

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I B I C I

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

**Nuevos blancos moleculares con
propiedades inmunomodulatorias en el
desarrollo de vacunas contra *Fasciola
hepatica***

Bioq. Leonardo Micael Silvane

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI)-CONICET
Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina
2020

DIRECTORA

Dra. Laura Cervi

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dr. Fabio Cerbán

Dra. Andrea Rópolo

Dra. Carina Porporatto

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Iván Marcipar

AGRADECIMIENTOS

Los primeros que quiero agradecer es a mi familia, tanto mi papa como mi mama y mi hermana fueron los que siempre me apoyaron y desde siempre me motivaron a seguir estudiando. Ustedes fueron parte del proyecto desde su lugar, sin ustedes no podría haberlo logrado.

Un párrafo especial para Eve que en conjunto con Lucho, siempre me apoyaron desde mi llegada a Córdoba y han hecho hasta lo imposible para que me sienta cómodo en la ciudad pudiendo dedicar toda mi atención al estudio. Muchas gracias por ser la mejor hermana que podría haber pedido desde siempre. A Lucho por ser familia y amigo. Un saludo especial para los pequeños Joaco y Luisi que me hicieron muy feliz con su llegada

No tengo más que palabras de total agradecimiento para mi directora Laura, alguien que desde un primer momento me ofreció un lugar y apoyo en las decisiones que tomara para bien o para mal en el proyecto. Además trabajar con alguien que casi no habla y que sus pocas interacciones muchas veces gruña; no debe ser muy fácil, sin embargo nunca me sentí incómodo y siempre sentí que tenía alguien en quien confiar aun cuando me haya costado demostrarlo

Nada se puede llevar a cabo sin un grupo de trabajo. Nunca voy a dejar de agradecer a alguna deidad o lo que sea que haya sido (spoiler creo que nada, tal vez Batman) que permitió que ese grupo haya sido con DAI. Si ser jefe supongo fue difícil no quiero imaginar lo que fue ser mi compañera pero aun así, la incondicionalidad y la paciencia no la voy a poder devolver de ninguna manera, tanto que hasta mi problema para completar frases era solucionado porque ella que ya sabía que iba a decir. No voy a olvidar nunca las charlas en el bioterio o en cultivo. Por si no se entendió lo digo de nuevo muchas gracias amiga y espero haber sido un digno Robin

Del laboratorio 109 (Dr. Rubinstein, Chiapello, Martin T., Lore, Lau Gatica, Silvi, Vero Mary, Santi, Vero Burstein, Pilar, Dai, Gise, Cris y Nacho) todos se portaron de maravillas conmigo fue gratificante poder compartir tanto trabajo como momentos de esparcimiento y valoro mucho la predisposición siempre de ayudar no importa el motivo.

Mención especial para Dai, Vero Mary, Santi, Vero Burstein, Pilar y Nacho que fueron los que más me aguantaron con los que vivimos los mejores momentos que me voy a llevar para siempre. Muchas gracias por haberme ofrecido su amistad.

El grupo de la Dra. Maletto que estuvieron siempre ayudándome con el Coagel. Desde Fer (que me enseñó todo desde cero) pasando por Ana, Coti y hasta Fede siempre alguna pregunta tuvieron que responderme y lo hicieron siempre de la mejor manera. De paso saludo a todos los chicos del lab-ex108 que tuvieron que bancar mis visitas fantasmas

A Pablo Romagnoli agradecerle haberse puesto la bata para ayudarme en los experimentos y estar siempre dándome ideas para sumar al proyecto

A las chicas del grupo de la Dra Motran (Lau, Coti y Xime) tanto por estar siempre disponibles para compartir reactivos o conocimientos pero sobre todo por la buena onda.

Quería agradecer también a los chicos del equipo de futbol del CIBICI por haber confiado en mis pocas habilidades y disculpen por mis locuras. El 2020 era nuestro año, nos cortaron las piernas.

A todos los que forman parte del CIBICI de alguna u otra manera fueron participes del proyecto, ya sea desde su colaboración activa - las chicas del citómetro (Paula y Pilar) y Laura Gatica con sus cortes histológicos - o haciendo que el funcionamiento del edificio sea posible y tengamos la oportunidad de realizar nuestros experimentos de la mejor manera posible.

“If one day, my words are against science, choose science.”

Mustafa Kemal Atatürk (1881-1938)

INDICE

ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	12
SUMMARY	15
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	18
<i>Fasciola hepatica</i> y su ciclo evolutivo.....	19
Fasciolosis	20
La fasciolosis, un problema sanitario desatendido	21
Fases de la infección	24
Tratamiento	25
Mecanismos efectores y de evasión del sistema inmune en la infección por <i>Fasciola hepatica</i>	26
Interacción de <i>F. hepatica</i> y sus huéspedes	29
El camino hacia el desarrollo de una vacuna	29
Proteínas recombinantes usadas como antígenos vacunales anti <i>F. hepatica</i>	30
Uso de la molécula de tipo Kunitz (FhKTM) como una herramienta novedosa para combatir la fasciolosis	32
Las nuevas estrategias vacunales y la necesidad del desarrollo de un adyuvante.....	36
Capítulo 2: OBJETIVOS.....	39
Objetivos generales	40
Objetivos específicos	40
Hipótesis.....	41
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Animales	43
Antígeno - adyuvante	43
Ensayos de inmunización	43
Evaluación del daño hepático.....	44
Supervivencia	45
Insumos y reactivos.....	45
Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA).....	45
Determinación de Citoquinas	46

Citometría de flujo	47
Ensayos enzimáticos para la determinación la actividad inhibitoria de FhKTM en presencia o ausencia de sueros de animales inmunizados.....	48
Cuantificación de poblaciones celulares por Morfología.....	49
Detección de óxido nítrico	49
Bloqueo de IL-17A	49
Obtención de células por lavado peritoneal	50
Obtención y cultivo de células	50
Análisis estadístico.....	51
Capítulo 4: RESULTADOS	52
Evaluación de la formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 en la vacunación contra <i>F. hepatica</i>	53
La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 previene el daño hepático	55
La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce una elevada respuesta inmune humoral específica	59
La inmunización con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 desarrolla respuestas de citoquinas IL-17A e IFN- γ específicas de antígeno.....	61
El tratamiento FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 eleva la producción de IFN- γ e IL-17 en células aisladas de Placas de Peyer (PPs) y Ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs).....	65
La vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 incrementa el reclutamiento de células CD11b ⁺ F4/80 ⁺ en la cavidad peritoneal y la producción de IL-6, IL-5, TNF, IL-17A e INF- γ	66
La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 promueve la activación de las células peritoneales y aumento en la producción de óxido nítrico	70
El uso de anticuerpos α -IL-17A en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 afecta la producción de IFN- γ	71
La neutralización de IL-17A reduce los niveles de IgG2a e IgA en los ratones tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16	74
El bloqueo de IL-17A disminuye la eficacia de la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 para proteger a los animales infectados con <i>F. hepatica</i>	75
La actividad inhibitoria de Kunitz es neutralizada por factores presentes en el suero de ratones inmunizados con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16	78
Capítulo 5: DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES	95
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	99

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
APC	Aloficocianina
ALT	Alanina aminotransferasa
ASC16	Ácido ascorbico
AST	Aspartato aminotransferasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Células dendríticas
CpG-ODN	Cytosine-phosphate-guanosine - oligodeoxynucleotide
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 tempranos
ELISA	Enzimoinmunoensayo en fase sólida
ET	Extracto total
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FCS	Citometria de flujo
FhCL1	Catepsinas L 1 <i>F. hepatica</i>
FhCL2	Catepsinas L 2 <i>F. hepatica</i>
FhCL3	Catepsinas L 3 <i>F. hepatica</i>
FhKTM	Inhibidor de proteasas tipo Kunitz 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
Ig	Inmunoglobulina
IFN	Interferón
IL-	Interleuquina
ILN	Ganglios linfáticos inguinales
INF	Infectados
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MGG	May Grünwald-Giemsa
Mtc	Metacercarias
MLN	Ganglios linfáticos mesentericos
SIN	No infectados
TRATAMIENTO	
NEJ	Larva migrante juvenil
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbúmina
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución tampón de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorhidrato de peridinina
PPs	Placas de Peyer
PES	Productos excreto-secretorios de <i>F. hepatica</i>
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RFU	Unidades de fluorescencia relativa

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
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
WT	Wild type
α IL- 17A	Anticuerpo anti-IL-17A

RESUMEN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que daña el hígado del huésped infectado y es causada por la migración y la actividad alimentaria de un trematodo: *Fasciola hepatica*, que afecta principalmente a rumiantes domésticos como el ganado vacuno y ovino. La fasciolosis ha generado pérdidas económicas significativas en el sector agrícola en todo el mundo debido a la reducción de la producción de carne y leche. El ser humano es susceptible a la fasciolosis por ingestión de las metacercarias en vegetales contaminados. El triclabendazol es el medicamento de elección utilizado para controlar la fasciolosis y es el único medicamento recomendado por la OMS para tratar la fasciolosis humana. Sin embargo, la resistencia al triclabendazol en *F. hepatica* se ha reportado en muchos países, incluida Australia, Irlanda, Brasil y Argentina. Estas limitaciones de la quimioterapia han llevado a que el desarrollo de vacunas para prevenir contra la infección por *F. hepatica* sea una prioridad en distintos laboratorios alrededor del mundo. Este hallazgo permitiría aumentar la seguridad de los alimentos y ayudar en la disminución de la producción de contaminación ambiental. En numerosos estudios se determinó que la mejor forma de eliminar a *F. hepatica* es durante la etapa migratoria de la larva juvenil hacia el hígado. En este período, se expresa entre otras, una proteína tipo Kunitz (FhKTM), la cual es un inhibidor de proteasas, capaz de inhibir las enzimas propias y del huésped. Esta proteína que se encuentra en el intestino, el tegumento y los productos excretorios-secretorios del parásito, puede ser considerada como inmunógeno para el desarrollo de una vacuna dada su participación en la supervivencia del patógeno

Los ensayos de inmunización utilizando péptidos sintéticos es una de las nuevas tecnologías nuevas implementadas en la inmunoterapia. La adición de un adyuvante refuerza el potencial de respuesta inmune del antígeno. CpG-ODN/Coa-ASC16, una nanoestructura de cristal líquido formada por autoensamblaje de éster de palmitato de 6-O-ascorbilo (Coa-ASC16) y el oligodesoxinucleótido sintético que contiene motivos de citosina-guanina no metilados (CpG-ODN), fue elegido por su capacidad de generar una respuesta Th1 y Th17 con una fuerte respuesta humoral y celular específica demostrado en modelos utilizando OVA como antígeno. Además, tiene la ventaja de proteger con su estructura de cristal líquido del ambiente enzimático hostil y generar una liberación gradual del péptido. En el presente trabajo de tesis evaluamos el potencial de FhKTM formulado con CpG-ODN/Coa-ASC16 en un modelo experimental de fasciolosis en

ratones y la respuesta inmune asociada con la protección del huésped. Nuestros resultados mostraron que la inmunización de ratones con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce protección contra el desafío de *F. hepatica* al prevenir el daño hepático y mejorar la sobrevivencia después de la infección. Además, en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 se indujo una potente respuesta inmune caracterizada por la secreción de IFN- γ e IL-17A con altos niveles de anticuerpos séricos IgG1, IgG2a e IgA específicos de antígeno. Tanto las células del peritoneo como el intestino evidenciaron una activación frente a la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. Esta reacción permite considerar estos sitios como los lugares donde se generará una respuesta inmune efectiva que podría provocar la eliminación del parásito para evitar la llegada al hígado. El bloqueo sistémico de IL-17A durante la infección disminuyó los niveles de anticuerpos IgG2a e IgA, así como la producción de IFN- γ , lo que debilitó el potencial protector de la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 aumentando la mortalidad de los ratones. La presencia de IL-17A se convierte así en un factor fundamental para el desarrollo de la respuesta inmune contra la infección por *F. hepatica* durante la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. En base a los resultados el presente estudio destaca el potencial de una nueva formulación de vacuna para mejorar el control y ayudar a la erradicación de la infección por *F. hepatica*, con posibles aplicaciones para huéspedes naturales como el ganado bovino y ovino

SUMMARY

Summary

Fasciolosis is a parasitic disease that damages the liver of the infected host and is caused by the migration and feeding activity of a fluke: *Fasciola hepatica*, which mainly affects domestic ruminants such as cattle and sheep. Fasciolosis has caused a significant economic burden on the agricultural sector worldwide due to reduced meat and milk production. Humans are susceptible to fasciolosis by ingesting the metacercariae in contaminated vegetables. Triclabendazole is the drug of choice used to control fasciolosis and is the only medicine, recommended by the WHO, to treat human fasciolosis. However, resistance to triclabendazole in *F. hepatica* has emerged and has been reported in many countries, including Australia, Ireland, Brazil, and Argentina. These limitations of chemotherapy have made the development of vaccines to prevent against *F. hepatica* infection a priority in different laboratories around the world, this finding would increase food safety and help decrease environmental contamination production.

Data from different sources suggest that the best way to eliminate *F. hepatica* is by the inhibition of the migratory stage of the juvenile larva towards the liver. It was found that during this period, a Kunitz-type protein (FhKTM) is expressed, among others. This is a protease inhibitor that acts in the parasite as well in host's enzymes. Considering that this protein is found in the intestine, the tegument and the excretory-secretory products, and its involvement in the parasite survival, it may be considered as an immunogen for the development of a vaccine.

Immunization assays using synthetic peptides is one of the new technologies implemented in immunotherapy. The addition of an adjuvant enhances the immune response potential of the antigen. CpG-ODN/Coa-ASC16, a liquid crystal nanostructure formed by self-assembly of 6-O-ascorbyl palmitate ester (Coa-ASC16) and the synthetic oligodeoxynucleotide containing unmethylated cytosine-guanine motifs (CpG-ODN), This adjuvant generates a Th1 and Th17 response with a strong specific humoral and cellular immune response demonstrated in models using OVA as the antigen. Furthermore, it has the advantage of protecting and generating a gradual release of the peptide.

In this work we evaluated the potential of FhKTM formulated with a liquid crystal nanostructure (CpG-ODN/Coa-ASC16) during an experimental model of fasciolosis in mice and the feasible immune response associated with host protection.

Our results showed that immunization of mice with FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induces protection against *F. hepatica* challenge by preventing liver damage and

Summary

improving survival after *F. hepatica* infection. Furthermore, in mice immunized with FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, a potent immune response characterized by secretion of IFN- γ and IL-17A was induced with high levels of antigen-specific serum IgG1, IgG2a and IgA antibodies.

Both the peritoneum and the intestine showed an activation status induced by the immunization with FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, thus becoming the sites where the elimination of the parasite could be controlled to avoid its arrival to the liver.

Blocking systemic IL-17A during infection decreased IgG2a and IgA antibody levels, as well as IFN- γ production, which reduced the protective potential of immunization with FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, increasing the mortality of the mice. The presence of IL-17A thus becomes a fundamental factor for the development of the immune response against infection by *F. hepatica* during vaccination with FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.

The present study highlights the potential of a new vaccine formulation to improve control and help eradicate *F. hepatica* infection, with possible applications for natural hosts such as cattle and sheep

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

***Fasciola hepatica* y su ciclo evolutivo**

Fasciola hepatica es un parásito helminto hermafrodita que se clasifica dentro del phylum Platyhelminthes (1), clase Trematoda, subclase Digenea, orden Equisistomiformes y familia Fasciolidae (2). La infección con *F. hepatica* ocurre por la ingestión de la metacercaria, la cual se encuentra usualmente enquistada en plantas acuáticas como el berro y es el estadio infectante en la fasciolosis. Una vez ingerida, la metacercaria atraviesa el estómago y luego el intestino delgado, en donde termina su proceso de desenquistamiento y se transforma en una larva juvenil. Esta última tiene la capacidad de penetrar la pared del intestino delgado y migrar a través de la cavidad abdominal hasta alcanzar el hígado. Alrededor de los cuatro a seis días post-infección las larvas juveniles ingresan al hígado, atravesando el parénquima hasta ubicarse en los conductos biliares. El adulto se localiza en los conductos biliares mayores y la vesícula biliar en sus huéspedes definitivos tales como ganado vacuno, ovino, caprino y eventualmente en humanos. Allí los parásitos maduran a su estadio adulto y viven por años, normalmente entre 1-2 años en el ganado vacuno y hasta 20 años en el ganado ovino (Figura 1). Los huevos fecundados son expulsados al medio ambiente con las heces, y madurando cuando se encuentran en un medio acuático con condiciones favorables de temperatura dando origen a una larva ciliada de vida libre, el miracidio. Éste tiene una vida de alrededor de 24 hs, durante las cuales nada en cursos de agua, hasta alcanzar un caracol del género *Lymnaea*. Dependiendo de las condiciones ambientales, al cabo de 40 a 60 días, se liberan al medio ambiente cercarias que rápidamente se enquistan en las pasturas dando origen a la metacercaria (3).

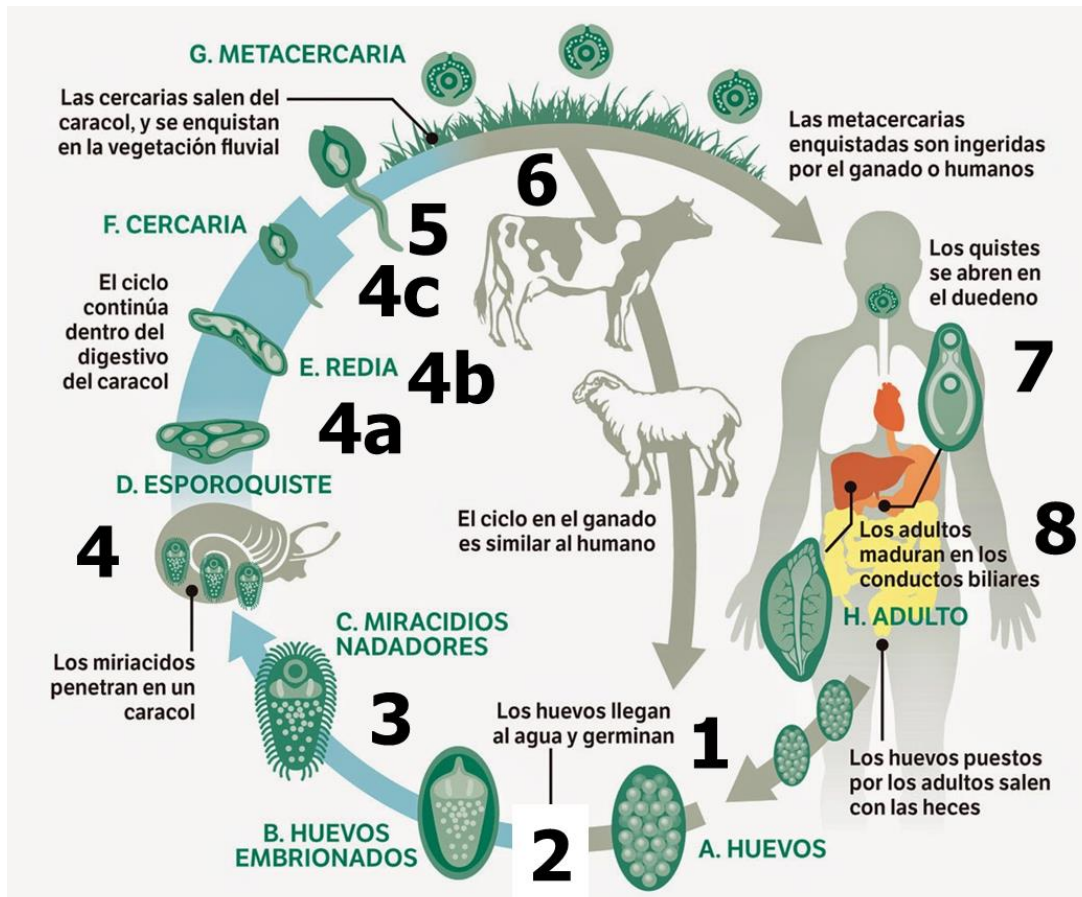


FIGURA 1. Ciclo biológico de *F. hepatica*. 1. Los huevos abandonan el hospedador definitivo con las heces. 2. De los huevos eclosionados emergen larvas ciliadas, los miracidios. 3. Los miracidios penetran en el hospedador intermediario, un caracol de agua dulce, *Lymnaea viatrix*. 4. En el interior del caracol, los miracidios se transforman en esporoquistes (4a) que se desarrollan en redias (4b) y éstas en cercarias (4c). 5. Las cercarias abandonan el caracol y, tras un periodo de vida libre en el agua, se enquistan sobre plantas acuáticas, transformándose en metacercarias. 6. Las metacercarias son ingeridas por el ganado o por humanos, hospedadores definitivos. El desenquistamiento se muestra en (7). 8. Las larvas juveniles atraviesan la pared intestinal, caen a peritoneo y luego migran por el parénquima hepático hasta alcanzar los conductos biliares, donde se originan los parásitos adultos, que producirán huevos eliminados por el hospedador en la materia fecal. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CCD). Créditos a José Antonio Penas [SCIENCE PHOTO LIBRARY](#)

Fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad cosmopolita que afecta la ganadería mundial y a su vez representa un importante desafío para la salud pública. El ganado vacuno y ovino son los huéspedes definitivos más afectados por *F. hepatica*, aunque búfalos, caballos, camellos, guanacos, ciervos y conejos pueden contraer también la infección. Las pérdidas económicas

mundiales debido a esta patología se estiman en unos 3000 millones anuales en el sector agropecuario, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha incluido en las lista de enfermedades tropicales desatendidas más importantes, con un número estimado de 17 millones de personas infectadas y 180 millones más en riesgo (4, 5). Estos números de casos podrían estar subestimados, ya que al no ser una enfermedad de reporte obligatorio, es frecuentemente subdiagnosticada y no existen registros sanitarios en numerosos países (6). El daño que produce el parásito en los animales se manifiesta por la producción reducida de carne y leche (7), disminución de la calidad de la lana (8), decomisos de hígado, infecciones secundarias por bacterias, abortos, reducción de fertilidad y en muchos casos en zonas de alta incidencia, la muerte de los animales por la manifestación aguda de la enfermedad.

En humanos, así como otras enfermedades parasitarias desatendidas, las infecciones son usualmente no letales con síntomas clínicos crónicos no patognomónicos, pero que tienen una injerencia en la economía de los países por su rol incapacitante en los trabajadores. Este hecho modifica al índice DALYs, (años de vida adaptados a la discapacidad), el que representa en términos ordinarios los años de vida saludable perdidos por la infección. La suma de los DALYs en la población puede considerarse como una medida de la brecha entre el estado de salud actual y una situación de salud ideal. Se estima que el número correspondiente de individuos incluidos en DALYs por fasciolosis a nivel mundial es de 197000, lo que coloca a la fasciolosis entre las principales enfermedades parasitarias debilitantes que ocasionan pérdidas en las economías en desarrollo en miles de millones de dólares cada año (9-11).

