T responden a estas diferencias genéticas, debido al desconocimiento entre el MHC-II presente en las CD4, y el TCR de los linfocitos, proliferando y produciendo

citoquinas (principalmente IFN- γ). Éste efecto es aún mayor cuando se realiza con CDs maduras (por ejemplo, a través de ligandos de TLR, como el LPS), debido a que esto aumenta la expresión de MHC-II, moléculas co-estimuladoras y citoquinas proinflamatorias, capaces de aumentar la activación de linfocitos T.

Por lo tanto, CDs de ratones C57BL/6 estimuladas o no con FhCL3 o rvFhCL3, fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos provenientes de ratones BALB/c en una relación (1:5). Al cabo de 5 días de co-cultivo, los sobrenadantes fueron colectados y las células analizadas por citometría de flujo.

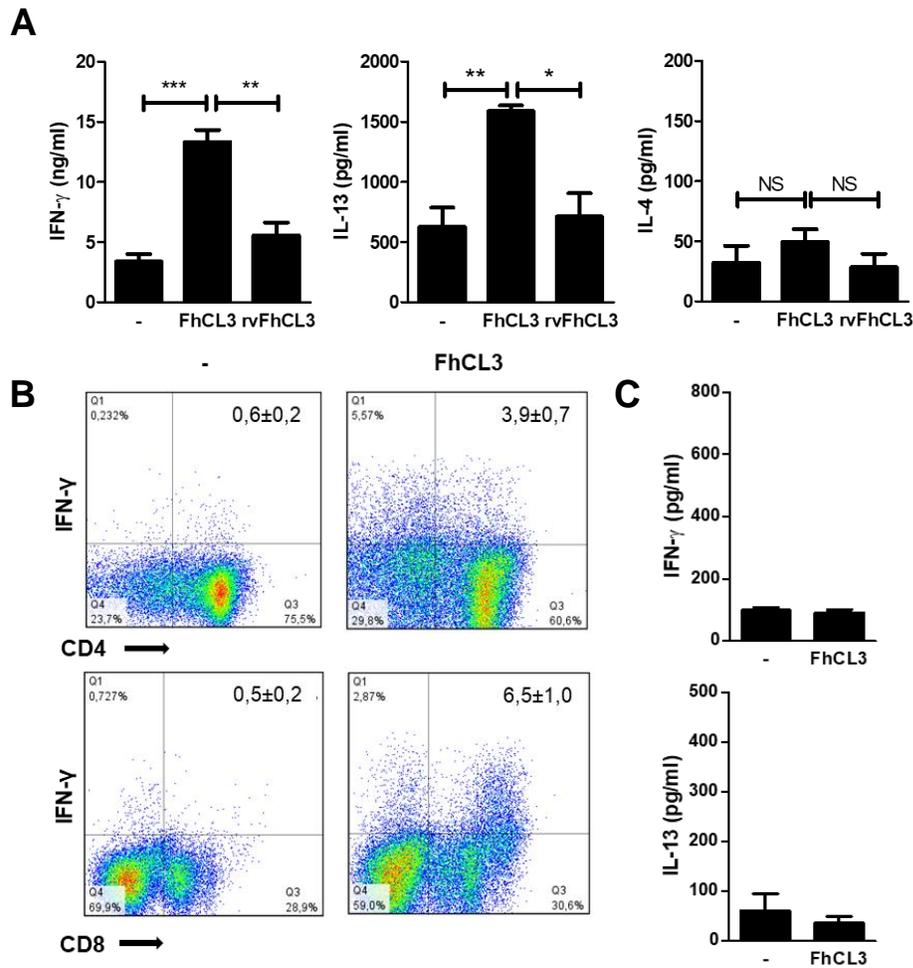
Se pudo observar que las CDs tratadas con FhCL3 (CDs-FhCL3) indujeron la producción de IFN- γ e IL-13, pero no de IL-4, en esplenocitos alogénicos (Figura 24 A).

Por el contrario, las CDs estimuladas con rvFhCL3, fueron incapaces de promover la expresión de éstas citoquinas en los esplenocitos (Figura 24 A), indicando que la actividad de cistein proteasa de FhCL3 estaría involucrada en el condicionamiento de las CDs de una respuesta alogénica particular. A su vez, se pudo establecer que las principales células productoras de IFN- γ fueron T CD8+ y en menor medida las células T CD4+ (Figura 24 B).

Por otro lado, esplenocitos de ratones WT BALB/c cultivados con FhCL3, en ausencia de CDs, no secretaron IFN- γ e IL-13, lo cual destaca el rol fundamental de la CDs, en la polarización de los linfocitos para promover la producción de estas citoquinas (Figura 24 C).

Estos resultados sugieren que FhCL3 condiciona a las CDs para promover un patrón que incluye citoquinas de diferentes perfiles de respuesta inmune adaptativa, como son IFN- γ e IL-13. Este fenómeno sería totalmente dependiente de la conservación de la

actividad enzimática de FhCL3 la cual sería esencial en la modulación de las CD4 y la consecuente capacidad para inducir un fenotipo particular de respuesta inmune adaptativa (Figura 24 D).



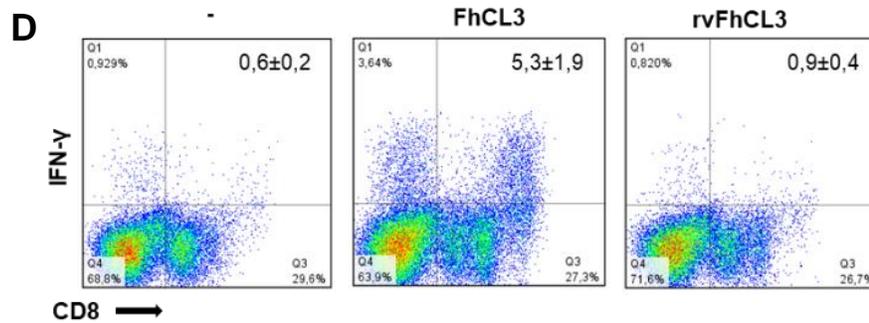


Figura 24. CDs-FhCL3 promueven la expresión de IFN- γ e IL-13 en esplenocitos alogénicos. CDs de ratones C57BL/6 tratadas con medio, FhCL3, rvFhCL3 o LPS durante 18 h fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos provenientes de ratones BALB/c. **(A)** Al cabo de 4 días, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, en los cuales se determinó la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-13 mediante la técnica de ELISA. **(B)** y **(D)**. Por otra parte, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-IFN- γ para luego ser analizadas por citometría de flujo (*Gate* en CD3). **(C)** Esplenocitos de ratones WT BALB/c fueron incubados con FhCL3 (10 μ g/ml) durante 48 h y se determinó la producción de IFN- γ e IL-13 en los sobrenadantes de cultivo. Los gráficos de barras muestran la media \pm DE de 4 pocillos por grupo. Los resultados de la citometría se muestran en diagramas representativos de puntos de 3 experimentos independientes, en los cuales se indican la media \pm DE correspondiente. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, diferencias no significativas.

Teniendo en cuenta que el tratamiento de CDs con antígenos del tegumento o PES de *F. hepatica*, inducen la expansión de células T reguladoras (24) estudiamos por citometría de flujo la población de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, en esplenocitos alogénicos co-cultivados con CDs-FhCL3. Pudimos determinar que las CDs-FhCL3 promueven un incremento de la población de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}, pero no modifican la expresión de Foxp3, indicando que no ocurriría una expansión de células T regulatorias (Figura 25).

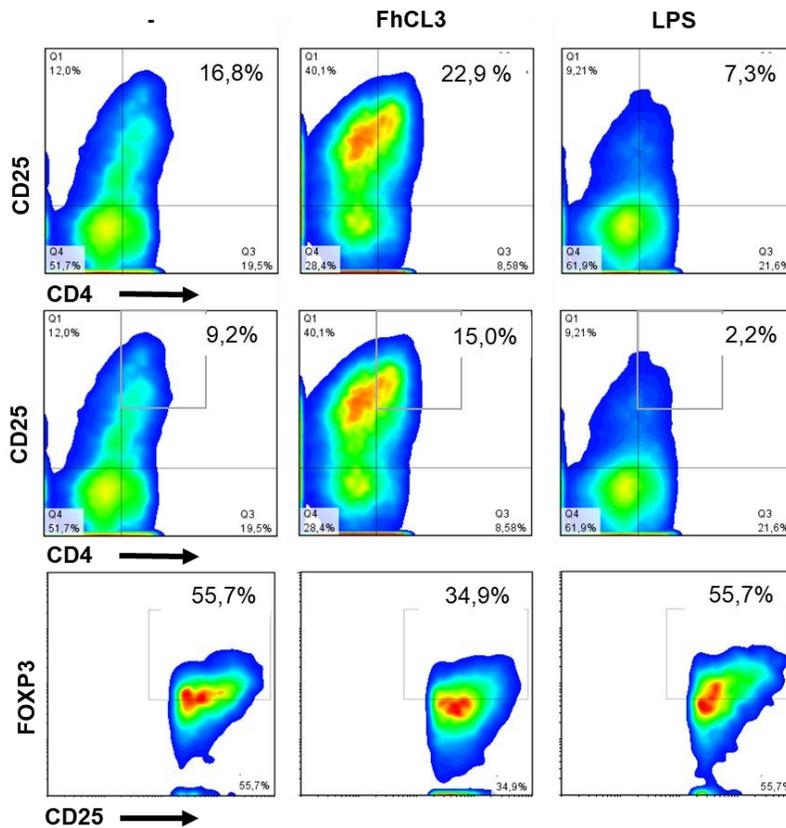


Figura 25. CDs-FhCL3 no inducen la expansión de linfocitos T regulatorios. CDs de ratones C57BL/6 tratadas con medio, FhCL3 o LPS durante 18 h fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos de ratones BALB/c. Al cabo de 4 días, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3, para luego ser analizadas por citometría de flujo. Se muestran gráficos representativos de 3 experimentos independientes, en los cuales se indican el porcentaje de cada población. CD4+CD25+> CD4+CD25^{high}>CD25^{high} Foxp3+.

4.4.1 La capacidad aloestimuladora de las CDs-FhCL3 es dependiente de la activación de NLRP3

Como se demostró anteriormente, FhCL3 promueve la liberación de IL-1 β e IL-18 en CDs, de manera dependiente de NLRP3. Además, se ha reportado la participación de IL-1 β e IL-18 en la generación de una respuesta de IFN- γ (122). Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos investigar si la activación del inflamasoma NLRP3 en CDs es necesaria para la inducción de IFN- γ en cultivos alogénicos. Para ello, CDs

provenientes de ratones NLRP3 KO o WT tratadas con medio o FhCL3, fueron cultivadas con esplenocitos alogénicos y al cabo de 4 días de cultivo se evaluó la producción de IFN- γ en los sobrenadantes. Interesantemente, observamos que las CDs deficientes en NLRP3 y estimuladas con FhCL3, presentan una habilidad disminuida para producir IFN- γ en los esplenocitos, a diferencia de lo que ocurre con CDs de animales WT (Figura 26 A).

Estos resultados sugieren que la activación de NLRP3 en CDs-FhCL3 es un evento crucial para la promoción de una respuesta de IFN- γ en esplenocitos alogénicos. A diferencia de lo observado, con la respuesta de IL-13, la cual no se modificó en ausencia de NLRP3 (Figura 26 B).

La activación no canónica de las CDs-FhCL3, independiente de caspasa1/11, se correlacionó con una incrementada producción de IL-1 β e IL-18 y consecuentemente en una capacidad aloestimuladora incrementada de estas células para producir IFN- γ , pero no IL-13.

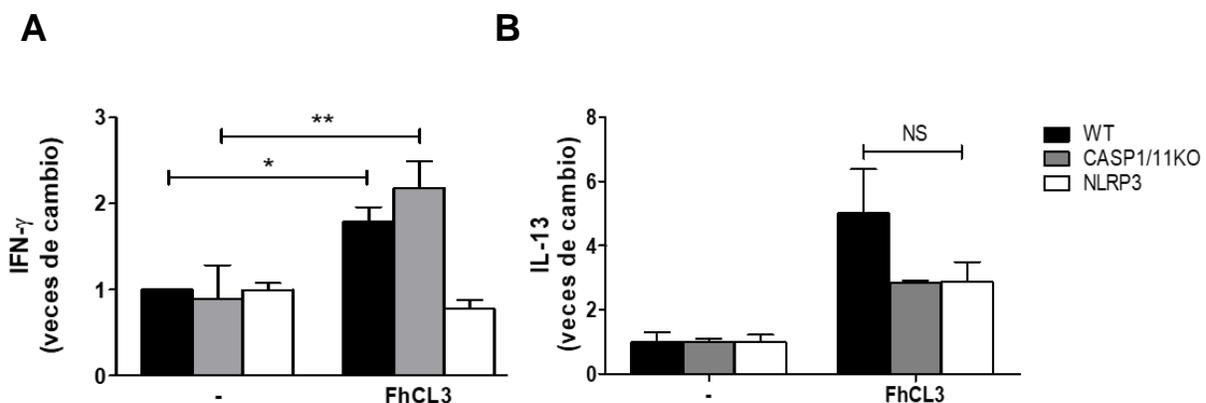


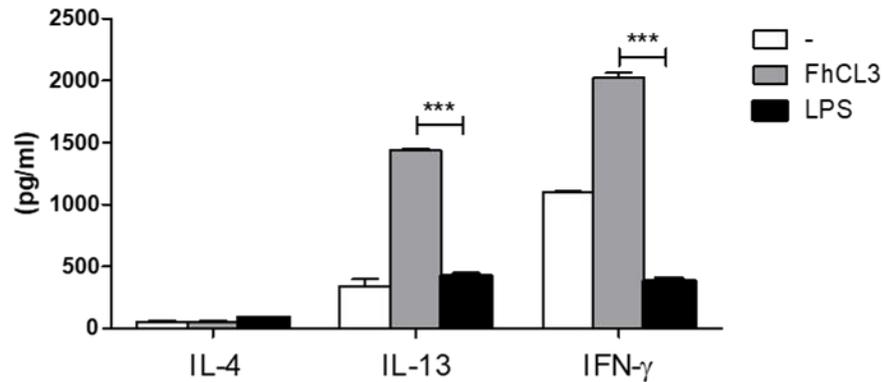
Figura 26. CDs-FhCL3 promueven la expresión de IFN- γ de manera dependiente de la presencia de NLRP3 e independientes de caspasas 1/11. CDs de ratones WT, CASP1/11 o NLRP3 KO (todos background C57BL/6) estimuladas con medio o FhCL3 durante 18 h fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos provenientes de ratones BALB/c. Al cabo de 4 días, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, en los cuales se determinó la producción de IFN- γ e IL-13 mediante la técnica de ELISA. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de ANOVA-Bonferroni. El gráfico de barras muestra las veces de cambio, respecto al control, esplenocitos alogénicos co-cultivados con

CDs (WT, CASP 1/11 KO o NLRP3 KO) no estimuladas. Se representan la media \pm DE de 4 pocillos por grupo.

4.5 CDs-FhCL3 inducen la producción de IFN- γ e IL-13 *in vivo*

Para estudiar la capacidad de las CDs-FhCL3 de modular una respuesta inmune adaptativa *in vivo*, CDs-FhCL3 fueron inyectadas intraperitonealmente en ratones C57BL/6 y al cabo de 7 días se obtuvieron células de los nódulos linfáticos inguinales, las cuales fueron re-estimuladas con FhCL3 durante 48 horas. En los sobrenadantes de cultivo se pudo observar que aquellas células provenientes de animales que fueron inmunizados con CDs-FhCL3 y re-estimuladas con FhCL3 secretaron importantes cantidades de IFN- γ e IL-13 (Figura 27 A). Mientras que la citometría de flujo realizada reveló que las principales células productoras de IFN- γ fueron los linfocitos T CD8 y CD4 (Figura 27 B). Si bien, el perfil de respuesta adaptativa es similar al obtenido en cultivos alogénicos donde FhCL3 actúa modulando a CDs para inducir la polarización, estos resultados indican que la respuesta mediada por IFN- γ e IL-13, sería específica a FhCL3. Mientras que, células de ratones a los que se les inyectó CDs no tratadas y re-estimuladas con FhCL3 no incluyen la expresión de estas citoquinas. Estos resultados muestran que las CDs presentan FhCL3, a los linfocitos *naïve*, los cuales luego de ser instruidos reconocerían a esta proteína, durante la re-estimulación *in vitro* con FhCL3, promoviendo su activación y la liberación de IFN- γ e IL-13.

A



B

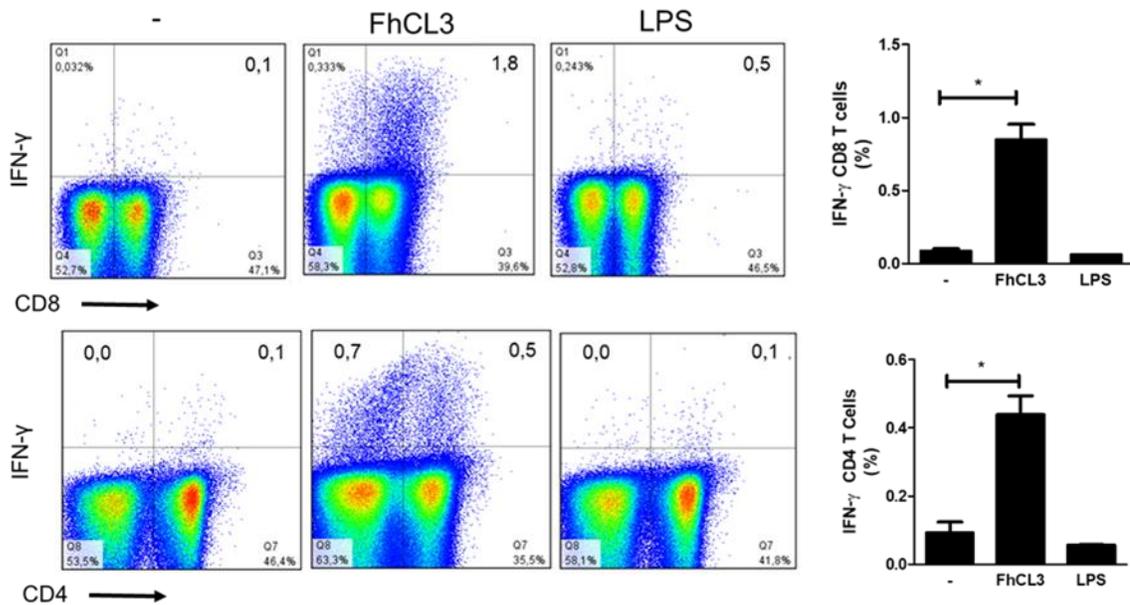
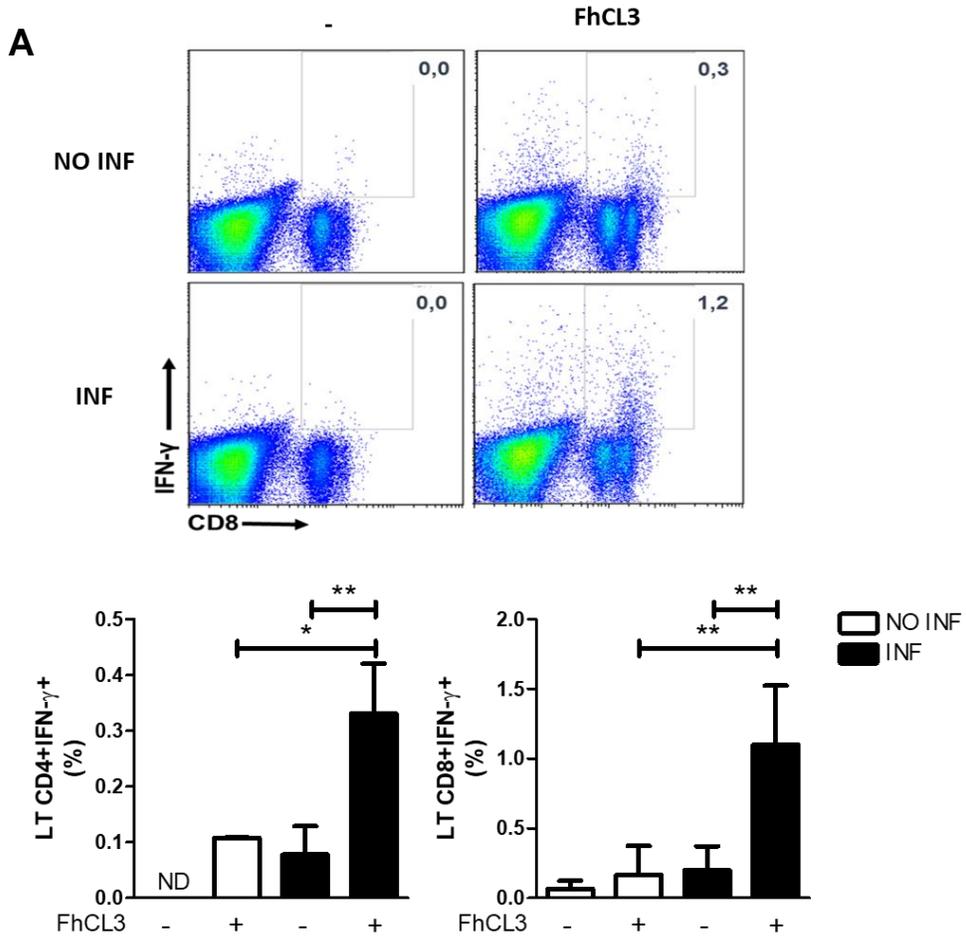


Figura 27. CDs-FhCL3 inducen un singular patrón de expresión de citoquinas específico a FhCL3, *in vivo*. CDs tratadas con medio de cultivo, FhCL3 o LPS durante 18 h fueron inyectadas intraperitonealmente a ratones C57BL/6. Al cabo de 7 días post inyección, las células de ganglios linfáticos inguinales fueron obtenidas y re-estimuladas con FhCL3 por 48h. **(A)** La producción de IL-4, IL-13 e IFN- γ se determinó en los sobrenadantes de cultivo utilizando la técnica de ELISA. Los resultados se presentan en gráficos de barras como media \pm DE y son representativos de dos experimentos independientes. **(B)** La producción de IFN- γ se evaluó en las células T CD4 y CD8 por citometría de flujo. Los datos se exponen en diagramas representativos de puntos. A la derecha, los gráficos de barras muestran media \pm DE de los porcentajes de las células T CD8+, IFN- γ + o T CD4+, IFN- γ + para cada condición. Todos los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. *p \leq 0.05; ***p < 0.001.