La fasciolosis, un problema sanitario desatendido

Si bien la definición de epidemiología está dada en el contexto de la salud humana, en el marco de las enfermedades parasitarias el término se aplica tanto a los animales como a humanos (12). La epidemiología de la fasciolosis depende de la presencia del caracol *Lymnaea*, condiciones idóneas de humedad y temperatura, factores topográficos y sistemas de pastoreo utilizados (13). En los últimos años se han detectado cambios en los comportamientos de los huéspedes intermediarios, como así también la aparición de otros géneros de caracoles resistentes a factores externos. Estos cambios permiten extender las áreas de incidencia de la enfermedad, demostrando la capacidad de adaptación del parásito a diferentes nichos ecológicos, influenciada directamente por el efecto del cambio climático (14-17).

Los mamíferos herbívoros que actúan como hospedadores definitivos de *F. hepática* presentan distinto grado de susceptibilidad y de resistencia al parásito (18, 19). Por

ejemplo, las ovejas son muy susceptibles y no presentan resistencia, mientras que el ganado bovino es menos susceptible y su resistencia frente al parásito es moderada. Esto determina que el desarrollo y los efectos de la infección sean diferentes en cada grupo, observándose por ejemplo mayor mortalidad en ovinos que en bovinos (20, 21). La epidemiología de *F. hepatica*, como la de otros agentes productores de zoonosis, presenta diferencias regionales. De manera que, el estudio de los aspectos sustanciales de su ciclo de transmisión, merece atención local a los efectos de establecer medidas racionales para su prevención y control. La fasciolosis ha sido reportada en los 5 continentes (22) y ningún país puede ser considerado libre de riesgo. Las áreas reconocidas de alta transmisión son las Altiplano de América del Sur, el valle del Nilo, la cuenca del mar Caspio, así como el este y sureste de Asia (23) (Figura 2.).



FIGURA 2. Distribución global de la infección por *Fasciola* en humanos, de acuerdo a lo informado por OMS. En rojo se presentan los países que reportaron casos de Fasciolosis en humanos. Adaptado de Ashrafi y col. 2014 (23)

En algunas áreas, la endemidad en humanos es casi del 100 por ciento. En regiones endémicas, los niños muy pequeños y las mujeres tienen más probabilidades de infectarse. Por otra parte, existe una alta incidencia de coinfección con otros parásitos, especialmente con *Echinococcus granulosus*.

En Argentina, el área de distribución de *F. hepatica* en animales es extensa, abarca desde el extremo norte del país al centro patagónico y de la región precordillerana hasta la costa del Atlántico. Predomina en las zonas bajas y anegadizas de la provincia de Buenos Aires, y en la región de influencia del río Paraná, incluyendo las provincias de Entre Ríos y Corrientes (70) y la precordillera de Neuquén, Río Negro y Chubut (71). Según informes de SENASA, la fasciolosis es endémica y es la cuarta enfermedad más importante para el ganado vacuno, con prevalencias superiores al 50% en bovinos y

60% en ovinos (14) (17) (21) (Oficina de estadística del SENASA, 2007). En los últimos 5 años, las mayores prevalencias de fasciolosis en frigoríficos se registraron en la Región Patagónica (6,8%), seguida de la Región Noreste (4,1%), Noroeste (2,2%), Cuyo (1,4%) y Pampeana (0,9%) (21) (Oficina de estadística del SENASA, 2007) (Figura 3) pero hasta el momento no hay información sobre la parasitosis en áreas naturales protegidas donde los animales pueden o no infectarse y desempeñar un papel local en la transmisión.

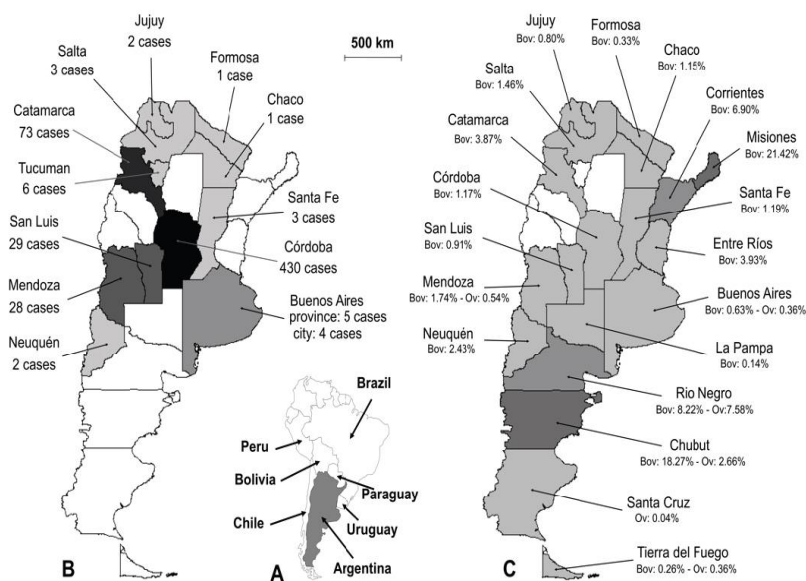


FIGURA 3. Distribución geográfica de la fasciolosis en Argentina. A) Localización de Argentina en Latinoamérica B) Infección por fasciolosis humana (número de casos), según las provincias; C) Distribución de la fasciolosis en el ganado bovino, incluidas las prevalencias provinciales. Datos proporcionados 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,(14).

En el caso de Córdoba, reportes del frigorífico Bustos Beltrán muestran que la enfermedad está ampliamente distribuida en todos los departamentos de la provincia en mayor o menor medida de acuerdo a los decomisos de vísceras infectadas. En zonas serranas de la provincia, las ovejas y cabras son de los animales más afectados por la enfermedad, ya sea por sus hábitos de alimentación, como por su capacidad de expandir la infección por contaminación de pasturas. Los pequeños productores de la región se muestran preocupados por la situación producto de las pérdidas ocasionadas en la industria ganadera ya sea por las muertes o los costos elevados de los antiparasitarios usados.

En Córdoba se han reportado 430 casos de personas infectadas en un periodo de seguimiento que comprende desde los años 1940-2010, producto de diagnósticos que se realizaron por análisis coproparasitológicos (288), intradermorreacción (63), cirugía (43), serología (13) y seis presentaciones erráticas (Figura 3). En general, las infecciones ocurren de enero a abril al aumentar las precipitaciones y las temperaturas, aunque se han analizado casos de brotes durante estancias vacacionales o de fines de semana largo con consumo de plantas acuáticas regionales sin el cuidado adecuado (14). Debido a la importancia clínica y patogenicidad de la fasciolosis, los pocos análisis de prevalencia obtenidos permiten concluir que la presencia de fasciolosis humana debe ser considerada como una patología infecciosa de gran importancia en la salud pública.

Fases de la infección

El daño producido la fasciolosis está directamente relacionado con la localización del parásito y la fase del ciclo evolutivo en el hospedador definitivo. La época del año en la cual ocurre la infección, la concentración de metacercarias tanto presentes en el ambiente como ingeridas, también son factores determinantes en el grado de compromiso y la letalidad de la infección. Durante la etapa invasiva las larvas migrantes juveniles atraviesan la pared del intestino y migran dentro de la cavidad peritoneal hasta la cápsula de Glisson, sin producir lesiones de importancia. En este período, en los hospedadores los signos clínicos y los hallazgos patológicos son poco frecuentes, excepto por pequeños focos hemorrágicos en la cavidad peritoneal, sin cambios en la pared intestinal (24). Este fenómeno estaría relacionado a la capacidad del parásito de inhibir la activación del sistema inmune y modular la función de células reclutadas en el peritoneo durante este trayecto. En el infiltrado peritoneal se pueden observar un gran número de células inmunes como linfocitos, macrófagos y eosinófilos (25).

La fasciolosis puede presentar tres formas clínicas diferentes: aguda, subaguda y crónica. El cuadro agudo se reporta cuando se consume un número considerable de metacercarias en un breve periodo de tiempo. El desenquistamiento masivo de numerosas larvas atravesando la cavidad abdominal al mismo tiempo, provoca hemorragias severas, anemias, ascitis, hepatitis fulminante que lleva a insuficiencia hepática aguda y muerte en los casos más graves. Este cuadro también depende de la edad del hospedador haciéndose letal en el caso de niños (26).

La fase crónica es la manifestación más frecuente de la enfermedad y se caracteriza por el consumo de metacercarias en pequeñas dosis en tiempos prolongados. El daño es una consecuencia de la migración de los gusanos por el hígado provocando ruptura de tejidos, formación de túneles, hemorragias y focos necróticos. Todo esto facilita su tránsito y alimentación. Luego, los parásitos ingresan a los conductos biliares, donde continúan su crecimiento y desarrollo, causando hiperplasia hepática.

También durante la etapa hepática puede desarrollarse la fasciolosis subaguda en la cual la ingesta elevada de metacercarias en un periodo de tiempo suficientemente largo para no provocar el proceso agudo o la forma clínica crónica (27)

Tratamiento

A pesar de que en la actualidad existen fármacos fasciolicidas, los mismos no evitan el daño hepático producido y los animales no desarrollan inmunidad protectora, por lo que fácilmente quedan expuestos a una futura reinfección (28). Dentro de los medicamentos antihelmínticos recomendables, el triclabendazol es el más importante puesto que puede eliminar el parásito en cualquier etapa del ciclo, además que la OMS lo ha declarado como el único recomendable para el tratamiento de fasciolosis en humanos (29, 30).

El triclabendazol es un derivado de los benzamidazoles, y se ha propuesto que produce la interrupción de procesos vitales como la alimentación o digestión y la ruptura de la estructura tegumental. La dosis recomendada es de 10 mg/kg dos veces, obteniendo resultados cercanos al 90-100% de eficiencia. Este régimen es llevado a cabo todos los años, en algunos casos dos veces durante el cambio de temporada aun cuando no funciona como preventivo haciendo el tratamiento costoso y peligroso (31).

En los últimos años se han reportado casos de resistencia en animales al triclabendazol en distintos países entre los que se destacan Australia, Irlanda, Brasil y Argentina provocando la disminución de su eficacia. En humanos los casos de resistencia se han centrado en zonas endémicas con contactos directos con ganado, prácticas inadecuadas de riego y consumos altos de vegetales no cocinados como Bolivia, Perú, Chile, Turquía y áreas rurales de Holanda (31).

En este contexto, y frente al uso indiscriminado e inadecuado de la droga por parte de los productores, el desarrollo de una estrategia preventiva de inmunoprofilaxis parece ser el único camino hacia el éxito en la batalla contra la fasciolosis (4). Sin embargo, a

lo largo de los años se ha visto dificultado puesto que, tanto en animales como humanos, el parásito establece una desregulación del sistema inmune del hospedador para facilitar su subsistencia. De hecho, hasta la fecha existen muy pocas vacunas disponibles a nivel comercial contra los principales helmintos parásitos y en particular contra *F. hepática* (32).

Mecanismos efectores y de evasión del sistema inmune en la infección por *Fasciola hepatica*

Los helmintos son macropatógenos, una condición que impide que sean ingeridos por las células fagocíticas. Durante la infección por estos parásitos, los productos secretados juegan un papel fundamental como moduladores de la activación de células que participan en la inducción de respuestas inmunes innatas y adaptativas. La prevalencia de infecciones producidas por helmintos se ha visto favorecida por la co-evolución de los parásitos junto al sistema inmune de los vertebrados, desarrollando estrategias como la liberación de moléculas inmunomoduladoras, modificando su tamaño o la composición del tegumento, para evadir el ataque por parte del hospedero (33, 34).

Durante la infección con *F. hepatica*, el sistema inmune innato del huésped desempeña un papel importante tanto para la defensa como para estimular la respuesta inmune adaptativa (35). Las respuestas innatas provocadas por la infección incluyen eosinofilia marcada y una rápida activación de macrófagos en el intestino y peritoneos del huésped a medida que las larvas juveniles viajan hacia el hígado (36, 37). La activación de estas células promueve la inmunidad humoral (respuesta adaptativa) mediante la diferenciación de células T-helper (Th2) que producen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, lo que resulta en la secreción de anticuerpos IgG1, IgE e IgA. Por otro lado, se suprime la diferenciación de las células Th1 y Th17 que promueven respuestas inmunitarias proinflamatorias (Figura 4) (33, 38). Las respuestas inmunes a los patógenos mantienen un equilibrio de expresión Th1 / Th2 / Th17 para hacer frente a los desafíos inmunes variables (39).

El tegumento del parásito cambia su conformación a lo largo del trayecto migratorio del parásito hasta su llegada al hígado. El mismo evoluciona desde una larva migrante a gusano adulto. Este recambio permanente de la capa exterior, glicocalix, permite la evasión del sistema inmune y se ha reportado que funciona a una velocidad mayor que

las de otros helmintos, incluso aún más cuando los anticuerpos específicos logran unirse a la superficie e intentan desarrollar su fase efectora (40, 41). Estos datos nos permiten teorizar que cuanto más temprana sea la expulsión del parásito, el sistema inmune esta menos proclive a ser inhibido. Los puntos críticos para lograr inhibir el ciclo del parásito serían el intestino, el peritoneo y la cápsula del hígado por lo que aquí debería actuar cualquier tipo de inmunopprofilaxis utilizada (37, 42, 43).

La liberación de productos excretorios-secretorios en conjunto con la expresión de antígenos tegumentales del parásito y alarminas derivadas del huésped, producidas por el daño en la pared intestinal promueve el reclutamiento de macrófagos. Estas células son activadas alternativamente expresando elevados niveles de actividad de arginasa a expensas de la disminución de la respuesta de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), permitiendo la diferenciación a células Th2 y células T regulatorias. Otro efecto inducido por este parásito, es el reclutamiento de mastocitos a la cavidad peritoneal que permitirán disminuir la reacción a ligandos de bacterias provenientes del lumen intestinal e inhibiendo la respuesta Th1 inducida por la traslocación bacteriana (44-46).

Otra población de células inmunes más comprometidas cuando se produce la infección con *F. hepatica* son las células dendríticas (CDs). Estudios han reportado que las CDs tratadas con antígenos de *F. hepatica*, carecen de algunos marcadores de maduración clásicos, como pueden ser las moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, MHCII, CD40) y/o una producción disminuida de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF α) (25, 47) (Figura 4). También ha sido comprobado que la maduración de CDs se ve afectada por los antígenos de este parásito, impidiendo que los agonistas de Receptores tipo Toll (TLR) puedan realizar la activación. En cuanto al fenotipo se ha visto que se genera un nuevo tipo de CDs denominada “semi-maduro” que se lo asocia con respuestas tolerogénicas (48). Por lo tanto podemos decir que los antígenos provenientes de *F. hepática* pueden modular la respuesta inmune a través de la manipulación de la actividad y función de las CDs, promoviendo la inducción de respuestas ineficaces en la eliminación del parásito (49, 50).

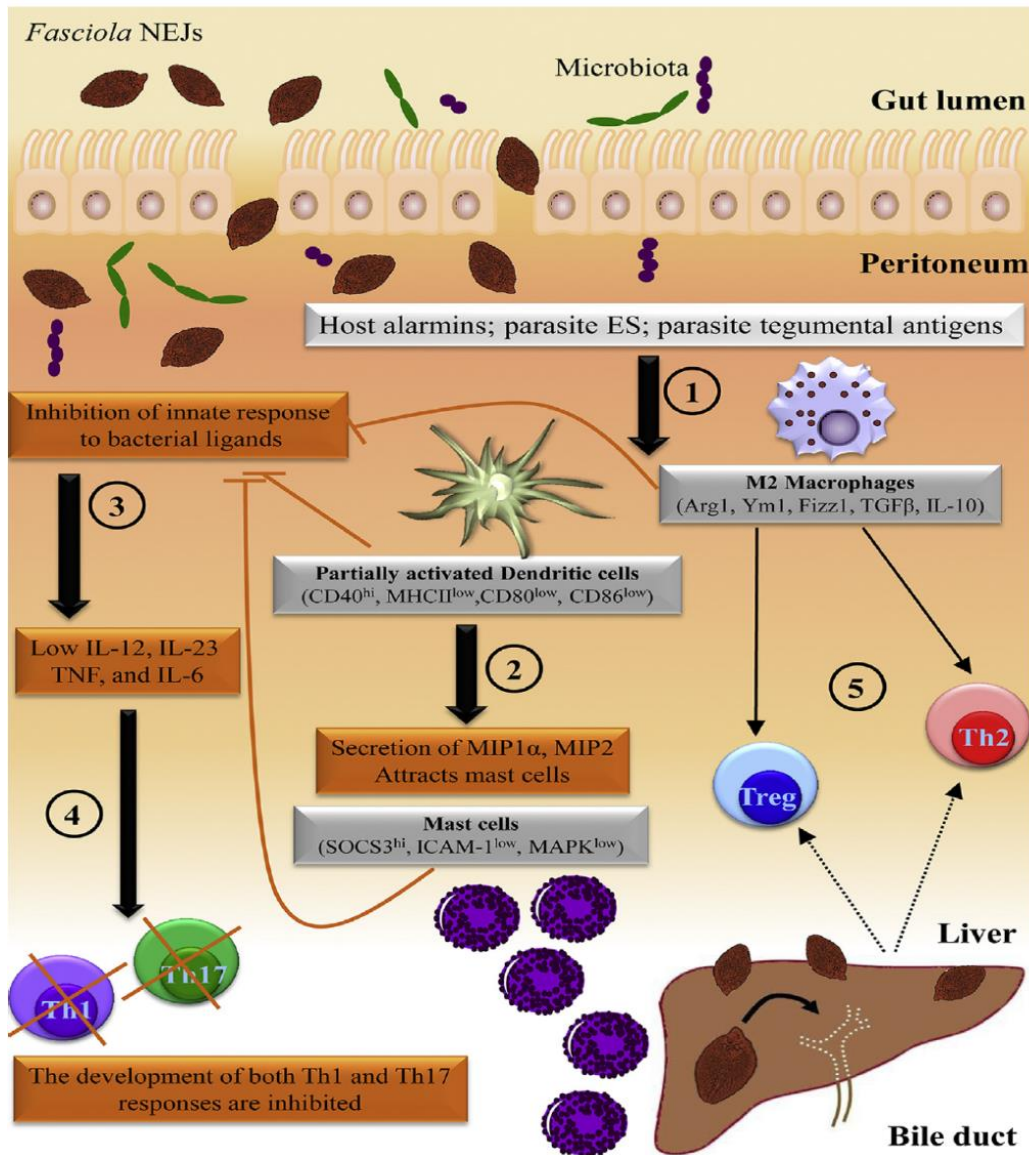


FIGURA 4. Modelo de respuesta inmune frente a la infección crónica por *F. hepatica*. 1. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) liberados por *F. hepatica* inducen macrófagos M2 (activados alternativamente). 2. Los macrófagos activados alternativamente atraen mastocitos, 3. Estas células (macrófagos, CDs y mastocitos) inhiben las respuestas innatas a antígenos de las bacterias que infectan al huésped mientras los parásitos atraviesan el intestino del huésped. 4. La inhibición de las respuestas innatas produce niveles bajos de IL-12, IL-23, TNF e IL-6. 5. Los niveles bajos de estas citoquinas impiden el desarrollo de las respuestas Th1 y Th17. Adaptado de Dalton y col. 2013 (33).

Interacción de *F. hepatica* y sus huéspedes

Múltiples especies de mamíferos están expuestas a contraer la infección con *F. hepatica*, y más allá de que los síntomas se mantengan por la capacidad del parásito de consumir sangre y provocar anemia o hemorragias, lo fundamental consiste en entender las diferencias que se encuentran en término del grado de susceptibilidad o resistencia por las distintas especies de huéspedes. El sistema inmune de cada animal reacciona de manera distinta frente a la infección y es un proceso dinámico donde entran en juego distintos mecanismos efectores.

Los bovinos desarrollan resistencia y pueden eliminar la infección en el transcurso de meses de producida. El rechazo se da en los casos de reinfección produciendo una reducción de la carga parasitaria (51, 52).

En el caso del ganado ovino son muy susceptibles a la fasciolosis, no desarrollan resistencia frente a un nuevo contacto con la enfermedad, por lo tanto, terminan falleciendo frente a repetidas infecciones. Se prevé que la generación de fibrosis en el hígado no permite el ingreso del gusano en una próxima infección lo que valida la menor injerencia en la salud del animal en una reinfección (19, 42, 53). Los conejos y ratones presentan un desarrollo de la enfermedad similar entre estas especies por lo que su utilización como modelo experimental se basa en su capacidad de emular la infección, el bajo costo y su facilidad de manejo en las habituales instalaciones de cuidado (54, 55).

En humanos el desarrollo en general de la enfermedad es crónico con niveles altos de morbilidad y presencia de gusanos en los canalículos biliares por largos periodos, pero sin un gran número de casos de mortalidad (6, 56)

El camino hacia el desarrollo de una vacuna

Hasta la fecha no existe una vacuna comercial disponible para la prevención de la fasciolosis. Estudios en la generación de una vacuna han obtenido resultados diversos con un porcentaje de protección promedio de 50%, que tuvieron como variables entre si los modelos y los inmunógenos utilizados. Los primeros intentos fueron utilizando metacercarias irradiadas, productos excretores secretores (PES) de *F. hepatica* o extractos somáticos del parásito. Aunque en estos primeros experimentos los niveles de

efectividad fueron más bajos de lo esperado, los resultados con cada una de las propuestas fueron aportando información tanto al entendimiento de la infección como el desarrollo de una nueva vacuna. En bovinos se logró probar que era posible activar el sistema inmune mediante la inmunización y lograr una inmunidad parcial. En el caso de ovinos, la vacunación tuvo dificultades para generar una respuesta inmune protectora en el tiempo y demostró la susceptibilidad natural que presenta el huésped (4, 32, 57).

En la última década se ha avanzado rápidamente en la tecnología "omics" permitiendo la generación de una amplia base de datos del genoma de distintos parásitos, entre ellos de *F. hepatica*. La implementación de estas nuevas estrategias ha permitido la aplicación de novedosos procedimientos como la utilización de herramientas bioinformáticas que predicen epítopes específicos para células B y T o vacunas comestibles, las cuales permiten por ejemplo la inmunización oral con antígenos recombinantes expresados en tejidos vegetales. Se puede sumar a ellos las vacunas de ADN, que debido a su baja inmunogenicidad en animales grandes no se han demostrado los niveles de protección necesarios para considerar un avance de fase en la investigación (58-61).

Los intentos fallidos fueron haciendo emerger la idea de la necesidad de nuevos blancos moleculares definidos donde centrarse para dirigir la respuesta del hospedero debido a la complejidad del parásito y los modelos donde llevarlo a cabo.