4.6 FhCL3 promueve una respuesta específica de IFN- γ en esplenocitos de animales infectados con *F. hepatica*

Con el objetivo de estudiar el efecto inmunológico de FhCL3 en el contexto de la infección con *F. hepatica*, se infectaron ratones C57BL/6 mediante la ingestión de una dosis controlada de metacercarias (forma infectante del parásito). Al cabo de 21 días post-infección, se recuperaron los esplenocitos totales, los cuales fueron re-estimulados con FhCL3 o un extracto total del parásito (ET) durante 48 h. Del mismo modo fueron tratados esplenocitos provenientes de animales no infectados, como control. Cuando se estudió la producción de citoquinas y las poblaciones celulares en los cultivos, se observó que en respuesta a la estimulación con FhCL3 un alto porcentaje de células T CD8 y CD4 de ratones infectados expresan IFN- γ , el cual también fue detectado en los sobrenadantes de cultivo (Figura 28 A y B). Mientras que, los esplenocitos de animales infectados son re-estimulados con ET, secretan citoquinas asociadas a un perfil Th2 como lo son IL-4, IL-13 e IL-10, pero IFN- γ en concordancia con lo que ha sido descrito anteriormente (Figura 28 C), (126-127). Por lo tanto, FhCL3 estaría favoreciendo un perfil pro-inflamatorio caracterizado por la producción de IFN- γ en animales infectados con *F. hepatica*.



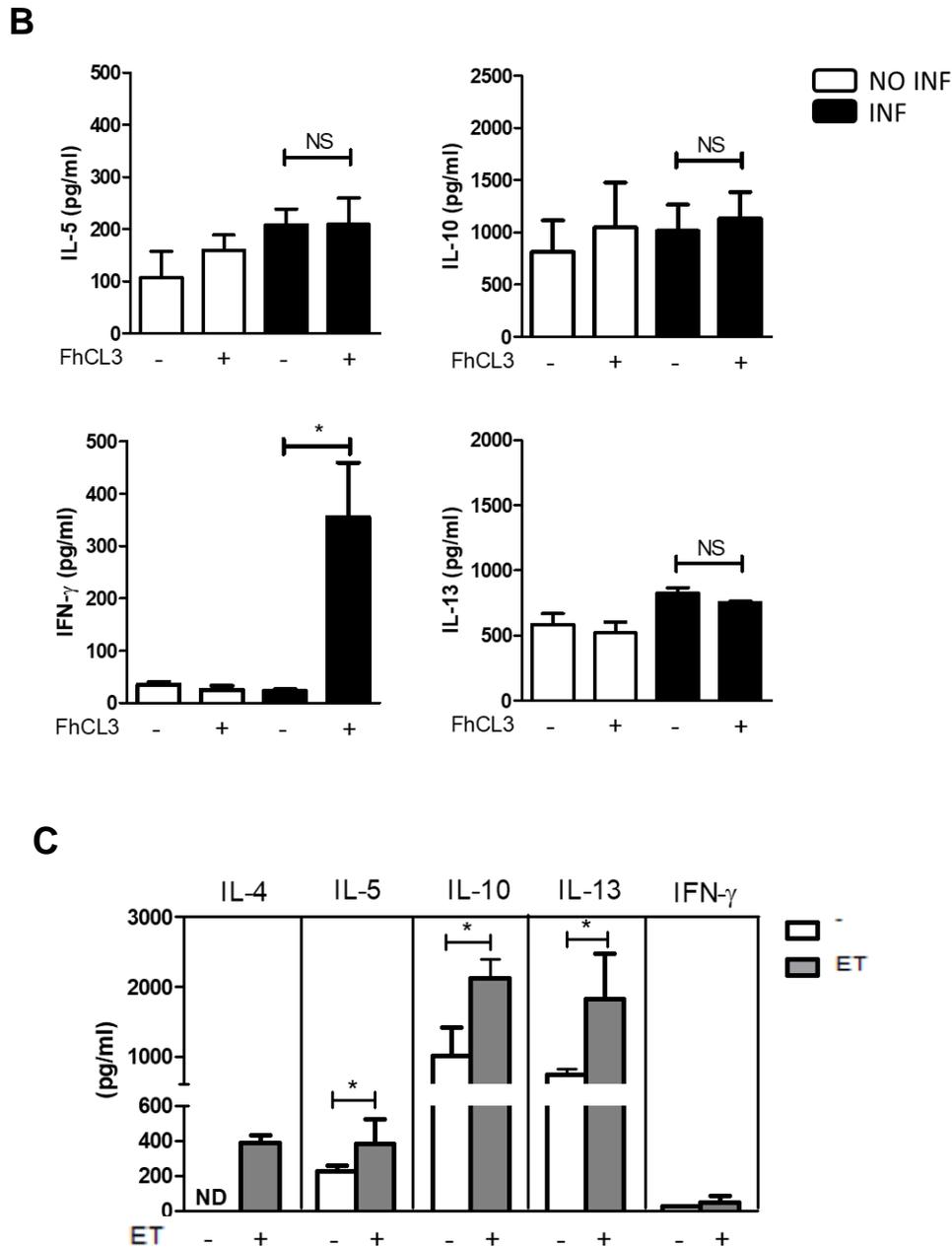


Figura 28. Esplenocitos de ratones infectados con *F. hepatica*, producen IFN- γ , en respuesta a FhCL3. Ratones C57BL/6 fueron infectados con una dosis de 10 metacercarias vía oral, y sacrificados a los 21 días post infección. Los esplenocitos de animales no infectados (NO INF) e infectados (INF) fueron obtenidos y re-estimulados con medio, FhCL3 o un extracto total de *F. hepatica* (ET). **(A)** La producción de IFN- γ se evaluó en las células T CD4 y CD8 de los bazo por citometría de flujo. Los datos se muestran en diagramas representativos de puntos. Los gráficos de barras muestran media \pm DE de los porcentajes de las células T CD8+, IFN- γ + o T CD4+, IFN- γ + para cada condición. **(B)** y **(C)** Las concentraciones de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ , fueron evaluadas mediante el test de ELISA, en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados se presentan en gráficos de barras como media \pm DE y son

representativos de tres experimentos independientes. Todos los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Bonferroni. * $p \leq 0.05$; *** $p < 0.001$.

4.7 La inmunización de ratones con FhCL3-MPLA promueve el desarrollo de una respuesta mediada por IFN- γ e IL-13

Diversas proteínas de *F. hepatica* han sido empleadas en la formulación de vacunas para inducir una respuesta protectora contra la infección, logrando en muchos casos una protección parcial (27, 128). En general muchas de las moléculas utilizadas son pertenecientes al estadio adulto por lo cual la protección sería a nivel hígado; sin embargo, se cree que lograr una protección en la primera etapa de la enfermedad podría resultar más eficiente, dado que evitaría la invasión de los tejidos del hospedador. Por lo tanto, tomando en cuenta que FhCL3 es expresada en el estadio larval y como fue demostrado en este trabajo de tesis es capaz de inducir la generación de una respuesta inmune, sería un candidato para el desarrollo de una nueva vacuna. Dado que se trata de una molécula pequeña para favorecer su capacidad inmunogénica fue empleado como adyuvante vacunal el monofosforil lípido A (MPLA) un derivado del LPS que tiene como ventaja una menor toxicidad por lo cual puede ser administrado en humanos.

Para ello los ratones fueron inmunizados vía intraperitoneal con FhCL3 (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$) y MPLA (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) al día 0 y 7. Al día 14 los nódulos linfáticos inguinales fueron extraídos, procesados y re-estimulados por 48 h con FhCL3 o con un antígeno no relaciona, ovalbúmina (OVA). Aquellas células que fueron cultivadas en presencia de FhCL3, secretaron significativos niveles de IFN- γ y en menor medida de IL-13. En cambio, en los sobrenadantes de las células incubadas con OVA, no se detectó la

presencia de estas citoquinas (Figura 29). Esto indicaría que la producción de IFN- γ e IL-13 es una respuesta específica a FhCL3.