Proteínas recombinantes usadas como antígenos vacunales anti *F. hepatica*

Diferentes proteínas nativas presentes en los PES o estructuras constituyentes de *F. hepatica* tales como el tegumento, o antígenos somáticos han sido usadas en el desarrollo de vacunas contra este parásito. Una de las primeras proteínas elegidas por el perfil inmunoprotector inducido en otras helmintiasis, es el caso de la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP) (54), la cual logró diferentes niveles de protección según el modelo utilizado. Otra opción en el mismo sentido fue la utilización de Glutación S-transferasa (GST), la cual en su forma nativa logró niveles interesantes de protección cercanos al 70% en ensayos en bovinos y ovinos (10, 34, 62). Por otro lado, los recombinantes de GST no pudieron reproducir lo encontrado en la forma nativa.

Las proteasas secretadas por el parásito se transformaron en un blanco interesante, ya que su función es fundamental por ser efectores moleculares principales tanto en la infección migración y establecimiento del parásito, como en la evasión de los mecanismos de defensa, sin dejar de lado su papel esencial en la obtención de nutrientes (4, 63-67).

De acuerdo al mecanismo catalítico y a los residuos fundamentales en la reacción de hidrólisis, las proteasas se clasifican en varios grupos: serín proteasas, cisteín proteasas, aspártil proteasas, metaloproteasas, treonín proteasas y glutamil proteasas (67). De estos grupos se ha visto que las cisteín proteasas se expresan en todos los estadios de vida del parásito y representan el grupo predominante. A través de un análisis proteómico de PES de gusanos adultos, se observa que constituye uno de los componentes principales de este estadio de desarrollo y se caracterizó como Catepsina L1 y L2 (FhCL1 y FhCL2, respectivamente), proteinasas lisosomales de vertebrados, a la fracción mayor.

La utilización de la combinación de estas fracciones homogéneas en modelos ovinos indujo un 60% de protección, pero fue menos eficiente cuando fueron utilizados por separado (34% FhCL1 Y 33% FhCL2). Teniendo en cuenta que el grado de protección generado por vacunas que utilizan proteínas provenientes del parásito adulto pueden inducir porcentajes variables y no son reproducibles entre distintos modelos animales, se consideró que una proteína altamente expresada en la fase juvenil sería una molécula blanco más interesante en el desarrollo de una vacuna por la importancia de producir una respuesta inmune protectora antes que el parásito establezca los mecanismos de evasión y modifique su conformación estructural (61, 68-70).

Durante el desenquistamiento, el 80% de las cistein-proteasas se correspondieron con Catepsina L3 (FhCL3) y Catepsina B (FhCB), siendo las encargadas de favorecer el traspaso a través del intestino y la penetración de la capsula del hígado. La estrategia de controlar estos puntos para permitir la expulsión del parásito fue testeada en ratas encontrando un 63% de protección mediante el uso de FhCL3 solo y un 53% en conjunto con FhCB (63, 69, 71).

Aunque los porcentajes de protección en el caso de vacunas experimentales desarrolladas contra proteasas no son lo suficientemente altos como para considerarlo comercialmente, la importancia de estas enzimas en el desarrollo de la enfermedad es innegable puesto que la exposición a recombinantes es suficiente para generar una respuesta inmune parcialmente preventiva contra el parásito. Un camino interesante a recorrer es el estudio de los inhibidores de proteasas, ya que estos son los encargados de

controlar la actividad proteolítica de enzimas, fundamentales para la supervivencia del parásito.

Uso de la molécula de tipo Kunitz (FhKTM) como una herramienta novedosa para combatir la fasciolosis

Las serina peptidasas están involucradas en muchos procesos fisiológicos que incluyen digestión, homeostasis y la cascada del complemento en distintos organismos de la naturaleza. Los parásitos tienen la capacidad de regular tanto sus propias proteasas o las del huésped para su propio beneficio, estos procesos llegan a ser exitosos por la utilización de varios inhibidores entre los cuales se destacan las proteínas de la familia tipo kunitz. Los miembros de la familia tipo kunitz estudiadas hasta el momento actúan sobre las serin-proteasas, aunque se ha visto que también pueden tener la capacidad de inhibir aspartato y cistein-proteasas. Inhibidores tipo kunitz pueden actuar bloqueando los canales catiónicos, modulando la respuesta inmune y permitiendo el establecimiento del parásito. Estudios proteómicos han demostrado que los inhibidores de proteasas son la segunda proteína más expresada en los productos PES en adultos y en larva migrante juvenil (NEJ) de *F. hepatica* con abundante representación de FhKTM y serpinas (Figura 5). El primer lugar lo ocupan las proteasas en especial las cistein proteasas, de aquí la importancia del descubrimiento de la capacidad de FhKTM para inhibir Catepsinas tipo L aunque no presente actividad contra otra importante enzima de la familia como Catepsina B. Este es el primer miembro de la familia tipo kunitz que muestra un accionar exclusivo para inhibir cistein-proteasas. (72, 73)

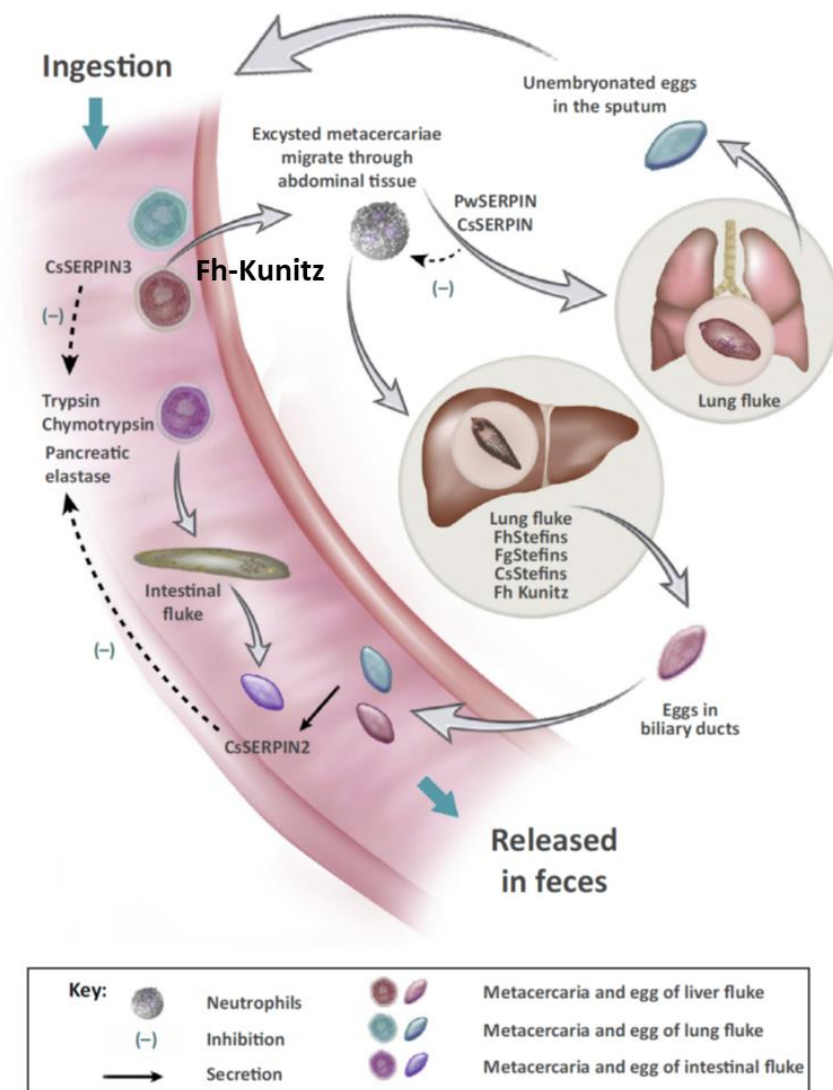


FIGURA 5. Inhibidores de proteasas producidos por trematodes transmitidos por alimentos en respuesta a proteasas en el huésped. Tras la ingestión por un huésped mamífero, las metacercarias de los trematodes transmitidos por los alimentos están expuestas a una gama de proteasas del huésped, incluyendo tripsina, quimotripsina y elastasa pancreática (PE). Las metacercarias desenquistadas secretan inhibidores de proteasas (p. Ej. PwSERPIN, CsSERPIN, Fh Kunitz) para protegerse y favorecer la penetración de tejidos como así también la migración a los pulmones (por ejemplo, *Paragonimus westermani*) o al hígado (p. ej., *F. hepatica*, *Clonorchis sinensis*), de esta forma pueden sobrevivir al ataque células inmunes como los neutrófilos, para convertirse en gusanos adultos. Adaptado Ranasinghe y col. 2017 (72).

Las Catepsinas L, como así también B, juegan un rol fundamental en la migración de NEJ para llegar al hígado, ya sea para atravesar el parénquima intestinal como para evadir el sistema inmune. Estas enzimas se encargan del mantenimiento y prevalencia del parásito en el huésped por lo tanto FhKTM puede participar regulando las proteasas secretadas tanto por el parásito como por el huésped (74).

El descubrimiento de FhKTM se produjo mediante el aislamiento de proteínas de un extracto completo del parásito. La porción aislada se correspondía con 58 aminoácidos que presentaban una leve o nula actividad de inhibición contra proteasas como quimitripsina, kalitreína, urokinasa, tripsina y otras serine proteasas participantes de la cascada de coagulación. Además mediante inmunofluorescencia se logró establecer su expresión en el intestino, el tejido parenquimal y el tegumento del gusano adulto (Figura 6) (73, 75). Los conocimientos de FhKTM acerca de la función de inhibir de forma exclusiva la cistein-proteasa Catepsina L y que su expresión se encuentra elevada en las primeras horas desde el ingreso de la metacercaria, permitieron suponer un rol en la supervivencia de las NEJ (76). Estudios previos utilizando un anticuerpo monoclonal MM3 específico para Catepsina L que también podía aislar en la porción reconocida a FhKTM permiten suponer que ambas proteínas formaban parte de un complejo molecular que es liberado por el parásito en el cual FhKTM protege tanto a la Catepsina del ambiente como al parásito de su propia proteasa (77).

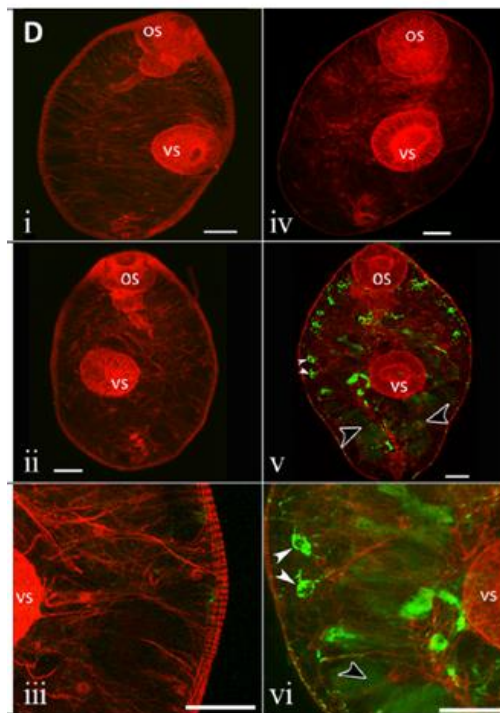


FIGURA 6. Inmunolocalización de FhKTM en NEJ mediante microscopía láser de barrido confocal. Expresión en el parénquima (flechas blancas) e intestino (flechas negras) de FhKTM, marcado con anticuerpos policlonales anti-FhKTM producidos en conejo, seguidos del anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a las primeras 24 hs desde el desenquistamiento. Todas las muestras se tiñeron con isotiocianato de faloidina-tetrametilrodamina (TRITC) para teñir el tejido muscular (fluorescencia roja) y proporcionar estructura. OS, succionador oral; VS, succionador ventral. Adaptado de Smith y col.2016 (76).

La utilización de inhibidores de proteasas ha sido estudiada previamente tanto para la generación de vacunas como potencial adyuvante basándose en su actividad enzimática . Durante años luego de su aislamiento en productos excretorios-secretorios, tegumento y huevos de *Schistosoma mansoni*, el inhibidor de proteasas tipo Kunitz de *S. mansoni* (*SmKI-1*), fue utilizado como antígeno en una formulación con resultados prometedores, logrando desarrollar una nueva estrategia efectiva que podría erradicar en conjunto con las drogas antiparasitarias la infección por Schistosomiasis . El potencial de las proteínas que contiene dominios tipo Kunitz para generar vacunas es relevante por su capacidad de mantener las estructuras entre especies, aunque puedan evolucionar separadamente y tener una nueva especificidad. Así la utilización de péptidos sintéticos cortos conteniendo epitopes específicos provenientes de dominios tipo Kunitz Smp-

147730 en el caso de *S. mansoni* produjo una protección parcial en ratones Balb/c infectados, con reducción de gusanos, lesiones y huevos atrapados en el hígado (78-80).

Otra enfermedad en que se intentó desarrollar una vacuna fue *Ancylostoma ceylanicum* utilizando una proteína tipo Kunitz, AceKI, que produjo un retraso en el desarrollo del gusano en hamsters mientras que la anemia se mantuvo (81, 82)

En base a los antecedentes planteados FhKTM como inhibidor de serin proteasas tiene la capacidad de ser un objetivo valido para estudiar como antígeno en el desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica*.

Las nuevas estrategias vacunales y la necesidad del desarrollo de un adyuvante

La elección de un inmunógeno dirigido a etapas de vida específicas del parásito y la elección del uso de adyuvantes para preparar la vacuna son etapas cruciales para producir una vacuna eficaz para prevenir la fasciolosis. Una vez definido el antígeno a utilizar, debemos tener en cuenta que la utilización de vacunas formadas por subunidades necesita tanto de ayuda en la reactogenicidad como en la inmunogenicidad. Por eso los adyuvantes se convierten en piezas claves que permiten potenciar una respuesta inmune fuerte, específica y duradera, a su vez también pueden cumplir el rol de sistema de transporte, presentación, modulación, estabilización y protección del inmunógeno.

Dentro de las cualidades que tiene que presentar un buen adyuvante se destaca también la seguridad. Este compuesto no debe dar lugar a reacciones adversas o permitir la generación de una respuesta autoinmune. Para esto se debe seguir la selección y optimización de las sustancias biológicas para el registro y aprobación de nuevos adyuvantes para uso humano o animal (83). Dentro de las sustancias que están en periodo de estudio, se encuentra los péptidos de cadenas cortas conformados por oligodeoxinucleótidos no metilados sintéticos con motivos CpG (CpG-ODN). Los cuales emulan el ADN liberado por bacterias y tienen la capacidad de activar el sistema inmune a través de la interacción con el receptor intracitoplasmático tipo Toll 9 (TLR9) permitiendo al huésped mejorar la capacidad de eliminar al patógeno (84, 85). Los TLR9 son expresados por múltiples células inmunes como las células B y CD que luego del contacto con CpG-ODN pueden generar mejoras en la respuesta de anticuerpos,

desarrollar una respuesta inmune de tipo Th1 y en algunos casos se comprobó la presencia de células T CD8+ citotóxicos (86, 87).

Estos datos han sido comprobados en estudios animales y ensayos clínicos en fases I-III. Sin embargo, CpG-ODN presenta algunas limitaciones como corta vida media, limitada biodistribución y farmacocinética, pobre especificidad y captación celular. Estas desventajas llevaron a desarrollar un vehículo que pudiera explotar el potencial de CpG-ODN como adyuvante (88, 89).

En este sentido, se desarrolló una estructura nanoparticulada conformada por 6-*o*-palmitato de ascorbilo (ASC16), la cual se autoensambla mediante un proceso por el cual se forma una estructura en fase cristal líquida que puede contener el CpG-ODN soluble dentro y modular su liberación. La estructura se obtiene luego de calentar una solución que contiene ASC16 hasta una temperatura crítica micelar y luego del enfriando, se forma una dispersión tipo gel (Coa-ASC16) que contiene dentro una fase líquida. Este fenómeno está dado por las porciones hidrofílicas (cadena alkyl) y grupos polares (ácido ascórbico), que se distribuyen de forma que se produzca una estructura lamelar tridimensional (Figura 7) (90). Las pruebas hasta el momento utilizando un modelo de OVA como antígeno y Coa-ASC16 como adyuvante ha dado como resultado un aumento de los niveles de anticuerpos específicos, una respuesta celular de tipo Th1-Th17 que se mantiene en el tiempo y sin efectos tóxicos adversos (91, 92). Los reportes de respuestas exitosas contra *F. hepatica* se caracterizan por una respuesta de anticuerpos mixta IgG1-IgG2 y los perfiles de respuesta Th1-Th17 (33, 57, 93-95). Por ello, es interesante pensar que además de proveernos de un medio de transporte seguro con un eficiente sistema de dosificación para el antígeno, nos ofrece un perfil de respuesta inmune favorable para la expulsión del parásito

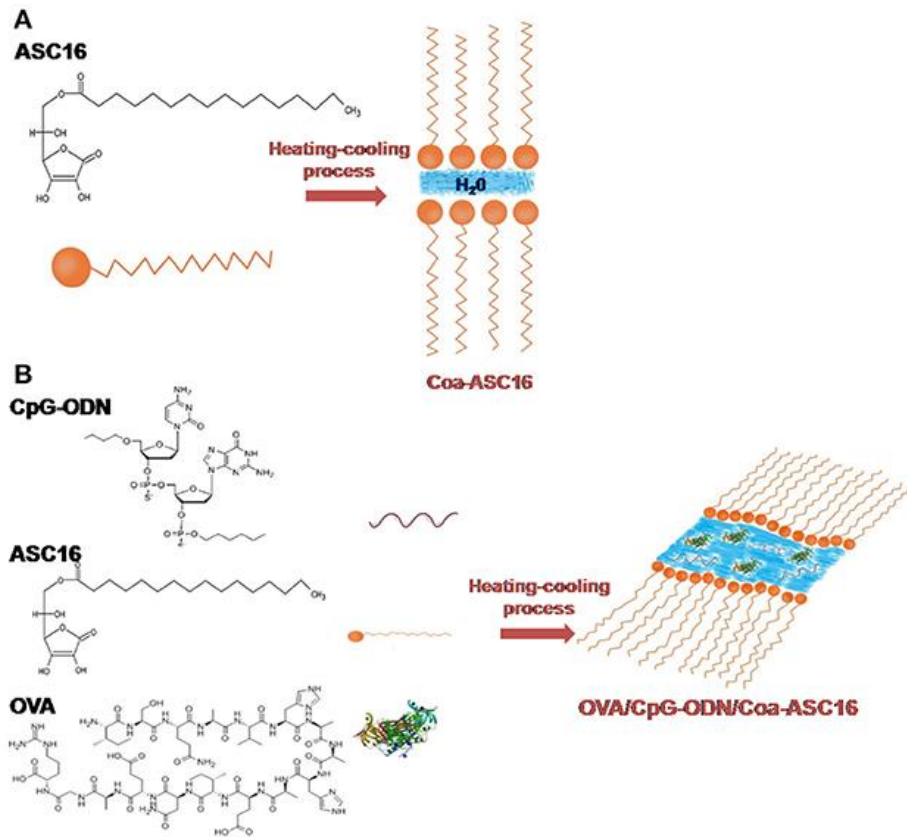


FIGURA 7. La formulación de OVA y CpG-ODN con la nanoestructura. (A) Representación esquemática de Coa-ASC16 e imagen fotográfica. (B) Esquema representación de OVA / CpG-ODN / Coa-ASC16. Adaptado de Chiodetti y col. (91).

En función de estos antecedentes la formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 aparece como un candidato capaz de generar importantes niveles de protección en un modelo murino de fasciolosis y la colocan como una posible vacuna con un perfil de inmunoprotección elevado en los huéspedes naturales en próximas experiencias. En consecuencia, el uso del péptido o proteína FhKTM aparece como una perspectiva interesante, no sólo en el plano del desarrollo de inmunógenos contra helmintos, sino además con vistas al estudio de los mecanismos de adaptación que el parásito pone en práctica en la interface frente al huésped

Capítulo 2: OBJETIVOS

Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo de tesis es investigar la capacidad una proteína del parásito helminto *Fasciola hepatica*, el inhibidor de proteasas de tipo Kunitz (FhKTM), en el desarrollo de una vacuna que promueva la inducción de una respuesta inmune efectiva en contra de la infección con el parásito.

Los resultados que se obtengan de este estudio aportarán datos sobre la optimización de un sistema vacunal para prevenir la infección con un parásito endémico en nuestra región, y permitirá diseñar vacunas más eficientes con potencial para ser utilizadas en el ganado

Objetivos específicos

1. Determinar la eficacia del tratamiento con el péptido FhKTM en combinación con el adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir protección en ratones susceptibles a la infección con *F. hepatica*.

2. Investigar la respuesta inmune generada por los distintos tratamientos, determinando:

A. La respuesta inmune celular, estudiando la generación de los perfiles Th1, Th2 y Th17 en los ratones inmunizados.

B. La respuesta inmune humoral, investigando la producción de los anticuerpos IgG1, IgG2a, IgA.

C. El estado de activación de las células peritoneales responsables de la inducción de la respuesta inmune

3. Establecer el posible mecanismo involucrado en la respuesta inmune generada por la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16

Hipótesis

Por todo lo expuesto anteriormente es que hipotetizamos que la generación de una vacuna con el péptido FhKTM formulada con el adyuvante FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, podría resultar en la potenciación de la respuesta inmune innata con la activación de células como neutrófilos o macrófagos (mediado por la respuesta Th17), o la respuesta Th1 que pudieran controlar al parásito en la fase de migración antes de su instalación en hígado. Adicionalmente, por tener la proteína propuesta, una participación en procesos vitales para el parásito y haber demostrado ser capaces de generar anticuerpos, la vacunación de animales con FhKTM provocaría un título elevado de anticuerpos anti-FhKTM que sería perjudicial para el parásito en las etapas migratorias tempranas.

Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ratones hembras BALB/c de entre 8-10 semanas fueron adquiridos en el Centro de Medicina Comparada, Universidad de Veterinaria, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa fe, 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) (881).

Antígeno - adyuvante

El péptido FhKTM fue sintetizado por ONTORES Biotechnologies (Zhejiang, China) a partir de la secuencia provista por nuestro laboratorio correspondiente a lo reportado por Bozas et. al. (75). La identidad y la pureza del péptido se analizaron mediante cromatografía líquida analítica de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF, alcanzando una pureza > 95%. El CpG-ODN fue proporcionado por Operon Technologies, Alameda, CA, EE. UU. El Coa-ASC16 se preparó mezclando con palmitato de 6-O-ascorbilo al 2% (p / v) y al 5% de dextrosa en un tubo eppendorf según un diseño y evaluación de la capacidad adyuvante. La solución se llevó a la temperatura crítica micelar (72°C) y luego se homogeneizó en un baño ultrasónico durante 10 minutos y finalmente se dejó alcanzar la temperatura ambiente. La consistencia obtenida fue semisólida. FhKTM y CpG-ODN se incorporaron en Coa-ASC16 siguiendo los pasos descritos como se describe Sánchez Vallecillo MF y col. (90).

Ensayos de inmunización

Los ratones BALB/c se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (n = 4-5) como se describe en la figura 8

GRUPOS	TRATAMIENTOS
SIN TRATAMIENTO	No Inmunizado y No Infectados
INFECTADO	No Inmunizado e Infectados
CpG-ODN/Coa-ASC16	Inmunizado con Adyuvante e Infectados
FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16	Inmunizado con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 e Infectados

FIGURA 8. Tabla de distribución de los ratones en los grupos correspondientes al modelo experimental diseñado

Las inmunizaciones se realizaron 3 veces a intervalos de 1 semana durante 2 semanas. Cada ratón se inmunizó con una dosis completa (250 µl) distribuida equitativamente en cinco sitios: cola, espalda, región del cuello y en ambas extremidades posteriores (25 µl / sitio). El CpG-ODN se administró a 75 µg/ratón/dosis. La dosis inyectada de FhKTM fue de 10 µg/ratón/dosis. Una semana después de la última inmunización, todos los grupos fueron infectados por vía oral con 6 metacercarias de *F. hepatica* (Laboratorio Dr. Sanabria, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina). Los ratones fueron eutanizados a tres días diferentes 0, 4 y 24 después de la infección de acuerdo al esquema experimental (Figura 9).

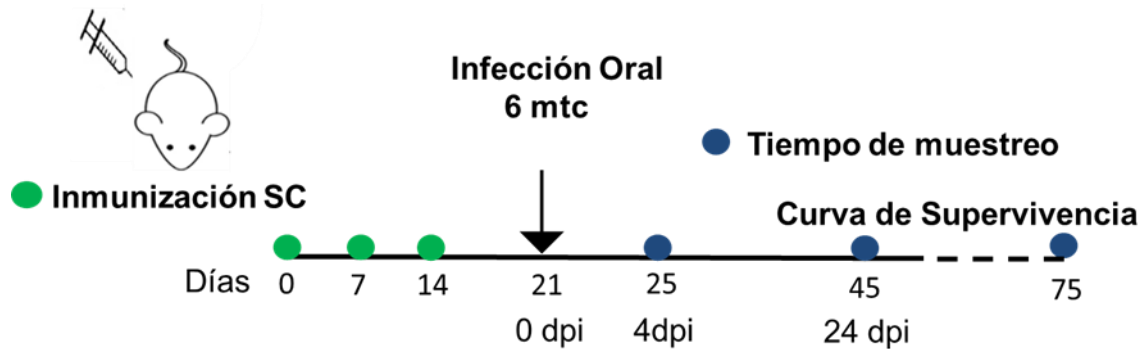


FIGURA 9. Diseño experimental en ratones BALB/c para la administración de la vacuna FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16

Evaluación del daño hepático

El daño hepático de los ratones se evaluó mediante tres formas diferentes. La actividad alanin transaminasa y aspartato transaminasa fue determinada en sueros de animales infectados y no infectados utilizando un kit comercial por BIOCON (96). Las lesiones macroscópicas se puntuaron (rango de 0 a 5) según el método descrito por Changklungmoa N y col. teniendo en cuenta la extensión del daño en la superficie de los hígados (97). Por otro lado, el examen histopatológico se realizó después de que los hígados se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% durante 48 h, seguido de inclusión en parafina. Secciones de 5 µm se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Las muestras histológicas se puntuaron de acuerdo con lo descrito por Chien-Chang Ch y col. con modificaciones (98). Las lesiones se puntuaron entre 0 y 9 en función de los siguientes hallazgos: infiltración de células inflamatorias (rango de puntuación, 0 a

3), junto con la evaluación del daño del tejido hepático (necrosis, focos hemorrágicos, fibrosis, rango de puntuación de 0 a 3), presencia de túneles y gusanos (rango de puntuación, 0 a 3), con 0 como normal y 9 como el que presenta el daño más severo.

Supervivencia

La curva de supervivencia se realizó a través del ensayo en los distintos grupos, en donde se observó la mortalidad y la supervivencia de los ratones en diferentes grupos hasta la finalización del experimento y se determinó la curva de supervivencia en cada uno de los grupos en estudio hasta el día 75 después de la infección utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software).

Insumos y reactivos

Se utilizaron anticuerpos comerciales en la técnica de ensayo inmuno-enzimático (ELISA) sándwich para la detección de IL-6 (Catálogo Nro. 555240, Lote: 2324756), IL-10 (Catálogo Nro. 555252, Lote: 2324786), 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), IL-17 PE, (Catálogo Nro., Lote, 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), anti CD11b APC (Catálogo Nro., Lote: , dilución: 1/500), anti F4/80 PE (Catálogo Nro.12480182, Lote: 87256, dilución: 1/500), anti CD170 (Siglec-f) APC (Catálogo Nro.50170282, Lote: 6272056, dilución: 1/500) y anti CD8 APC-Cy7 (Catálogo Nro. 561093, Lote: 6374020, dilución: 1/400) fueron obtenidos en Becton Dickinson (San Diego, California, 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 fueron establecidas en nuestro laboratorio. El lipopolisacárido (LPS; *E. coli* cepa 0111:84, Catálogo Nro. L4005) fue obtenido Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA)

La respuesta humoral desarrollada por los animales inmunizados se analizó por técnica de ELISA según el protocolo que se describe a continuación. Las placas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se sensibilizaron con 100 μ L de una solución del péptido FhKTM a una concentración final de 10 μ g/mL en PBS durante 18 h. a 4° C.

Materiales y Métodos

Las placas se lavaron 3 veces (10 min cada vez) con PBS-Tween. A continuación, se incubó con suero fetal bovino (SFB) en PBS al 5% (200 μ L/pocillo) para bloquear los posibles sitios libres sobre el poliestireno incubando durante 1 h a 37° C. Las placas se lavaron 3 veces (10 min cada vez) con PBS-Tween. Las muestras diluidas en forma seriada en PBS-SFB 2% se incubaron 1 h a 37° C en cámara húmeda (100 μ L/pocillo). Las placas se lavaron como se describió anteriormente y se agregó una solución en PBS-SFB 2% del segundo anticuerpo (anti-IgG1 o anti-IgG2 o anti-IgA) conjugado a peroxidasa (Invitrogen) (100 μ L/pocillo). Se incubó 1h a 37° C en cámara húmeda y se repitió la etapa de lavado. El agregado de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno (100 μ L/pocillo), evidenció la reacción antígeno anticuerpo. El desarrollo de color se detuvo a los 15 min. agregando HCl 10% (50 μ L/pocillo) y se midió la absorbancia a 492 nm densidad óptica (D.O.). El título se determinó por dilución en serie del suero y el corte se determinó por el doble del valor de la media del blanco.

En el caso de la detección de IgA en heces, se determinó en un extracto a través de la obtención de 5 pellets de materia fecal en 0,5 ml de una solución compuesta por 100 μ g/ml inhibidor de tripsinas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mg/ml albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 30 mM EDTA en PBS, (pH=7.6). Después de la homogenización y centrifugación a 4 C°, los sobrenadantes fueron utilizados siguiendo el mismo procedimiento antes planteado para determinar los títulos de anticuerpos IgA en suero (99).

Determinación de Citoquinas

La detección de IL-4, IL-10, IL-5, TNF, IFN- γ e IL-17A fue realizada en sobrenadantes de cultivos celulares utilizando la técnica de ELISA sándwich. Las placas de 96 pocillos, fondo plano (Greiner Bio-One, Catálogo Nro 675061) fueron sensibilizadas con el anticuerpo de captura correspondiente a 4°C, durante toda la noche. A continuación, fueron lavadas e incubadas con PBS-BSA 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 1 h. Finalmente, fue agregado 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.

Citometría de flujo

Las células de bazo y las células obtenidas a través de lavados peritoneales fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS conteniendo SFB 2% y azida de sodio 0,1% (PBS/SFB). Para la tinción de moléculas de superficie, 1×10^6 células se incubaron durante 30 min a 4°C con los anticuerpos monoclonales (o sus controles de isotipo) conjugados a sus respectivos fluorocromos (anti MHC-II PE, (anti- I-A/I-E), anti CD4 FITC, anti CD11b APC, anti F4/80 PE, anti CD170 (Siglec-f) APC y anti CD8 APC-Cy7) en las diluciones indicadas en insumos y reactivos. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/SFB y se resuspendieron en PBS hasta su análisis (Figura 10).

Con el fin de estudiar la expresión de moléculas intracelulares, 1×10^6 células se fijaron y permeabilizaron durante 20 minutos a 4°C en solución Cytotfix/Cytoperm de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BD Biosciences). La tinción intracelular se realizó con los anticuerpos correspondientes (anti IL-17 PE, anti IFN- γ PE) o el control de isotipo durante 30 minutos a 4°C. Por último, las células se lavaron con PBS/SFB dos veces y se resuspendieron en PBS/paraformaldehído 1%.

Las poblaciones celulares fueron analizadas utilizando citómetros de flujo BD FACScalibur (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo 6.

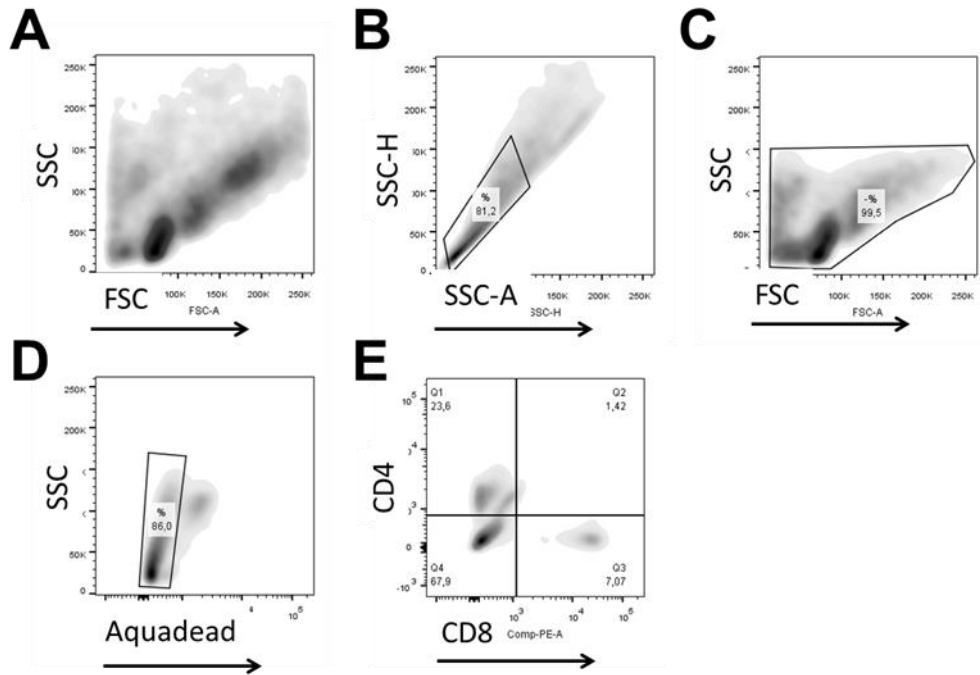


FIGURA 10. Estrategia de *gates* para el análisis de poblaciones de células peritoneales a través del software Flow Jo. (A) FSC-SSC > (B) Singletes > (C) FSC-SSC 2 > (D) Tinción Live/ Dead Aqua > (E) CD4+; CD8+. Las células peritoneales obtenidas de ratones BALB/c fueron recolectadas y marcadas con Aquadead para la discriminación entre células vivas y muertas, y con anti-CD4 (APC) y anti-CD8 (PE) para la determinación del porcentaje (Utilizado como ejemplo representativo). Fueron determinadas además otras poblaciones F480+CD11b+, Siglec-f+CD11b+, Ly6G+Gr1+, B220+CD4+

Ensayos enzimáticos para la determinación la actividad inhibitoria de FhKTM en presencia o ausencia de sueros de animales inmunizados

La proteína recombinante 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 con 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. Para demostrar la actividad neutralizante del suero, distintas concentraciones de FhKTM se incubaron con suero de los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 o INFECTADO o SIN TRATAMIENTO durante 15 minutos antes de la adición de FhCL3. Pasados 10 minutos se sumó el sustrato Tos-GPR-AMC. La velocidad de escisión del sustrato se midió a 540 nm usando un lector de placas Biotek ELx800. Las mediciones de fluorescencia (Unidades de fluorescencia relativa - RFU) se realizaron a

intervalos de 60 segundos, durante 20 minutos. Como control negativo se usó un inhibidor específico de proteasas E64.

Cuantificación de poblaciones celulares por Morfología

Los preparados de células peritoneales fueron realizados usando una citocentrífuga a 1500 rpm por 10 minutos. Cuatro frotis correspondientes a cada grupo fueron teñidos con May Grunwald Giemsa (MGG) para su evaluación morfológica. Se contaron 200 células por preparados para determinar las distintas poblaciones celulares.

Detección de óxido nítrico

En sobrenadantes de cultivo de células peritoneales se determinó la concentración de nitritos mediante la adición de 100 μ l del reactivo de Griess (1% sulfonamida y 0.1% Naftilenodiamina en 5% de ácido fosfórico) a 100 μ l de sobrenadante. La densidad óptica (DO) se leyó a 540 nm y la concentración de óxido nítrico (ON) se determinó utilizando una curva generada a partir de concentraciones estándar de nitrito de sodio (100).

Bloqueo de IL-17A

A los fines de inducir la inhibición funcional de IL-17A, se administraron anticuerpos monoclonales al grupo vacunado con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. El anticuerpo monoclonal anti-ratón IL-17A purificado (α IL-17A) se preparó usando PBS libre de endotoxina. Dos días antes y dos días después de la infección, los ratones vacunados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 y el grupo INFECTADO fueron inyectados con 200 μ g (i.p., 200 μ L) de α IL-17A. Se designaron dos grupos control adicionales que fueron tratados igual que los grupos FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 o INFECTADO y fueron inyectados con un control de isotipo inespecífico IgG [200 μ g (i.p.)] en dosis comparable con los grupos que recibieron el anticuerpo α IL-17A como tratamiento (101) (Figura 11).

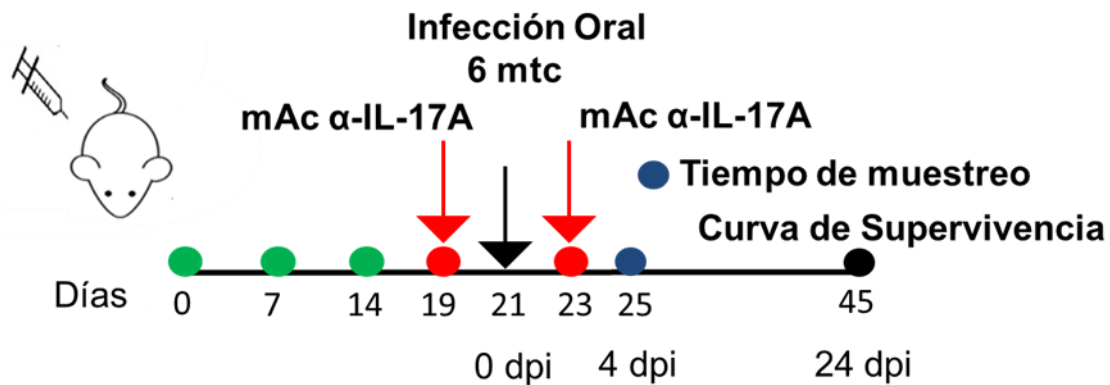


FIGURA 11. Diseño experimental durante la aplicación de anticuerpos bloqueantes α IL-17A

Obtención de células por lavado peritoneal

La cavidad peritoneal de los ratones BALB/c se lavó con 2 ml de RPMI suplementado (PBS-suero 2%) por animal. El sobrenadante de los lavados peritoneales fue recogido y puesto a resguardo en frío para la posterior determinación de citoquinas mediante ELISA. Después de la determinación de la viabilidad por exclusión de azul de tripan (la viabilidad celular fue $> 95\%$), las células se aislaron para analizar las poblaciones mediante cytopsin. Para realizar cultivos celulares se ajustaron 1×10^6 células/ml y se conservaron durante 12 h. Las células y el sobrenadante se cosecharon para el análisis de activación y poblaciones a través de FACS o concentración de ON por reacción de Griess.

Obtención y cultivo de células

Se removieron y colectaron placas de Peyer (PPs) del intestino delgado de los ratones y luego se incubaron en RPMI 1640 (medio Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El medio contenía 0,5 mg / ml de colagenasa, SFB al 2% (v/v) (Thermo Fisher Scientific), 100 U / ml de penicilina y 100 μ g / ml de estreptomina durante 30 minutos. Las células provenientes de las PPs se filtraron a través de un filtro celular (100 μ m; BD) y se lavaron con el medio sin colagenasa. Las células se suspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 55 μ M, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 μ g /ml y luego se cultivaron a $1,0 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos estimuladas con FhKTM (1/100 x pocillo) durante 3 días a 37 °C bajo una atmósfera al 5% de CO₂.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron células de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), inguinales (ILN), homogeneizadas y suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY), piruvato sódico 1 mM, 2 m-l-glutamina, 100 U de penicilina / ml y 100 µg de estreptomina / ml (Becton Dickinson, San Diego, California, EE. UU.) (Medio completo). Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂ y 95% de aire) y se estimularon con FhKTM (2 µg / ml) durante 72 h.

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 de los diferentes órganos. En los experimentos *in vivo*, se utilizaron entre 3-5 animales por grupo y se repitió el ensayo 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). Los ensayos de supervivencia fueron analizados mediante el test Kaplan-Meier (Test Long-rank). Las diferencias con un valor de $p \leq 0.05$ fueron consideradas significativas. Los datos obtenidos se expresan como el promedio \pm DE a través del software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software).

Capítulo 4: RESULTADOS

Evaluación de la formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 en la vacunación contra *F. hepatica*

El modelo experimental fue desarrollado en ratones BALB/c, ya que se ha determinado la alta susceptibilidad de esta cepa a la infección con *F. hepatica* (102), para determinar el grado de protección que podría generar la vacuna. A la cuarta semana del esquema (Figura. 15) y luego de completar la tercera dosis, se realizó la infección con 6 metacercarias del parásito. Este número fue estimado a partir de un experimento previo en el que se determinó que con esta dosis se pueden encontrar gusanos en el hígado al día 24 post-infección con un estado de salud del ratón aceptable.

Se realizó, en primer lugar, un experimento de supervivencia que se prolongó durante 75 días post-infección, siguiendo el esquema experimental de la Figura 9. Los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Línea verde) presentaron un 80% de supervivencia, lo que fue significativamente más alto que el porcentaje dado por la inmunización con CpG-ODN/Coa-ASC16 (20%) (Línea roja) o solo infectados (línea azul), los cuales murieron en su totalidad al día 32 dpi aproximadamente. (Figura 12). Este resultado muestra que la formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce un alto grado de protección que puede controlar la infección por *F. hepatica*

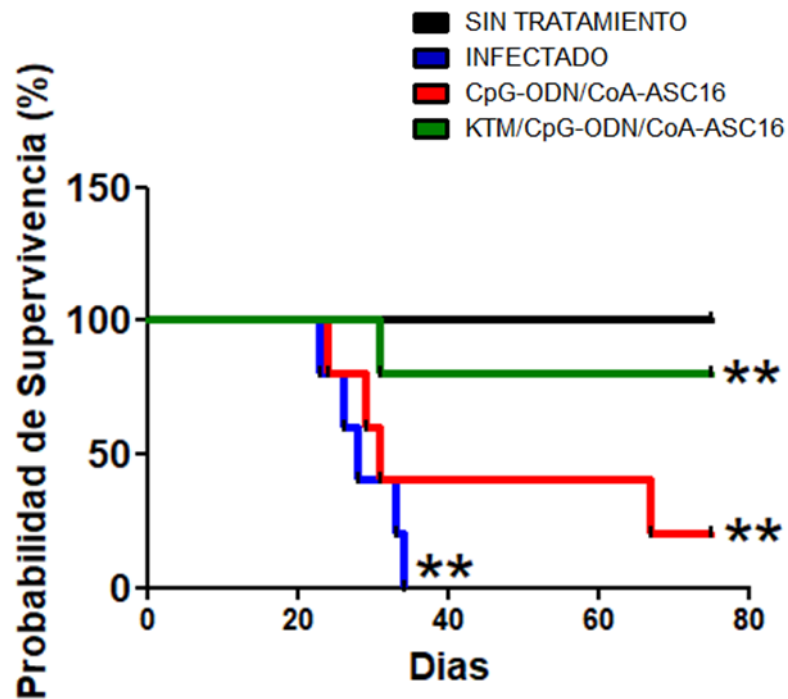


FIGURA 12. La vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 incrementa la probabilidad de supervivencia a la infección con *F. hepatica* en un modelo murino de infección. La supervivencia de los ratones luego de ser infectados fue monitoreada por 75 días. A cada grupo se le asignaron 5 ratones BALB/c de dos meses de edad. La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostró un porcentaje significativo de animales que sobrevivían a la infección por *F. hepatica* en relación con los demás grupos evaluados. El gráfico es representativo de 2 experimentos replicados. Los datos fueron evaluados por el método estadístico Kaplan–Meier (Test log-rank) $**p \leq 0.01$.

La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 previene el daño hepático

El primer parámetro que analizamos fueron las condiciones de los ratones que formaban parte del experimento, determinando su morbilidad en términos del estado físico y movilidad de los mismos. Los ratones del grupo INFECTADO presentaron una notoria caída del pelo, en algunos casos signos de hinchazón y dificultad para moverse en los espacios físicos. Aquellos pertenecientes al grupo CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron síntomas similares, aunque no en la totalidad de los casos (1/4). Por último, el estado de salud de los grupos vacunados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue comparable con aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento (SIN TRATAMIENTO)

Siendo el hígado el órgano blanco de la infección por *F. hepatica*, realizamos un análisis macroscópico y microscópico de los mismos en los distintos grupos de animales. De acuerdo al esquema experimental ya expuesto (Figura 9) se procedió el día 24 post-infección a la extracción de los hígados para su estudio.

En los hígados INFECTADO se observó una extensa fibrosis que se extendía hasta cambiar la arquitectura total del lóbulo en los casos más severos (Figura 13 B), un cambio de color en la vesícula tornándose rojo-negro con un aumento del tamaño. Además, cuando se provocó la ruptura de la vesícula biliar, se pudo observar la salida de gusanos en conjunto con los líquidos biliares sanguinolentos. Este patrón se repitió en el grupo CpG-ODN/Coa-ASC16 (Figura 13 C). En cuanto a los hígados de los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, estos presentaron un tamaño y complejidad comparable a la de los ratones SIN TRATAMIENTO (Figura 13 A-D).