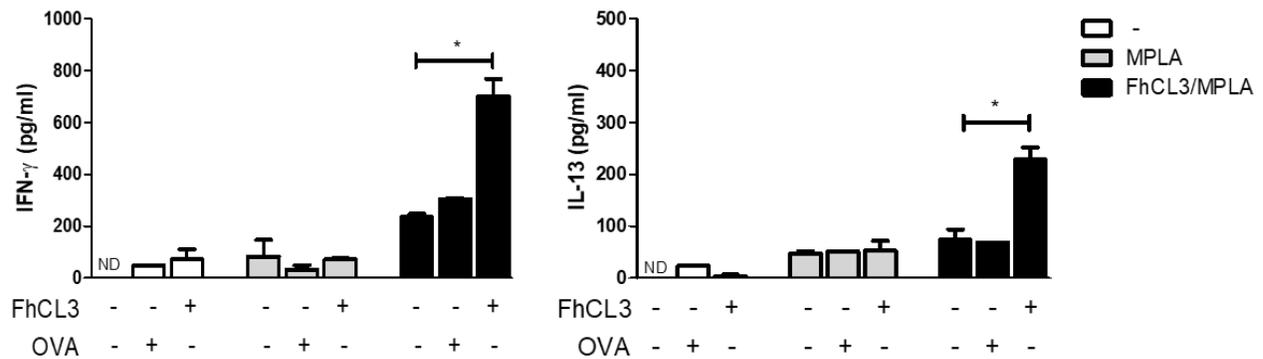


Figura 29. Producción específica de IFN- γ e IL-13 en respuesta a FhCL3, luego de la vacunación con FhCL3/MPLA. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados intraperitonealmente con FhCL3 (10ug/animal) y MPLA (100ug/animal) en dos dosis con un intervalo de 7 días. Al séptimo día post inmunización las células de ganglios linfáticos inguinales fueron obtenidas y re-estimuladas con FhCL3 u OVA por 48 h. la producción de IFN- γ e IL-13 fueron cuantificada empleando el test de ELISA. Los gráficos de barras representan las concentraciones de las citoquinas como media \pm DE y son representativos de dos experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Bonferroni. ND, no detectable. * $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 5: **DISCUSIÓN**



Los helmintos tienen la capacidad de infectar e invadir eficientemente los tejidos del hospedador, y su vez, de modular el sistema inmune. Estos parásitos han desarrollado estrategias, como la evasión o la supresión de la respuesta inmune del huésped que previene su expulsión y facilita la permanencia en diferentes tejidos, permitiendo su supervivencia en el tiempo.

Durante la infección, las células de la inmunidad innata como CD4 y macrófagos entran en contacto con el parásito y desarrollan un fenotipo que promueve la diferenciación de células Th2. Éstas últimas, secretan citoquinas, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 que estimulan la secreción de anticuerpos, IgG1, IgG4 e IgE. Por otro lado, este perfil de respuesta inhibe la diferenciación de células proinflamatorias Th1 secretoras de IFN- γ , que mediarían una respuesta protectora (129-131). Además, en diferentes modelos de infecciones experimentales con estos parásitos, se ha observado un incremento en células T regulatorias, que secretan TGF β e IL-10, y expresan el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (132). Los cuales contribuyen a la supresión del desarrollo de las células Th1 y limitan la respuesta Th2. A su vez, esta respuesta de tipo Th2 promueve y controla el daño tisular provocado por la migración y alimentación del parásito, y contribuye a la reparación de tejidos (129, 131, 133-134). Por lo tanto, la inmunomodulación inducida por helmintos es rápida y sostenida y asegura la persistencia del parásito en el huésped.

En este contexto, *F. hepatica* ha desarrollado estrategias para la evasión o la supresión de la respuesta inmune del hospedador. Se ha determinado que, desde el comienzo de la infección, las larvas juveniles de este parásito regulan las funciones de células de la inmunidad innata como CD4, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Particularmente, las

CDs que entran en contacto con antígenos excretados-secretados y tegumentales de *F. hepatica*, adquieren un fenotipo de activación parcial, que condiciona su capacidad de respuesta a la estimulación con PAMPs, como ligandos bacterianos y, como resultado, no pueden promover el desarrollo de respuestas Th1 y Th17, específicas para el antígeno. En este sentido, se ha demostrado que diferentes preparaciones antigénicas de este parásito tales como, TE, FhTeg y PES disminuyen el estado de activación de CDs, inducido por LPS (23-24, 135). Sin embargo, las propiedades inmunológicas de las moléculas individuales que forman parte de estos productos, no han sido completamente dilucidadas. Diversos grupos de investigación han llevado a cabo numerosos intentos para purificar e identificar las moléculas con propiedades inmunológicas dentro de estas complejas mezclas de antígenos. Se ha logrado establecer que las enzimas FhCL1, FhGST, la molécula de defensa del helminto (FhHDM) y el inhibidor de proteasas (FhKTM) tienen este efecto modulador sobre las CDs, que conlleva a la supresión de la respuesta inmune adaptativas Th1 y/o Th17. De hecho, en nuestro laboratorio, se ha podido demostrar que en ausencia de la molécula coinhibitoria PDL-2, se pierde el balance entre las respuestas Th1 y Th2, resultando en una exacerbada respuesta Th1 durante la infección con *F. hepatica*. Esto sugiere que existirían moléculas dentro los productos derivados del parásito que promueven respuestas de tipo inflamatorias (136). De acuerdo con estos resultados, datos de otros autores muestran la capacidad de los componentes del parásito para inducir este tipo de respuestas. Así, Noya V y col. demostraron que un péptido tipo mucina derivado de *F. hepatica* (Fhmuc) tiene propiedades inmunoestimuladoras ya que mejora la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-12/IL-23p40 en CDs

estimuladas con LPS, incrementando la capacidad de estas células para promover respuestas de IFN- γ en esplenocitos alogénicos (137).

A pesar de la caracterización de diferentes moléculas del parásito capaces de modular la respuesta inmune, existen otras, esenciales en distintos estadios evolutivos del parásito, de las cuales se desconoce su efecto sobre el sistema inmune.

En este trabajo de tesis investigamos la capacidad de una proteína recombinante activa de FhCL3, para modular la respuesta inmune en CDs. FhCL3 es una cisteín proteasa con actividad colagenolítica, altamente expresada por la larva juvenil y desempeña un papel fundamental en la migración que realiza el parásito a través de los tejidos del hospedador. McGonigle y col. demostraron que el silenciamiento de catepsinas L en estadio infectivo de *F. hepatica*, empleando ARN de interferencia, reduce la penetración intestinal (53). Esto soporta la noción de que este tipo de enzimas son factores de virulencia claves para el curso de la patología.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo indican que FhCL3 induce una maduración parcial en CDs, caracterizado por un ligero aumento en la expresión de MHC-II, sin modificaciones en la expresión de MHC-I y las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. Es conocido que otras catepsinas presentes en células de mamíferos, como catepsina S, participan en el procesamiento de la cadena invariante (Ii) del MHC-II. La catepsina S escinde un fragmento de Ii dejando una parte conocida como CLIP, la cual permanece asociada con el complejo. La degradación proteolítica de Ii permite la disociación de CLIP del MHC-II, la carga antigénica y el posterior desplazamiento de MHC-II cargado a la superficie celular. La participación de catepsinas L en este proceso es controversial, Li Q. y col. descartan que catepsina L

esté involucrada, mientras que otros autores demuestran un rol crucial en este fenómeno (138). En base a estos resultados podríamos especular una la participación de FhCL3 en la promoción de MHC-II a la membrana de las CDs. Sin embargo, la localización de esta proteína fundamentalmente en citoplasma contradice esta afirmación, ya que el clivaje del fragmento CLIP y su movilización hacia la membrana celular ocurre en la vía vesicular.

Mediante experimentos de microscopia confocal demostramos que luego de la endocitosis por las CDs, FhCL3 se localiza fundamentalmente en citoplasma presentado una débil colocalización con endosomas tempranos y lisosomas, confirmando su ubicación citosólica. En general, la maquinaria fagocítica utilizada para internalizar partículas extrañas da como resultado la formación de un fagosoma que madura y favorece el inicio de la respuesta inmune. Luego de ser endocitadas las moléculas de helmintos, tales como el SEA de *Schistosoma mansoni* y el antígeno filarial ES-62 son localizados en vesículas LAMP1+ en CDs (139). En acuerdo con estos resultados, otros autores mostraron que la elastasa derivada de neutrófilos es endocitada por células epiteliales y macrófagos (124). Del mismo modo, se ha descrito que catepsina L1, es internalizada por macrófagos peritoneales, aunque a diferencia de FhCL3, FhCL1 presenta una mayor localización con endosomas tempranos (28). Por el contrario, dada la escasa colocalización de FhCL3 con endosomas o lisosomas, hipotetizamos que el mecanismo de endocitosis sea diferente o podría ocurrir un escape de dichas organelas. Considerando que FhCL3 es una proteína de bajo peso molecular, hace pensar que su entrada a la célula podría ser mediada por un mecanismo de pinocitosis, mediante el cual sería captada del medio

extracelular, formando pequeñas vesículas y en el transcurso del tiempo sería liberada al citosol.

El incremento en la síntesis y liberación de IL-1 β e IL-18 observado en CDs tratadas con FhCL3, concuerda con otros estudios que han mostrado la capacidad de moléculas de helmintos de inducir la producción de estas citoquinas. Sorprendentemente, la sola estimulación de las CDs con FhCL3 fue suficiente para la producción de IL-1 β e IL-18. Estos resultados no acuerdan con el modelo clásico de activación del inflamasoma que establece el requerimiento de al menos dos señales o estímulos para el ensamble y activación del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, este modelo estaría sujeto al tipo celular, dado que se ha visto que ciertas poblaciones, como los monocitos secretan IL-1 β , en respuesta a la estimulación con LPS. De todas formas, es posible que la entrada de FhCL3 a las CDs cause un estrés celular que dé lugar a la formación de DAMPs, como por ejemplo ATP o ROS, que podrían actuar como segunda señal para el ensamble y activación del inflamasoma. Esta hipótesis está basada en nuestras observaciones mostrando que luego de la inhibición de tres eventos claves involucrados en la segunda etapa de la activación del inflamasoma: la producción de ROS, el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal, la producción de IL-1 β inducida por FhCL3, se ve reducida.

El ensamble del inflamasoma NLRP3 tiene como desenlace la activación de caspasa 1, la cual lleva a cabo la maduración de pro-IL-1 β a su forma biológicamente activa. Sin embargo, nuestros datos indican que este fenómeno es totalmente independiente de la actividad de caspasa, dado que tanto las CDs provenientes de animales deficientes en caspasa 1/11 como las CDs WT pretratadas con un inhibidor de pan caspasas fueron

capaces de secretar IL-1 β luego de la estimulación con FhCL3. A su vez, pudimos comprobar que la actividad de cisteín proteasa de FhCL3 es clave en este proceso. Algunos estudios han demostrado que las serin proteasas derivadas de neutrófilos y macrófagos, como la proteinasa-3 (PR3), elastasa y catepsina-G son enzimas capaces de procesar pro-IL-1 β en un fragmento de 21 kDa. Además, las metaloproteinasas de matriz (MMP), como la estromelina 1, las gelatinasas A y B, también se han demostrado capaces de escindir pro-IL-1 β (140). De manera similar, las proteinasas de *C. albicans* son uno de los muchos ejemplos de enzimas derivadas de microorganismos capaces de procesar pro-IL-1 β (141). Curiosamente, la capacidad de inducir la secreción de IL-1 β independientemente de caspasa-1 en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, muestra la existencia de vías alternativas de activación de IL-1 β (142). En línea con estos resultados, en este trabajo hemos demostrado por primera vez, la capacidad de una enzima de *F. hepatica* para proteolizar a pro-IL1 β a su forma activa de una manera independiente de caspasas confirmando una activación alternativa del inflamasoma.