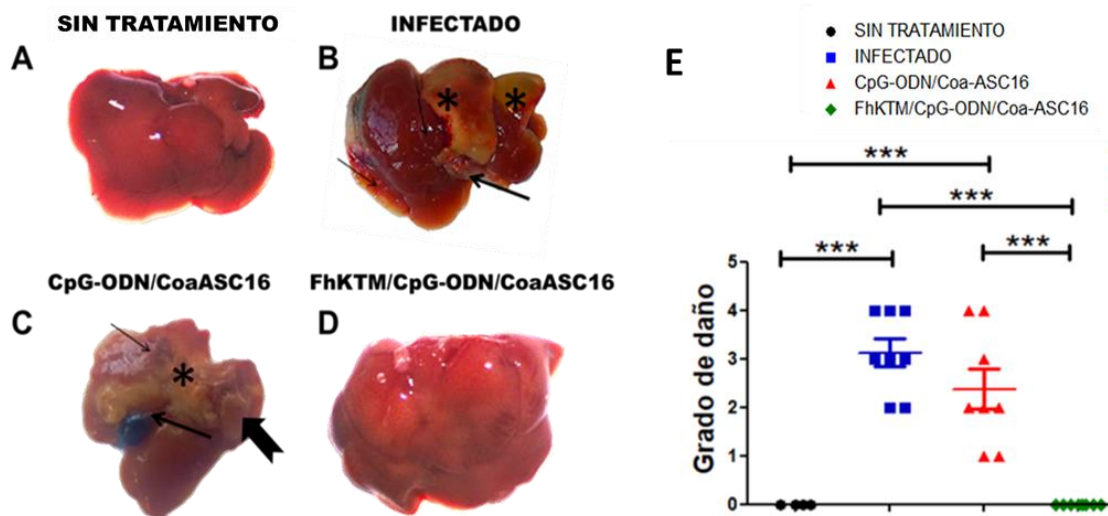


FIGURA 13. La vacunación con FhKTM /CpG-ODN/Coa-ASC16 en ratones evita el daño hepático visible causado por la infección por *F. hepatica*. Lesiones macroscópicas de hígados de ratones después de 24 días de la infección con *F. hepatica* o sin infección. (A) SIN TRATAMIENTO: el tejido de ratones sin tratamiento mostró una arquitectura estándar sin lesiones observadas. (B) INFECTADO: hay marcadas irregularidades de la cápsula (flecha delgada), cambios en el color del tejido (asterisco) que pertenecen a la creciente fibrosis generada y agrandamiento de los conductos biliares (flecha gruesa). (C) CpG-ODN/Coa-ASC16. Múltiples focos de fibrosis (asterisco), también agrandamiento, engrosamiento y cambios de color debido a hemorragias en la vesícula biliar (flecha gruesa) y la presencia de gusanos en la superficie del hígado (flecha con muesca) (D) FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16. Los hígados mantuvieron una estructura similar a los ratones del control SIN TRATAMIENTO sin lesiones visibles. En el lado derecho se resume el grado de daño presente en la extensión de los hígados analizados durante los experimentos 24 dpi. Los datos mostrados se agrupan a partir de dos experimentos independientes con un total de n = 5-8 por grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. ***p <0.001

El análisis microscópico presentó una correlación con lo observado en el análisis macroscópico, ya que los animales vacunados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron una estructura parenquimal preservada, similar a los cortes de hígados del grupo SIN TRATAMIENTO (Figura 14 A). Los hígados de los animales INFECTADO y CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron las características habituales en la afección por *F. hepatica*, la presencia de tractos generados por el paso de gusanos, así como la presencia de los mismos en los cortes, un extenso infiltrado inflamatorio, moderada necrosis de hepatocitos y una proliferación excesiva del tejido conectivo reemplazando las células funcionales (Figura 14 A). Estos resultados fueron resumidos en una tabla y a su vez el daño recibió un puntaje representativo tanto del estado macroscópico como microscópico del hígado. (Figura 13 E-14 B).

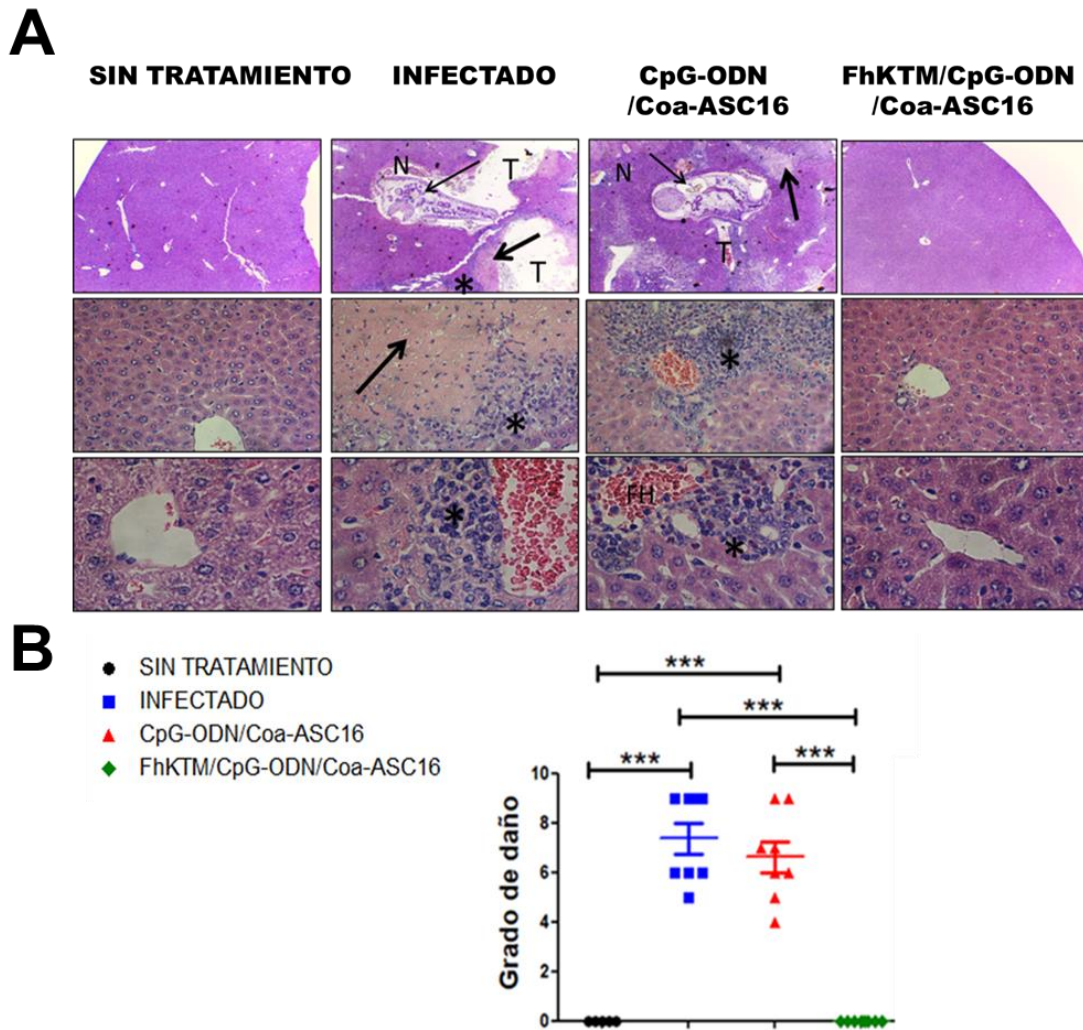


FIGURA 14. La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 previene el daño hepático provocado por la infección por *F.hepatica*. (A) La evaluación histopatológica de los hígados de los diferentes grupos se realizó 24 días después de la infección. Los ratones del grupo control SIN TRATAMIENTO mostraron la arquitectura hepática esperada de los ratones sin infección (izquierda) (H / E, 100 x (arriba) 400x (medio) 900x (abajo)). El grupo INFECTADO mostró la presencia de NEJ en el parénquima hepático (flecha delgada), tracto asociado al desplazamiento (T), infiltrado inflamatorio extenso (*), necrosis hepatocítica moderada (N) y proliferación de fibrosis transformándolo en tejido conectivo (flecha gruesa) como la etapa crónica de la infección (centro izquierda). Asimismo, el control CpG-ODN/Coa-ASC16 evidenció la presencia de NEJ y sus consecuencias (centro derecha). Los ratones FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mantuvieron la estructura del parénquima hepático a pesar de la infección (derecha). (B) A la derecha, las muestras histológicas se puntuaron entre 0 y 9 en función de los siguientes hallazgos: infiltración de células inflamatorias (rango de puntuación, 0 a 3), junto con la evaluación del daño del tejido hepático (necrosis, focos hemorrágicos, fibrosis, rango de puntaje 0 a 3), presencia de túneles y trematodos (rango de puntaje, 0 a 3), con 0 como normal y 9 como el dañado más severo. Los datos mostrados se agrupan a partir de dos experimentos independientes con total (n = 5-8 por grupo). Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. ***p < 0.001

Resultados

Otra herramienta utilizada en el estudio del funcionamiento hepático, fue la determinación de las transaminasas hepáticas Alanina aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST) en el suero, las cuales dan un indicio del estado de los hepatocitos puesto que cuando se dañan, estas enzimas son liberadas al torrente sanguíneo (96). En cuanto a la especificidad de la determinación por la concentración exclusiva elevada en el citosol de las células del hígado, ALT proporciona un resultado más certero mientras que AST se encuentra además de en hepatocitos, en el citosol y mitocondrias de otros órganos como el miocardio, el músculo esquelético, los riñones, el cerebro, el páncreas, el pulmón, los leucocitos y los eritrocitos (96).

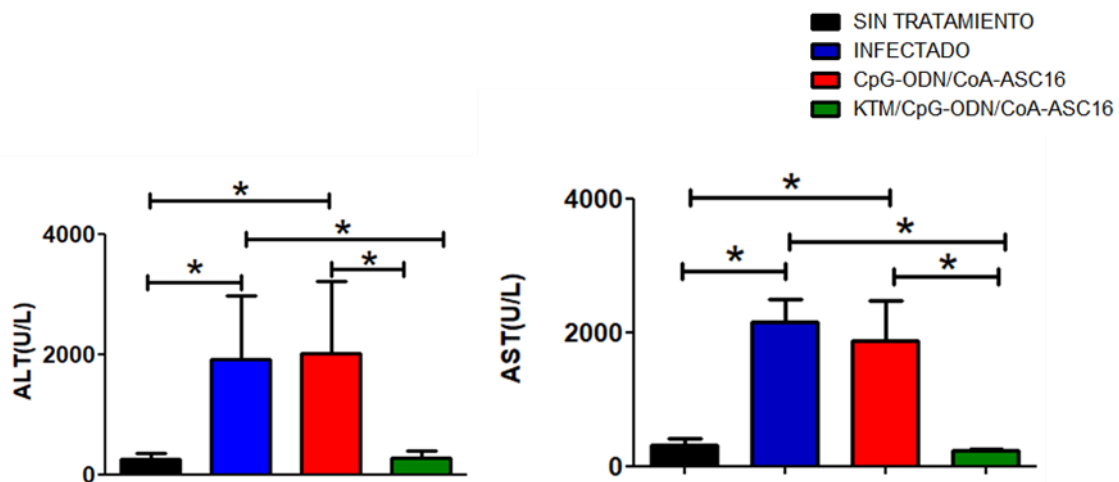


FIGURA 15. Las enzimas transaminasas de los ratones tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 sugieren la preservación de la estructura de los hepatocitos durante la infección con *F. hepatica*. Las muestras de suero se tomaron en el momento de la eutanasia, 24 dpi. Los niveles de AST (derecha), aspartato aminotransferasa; ALT (izquierda), la alanina aminotransferasa se determinó utilizando un método cinético-UV, bajo los protocolos establecidos por el fabricante. Los gráficos son representativos de 2-3 replicados. Las barras representan la media \pm DE correspondiente. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. * $p < 0.05$

Los resultados obtenidos son coherentes con lo observado en los estudios macroscópicos y microscópicos en hígados, ya que los grupos INFECTADO y CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron niveles elevados de ambas transaminasas hepáticas mientras que aquellos que recibieron el tratamiento con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron concentraciones similares a aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento (Figura 15).

En conjunto estos resultados muestran la ausencia de larvas en hígado en los ratones vacunados, sin ruptura del tejido hepático o marcadores enzimáticos elevados. Lo que sugiere que el tratamiento previene el daño hepático, a expensas del detenimiento del ciclo del parásito, manteniendo los animales en buenas condiciones físicas.

La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce una elevada respuesta inmune humoral específica

Uno de los resultados reiteradamente mostrados en la producción de vacunas contra *F. hepatica* es la relación entre altos niveles de protección y la presencia de anticuerpos con un perfil mixto IgG1-IgG2a. Aunque no se haya descifrado exactamente el lazo que une estos resultados, se han propuesto mecanismos como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la participación en la activación de células que faciliten la expulsión del parásito.

Analizamos en las muestras de sueros, los títulos de anticuerpos anti FhKTM de tipo IgG1/IgG2a. Nuestros resultados mostraron que todos los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 generaron un significativo título de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2a en suero (Figura 16). Estos títulos, se mantuvieron elevados para ambos tipos de anticuerpos desde antes de la infección (0 dpi) hasta el día 24 dpi en comparación con los demás grupos (Figura 16). Este fenómeno se repitió para el caso de la determinación del título de anticuerpos IgA en suero, heces y lavado intestinal (Figura 17). Además del hecho que la inmunización subcutánea permita establecer una respuesta en la mucosa intestinal, podemos suponer que la presencia de IgA puede ser esencial ya que en el caso de otros parásitos permite la expulsión en su fase de instalación de la enfermedad (103-106).

Los gráficos representan los títulos de corte para anticuerpos determinados por ELISA. En los mismos puede observarse que para IgG2a e IgG1 los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 en promedio van aumentando desde 1/250 el día 0 hasta 1/1500 al día 24 mientras que los animales inmunizados con CpG-ODN/Coa-ASC16 aumentan desde 1/10 el día 0 hasta 1/100 al día 24. Estos niveles generados por el adyuvante son considerados significativamente menores y posiblemente generados por reacciones cruzadas hacia antígenos no específicos.

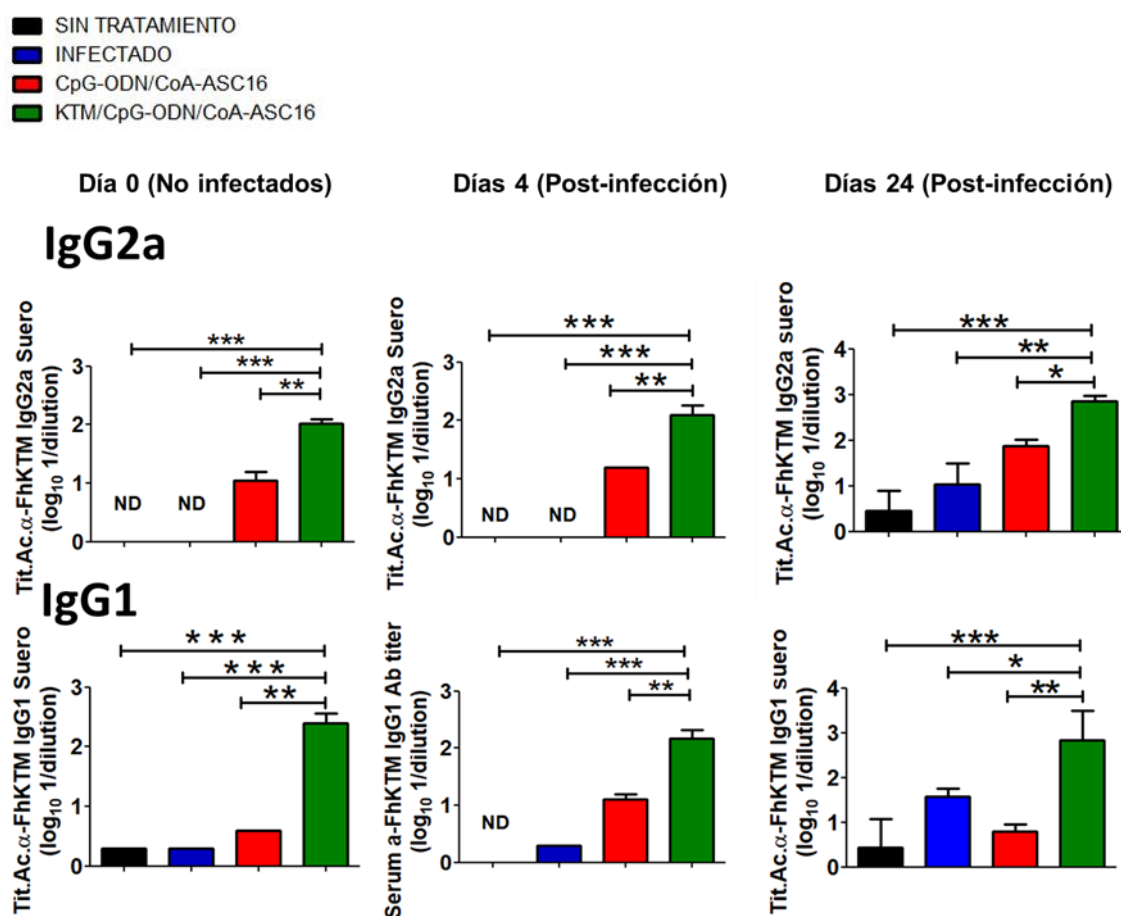


FIGURA 16. Detección de anticuerpos IgG específicos de FhKTM. Anticuerpos de subclase IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados mediante ELISA. Se recogieron muestras de suero de los ratones mediante sangrado retroorbital a los 0, 4 y 24 días después de la infección. Se analizó las respuestas de anticuerpos específicos contra FhKTM. Los resultados se expresaron como la media de los valores de $DO\ 450 \pm DE$ y son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En conclusión, el grupo de animales inmunizados con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 muestra, en concordancia con lo observado previamente (la sobrevida, estado físico en general, los estudios macro y microscópicos de los cortes de tejido de hígado) una respuesta de anticuerpos robusta, variada, específica y que se mantiene a lo largo del tiempo.

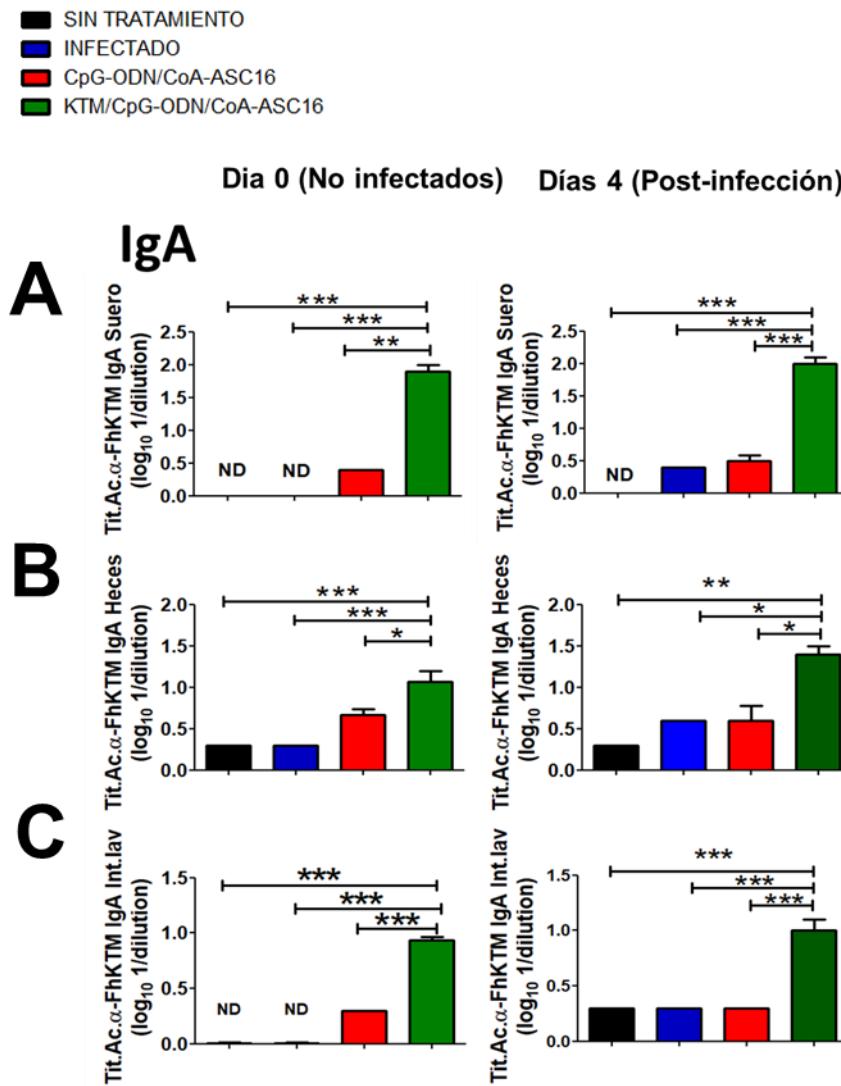


FIGURA 17. Detección de anticuerpos IgA específicos de FhKTM. Se detectaron títulos de IgA en la infección aguda en los días 0 y 4 en (A) suero, (B) heces y (C) lavado intestinal. Los resultados se han expresado como la media de los valores de $DE 450 \pm DE$ y son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La inmunización con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 desarrolla respuestas de citoquinas IL-17A e IFN- γ específicas de antígeno

La respuesta inmune provocada en el huésped por la infección con *F. hepatica* se caracteriza por la secreción de citoquinas como IL-10, IL-5 e IL-4, las cuales modulan la respuesta del hospedador para permitir el establecimiento y perpetuidad del parásito. Así como la respuesta mixta de anticuerpos se relaciona con protección en los casos de inmunizaciones en animales infectados con *F. hepatica*, un perfil de citoquinas Th1 (por

Resultados

ejemplo, IFN- γ) se ha encontrado como una herramienta fundamental para combatir la enfermedad (33, 57, 93). Por ello, decidimos evaluar la secreción de citoquinas (IL 4, IFN- γ , IL17, IL-10, IL-5) en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, a distintos tiempos post infección, re-estimulados *in vitro* con FhKTM.

Nuestros resultados muestran que la inmunización con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 indujo un aumento de la secreción de citoquinas IL-17A, IFN- γ e IL-5 en los esplenocitos (Figura 18 día 0). Este nivel de citoquinas se mantuvo significativamente alto para el caso de IL-17A e IFN- γ durante los periodos 4 y 24 dpi en comparación con los demás grupos. IL-5 en cambio se mantuvo en niveles similares que se asemejaban a los encontrados en el grupo INFECTADO. Durante estos periodos analizados, IL-4 disminuyó en relación con aquellos ratones que recibieron solo la infección. Del mismo modo ocurrió para IL-10 en el 24 dpi (Figura 18).