Dentro de los inflamasomas el receptor NLRP3 es el más estudiado, probablemente por su capacidad de ser activado por una amplia variedad de estímulos.

En el presente trabajo, demostramos una participación parcial de NLRP3 en la producción de IL-1 β . Este resultado, nos permite especular que otros inflamasomas podrían participar en el reconocimiento de FhCL3 como una señal de peligro para la célula, entre ellos se pueden mencionar NLRP1, NLRP12 y AIM2. Todos estos receptores contienen un dominio pirin de unión a ASC y a su vez ASC se une por su dominio CARD a caspasa 1, durante el ensamble que ocurre en la activación del

inflammasoma (61). Luego de la infección por patógenos, ASC, normalmente presente en el núcleo, se redistribuye rápidamente al citosol, seguido del ensamble de agregados perinucleares, que contienen varios componentes de inflammasoma, incluidos la caspasa-1 y los receptores tipo Nod (NLR) denominados *speck* (125).

Dados algunos resultados que sugieren la ausencia de la formación de *speck*, durante el tratamiento en CDs con FhCL3 y la prescindencia de caspasa 1 en este fenómeno, especulamos que, en esta activación alternativa, el ensamble de NLRP3-ASC-caspasa 1, no sería estrictamente necesario en este fenómeno. Así, la localización de FhCL3 enzimáticamente activa en el citoplasma de las CDs, podría mimetizar la función de caspasa 1 madura, actuando en el clivaje de pro-IL-1 β , sin la necesidad de plataforma arriba descrita.

La participación parcial de NLRP3 en la producción de IL-1 β podría ser explicada por lo menos de dos maneras diferentes. Por un lado, podría ocurrir una interacción directa entre FhCL3 y NLRP3. Resultados preliminares de un análisis predictivo de acoplamiento molecular o *docking* indican que FhCL3 y NLRP3 podrían interaccionar físicamente. Aunque estos resultados deben ser corroborados por otras técnicas que muestren la interacción física de otras proteínas. Este dato abre la posibilidad de la formación de un complejo entre NLRP3 y FhCL3, que facilite el acercamiento entre FhCL3 y pro-IL-1 β , para que se produzca la proteólisis de la pro-IL-1 β . Esta hipótesis está sustentada en los resultados Bruchard M y col, demostraron que catepsina B lisosomal es capaz de interaccionar físicamente o directamente con el dominio LLR de NLRP3 (109). Para que dicha interacción ocurra es necesario que catepsina B sea liberada al citosol. En contraste, ante la posibilidad de que no existiera una interacción

directa entre FhCL3 y NLRP3, se podría especular, basados en nuestros resultados, que la producción de ROS, el eflujo de potasio y la disrupción lisosomal actuarían como intermediarios en la activación del inflamasoma. Estos antecedentes, sumados a la ubicación subcelular citosólica que presenta FhCL3 al ingresar a la célula, sugiere que esta enzima tendría una actividad *caspasa like* en las CDs.

Por otro lado, otra consecuencia de la activación de caspasa 1 es la inducción de piroptosis, una forma de muerte celular caracterizada por la hinchazón de la célula y la ruptura de membrana. Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos en este trabajo, que muestran la independencia entre la producción de IL-1 β y caspasa 1 se podría correlacionar con la ausencia de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), un marcador de la integridad de membrana la cual es liberado durante la lisis celular, inducido por FhCL3. Así, la activación alternativa promovida por FhCL3 del inflamasoma en CDs, llevaría a un destino final a estas células que no incluye la muerte, sino a una sobrevivida más prologada, que favorezca su función de célula presentadora de antígeno (143-144). Este mecanismo promueve la liberación no solo de la forma madura de IL-1 β , sino también de pro-IL-1 β , la cual se vuelve más accesible a la proteólisis de proteasas extracelulares (145).

La activación del inflamasoma ha sido ampliamente reportada en respuesta a bacterias patógenas (146). Mientras que el papel de los inflasomas en la respuesta del hospedador a la patogénesis de las infecciones causadas por parásitos protozoarios intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium spp.* y *Leishmania spp.*, ha sido menos estudiada. Aún así, algunos estudios han confirmado que el eje inflamasoma/IL-1 β y/o IL-18 es requerido para disminuir la carga parasitaria

en macrófagos, por medio de mecanismos dependientes de la producción de NO (98). En todos estos ejemplos participan caspasa 1 y NF- κ B, a diferencia de la independencia de estas moléculas observada en CDs estimuladas con FhCL3.

Sin embargo, el rol de los inflamasomas en el contexto de infecciones con helmintos no ha sido del todo esclarecido. Existen escasos reportes, donde demuestran que el SEA de *S. mansoni*, mejora la secreción de IL-1 β inducida por un ligando de TLR, ya que es capaz de activar el inflamasoma NLRP3, a través de su interacción con el complejo formado por los receptores dectina-2 y Fc gamma (Fc γ R) (108). Esto sería mediado por vía de la señalización de la quinasa Syk que se ha visto, que promueve el eflujo de potasio y la formación de ROS, en CDs (107). De manera similar, otros estudios determinaron que una ribonucleasa, omega-1 de *S. mansoni* mejora la producción de IL-1 β promovida por ligandos de TLR2 o dectin-1, en células peritoneales de ratón (147). En concordancia con esto, otros autores pudieron observar que el nematodo intestinal, *T. muris*, induce la liberación de IL-18 en conjunto con LPS y nigericina, un activador de NLRP3, en macrófagos (105). En todos estos casos es requerida la primera señal de activación del inflamasoma (PAMPs), a diferencia de nuestros resultados, donde FhCL3 es capaz de inducir la producción de estas citoquinas de manera independiente de la estimulación con LPS. No obstante, otras investigaciones han reportado que la sola estimulación de células hepáticas estrelladas con el SEA, fue suficiente para generar IL-1 β , lo cual conduce a fibrosis y dependiente de la vía de la señalización mediada por las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) (106).

Solo existe un trabajo publicado donde una proteína de tipo catelicidina de *F. hepatica*, FhHDM-1, es capaz de modular el inflamasoma NLRP3. Al contrario de la enzima

estudiada en este trabajo de tesis, FhHDM-1 previene la acidificación endolisosomal, lo cual se traduce en una inhibición de la activación del inflamasoma, promovida por LPS y NanoSiO₂, en macrófagos derivados de médula ósea (36).

Por otro lado, pudimos observar que FhCL3 induce la síntesis de *novo* de pro-IL-1 β , aunque esta producción, no estaría mediada por NF- κ B, dado que no se observó activación de este factor de transcripción en las CDs estimuladas con FhCL3. Interesantemente, este resultado mostrando la ausencia de activación de NF- κ B, concuerda con la falta de producción de IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF, las cuales son citoquinas dependientes de este factor de transcripción en CDs-FhCL3

Estos resultados podrían ser explicados, por algunos reportes que muestran la participación de otros factores de transcripción en la producción de pro-IL-1 β , pro-IL-18 y otros componentes del inflamasoma. De hecho, existe un reporte que propone un modelo de activación transcripcional del gen que codifica para IL-1 β , dinámico y complejo, que puede dividirse en dos fases. En una primera fase participarían IRF-8 y p65, mientras que, en una segunda fase, PU.1 promovería el reclutamiento de IRF-4, el cual potencia la transcripción en células de origen mieloide. Esto lleva a la producción de IL-1 β y otras citoquinas proinflamatorias como IL-6, IFN- β , que en nuestro caso no fueron detectadas (148). En línea con esto, ha sido comprobado que IL-21 es capaz de promover la expresión de IL-1 β , de manera independiente de NF- κ B, y sería mediada por una vía alternativa dependiente de STAT3, en CDs convencionales de pulmón (149). Teniendo en cuenta estos antecedentes sería necesario realizar más estudios para esclarecer la regulación transcripcional que estaría mediando la expresión de IL-1 β inducida por FhCL3.

Desde su descubrimiento en 1973 por Ralph Steinman, el conocimiento sobre la biología y funcionalidad de las CDs ha tenido un crecimiento exponencial. Estas células poseen una capacidad única de captar, procesar y presentar antígenos extraños y propios, tanto a los LT CD4+ como a los LT CD8+. Dada la habilidad de estas células como presentadoras de antígenos, resultan ser intermediarias críticas entre los sistemas inmune innato y adaptativo, ya que estimulan, regulan y orquestan la inmunidad y la tolerancia en el organismo.

Nuestros resultados muestran que CDs-FhCL3 fueron capaces de modular la respuesta inmune adaptativa de linfocitos T presentes en esplenocitos alogénicos. El desconocimiento que ocurre entre las moléculas del MHC-II presentes en las CDs y el TCR en los linfocitos T, promueve la proliferación y producción de citoquinas, principalmente IFN- γ . Este fenómeno se ve exacerbado cuando el microambiente generado durante la estimulación de la CDs es inflamatorio.

El tratamiento de las CDs con FhCL3 condiciona a estas células para estimular la producción de IFN- γ e IL-13 en esplenocitos alogénicos. Se pudo establecer que la principal fuente de IFN- γ fueron los linfocitos T CD4 y en mayor medida las células T CD8. Usando CDs de animales deficientes en NLRP3, se determinó la dependencia de este receptor, en la capacidad de estas células para promover la producción de IFN- γ en esplenocitos alogénicos. Por el contrario, CDs de ratones CASP1/11 KO conservaron su capacidad para estimular la liberación de IFN- γ por linfocitos T alogénicos. La dependencia de NLRP3 en CDs para inducir la producción de IFN- γ y no de IL-13 en esplenocitos alogénicos, podría deberse a la participación de otros

inflamasomas diferentes a NLRP3, tales como NLRP1, NLRP12, etc. Más experimentos son necesarios para indagar sobre esta hipótesis.

Otro ejemplo de la capacidad de los helmintos para estimular el inflamasoma ha sido claramente demostrado en un modelo de infección murina con *Trichuris muris*, un nematodo gastrointestinal, en donde el incremento en la producción de IL-18, se correlacionó con la liberación de IFN- γ . Este fenómeno sería dependiente de NLRP3 y controlaría la expansión de la respuesta Th2, lo cual impide la completa expulsión del gusano, permitiendo su cronicidad en el hospedador (105). Por el contrario, otros reportes muestran que IL-18 es requerida para promover la respuesta de tipo Th2, ya que incrementa la secreción de IL-13 en linfocitos T CD4 y en células NK, lo cual tendría un rol crucial en la protección contra la infección (150).

La respuesta inmune adaptativa promovida por CDs-FhCL3, es similar a lo reportado en un modelo de alergia inducido por la administración intranasal de OVA. En donde, se ha descrito una población celular denominada “super Th1”, que producen tanto IFN- γ como IL-13 (151). Estas citoquinas promueven cuadros severos de asma, ya que generan daño de células epiteliales, inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias. IL-13 induce la hiperplasia de células caliciformes con hiperproducción de moco y eosinofilia, y junto con IL-4, es el estímulo principal para el “switching” o cambio de isotipo de anticuerpo para que las células plasmáticas secreten IgE (152). Al mismo tiempo, IL-13 estimula la fibrosis de las vías respiratorias, en gran parte a través de la capacidad de las metaloproteinasas de la matriz 9 y 12 para activar el TGF- β , lo que favorece la acumulación de eosinófilos y macrófagos en el pulmón.

Es conocido que, IL-1 β promueve respuestas de tipo Th1 y Th17, sin embargo, en presencia de citoquinas polarizantes Th2 también pueden sostener una inmunidad mediada por Th2. Además, mientras que la resistencia a nematodos gastrointestinales como *T. muris* es dependiente de IL-1 β , la inducción de la secreción de esta citoquina es un mecanismo por el cual los nematodos intestinales crean un ambiente adecuado para la cronicidad parasitaria, como por ejemplo en la infección con *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. Esta citoquina actúa para suprimir la producción de las citoquinas innatas IL-25 y -33, las cuales son críticas para la promoción de las respuestas inmunes de tipo Th2 (104). A diferencia de la infección con parásitos intestinales, la supervivencia a largo plazo de *F. hepatica* dentro de su hospedador mamífero está condicionada por las respuestas inmunes de tipo Th2 (2). Sin embargo, durante la infección aguda de ratones con *F. hepatica*, no se detecta IL-1 β , mientras que la producción de IL-25 y IL-33 se produce dentro de 24 h después de la infección y aumento en los días posteriores. Estos hallazgos sugieren que *F. hepatica* ha desarrollado nuevos mecanismos para regular la producción de IL-1 β y así controlar el fenotipo de las respuestas inmunitarias del hospedador.

Por otra parte, el estudio de la respuesta específica a FhCL3 *in vivo* generada por las CDs-FhCL3, reveló la capacidad de estas células de inducir una respuesta adaptativa, de tipo IFN- γ e IL-13, similar a la obtenida en cultivos alogénicos. Estos resultados convierten a FhCL3 en un antígeno promisorio en el desarrollo de una vacuna con el parásito, ya que la respuesta de IFN- γ ha sido asociada anteriormente con respuestas protectoras contra el parásito. IL-13 podría actuar en la reparación de tejidos incrementando la síntesis de colágeno y fibrosis. Sin embargo, desconocemos el papel

de NLRP3 o caspasas en la inducción de una respuesta adaptativa durante la infección.

En el contexto de la infección con *F. hepatica*, también observamos que se genera una respuesta específica de FhCL3 mediada por IFN- γ , donde, de manera similar a lo que ocurre en los modelos presentados anteriormente, las principales células productoras de esta citoquina son los linfocitos T CD4 y CD8. Sin embargo, no se detectó la presencia de IL-13 en los cultivos, esto podría deberse a que durante la infección el sistema inmune del huésped interacciona con múltiples moléculas derivadas del parásito y propias, las cuales pueden influenciar o incluso bloquear la respuesta a FhCL3. Por ejemplo, se ha descrito que FhKTM (el cual también es expresado por la larva juvenil), puede actuar como inhibidor de serin proteasas, pero también es capaz de inhibir la actividad de cisteín proteasas, como lo son catepsinas L1 y L2 de *F. hepatica* (153), las cuales pertenecen a la misma familia enzimas de FhCL3. Se podría especular entonces que, la inhibición de FhKTM a FhCL3 bloquearía la capacidad enzimática de esta última inhibiendo tal vez, su actividad inmunomoduladora.

Cuando se evaluó la capacidad de FhCL3 en conjunto con un adyuvante vacunal el monofosforil lípido A (MPLA) un ligando de TLR4, que polariza la respuesta hacia un perfil Th1, se encontró nuevamente una respuesta caracterizada por la expresión de IFN- γ e IL-13 específica a FhCL3, dado que en respuesta a una proteína no relacionada (OVA) no se observó este fenómeno. Esta modulación ejercida por FhCL3 en el sistema inmune del hospedador podría resultar protectora en el contexto de la infección.

En resumen, este es el primer reporte en el cual se describe una molécula derivada de *F. hepatica* con la capacidad de promover la activación alternativa del inflammasoma NLRP3, independientemente de la actividad de caspasas, caracterizada por la liberación tanto de IL-1 β como de IL-18. Esto tiene consecuencias a nivel de la respuesta adaptativa dado que confiere un singular patrón de expresión de citoquinas IFN- γ e IL-13 que podría resultar protectora en esta parasitosis o en otras infecciones por helmintos.

Este trabajo de investigación no solo abre perspectivas en el campo de desarrollo de vacunas contra este helminto sino también en la manipulación de CDs, ya que la presencia de esta proteína con actividad enzimática en citoplasma sugiere su posible capacidad de modular eventos de presentación cruzada de antígenos ya sea incrementando o disminuyendo esta habilidad con consecuencias en la generación de respuestas antitumorales o en la inhibición de respuestas exacerbadas durante procesos autoinmunes.

Finalmente, este trabajo abre nuevos interrogantes sobre el papel de la activación del inflammasoma en infecciones con helmintos que a diferencia de las infecciones bacterianas o por protozoarios se desconoce el destino final de estas células luego de este fenómeno de activación de la respuesta inmune innata..

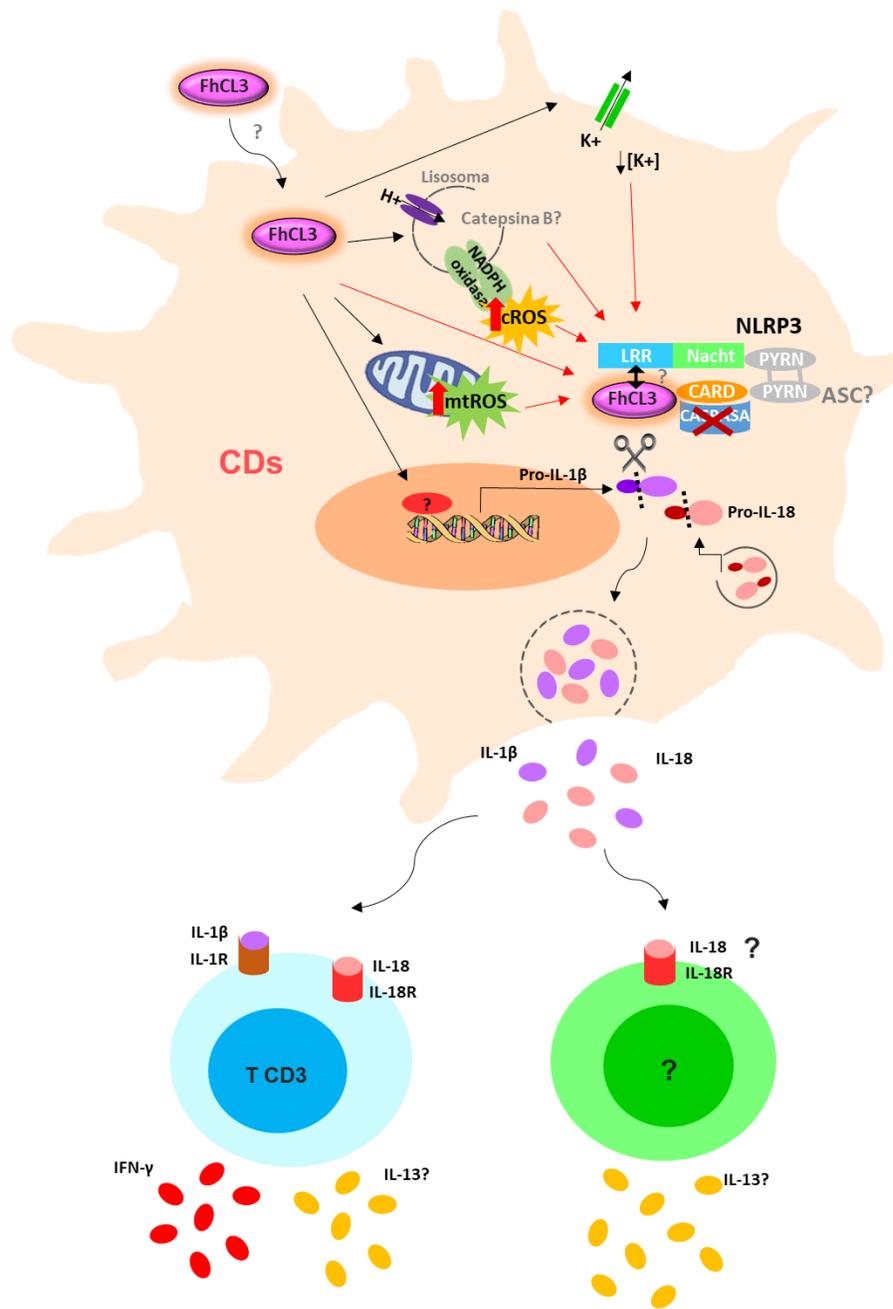


Figura 27. Modelo de activación del inflammasoma NLRP3, inducida por FhCL3. FhCL3 es internalizada por las CDs, se ubica en el citosol y promueve: **(1)** La transcripción y síntesis de *novovo* de pro-IL-1 β ; **(2)** La generación de ROS citoplasmático y mitocondrial; **(3)** La acidificación lisosomal que facilita la activación de catepsinas endógenas de la célula, principalmente catepsina B, la cual es liberada al citosol; y **(4)** El eflujo de potasio, disminuyendo la concentración de potasio intracelular. A su vez, estos eventos contribuyen a la activación del receptor NLRP3, que podría interaccionar directamente con FhCL3 (en presencia o ausencia de ASC). Ocurre la proteólisis y maduración de pro-IL-1 β y pro-IL-18 (pro-IL-18 se expresa constitutivamente en CDs), de manera independiente de la actividad de caspasas. Las formas activas de IL-1 β e IL-18 son liberadas al medio extracelular, donde se encuentran e interaccionan con sus respectivos receptores, en la superficie celular. Las células, responden a estos estímulos secretando IFN- γ y/o IL-13. Los linfocitos T, son los principales productores de IFN- γ .