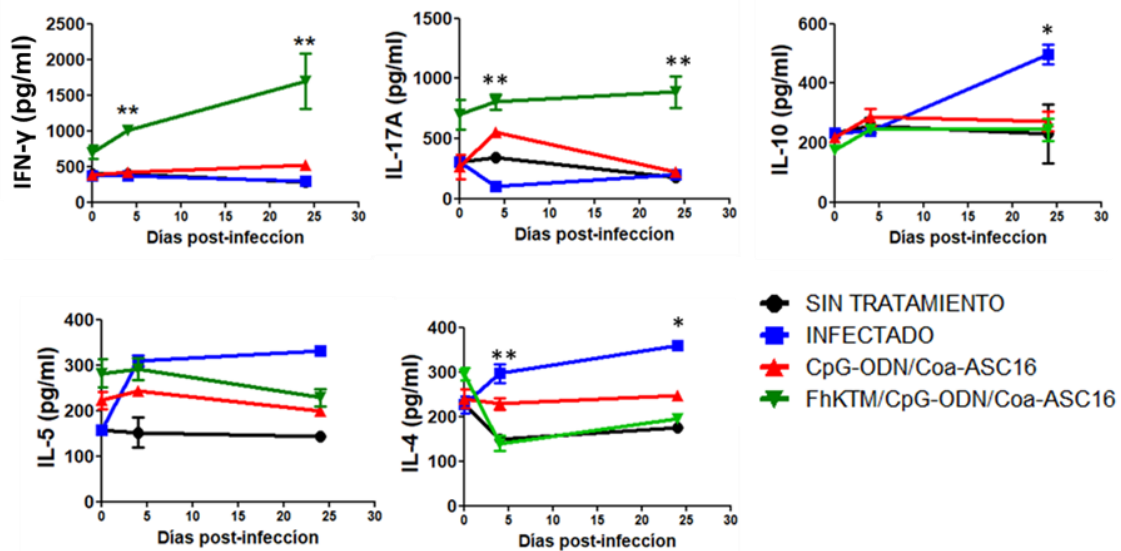


FIGURA 18. Respuestas inmunes a citoquinas específicas de FhKTM en ratones BALB/c después de la vacunación. En los días 0, 4 y 24 post-infección, se recogieron bazos y se estimularon los esplenocitos *in vitro* con FhKTM durante 72 hs. Los sobrenadantes de cultivo de células de bazo se evaluaron para la producción de IL-17A, IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-4 por ELISA. Los resultados se muestran como media \pm DE y niveles de significación indicados por los valores de p. Se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Tukey * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Las células obtenidas de ILN también fueron cultivados durante 72 hs y los sobrenadantes analizados para la determinación de citoquinas. Se observó que los niveles de IL-17A e IFN- γ se encontraban elevados desde antes de la infección y se mantuvieron hasta el 24 dpi en los animales vacunados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-

Resultados

ASC16 en comparación con los niveles observados en los sobrenadantes de los ILNs de los distintos grupos (Figura 19). Por el contrario, la concentración de IL-10 fue menor a la del grupo INFECTADO, mientras que IL-4 no fue detectada en ninguno de los grupos estudiados (Figura 19).

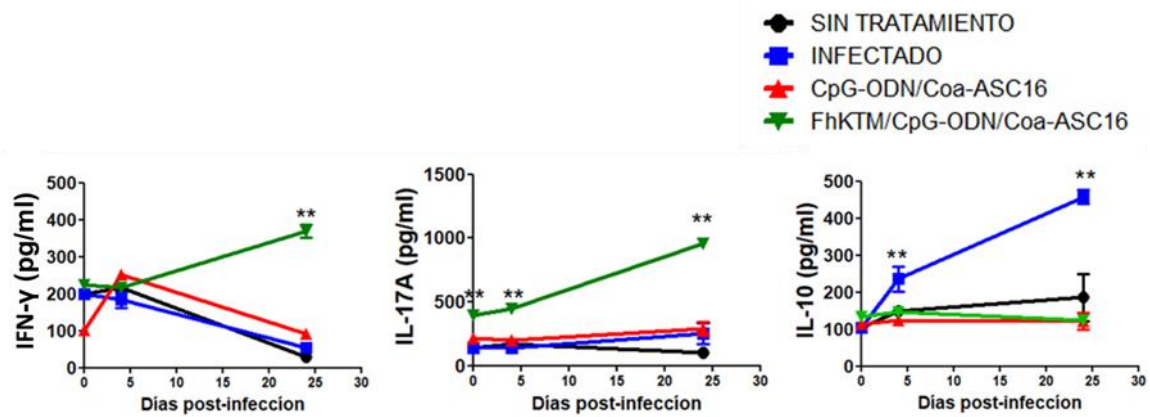


FIGURA 19. Respuestas de citoquinas específicas de FhKTM en ratones BALB/c después de la vacunación. En los días 0, 4 y 24 post-infección, se recogieron los ILNs y se estimularon las células in vitro con FhKTM durante 72 hs. Los sobrenadantes de cultivo de células de IGN se evaluaron para la producción de IL-17A, IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-4 por ELISA. Los resultados se muestran como media \pm DE y niveles de significación indicados por los valores de p. Se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Tukey ** p < 0,01.

Dado que la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 produjo un incremento en los niveles de INF- γ e IL-17 en esplenocitos y células de ILNs, nuestro próximo objetivo fue determinar la fuente de células productoras de estas citoquinas. Utilizando análisis por FCS encontramos que células T CD4⁺ y CD8⁺ del bazo de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 producían INF- γ a 0-4 dpi (Figura 20 A-B). Las células T CD4⁺ también fueron responsables de la producción de INF- γ e IL-17 a 24 dpi (Figura 20 C).

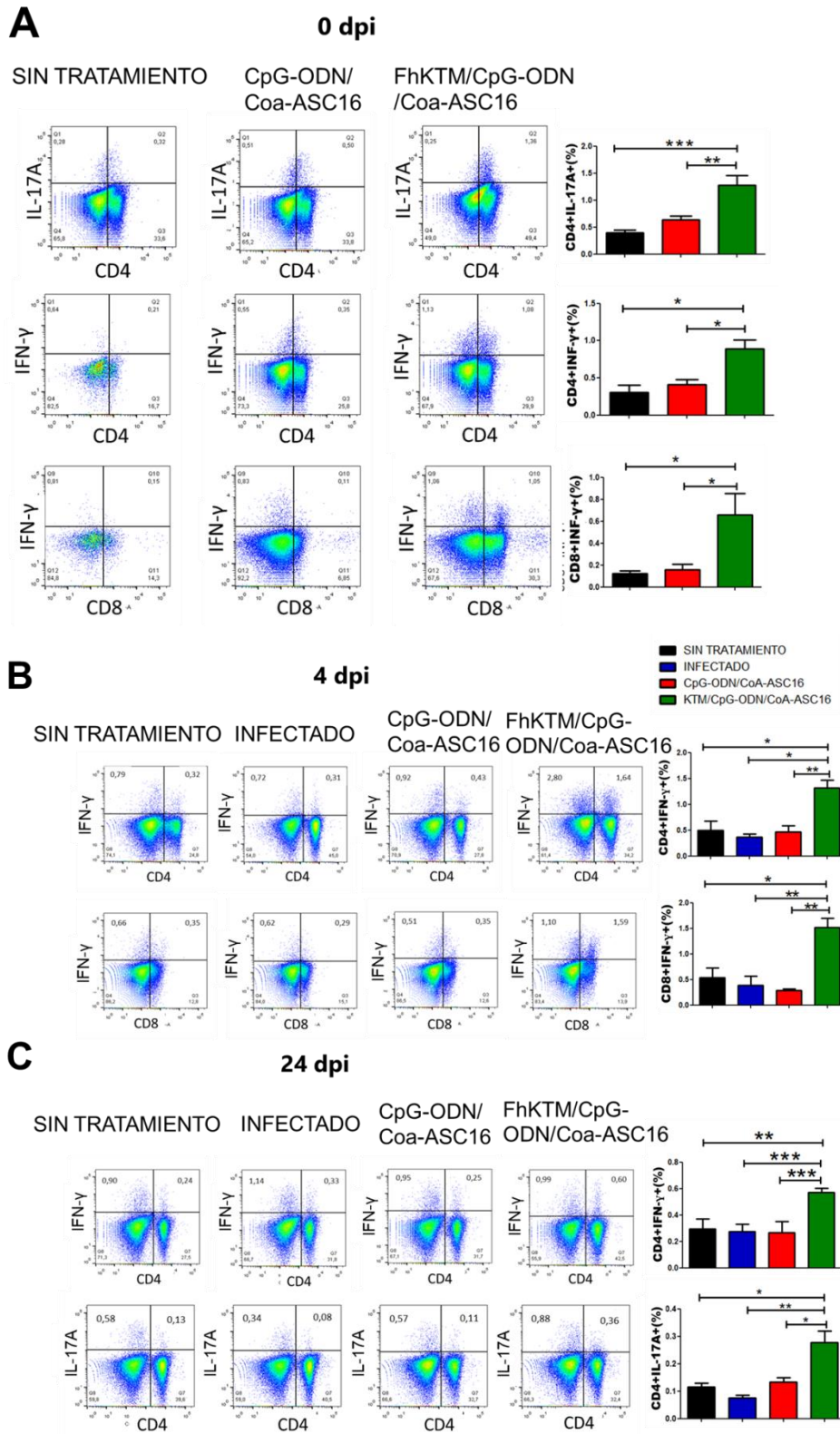


FIGURA 20. Células T CD4⁺ y CD8⁺ de bazo en los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 producen IL-17A e INF- γ . Suspensiones celulares de esplenocitos de ratones tratados en el día 0 (A) (no infectado), 4 (B) y 24 (C) dpi se cultivaron durante 3 días con FhKTM. La producción de INF- γ se evaluó en las células T CD4⁺ y CD8⁺ mientras que IL-17A solo fue determinada en células T CD4⁺. Los datos se muestran en diagramas representativos de puntos del análisis por citometría de flujo. Los gráficos de barras muestran la media \pm DE de los porcentajes de las células T CD4⁺- IL-17A⁺ - T CD8⁺, INF- γ ⁺ o T CD4⁺, INF- γ ⁺ para cada grupo. Los resultados se presentan en gráficos de barras como media \pm DE y son representativos de dos experimentos independientes. Todos los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-TUKEY. *p \leq 0.05; ** p <0,01***p <0.001.

En conclusión, nuestra formulación permite generar en los animales inmunizados, una potente respuesta Th1-Th17 que se mantiene en el tiempo en distintos órganos, que en conjunto con la presencia de IL-5 y anticuerpos permitirían a evitar la llegada del gusano al hígado.

El tratamiento FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 eleva la producción de INF- γ e IL-17 en células aisladas de Placas de Peyer (PPs) y Ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs)

Se ha propuesto que existen tres etapas fundamentales durante el transcurso del ciclo evolutivo de *F. hepatica*, en donde las larvas juveniles (NEJ) presentarían un mayor grado de susceptibilidad: el intestino, al momento en que se produce el traspaso de la pared, el peritoneo, durante el pasaje hacia el hígado y por último en el punto de entrada de su migración a través del parénquima del hígado. La producción elevada de IL-17A encontrada podría relacionarse con la aparición de IgA en materia fecal (Figura 21), dado que existen trabajos en donde se describe la participación de IL-17 en el pasaje de IgA al lumen intestinal y la participación de células Th17 en órganos linfáticos para el cambio de isotipo de anticuerpos (107). Considerando que la respuesta inmune local podría ser clave para evitar la diseminación del parásito, se analizaron también las citoquinas producidas en sobrenadante de cultivos de células de PPs y MLNs reestimuladas in vitro con FhKTM, en donde encontramos una elevada concentración de

IL-17A e INF- γ en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 en comparación con los demás grupos estudiados (Figura 21).

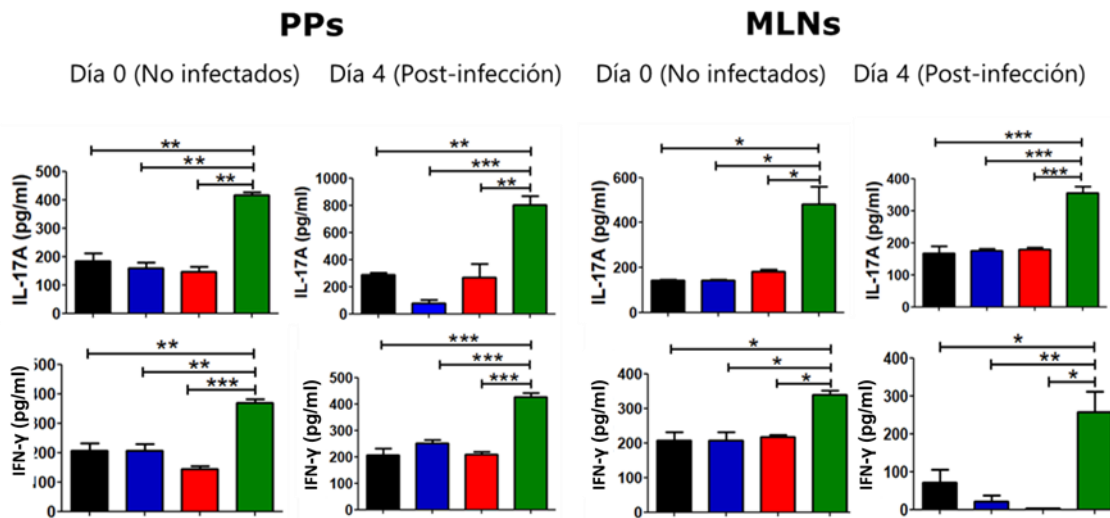


FIGURA 21. Los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron una mayor producción de IFN- γ , IL-17A en sobrenadantes de PPs y MLNs. Suspensiones celulares de PPs y MLNs de ratones tratados en el día 0 (no infectado) y 4 d.p.i. se cultivaron durante 3 días con FhKTM. El IFN- γ e IL-17A se midieron en los sobrenadantes de cultivo mediante la prueba ELISA. Los resultados se muestran como media \pm DE y los niveles de significación indicados por los valores de p se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Tukey * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

La vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 incrementa el reclutamiento de células CD11b⁺F4/80⁺ en la cavidad peritoneal y la producción de IL-6, IL-5, TNF, IL-17A e INF- γ

Como definimos previamente, un sitio en donde se podría controlar a las larvas juveniles mediante la vacunación es el peritoneo, por lo cual decidimos analizar las poblaciones de células peritoneales y las citoquinas liberadas. Se realizó un lavado peritoneal al día 4 post-infección y las células obtenidas fueron estudiadas mediante análisis por citometría de flujo y citospin. Paralelamente el sobrenadante de las mismas fue evaluado por ELISA para la determinación de citoquinas. Los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron un elevado número de células CD11b⁺F4/80⁺ que pueden relacionarse con macrófagos (Figura 22 B). Tanto el porcentaje como el número absoluto determinado por la citometría de flujo demostraron el aumento en el reclutamiento de macrófagos al peritoneo en comparación con los otros

Resultados

grupos analizados. Este resultado se corroboró mediante la observación y recuento de células en preparados teñidos con MGG (Figura 22 A). Este número significativamente mayor de células $CD11b^{+}F4/80^{+}$ o macrófagos con respecto a los demás grupos se contraponen con una disminución del número de células $CD11b^{+}Siglec-f^{+}$ definidas como eosinófilos quienes son habitualmente atraídos a la zona durante las parasitosis (Figura 22 B). Un resultado inesperado fue el número menor de células $Ly6G^{+}GR1^{+}$, neutrófilos, en relación con la concentración de IL-17A a pesar de su función quimioatractante de neutrófilos, por lo que hipotetizamos que estas células no serían imprescindibles para combatir la infección en este modelo

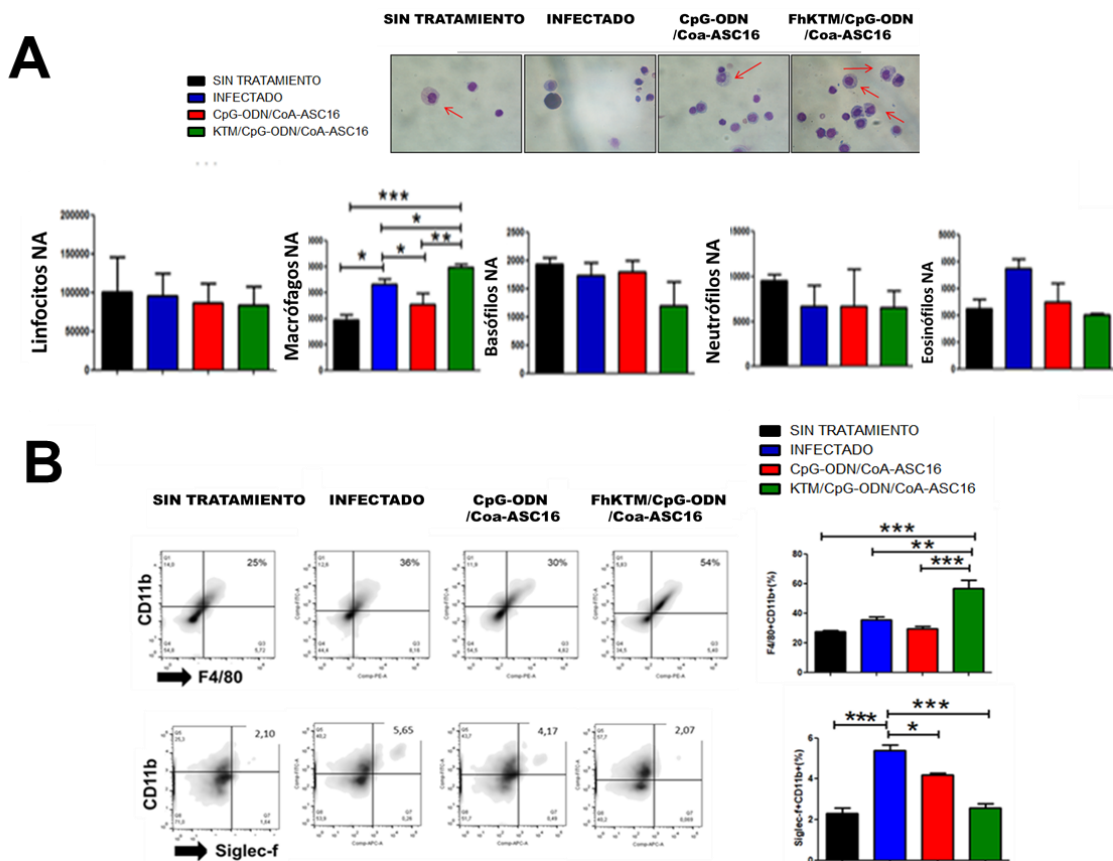


FIGURA 23. Las células CD11b+ F4/80+, definidas como macrófagos, se reclutan en la cavidad peritoneal de ratones vacunados con FhKTM/CpG-ODN/CoA-ASC16. (A) Arriba, el campo representativo para las células peritoneales teñidas con MGG de ratones BALB/c tratados, con las flechas que muestran los macrófagos. Aumento original, 400X SI. A continuación, los gráficos de barras resumen los números absolutos de las diferentes poblaciones celulares en el exudado peritoneal de los ratones tratados. NA Número Absoluto (B) Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b y F4/80- anti-CD11b y Siglec-f y se analizaron mediante citometría de flujo. Las gráficas de puntos representan la región de acuerdo con la dispersión frontal frente a la dispersión lateral, y las células se tomaron sobre el número total de células vivas y se muestran como un porcentaje. Los datos son representativos de 2 experimentos con resultados similares. Las barras representan la media \pm DE y son representativas de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon utilizando las pruebas de comparación múltiple de una vía ANOVA + Tukey. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Los ratones que recibieron tratamiento con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron además un aumento significativo en la producción de citoquinas IL6, IL-5, TNF, IL-17A e INF- γ en el lavado peritoneal en relación con los demás grupos (Figuras 23).

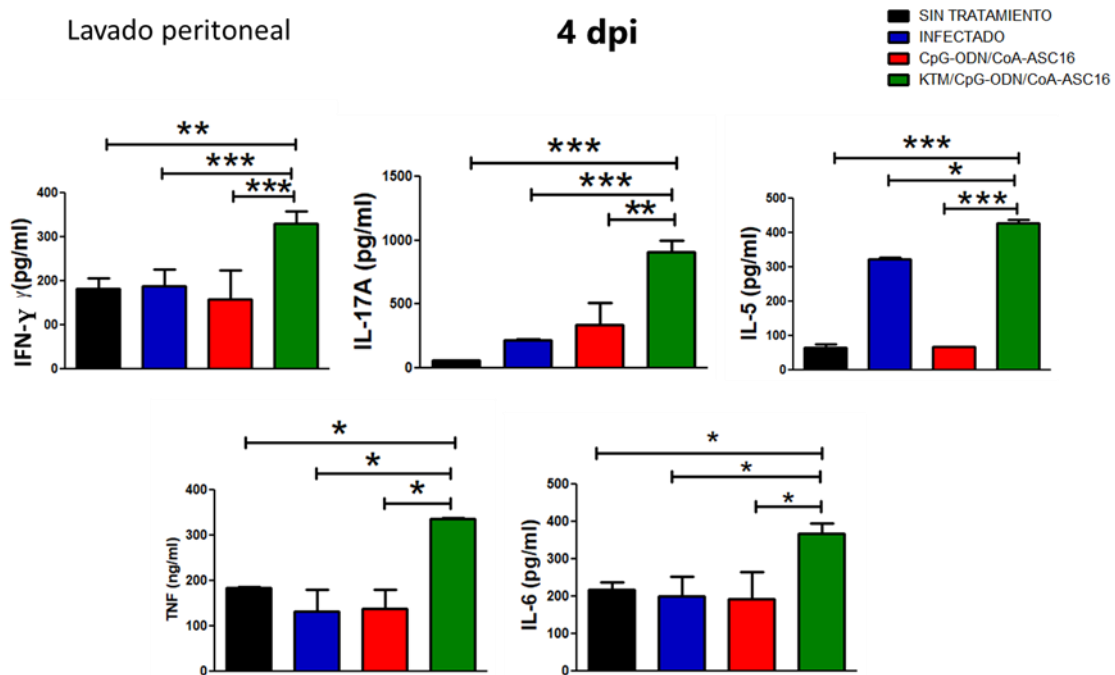


FIGURA 23. Las citoquinas de los lavados peritoneales de ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 demuestran un perfil inmunológico mixto Th1-Th2-Th17. Los lavados peritoneales fueron extraídos a 4 dpi en 2 ml de PBS-suero 2% frío. Las concentraciones de IL-6, IL-5, TNF, IL-17A e INF- γ fueron evaluadas mediante el test de ELISA, en los sobrenadantes de lavados peritoneales. Los resultados se presentan en gráficos de barras como media \pm DE y son representativos de dos experimentos independientes. Todos los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

El reclutamiento de monocitos-macrófagos hacia la cavidad peritoneal sucede en los primeros estadios de infección por *F. hepatica* (33). En el presente estudio, se mostró que la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 recluta un número significativamente mayor de macrófagos con un ambiente dominado por citoquinas proinflamatorias de perfil tipo Th1-Th17, contrario a lo reportado durante la fasciolosis, que modula el medio ambiente hacia un perfil antiinflamatorio impidiendo la respuesta inmune efectiva contra la infección.