CONCLUSIONES



1. FhCL3 enzimáticamente activa es internalizada por CDs y promueve una maduración parcial estas células, promoviendo la secreción de IL-1 β e IL-18.
2. FhCL3 induce la expresión IL-1 β , de manera no canónica, ya que es independiente de la activación de NF- κ B.
3. La producción de IL-1 β e IL-18 inducida por FhCL3 es dependiente NLRP3 y no requiere de la actividad de caspasas.
4. FhCL3 estimula la síntesis y liberación de IL-1 β a través de la producción de ROS, el eflujo de potasio y la acidificación lisosomal.
5. FhCL3 es capaz escindir específicamente el precursor de IL-1 β , facilitando la maduración de esta citoquina.
6. FhCL3 condiciona a las CDs para promover la producción IFN- γ e IL-13 en cultivos alogénicos.
7. La capacidad aloestimuladora de las CDs-FhCL3 es dependiente de la activación de NLRP3.
8. CDs-FhCL3 estimulan la producción de IFN- γ e IL-13 en respuesta a FhCL3, *in vivo*.

9. Durante la infección con *F. hepatica* se genera una respuesta adaptativa mediada por IFN- γ , específica a FhCL3.

10. La inmunización con FhCL3-MPLA promueve el desarrollo de un perfil de IFN- γ e IL-13, en respuesta a FhCL3, que podría resultar protector en el contexto de la infección con *F. hepatica*.

Trabajos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral

Motran CC, Ambrosio LF, Volpini X, **Celias DP** and Cervi L. *“Dendritic Cells and Parasites: From Recognition and Activation to Immune Response Instruction”*. Seminars in Immunopathology. 2017 Feb; 39(2):199-213.

Motran CC, Silvane L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, **Celias DP**, and Cervi L. *“Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells”*. Front Immunol. 2018 Apr 4; 9:664.

Celias DP, Corvo I, Silvane L, Tort J, Chiapello L, Fresno M, Arranz A, Motrán CC and Cervi L *“Cathepsin L3 from Fasciola hepatica activates the inflammasome via NOD like receptor 3 in murine dendritic cells”*. Manuscrito enviado.

BIBLIOGRAFÍA



1. S. A. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: J.P. D, editor. *Fasciolosis*. CABI Publishing 1999. p. 1–29.
2. Molina-Hernandez V, Mulcahy G, Perez J, Martinez-Moreno A, Donnelly S, O'Neill SM, et al. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary parasitology*. 2015 Feb 28;208(1-2):101-11.
3. Cuervo PF, Cataldo SD, Fantozzi MC, Deis E, Isenrath GD, Viberti G, et al. Liver fluke (*Fasciola hepatica*) naturally infecting introduced European brown hare (*Lepus europaeus*) in northern Patagonia: phenotype, prevalence and potential risk. *Acta Parasitol*. 2015 Sep;60(3):536-43.
4. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2 *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology: Academic Press*; 2009. p. 41-146.
5. Nyindo M, Lukumbagire AH. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *Biomed Res Int*. 2015;2015:786195.
6. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. *Parasitology*. 2014 Dec;141(14):1918-46.
7. Mera y Sierra R, Agramunt VH, Cuervo P, Mas-Coma S. Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasit Vectors*. 2011 Jun 11;4:104.
8. Charlier J, Bennema SC, Caron Y, Counotte M, Ducheyne E, Hendrickx G, et al. Towards assessing fine-scale indicators for the spatial transmission risk of *Fasciola hepatica* in cattle. *Geospat Health*. 2011 May;5(2):239-45.
9. Boray JC, Fraser GC, Williams JD, Wilson JM. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Aust Vet J*. 1985 Jan;62(1):4-6.
10. Torgerson PC, J. Epidemiology and control. In: J.P. D, editor. *Fasciolosis*. Londres: Cab International 1999. p. 113–39.
11. Dawes B, Hughes DL. FASCIOLIASIS: THE INVASIVE STAGES OF *FASCIOLA HEPATICA* IN MAMMALIAN HOSTS. *Adv Parasitol*. 1964;2:97-168.
12. Zafra R, Buffoni L, Perez-Ecija RA, Mendes RE, Martinez-Moreno A, Martinez-Moreno FJ, et al. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res Vet Sci*. 2009 Oct;87(2):226-32.
13. Zafra R, Perez-Ecija RA, Buffoni L, Moreno P, Bautista MJ, Martinez-Moreno A, et al. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol*. 2013 May;148(4):373-84.
14. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1954-61.
15. Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Mar;158(1):52-64.

16. Gu YQ, Walling LL. Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato activity on dipeptide and tripeptide substrates. *Eur J Biochem.* 2000 Feb;267(4):1178-87.
17. Morty RE, Morehead J. Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26057-65.
18. McCarthy E, Stack C, Donnelly SM, Doyle S, Mann VH, Brindley PJ, et al. Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol.* 2004 May;34(6):703-14.
19. Wolf-Spengler ML, Isseroff H. Fascioliasis: bile duct collagen induced by proline from the worm. *J Parasitol.* 1983 Apr;69(2):290-4.
20. McManus DP, Dalton JP. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology.* 2006;133 Suppl:S43-61.
21. Cordero del Campillo MR-V, F.D.; Martínez, A.R.; Sánchez, M.C.; Hernández, S.; Navarrete, I.; Diez, P.; Quiroz, H. *Parasitología veterinaria*. In: Interamericana MH, editor. Madrid 1999. p. 990.
22. Dowling DJ, Hamilton CM, Donnelly S, La Course J, Brophy PM, Dalton J, et al. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect Immun.* 2010 Feb;78(2):793-801.
23. Hamilton CM, Dowling DJ, Loscher CE, Morphew RM, Brophy PM, O'Neill SM. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect Immun.* 2009 Jun;77(6):2488-98.
24. Falcon C, Carranza F, Martinez FF, Knubel CP, Masih DT, Motran CC, et al. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010 Sep 15;137(1-2):36-46.
25. Guasconi L, Serradell MC, Garro AP, Iacobelli L, Masih DT. C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology.* 2011 Jul;133(3):386-96.
26. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):584-91.
27. Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet Parasitol.* 2013 Aug 1;195(3-4):272-85.
28. Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, Robinson MW, Turnbull L, Whitchurch C, et al. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. *J Biol Chem.* 2010 Jan 29;285(5):3383-92.
29. Donnelly S, Dalton JP, Robinson MW. How pathogen-derived cysteine proteases modulate host immune responses. *Adv Exp Med Biol.* 2011;712:192-207.
30. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):166-73.

31. Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, Sayed AA, Williams DL, Dalton JP. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *Faseb j.* 2008 Nov;22(11):4022-32.
32. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Aug;8(8):1891-907.
33. Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, et al. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Jun;7(6):1111-23.
34. Spithill TWC, C.; Piedrafita, D.; Smooker, P.M. Prospects for Immunoprophylaxis Against *Fasciola hepatica* (Liver Fluke). In: Caffrey CR, editor. 2012.
35. Robinson MW, Donnelly S, Hutchinson AT, To J, Taylor NL, Norton RS, et al. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 2011 May;7(5):e1002042.
36. Alvarado R, To J, Lund ME, Pinar A, Mansell A, Robinson MW, et al. The immune modulatory peptide FhHDM-1 secreted by the helminth *Fasciola hepatica* prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting endolysosomal acidification in macrophages. *Faseb j.* 2017 Jan;31(1):85-95.
37. Robinson MW, Alvarado R, To J, Hutchinson AT, Dowdell SN, Lund M, et al. A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase. *Faseb j.* 2012 Nov;26(11):4614-27.
38. Ramos-Benitez MJ, Ruiz-Jimenez C, Aguayo V, Espino AM. Recombinant *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein suppresses toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Sci Rep.* 2017 Jul 14;7(1):5455.
39. Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Nov;62(1):9-17.
40. Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, et al. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol.* 1997 Feb;83(1):1-5.
41. Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics.* 2001 Sep;1(9):1128-32.
42. Morphew RM, Wright HA, LaCourse EJ, Woods DJ, Brophy PM. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Jun;6(6):963-72.
43. Grams R, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Upatham ES, Viyanant V. Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol Int.* 2001 Jul;50(2):105-14.
44. Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol.* 1998 Feb;88(2):85-94.

45. Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, et al. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Jul;136(1):1-10.
46. Cwiklinski K, de la Torre-Escudero E, Trelis M, Bernal D, Dufresne PJ, Brennan GP, et al. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Dec;14(12):3258-73.
47. Sansri V, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Sobhon P, Meemon K. Molecular cloning, characterization and functional analysis of a novel juvenile-specific cathepsin L of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop*. 2013 Oct;128(1):76-84.
48. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol*. 2004 May;34(6):675-82.
49. Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Duran R, Roche L, et al. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*. 2008 Oct;90(10):1461-75.
50. Zawistowska-Deniziak A, Wasyl K, Norbury LJ, Wesolowska A, Bien J, Grodzik M, et al. Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2013 Jul;190(1):27-37.
51. Corvo I, Cancela M, Cappetta M, Pi-Denis N, Tort JF, Roche L. The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Sep;167(1):41-7.
52. Norbury LJ, Beckham S, Pike RN, Grams R, Spithill TW, Fecondo JV, et al. Adult and juvenile *Fasciola* cathepsin L proteases: different enzymes for different roles. *Biochimie*. 2011 Mar;93(3):604-11.
53. McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol*. 2008 Feb;38(2):149-55.
54. Corvo I, O'Donoghue AJ, Pastro L, Pi-Denis N, Eroy-Reveles A, Roche L, et al. Dissecting the active site of the collagenolytic cathepsin L3 protease of the invasive stage of *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2269.
55. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26.
56. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014 May 22;157(5):1013-22.
57. Sanders MG, Parsons MJ, Howard AG, Liu J, Fassio SR, Martinez JA, et al. Single-cell imaging of inflammatory caspase dimerization reveals differential recruitment to inflammasomes. *Cell Death Dis*. 2015 Jul 9;6:e1813.
58. Inoue M, Shinohara ML. NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis*. 2013;2013:859145.
59. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun*. 2015 Jun 10;6:7360.

60. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun.* 2013;4:1611.
61. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677-87.
62. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun;1319:82-95.
63. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J Inflamm Res.* 2015;8:15-27.
64. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787-91.
65. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Ozkurede U, Kim YG, Arindam C, et al. Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *J Immunol.* 2014 Oct 15;193(8):4214-22.
66. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 2012 Mar 19;13(4):325-32.
67. Kim RY, Pinkerton JW, Gibson PG, Cooper MA, Horvat JC, Hansbro PM. Inflammasomes in COPD and neutrophilic asthma. *Thorax.* 2015 Dec;70(12):1199-201.
68. Rabeony H, Pohin M, Vasseur P, Petit-Paris I, Jegou JF, Favot L, et al. IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol.* 2015 Oct;45(10):2847-57.
69. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):821-32.
70. Hari A, Zhang Y, Tu Z, Detampel P, Stenner M, Ganguly A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep.* 2014 Dec 2;4:7281.
71. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2015 May 1;194(9):4507-17.
72. Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol.* 2015 Oct;45(10):2911-7.
73. Hussen J, Duvel A, Koy M, Schuberth HJ. Inflammasome activation in bovine monocytes by extracellular ATP does not require the purinergic receptor P2X7. *Dev Comp Immunol.* 2012 Oct;38(2):312-20.
74. Shenderov K, Riteau N, Yip R, Mayer-Barber KD, Oland S, Hieny S, et al. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1beta in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2029-33.
75. van Bruggen R, Koker MY, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Kuijpers TW, et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood.* 2010 Jul 1;115(26):5398-400.
76. Crane DD, Bauler TJ, Wehrly TD, Bosio CM. Mitochondrial ROS potentiates indirect activation of the AIM2 inflammasome. *Front Microbiol.* 2014;5:438.
77. Lawlor KE, Vince JE. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1840(4):1433-40.

78. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):311-23.
79. Miao H, Ou J, Ma Y, Guo F, Yang Z, Wiggins M, et al. Macrophage CGI-58 deficiency activates ROS-inflammasome pathway to promote insulin resistance in mice. *Cell Rep*. 2014 Apr 10;7(1):223-35.
80. Zhuang Y, Yasinta M, Hu C, Zhao M, Ding G, Bai M, et al. Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):F857-66.
81. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847-56.
82. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol*. 2013 Aug;14(8):812-20.
83. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, et al. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Jan 7;54(1):110-20.
84. Cho MH, Cho K, Kang HJ, Jeon EY, Kim HS, Kwon HJ, et al. Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy*. 2014 Oct 1;10(10):1761-75.
85. Shao BZ, Wei W, Ke P, Xu ZQ, Zhou JX, Liu C. Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Dec;20(12):1021-8.
86. Jabir MS, Hopkins L, Ritchie ND, Ullah I, Bayes HK, Li D, et al. Mitochondrial damage contributes to *Pseudomonas aeruginosa* activation of the inflammasome and is downregulated by autophagy. *Autophagy*. 2015;11(1):166-82.
87. Li Y, Yang J, Chen MH, Wang Q, Qin MJ, Zhang T, et al. Ilexgenin A inhibits endoplasmic reticulum stress and ameliorates endothelial dysfunction via suppression of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in an AMPK dependent manner. *Pharmacol Res*. 2015 Sep;99:101-15.
88. Liu W, Gu J, Qi J, Zeng XN, Ji J, Chen ZZ, et al. Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *J Cell Mol Med*. 2015 Aug;19(8):1949-55.
89. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):401-14.
90. Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*. 2015;6:262.
91. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J Exp Med*. 2010 Aug 2;207(8):1745-55.
92. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 2008 Mar 6;452(7183):103-7.

93. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):556-65.
94. Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Jr., Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):566-75.
95. Kamada AJ, Pontillo A, Guimaraes RL, Loureiro P, Crovella S, Brandao LA. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Nov;109(7):960-3.
96. Gorfu G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *MBio*. 2014 Feb 18;5(1).
97. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FR, et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):3373-83.
98. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2015 May;265(1):156-71.
99. Olivier M, Van Den Ham K, Shio MT, Kassa FA, Fougeray S. Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Front Immunol*. 2014;5:25.
100. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009 May 8;5(5):487-97.
101. Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One*. 2010 Apr 2;5(4):e10008.
102. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol*. 2016 Feb;46(2):269-80.
103. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*. [Review Article]. 2014 01/08/online;15:84.
104. Zaiss MM, Maslowski KM, Mosconi I, Guenat N, Marsland BJ, Harris NL. IL-1beta suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003531.
105. Alhallaf R, Agha Z, Miller CM, Robertson AAB, Sotillo J, Croese J, et al. The NLRP3 Inflammasome Suppresses Protective Immunity to Gastrointestinal Helminth Infection. *Cell Rep*. 2018 Apr 24;23(4):1085-98.
106. Meng N, Xia M, Lu YQ, Wang M, Boini KM, Li PL, et al. Activation of NLRP3 inflammasomes in mouse hepatic stellate cells during *Schistosoma J.* infection. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):39316-31.
107. Lu Y-Q, Zhong S, Meng N, Fan Y-P, Tang W-X. NLRP3 inflammasome activation results in liver inflammation and fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum* in a Syk-dependent manner. *Scientific Reports*. 2017 2017/08/14;7(1):8120.

108. Ritter M, Gross O, Kays S, Ruland J, Nimmerjahn F, Saijo S, et al. Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20459-64.
109. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*. 2013 Jan;19(1):57-64.
110. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1357-61.
111. Orłowski GM, Colbert JD, Sharma S, Bogyo M, Robertson SA, Rock KL. Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1beta Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1beta Activation. *J Immunol*. 2015 Aug 15;195(4):1685-97.
112. Ceru S, Konjar S, Maher K, Repnik U, Krizaj I, Bencina M, et al. Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus. *J Biol Chem*. 2010 Mar 26;285(13):10078-86.
113. Wang YR, Qin S, Han R, Wu JC, Liang ZQ, Qin ZH, et al. Cathepsin L plays a role in quinolinic acid-induced NF-Kappab activation and excitotoxicity in rat striatal neurons. *PLoS One*. 2013;8(9):e75702.
114. Maher K, Završnik J, Jerić-Kokelj B, Vasiljeva O, Turk B, Kopitar-Jerala N. Decreased IL-10 expression in stefin B-deficient macrophages is regulated by the MAP kinase and STAT-3 signaling pathways. *FEBS Lett*. 2014 Mar 3;588(5):720-6.
115. Ministerio de Ciencia TelP-PdIN <http://www.bioterios.mincyt.gob.ar/2017/>; Available from: <http://www.bioterios.mincyt.gob.ar/>.
116. Robinson MW, Corvo I, Jones PM, George AM, Padula MP, To J, et al. Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Apr 5;5(4):e1012.
117. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.
118. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1693-702.
119. Montesinos MM, Pellizas CG, Velez ML, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Coleoni AH. Thyroid hormone receptor beta1 gene expression is increased by Dexamethasone at transcriptional level in rat liver. *Life Sci*. 2006 Apr 25;78(22):2584-94.
120. Hernandez AH, Curi R, Salazar LA. Selection of reference genes for expression analyses in liver of rats with impaired glucose metabolism. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):3946-54.
121. Duhovny D NR, Wolfson HJ. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. Rome, Italy, Lecture Notes in Computer Science 2002.
122. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*. 2011 Mar;32(3):110-6.
123. He Y, Franchi L, Nunez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol*. 2013 Jan 1;190(1):334-9.

124. Alfaidi M, Wilson H, Daigneault M, Burnett A, Ridger V, Chamberlain J, et al. Neutrophil elastase promotes interleukin-1beta secretion from human coronary endothelium. *J Biol Chem.* 2015 Oct 2;290(40):24067-78.
125. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3173-82.
126. Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KH. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5372-8.
127. O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, Mills KH, et al. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 2000 Mar;22(3):147-55.
128. Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol.* 2014 Oct 15;44(12):915-27.
129. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology.* 2007;212(6):475-90.
130. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jun;11(6):375-88.
131. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int J Parasitol.* 2013 Mar;43(3-4):301-10.
132. Hill JA, Benoist C, Mathis D. Treg cells: guardians for life. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):124-5.
133. Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology.* 2009 Jan;126(1):18-27.
134. Massacand JC, Stettler RC, Meier R, Humphreys NE, Grecis RK, Marsland BJ, et al. Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):13968-73.
135. Falcon CR, Carranza FA, Aoki P, Motran CC, Cervi L. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Fasciola hepatica* antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. *J Infect Dis.* 2012 Feb 1;205(3):506-14.
136. Stempin CC, Motran CC, Aoki MP, Falcon CR, Cerban FM, Cervi L. PD-L2 negatively regulates Th1-mediated immunopathology during *Fasciola hepatica* infection. *Oncotarget.* 2016 Nov 22;7(47):77721-31.
137. Noya V, Brossard N, Rodriguez E, Dergan-Dylon LS, Carmona C, Rabinovich GA, et al. A mucin-like peptide from *Fasciola hepatica* instructs dendritic cells with parasite specific Th1-polarizing activity. *Sci Rep.* 2017 Jan 12;7:40615.
138. Li Q, Ao J, Mu Y, Yang Z, Li T, Zhang X, et al. Cathepsin S, but not cathepsin L, participates in the MHC class II-associated invariant chain processing in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Dec;47(2):743-50.
139. Cervi L, MacDonald AS, Kane C, Dzierszynski F, Pearce EJ. Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2016-20.

140. Stehlik C. Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3524-30.
141. Beausejour A, Grenier D, Goulet JP, Deslauriers N. Proteolytic activation of the interleukin-1beta precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):676-81.
142. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, et al. Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol.* 2010 Apr 1;184(7):3326-30.
143. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010 Dec;11(12):1136-42.
144. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014 Oct 9;514(7521):187-92.
145. Afonina IS, Muller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity.* 2015 Jun 16;42(6):991-1004.
146. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del Barrio L, Re F. Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2037-50.
147. Ferguson BJ, Newland SA, Gibbs SE, Toulomousis P, Fernandes dos Santos P, Patel MN, et al. The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1beta secretion in macrophages. *Int J Parasitol.* 2015 Nov;45(13):809-13.
148. Zhang Y, Sacconi S, Shin H, Nikolajczyk BS. Dynamic protein associations define two phases of IL-1beta transcriptional activation. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):503-12.
149. Wan CK, Li P, Spolski R, Oh J, Andraski AB, Du N, et al. IL-21-mediated non-canonical pathway for IL-1beta production in conventional dendritic cells. *Nat Commun.* 2015 Aug 13;6:7988.
150. Liu Q, Liu Z, Whitmire J, Alem F, Hamed H, Pesce J, et al. IL-18 stimulates IL-13-mediated IFN-gamma-sensitive host resistance in vivo. *Eur J Immunol.* 2006 May;36(5):1187-98.
151. Nakanishi K. Unique Action of Interleukin-18 on T Cells and Other Immune Cells. [Review]. 2018 2018-April-20;9(763).
152. Sanders NL, Mishra A. Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Dec;32:31-9.
153. Smith D, Tikhonova IG, Jewhurst HL, Drysdale OC, Dvorak J, Robinson MW, et al. Unexpected Activity of a Novel Kunitz-type Inhibitor: INHIBITION OF CYSTEINE PROTEASES BUT NOT SERINE PROTEASES. *J Biol Chem.* 2016 Sep 9;291(37):19220-34.