La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 promueve la activación de las células peritoneales y aumento en la producción de óxido nítrico

Estudios previos han demostrado que una de las respuestas que podría ser utilizadas por los huéspedes para eliminar la infección por *F. hepatica* es ADCC. En ensayos *in vitro*, se ha reportado que macrófagos peritoneales a través del reconocimiento de antígenos superficiales del parásito mediado por anticuerpos genera la activación de estas células, concluyendo que la liberación de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno terminarían dañando el tegumento (42, 43). La inmunización con FhKTM/CpG-ODNCoa-ASC16 en ratones provocó un aumento en la expresión de MHC-II determinado por FACS en células peritoneales (MFI verde vs otros grupos) (Figura 24 A), como así también un aumento de la producción de ON en los sobrenadantes luego de 12 horas de cultivo (Figura 24 B).

Nuestros resultados muestran que durante la inmunización con FhKTM/CpG-ODNCoa-ASC16 ocurre un incremento en el reclutamiento de macrófagos, activación de las células peritoneales y elevada producción de ON. Esto sumado a la circulación de anticuerpos séricos específicos, podrían en conjunto formar parte de un mecanismo, como el de ADCC que participa en la eliminación de las larvas juveniles migrantes de *F. hepatica*.

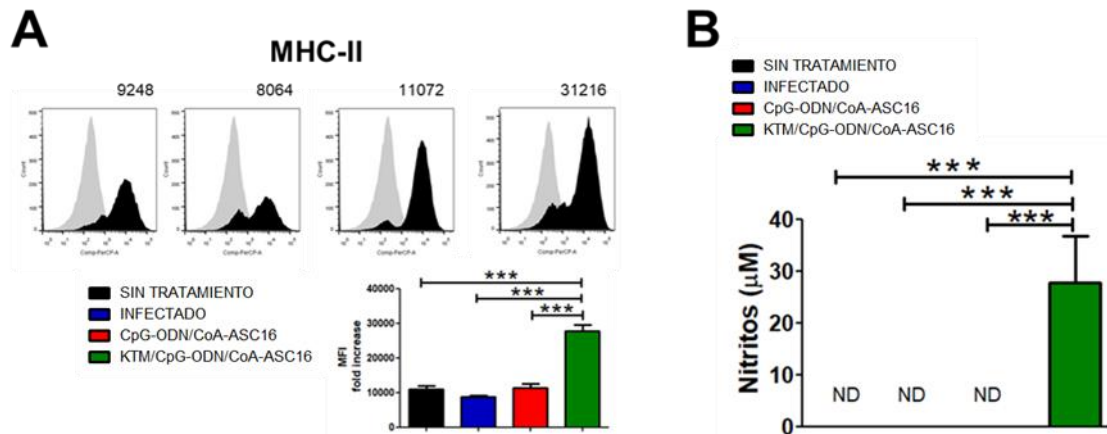


FIGURA 24. Las células peritoneales de los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentan un mayor estado de activación y producen una elevada concentración de óxido nítrico. (A) Las células peritoneales viables se tiñeron con anticuerpos anti-MHCII y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las poblaciones marcadas para MHCII+ con diferentes tratamientos. Cada histograma corresponde a un experimento representativo. Los gráficos de barras muestran el incremento relativo con respecto al control sin estímulos (control de isotipo en gris). Las barras representan la media \pm DE y son representativas de dos experimentos independientes. (B) Las células peritoneales se cultivaron durante 12 h con medio para la detección de nitritos. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se mezclaron con 200 μL de reactivo de Griess para cuantificar los nitritos. ND, no detectado. Las barras representan la media \pm DE y son representativas de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon utilizando las pruebas de comparación múltiple de una vía ANOVA + Tukey. *** $p \leq 0.001$.

El uso de anticuerpos α -IL-17A en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 afecta la producción de IFN- γ

Existen reportes que muestran un efecto sinérgico entre IL-17 e IFN- γ en la activación de macrófagos para sus funciones microbicidas (108-111). En este trabajo encontramos altas concentraciones de IL-17A en los distintos órganos de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. Sumado a los reportes que muestran un papel fundamental para IFN- γ en la activación de macrófagos, favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, decidimos incluir en el cronograma de inmunizaciones, 2 dosis de anticuerpos neutralizantes α -IL-17A a 2 días previos a de la infección y una dosis 2 días posteriores. Los esplenocitos de los ratones fueron cosechados 4 dpi y cultivados durante 72 h con FhKTM. Luego del tiempo estipulado se analizaron los sobrenadantes para la producción de IFN- γ y las células fueron

clasificadas en poblaciones productoras de IL-17A e IFN- γ . Aquellos ratones vacunados que recibieron tratamiento con anticuerpos α -IL-17A presentaron una menor concentración de IFN- γ (Figura 25) y una producción disminuida de las células CD4+ productoras de IFN- γ en comparación con aquellos animales tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. En el caso de la determinación de IL-17A, como era esperable, se encontró disminuida cuando se aplicó el anticuerpo α -IL-17A. Otro control realizado fue la implementación de un tratamiento con un anticuerpo monoclonal de isotipo sin especificidad dando un resultado similar al grupo de animales solo vacunados en relación a la producción de IFN- γ (Figura 25).

Numerosos reportes muestran la asociación entre las respuestas inmunes protectoras contra la infección con *F. hepatica* y la respuesta Th1 caracterizada por una alta secreción de IFN- γ con una respuesta mixta de anticuerpos. En vistas de la relación estrecha encontrada entre la presencia de IL-17A e IFN- γ podemos pensar que este fenómeno contribuiría a la protección generada por la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.

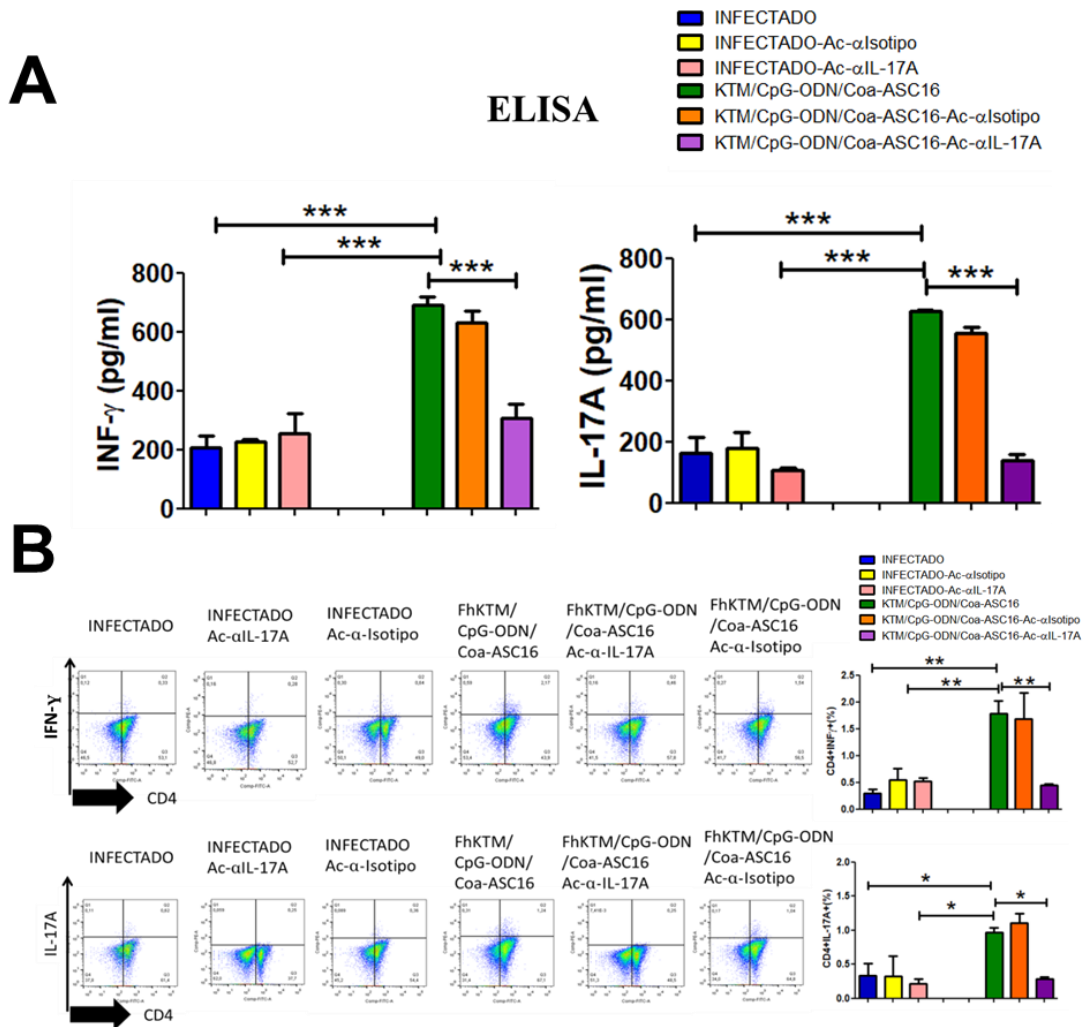


FIGURA 25. La administración de un anticuerpo α -IL-17A disminuye la liberación de INF- γ en esplenocitos de ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los ratones se administraron con anticuerpo α -IL-17A y el correspondiente control de isotipo (250 μ g i.p) 2 días antes y después de las infecciones. Tanto la secreción de IL-17A como la de INF- γ se evaluaron en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos mediante (A) ELISA y las poblaciones se determinaron por intermedio de (B) CITOMETRIA DE FLUJO. Los gráficos son representativos de 2-3 replicados. Las barras representan la media \pm DE correspondiente. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el test de ANOVA-Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La neutralización de IL-17A reduce los niveles de IgG2a e IgA en los ratones tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16

En vistas de la actividad sinérgica entre IFN- γ e IL-17A y los estudios que sugieren que IL-17A es una citoquina que permite un mayor traspaso de IgA hacia el lumen intestinal (107, 112), y que IFN- γ favorece la secreción de anticuerpos de tipo Th1 tal como IgG2a (113, 114), decidimos analizar cómo se encontraban los títulos de anticuerpos en aquellos ratones que recibieron el tratamiento con anticuerpos α -IL-17A.

Con este fin, se realizaron las extracciones de sangre y recolección de materia fecal a 4 dpi determinándose los títulos de IgG1, IgG2a e IgA. Los niveles de anticuerpos IgA tanto en suero como en extractos fecales de animales FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 se vieron afectados por la ausencia de IL-17A en comparación con los grupos que solo recibieron tratamiento con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Figura 26). Los mismos resultados fueron observados para los títulos de IgG2a en suero, mientras que en el caso de IgG1 se vio una tendencia a disminuir, la que no resultó significativa entre los grupos (Figura 26).

Estos resultados sugieren una participación fundamental de IL-17A para la generación de una respuesta potente de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.

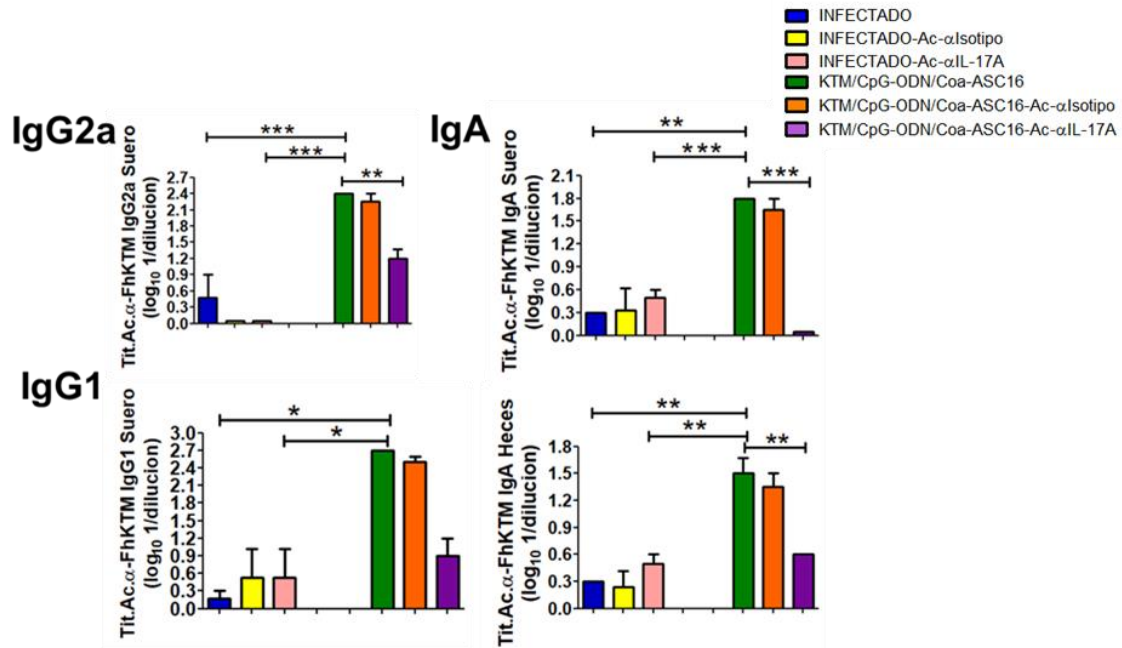


FIGURA 26. El bloqueo de IL-17A reduce la respuesta de anticuerpos específicos contra FhKTM en ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los ratones se trataron con anticuerpo α -IL-17A y el correspondiente control de isotipo (250 μ g i.p) 2 días antes y después de las infecciones. A los 25 días después de la primera inmunización, se obtuvieron muestras de suero y de heces, y se midieron los niveles de anticuerpos FhKTM mediante ELISA. Los títulos se detectaron por dilución de suero en serie y el límite se determinó como el doble del valor de la media del blanco. Pruebas de comparación múltiple ANOVA + Tukey unidireccional. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

El bloqueo de IL-17A disminuye la eficacia de la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 para proteger a los animales infectados con *F. hepatica*

Habiendo determinado que IL-17A es un factor clave para que la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 pueda generar una respuesta específica de anticuerpos y de IFN- γ , nuestro próximo propósito fue evaluar si la neutralización de IL-17A durante el proceso de vacunación disminuye la efectividad contra la infección con *F. hepatica*. Para ello utilizamos el mismo esquema experimental que usamos para la determinación de anticuerpos y citoquinas (Figura 15) pero en este caso determinamos la sobrevivencia de los animales. Los ratones que fueron tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 y luego recibieron los anticuerpos α -IL-17A comenzaron a morir mucho tiempo antes (19 dpi) que los demás controles, de forma sorprendente, antes que el grupo infectado o el grupo infectado y tratado con Acs. También se completó el experimento para ellos en un tiempo significativamente menor (22 dpi) (Figura 27). Los

Resultados

hígados de los ratones tratados fueron extraídos el día de su muerte, en caso de los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 fueron eutanizados para luego ser obtenidos, y se evaluaron las lesiones macroscópicas. La estructura superficial de los hígados de los ratones vacunados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 que recibieron las dosis de anticuerpos α -IL-17A se encontró afectada por una creciente fibrosis que llegó a transformar el parénquima de un lóbulo, también pudo observarse un anormal alargamiento de la vesícula biliar a lo que se suma un cambio de color a negro rojizo producto de hemorragia, luego de la ruptura de la misma se pudo encontrar gusanos de *F. hepatica* en el líquido vesicular. Por el contrario, el grupo inmunizado con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 no mostró lesiones ni cambios en el tamaño de sus hígados. Se resumieron los datos obtenidos asignando puntajes según el daño macroscópico en la extensión del hígado. (Figura 28)

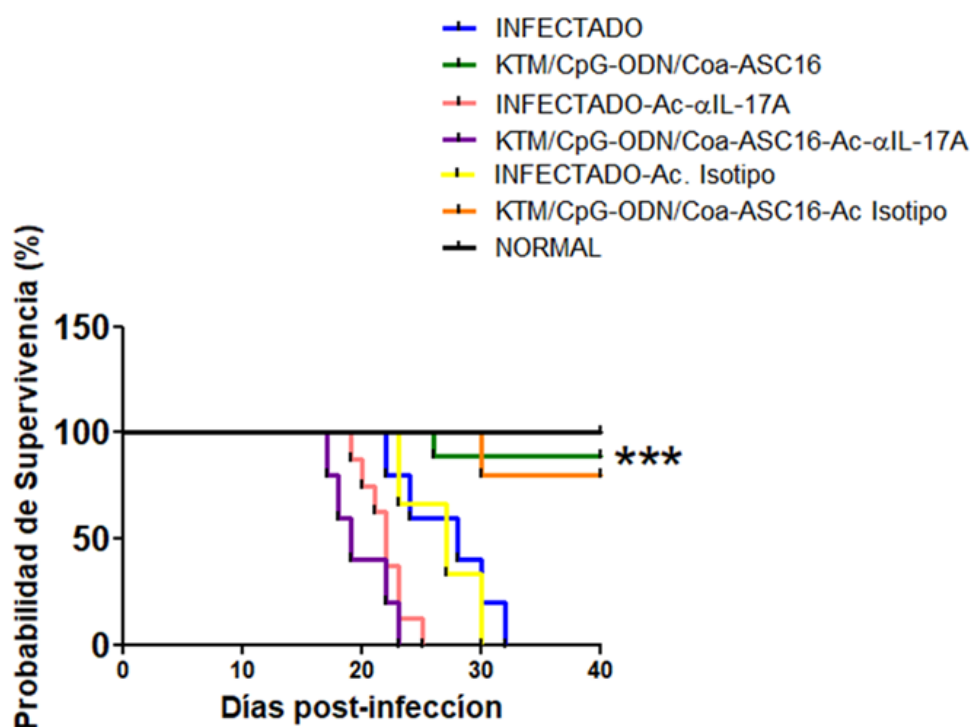


FIGURA 27. La neutralización de IL-17A disminuyó la eficacia de la vacuna FhKTM/CpG-ODN /Coa-ASC16. Los ratones fueron administrados con una dosis de anticuerpo α -IL-17A y el correspondiente control de isotipo (250 μ g i.p) 2 días antes y después de las infecciones. Los gráficos de Kaplan-Meier muestran curvas de supervivencia para los distintos grupos involucrados con un seguimiento que se extendió hasta el 40 dpi. Las diferencias estadísticas entre las curvas de supervivencia se calcularon mediante la prueba de Mantel-Cox. *** $p \leq 0.001$.

En conjunto estos datos sugieren que la generación de IL-17A en animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 es esencial para que se genere una respuesta inmune Th1-Th17 con altos títulos de anticuerpos específicos que son parte de los mecanismos de protección contra la infección con *F. hepatica*.

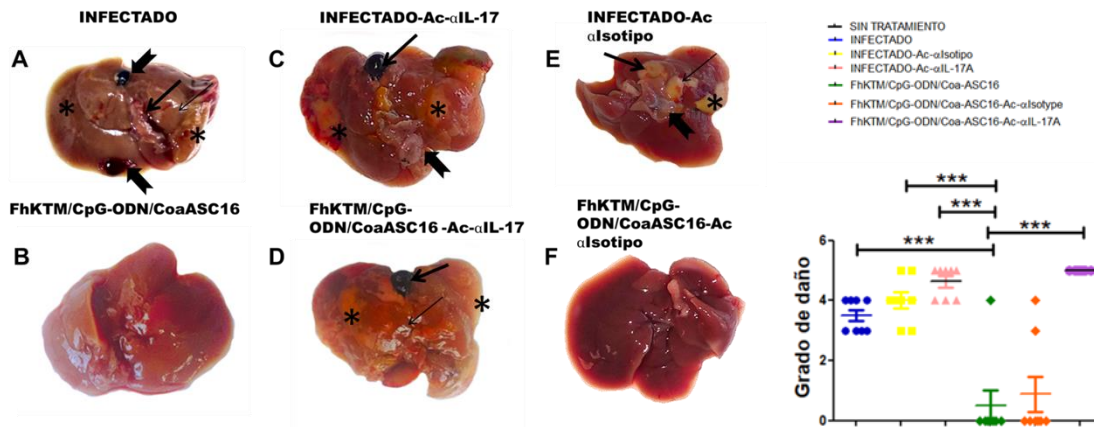


FIGURA 28. La neutralización de IL-17A disminuye la efectividad de la vacuna FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 contra la infección por *F. hepatica*. (A) INFECTADO, el hígado muestra un agrandamiento marcado por vesícula biliar distendida (flecha gruesa), áreas de extendidas de fibrosis (asteriscos) y larvas en la superficie del parénquima (flecha con muesca). (B) FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16: hígado que muestra tamaño normal sin lesiones observables (C) INFECTADO-Ac- α IL-17A: el hígado muestra un marcado daño macroscópico grave (flecha delgada) y presenta una superficie irregular que indica fibrosis hepática (asterisco) Se puede observar la presencia de larvas en la superficie (flecha con muesca). (D) FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16 -Ac- α IL-17A: el parénquima hepático está severamente reducido, firme y presenta una superficie irregular (flecha delgada) que indica fibrosis hepática (asterisco). Aspecto macroscópico anormal de la vesícula distendida con presencia de sangre en el interior (flecha gruesa) (E) INFECTADO-Ac- α Isotipo: el hígado es más pequeño que uno normal y presenta un tejido superficial irregular que indica hipertrofia (flecha delgada) y se reemplaza los hepatocitos por tejido conectivo (asterisco). Puede verse un gusano liberado después de la ruptura de la vesícula biliar (flecha con muesca). FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16-Ac- α Isotipo: hígado que no muestra una patología macroscópica aparente. En el lado derecho se resume el grado de daño presente en la extensión de los hígados analizados durante los experimentos de supervivencia. Los datos mostrados se agrupan a partir de dos experimentos independientes con un total de (n = 8-10 por grupo). Pruebas de comparación múltiple ANOVA + Tukey unidireccional. * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001

La actividad inhibitoria de Kunitz es neutralizada por factores presentes en el suero de ratones inmunizados con FhKTM / CpG-ODN / Coa-ASC16

La actividad de Kunitz está relacionada con la funcionalidad de la Catepsina L cisteína proteasas (CL) de *F. hepática* (75, 76). Por un lado, un anticuerpo monoclonal, MM3, utilizado para el diagnóstico de fasciolosis reconoce tanto FhCL1 como FhCL2 junto con FhKTM (77). Además, aunque FhKTM se definió clásicamente como inhibidor de la serina proteasa, también se describió como un regulador de cisteína proteasa (75, 76). Todos estos datos sugieren que FhKTM podría controlar la activación de las Catepsinas secretadas por parásitos, evitando injurias para sí mismos.

Se ha demostrado que FhCL3 tiene una importante actividad colagenolítica que podría facilitar la invasión del parásito juvenil a través de los tejidos del huésped (74, 115). Empleamos un ensayo basado en el uso de un sustrato fluorescente para medir la posible inhibición de la interacción entre FhKTM y FhCL3 por el suero de ratones inmunizados con FhKTM/CpG- ODN/Coa-ASC16.

Para probar si FhKTM inhibe la actividad enzimática de FhCL3, FhKTM se incubó con medio de cultivo que contenía FhCL3 y se controló la actividad enzimática usando un sustrato fluorogénico. FhKTM inhibió el 70% del total de la actividad de FhCL3 (Figura 29, líneas violetas vs rojas). En contraste, cuando se añadió suero de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 a la reacción, el porcentaje de inhibición dependiente de kunitz se redujo del 70% al 30% (Figura 29, líneas verdes frente a rojas). La adición de suero de animales del grupo SIN TRATAMIENTO no afectó la actividad de FhKTM, ya que todavía se observó un 66% de inhibición de la actividad enzimática de FhCL3 (Figura 29, líneas amarillas vs rojas). Estos resultados sugieren que factores del suero de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, presumiblemente anticuerpos, podría ser responsable de la neutralización de la actividad de FhKTM, permitiendo que FhCL3 esté libre de actividad de inhibición enzimática.

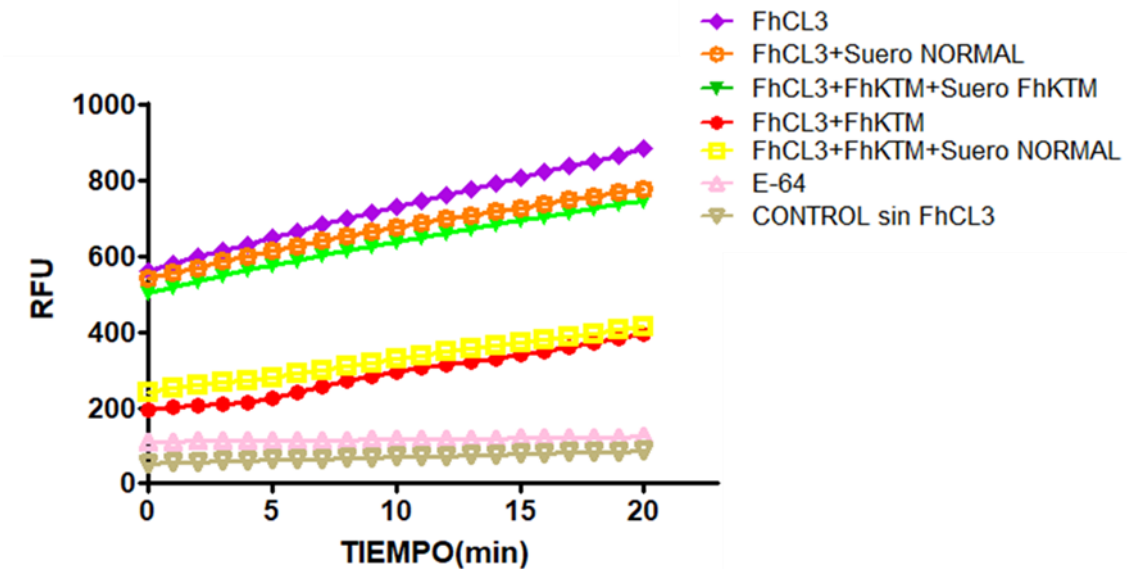


FIGURA 29. Factores del suero de ratones vacunados con FhKTM/CpG-ODN /Coa-ASC16 bloquea la actividad inhibidora de la cisteína proteasas de FhKTM in vitro. La actividad de cisteína proteasa de FhCL3 (presentada como unidad de fluorescencia relativa, RFU) en medios de cultivo RPMI 1640 medidos con el sustrato de péptido fluorogénico, TOS-GPR-AMC, en ausencia (púrpura) o presencia del inhibidor FhKTM (rojo). Se incluyó el pretratamiento con FhKTM con suero de ratones FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 inmunizados (verde) o suero del grupo SIN TRATAMIENTO (amarillo). E-64 es un inhibidor irreversible de la cisteína proteasa y se utilizó para desarrollar el control negativo. Los resultados son producto de 2 experimentos individuales con 3-4 repeticiones para cada curva.

Capítulo 5: DISCUSIÓN

Los países en vías de desarrollo son víctimas de los mayores problemas sanitarios provocados por helmintos. De acuerdo a informes de la OMS, tanto la economía como la salud pública sufren importantes consecuencias, con aproximadamente 2 mil millones de personas infectadas por uno o más de éste tipo de parásitos (9, 14, 23, 116). El potencial de transmisión de helmintos se asocia tanto a prácticas sanitarias deficientes como a la capacidad de sobrevivencia de estos parásitos en sus huéspedes, por su habilidad para manipular su sistema inmune. *F. hepatica* es un helminto de distribución mundial que afecta principalmente a la ganadería. En los últimos años, la fasciolosis ha sido incluida como una parasitosis tropical desatendida en ascenso con millones de personas en riesgo de infección (116, 117).

El Triclabendazol es capaz de eliminar en el ganado, los estadios juveniles del parásito a partir de la primera semana post-infección, y evitar así, la fase de migración intra-hepática que induce un daño permanente y obliga al descarte del hígado para consumo humano. Actualmente, el empleo de drogas fasciolicidas representan la principal estrategia utilizada en el control de dicha enfermedad. Sin embargo, algunas desventajas como la vida media corta en la sangre, los costos, recidivas en alimentos y el hecho que los animales no desarrollan inmunidad protectora por lo que se re-infectan fácilmente han sido junto con la aparición de resistencia, por su uso frecuente e indiscriminado, factores que promueven desarrollo de nuevas estrategias de inmunoprofilaxis contra la fasciolosis (29-31, 118-120). En este contexto la vacunación sería la opción más factible puesto que los nuevos fármacos necesitan altos costos de desarrollo, tiempo y requerimientos de alta exigencia para que se otorguen patentes (4, 33).

Debido a las complejas estrategias de modulación del sistema inmune del hospedero por el parásito, se ha dificultado el desarrollo de una vacuna, de hecho hasta la fecha no existen a nivel comercial vacunas disponibles contra *F. hepatica*. Esta situación representa un desafío que con las nuevas herramientas tecnológicas y el conocimiento adquirido de experiencias previas con inmunógenos podrían acelerar y permitir una nueva vacuna que permita la prevención de la infección y ayude a alargar la vida útil de los fármacos (31, 32, 121).

Los aspectos a tener en cuenta a la hora de estudiar el nivel de protección que confiere una vacuna son, entre otros: la especie, raza, y edad de los animales de laboratorio elegidos. En relación a la forma infectante, la dosis, la vía y protocolo de administración como también la virulencia deben ser ajustadas y reportadas para establecer las

condiciones del experimento. Por otra parte, el inmunógeno empleado: tipo de inmunógeno, número de dosis de inmunización aplicadas, intervalo entre ellas y vía de administración; tipo y concentración de adyuvantes utilizados; y la duración de la inmunidad.(122, 123)

Todos estos aspectos fueron abordados en nuestro estudio con el objetivo de generar una nueva estrategia de control que tenga por finalidad contribuir a la prevención de infecciones en el ganado en nuestra zona agraria. Además, a pesar de que varios antígenos han sido probados como vacunas prometedoras como candidatos en ratones, se logró una protección parcial con una leve mejoría de la supervivencia animal o daño hepático, lo cual resulta insuficiente para un nuevo paso en el desarrollo de una vacuna comercialmente viable para la producción ganadera (94, 124, 125). Por estas razones sigue siendo importante definir nuevos candidatos a vacunas y formulaciones adyuvantes eficientes en modelos murinos antes del examen de la capacidad protectora en huéspedes naturales como vacas u ovejas.

En este contexto se eligió un modelo murino, en el cual los ratones BALB/c que son susceptibles a la infección (102), recibieron tres dosis subcutáneas de nuestra formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 durante tres semanas. Una semana posterior a la última inmunización, los animales fueron infectados por vía oral con 6 metacercarias, que, según nuestros experimentos iniciales, permiten desarrollar la enfermedad con gusanos en el hígado a partir de 20 días post-infección.

La elección del adyuvante debe tener la misma consideración que el inmunógeno ya que la respuesta inmune, el transporte y en muchos casos, la protección del antígeno frente al medio ambiente permitirá que la vacuna resulte eficiente. (126). Estas características las reúne la plataforma CpG-ODN/Coa-ASC16, la nanoestructura de Coa-ASC16 tiene una cierta rigidez, que permite modular la liberación de moléculas en el medio biológico o proporcionar estabilidad a las moléculas cargadas (90, 92). Anteriormente, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que Coa-ASC16 genera una liberación sostenida de la proteína OVA y CpG-ODN y promueve la captación conjunta de estos por las CDs en nódulos linfáticos drenantes cercanos al sitio de inoculación. Coa-ASC16 ejerce un efecto protector evitando la degradación por proteasas del huésped del antígeno OVA y CpG-ODN. Este efecto permitiría mejorar la capacidad intrínseca del adyuvante CpG-ODN prolongando su degradación, lo que favorecería la generación de una respuesta inmune de tipo Th1 (90-92). Estas ventajas podrían haberse reiterado en la formulación usada en el presente trabajo ya que la inmunización con el antígeno FhKTM indujo una

robusta respuesta inmune humoral y celular específica, con un incremento marcado de la secreción de IFN- γ en distintos órganos de los animales inmunizados

Las dificultades presentadas por las formulaciones probadas inicialmente que utilizaban componentes o subunidades de proteínas del parásito, como así también los inconvenientes en la producción y purificación de vacunas recombinantes, nos ha llevado a desarrollar nuestra propuesta contemplando una nueva alternativa tecnológica, que es la utilización de un péptido sintético (127, 128). En los últimos años, los péptidos han sido considerados para distintos ensayos de vacunación en humanos debido al proceso de producción simple y rentable en comparación con otros sistemas tradicionales (129). Se encuentran en desarrollo múltiples vacunas peptídicas adecuadas para la administración humana, incluidas las vacunas terapéuticas contra el cáncer y los nuevos proyectos contra distintas enfermedades infecciosas humanas (130, 131). La producción de los péptidos en síntesis en fase sólida permite obtener un producto sin utilización excesiva de reactivos y sin presencia de contaminantes, con una estereoquímica de aminoácidos sin cambios debido al uso de grupos protectores durante el proceso (132). Otro aspecto interesante es que los péptidos pueden provocar respuestas inmunitarias específicas, evitando en consecuencia secuencias alérgicas y/o reatogénicas (133-135).

La decisión de utilizar el inhibidor de proteasas FhKTM como inmunógeno estuvo basada por un lado en las funciones vitales que se le atribuyen durante todo el ciclo de desarrollo de *F. hepatica*, como son la de participar en la alimentación, la protección del parásito a través de la regulación de las principales proteasas secretadas por el parásito y/o provenientes del huésped (75, 76, 79, 136, 137). Por otra parte, existen antecedentes de la utilización de proteínas tipo kunitz de otros agentes infecciosos en la generación de vacunas, como los recombinantes de inhibidores de proteasas con dominios tipo kunitz TgPI-1, Omp-19 y AceKI, lo que fueron capaces de inducir niveles de protección significativos en modelos murinos de infecciones por *T. gondii*, *B. abortus* y *A. ceylanicum*, respectivamente (81, 138-141).

Las tres etapas del ciclo de *F. hepatica* donde se ha propuesto como los momentos claves en donde se puede desarrollar una respuesta inmune efectiva, revirtiendo la modulación generada por el parásito son: el pasaje por intestino, el peritoneo y la superficie y el parénquima hepático. Todos estos sitios comparten la migración de la larva juvenil y la liberación de proteasas, ya sea luego del desenquistamiento en el intestino donde atraviesa la pared del duodeno hacia el peritoneo y al final de su

recorrido donde nuevamente la secreción de sus enzimas son esenciales para disgregar la cápsula del hígado llegando al parénquima (4, 33, 57). Se determinó que en estas etapas críticas en el desarrollo del ciclo evolutivo del parásito existe una alta expresión de inhibidores de proteasas tal como FhKTM, por lo que se consideraron estos sitios como puntos claves a analizar la respuesta inmune (73, 76, 142, 143)

En el presente trabajo, se pudo observar en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, que los gusanos no lograban llegar al hígado ya que tanto los estudios macroscópicos como microscópicos a 24 dpi no mostraron las lesiones características provocadas por el paso migratorio del parásito, como tampoco la presencia de los mismos como ocurrió en los animales solo infectados o que solo recibieron dosis del adyuvante. Otro parámetro utilizado que reflejó el estado del hígado de los animales fue la determinación de las transaminasas hepáticas que permiten evaluar la situación en la que se encuentra el hepatocito (96). Como era esperable ambas transaminasas (AST-ALT) mostraron una concentración en el suero de los ratones FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 similar a los niveles encontrados en los animales SIN TRATAMIENTO. Estos parámetros funcionan tanto para evaluar la conservación de la estructura hepática como la efectividad de la vacunación, dado que cuando los experimentos son realizados, en etapas tempranas de la infección, la larva no ha madurado en la vesícula biliar por lo que el conteo de huevos y gusanos son difícilmente realizables y no sería preciso para la evaluación general de la vacuna. Aun así, pudimos evaluar también la eficacia del tratamiento con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mediante un ensayo de supervivencia, en donde se observó que los animales inmunizados con formulación propuesta lograban un mayor grado de supervivencia frente a la infección con respecto a otros grupos control.

Existen solo unas pocas vacunas aprobadas en el mercado para la prevención de infecciones por parásitos helmintos en ganado, entre la que se destaca la formulación Providean Hidatil EG95 contra *Echinococcus granulosus* con aplicación en países latinoamericanos en cabras y ovejas. Las dificultades para la obtención de material de los parásitos en ciertas etapas de su ciclo, en conjunto con su capacidad inmunomoduladora han sido los desafíos más complejos para el desarrollo de una vacuna contra infecciones por helmintos (32, 57). Los antecedentes en el caso de *F. hepatica* se remontan a la utilización de metacercarias atenuadas con radiación, los que no mostraron la generación de resistencia a la infección cuando se utilizaron en ganado vacuno (4, 57). Con los avances de nuevas tecnologías se lograron aislar distintas

proteínas nativas que formaron parte de primeras experiencias, como el caso de la proteasa Catepsina L, Glutación S-transferasa (GST) and Proteína transportadora de ácidos grasos (FABP). Estas proteínas fueron capaces de inducir protección en el ganado vacuno y ovino, aunque no en los niveles necesarios como para considerarlos como antígenos para el inicio de un desarrollo comercial (4, 57). La importancia de estos resultados está dada por la caracterización de una respuesta inmune asociada a la protección y que se destaca por una respuesta humoral mixta de perfil Th1-Th2 y una elevada reacción inmune con una importante participación de la citoquina IFN- γ (33, 93).

A través del estudio de los cambios en la expresión de genes en ovejas infectadas con *F. hepatica* se obtuvo información importante sobre los mecanismos moleculares involucrados en cambios fisiológicos y patológicos del huésped. Durante la infección se ha demostrado el predominio de una respuesta inmune Th2 y supresión de respuestas Th1/Th17. Con respecto a esto último, *F. hepatica* puede inhibir la diferenciación y la estabilidad de las células Th17 con disminución de niveles de expresión de genes asociados a IL-17 (95). La relación entre una respuesta inmune protectora con la producción de IL-17 ha sido poco descrita en fasciolosis aunque se especula que su inhibición beneficia la supervivencia del parásito dentro del huésped. Existe un reporte que demuestra que el uso de péptidos sintéticos derivados de *F. hepatica* en un ensayo de vacunación en ratones, genera ciertos niveles de protección a través de la estimulación en la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-17 (94). En otras infecciones por helmintos como *Schistosoma haematobium* y *Echinostoma caproni*, las citoquinas relacionadas con Th17 (IL-17, IL-21 e IL-23) se asociaron con protección contra la reinfección/infección de estos parásitos respectivamente (144, 145). Estos resultados se correlacionan con lo observado en nuestro modelo en donde la elevada producción de anticuerpos específicos IgG1-IgG2a, en conjunto con la alta concentración tanto de IFN- γ como IL-17A se asocia con la protección encontrada en la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16

A los altos títulos de IgG1-IgG2a encontrados en suero, se podría agregar la detección de anticuerpos específicos de tipo IgA tanto en suero como en materia fecal. Aunque la obtención de estos títulos fue inesperada, teniendo en cuenta el modo de inoculación subcutáneo, realizamos la determinación de IgA por ser el intestino uno de los lugares donde se puede realizar la expulsión de la larva. Otros parásitos intestinales suelen ser eliminados por medio de la intervención de anticuerpos de este tipo a nivel del intestino

delgado en su fase larval evitando que llegue a su estadio adulto en el tejido (146). Un ejemplo es el caso de nematodos complejos como *Trichinella spiralis* en el que también puede disminuir la fecundidad de las hembras adultas *in-vitro* o protozoos monocelulares como *Giardia*, en la cual se ha demostrado que ratones deficientes en IgA no pueden erradicar la infección (103, 147-149). Además, se ha observado que la presencia de IgA en la superficie de la mucosa intestinal ayuda a neutralizar las enzimas metabólicas digestivas liberadas por *Strongyloides* interfiriendo con la capacidad del gusano para alimentarse (146).

Por otra parte, se ha demostrado que diferentes sistemas de administración de las vacunas influyen en el perfil de las respuestas inmunes generadas. En nuestro sistema experimental la respuesta específica y sistémica de IgA fue un hallazgo inesperado, el cual estuvo refrendado por datos de la bibliografía que postulan diferentes hipótesis para la generación de IgA a partir de inmunizaciones parenterales (150, 151). Una de ellas propone que el inmunógeno es capturado por las células presentadoras de antígenos locales, cercanas al sitio de inoculación, para luego transportarse a sitios de la mucosa donde los antígenos serán presentados a las células T. Por otro lado, la otra hipótesis plantea que el antígeno se presenta periféricamente a las células T y B naive que luego de la activación migran a los compartimientos de la mucosa para realizar la generación de una amplia respuesta inmune local (152). Nuestros resultados sugieren la activación local en un inicio, ya que observamos un incremento del tamaño de los ILNs cercanos a los sitios de inoculación y las células de dichos órganos linfáticos fueron capaces de incrementar la secreción de citoquinas IFN- γ e IL-17A luego de dos inmunizaciones previo a la infección.

Un reporte que avala estas ideas es aquel relacionado con la inmunización intramuscular con toxoide tetánico que produce un aumento IgA en la mucosa intestinal de ratones BALB/c (153, 154). Otro importante antecedente corresponde a la generación de anticuerpos neutralizantes IgG e IgA contra *Haemophilus influenzae* a nivel de la saliva y secreciones vaginales por la inmunización subcutánea con antígenos cápsulares en conjunto con vitamina D3 y toxina diftérica (155). Por otra parte, se demostró que la inmunización en monos con proteínas de membranas de *Chlamydia trachomatis* desarrolla una respuesta específica de tipo IgG e IgA en materia fecal, saliva, secreciones vaginales y lágrimas (156, 157). A través de estos hallazgos y de nuestros datos podríamos concluir que la inmunización parenteral con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce anticuerpos específicos IgA que podrían ser protectores, sugiriendo que

FhKTM presenta una fuerte inmunogenicidad. También se sugiere que la inclusión de CpG-ODN en la formulación podría ayudar a la generación de anticuerpos IgA, ya que se ha visto que, en modelos con OVA, este adyuvante puede inducir una respuesta inmune específica con mayor producción de anticuerpos IgA en mucosa e IgG sistémica (158).

En relación a los anticuerpos IgG1-IgG2a no hay una descripción clara de cuál es el mecanismo utilizado por estos anticuerpos en los reportes de vacunas que causan algún grado de protección contra *F. hepatica*. El abordaje, en general, refiere a la presencia o ausencia de los mismos en correlación con la eficacia de la inmunización (4, 57). Una posible explicación mecanística para la participación de anticuerpos fue la dada por Piedrafita y col., quienes investigaron la posible eliminación del parásito a través de un mecanismo que involucra la ADCC. En este caso se demostró en estudios *in vitro* que las larvas juveniles en presencia de células peritoneales y suero de ratas infectadas perdían movilidad lo que se atribuía a la muerte de las mismas. Se pudo observar en este trabajo el acumulo de células pegadas al tegumento concomitante con el aumento de ON en el sobrenadante del cultivo (43). Si bien esto fue probado en ensayos *in vitro*, este mecanismo podría ocurrir en peritoneo, uno de los lugares planteados como posible microambiente para que actué la respuesta inmune producida por la vacunación, por lo que nos resultó pertinente evaluar como afectaba la inmunización en este sitio 4 dpi, ya que se ajusta a los tiempos que tardaría el parásito en migrar desde el intestino hasta la cápsula del hígado.

En etapas tempranas de la infección con *F. hepatica* se ha reportado el reclutamiento de eosinófilos, células dendríticas y mastocitos al peritoneo, tanto en modelos experimentales en rata como en ovejas (33). Se le ha asignado en anteriores estudios en vacunas un rol protector a los eosinófilos pero no ha sido descrito el mecanismo por el cual mediarían esta función (33, 42, 159). El análisis de las poblaciones reclutadas al peritoneo luego de la inmunización por FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostró una disminución del porcentaje de eosinófilos en comparación con los animales del grupo INFECTADO. Ratones deficientes en eosinófilos mostraron resistencia a la infección con *N. brasiliensis*, *T. spiralis*, *T. muris* o *S. mansoni* demostrando que su presencia no es estrictamente necesaria en el proceso de expulsión de gusanos (160-163). Estudios previos ya han reportado eosinofilia sistémica baja en huéspedes con cierto nivel de protección contra *F. hepatica* (18, 63). La ausencia de eosinofilia, encontrada comúnmente en las infecciones con helmintos, está asociada a una rápida respuesta por

parte huésped eliminando el establecimiento del parásito (164). Esta respuesta de Tipo Th1 desarrollada antes de la infección, impide el reclutamiento de eosinófilos, quienes se ha reportado en parasitosis extraintestinales participan en el establecimiento de la infección al promover recursos esenciales que apoyan el crecimiento de parásitos y previenen una respuesta inmune tóxica como la producción de ON, y la secreción de citoquinas IL-10 e IL-4 (164-166). Estas citoquinas se encuentran disminuidas en los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.

En el mismo sentido a pesar de la alta concentración de IL-17A en el lavado peritoneal, el reclutamiento de neutrófilos no fue observado en la cavidad peritoneal de los animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. Es reconocida la relación que existe entre la actividad de IL-17 y los neutrófilos, aunque estas células suelen promover respuestas de tipo Th2 en helmintos como *N. brasiliensis* (167). En nuestro caso la función de IL-17 parece ser independiente de la presencia de neutrófilos tal como se ha visto en infecciones fúngicas por *C. albicans* en las cuales IL-17 desarrolla un rol protector desacoplado de la presencia de neutrófilos en la mucosa oral (168, 169). Es importante destacar que la presencia de IFN- γ en el peritoneo, también podría afectar el reclutamiento de neutrófilos o su supervivencia, este fenómeno puede ocurrir a través de la modulación de moléculas de adhesión y quimiocinas aun en presencia de IL-17 (170, 171).

Dentro de las poblaciones celulares observadas en el peritoneo de los ratones inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 se observó sólo un incremento de macrófagos. Entre las funciones de IL-17, se encuentra la inducción de la producción de quimiocinas que permiten el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de la infección (111, 172-176). En el caso de IFN- γ se ha visto que estimula directamente la generación de monocitos al inducir la expresión de reguladores específicos de linaje de mielopoiesis y suprime la producción de neutrófilos al perturbar la señalización mediada por G-CSF (170, 175). La secreción mejorada de quimiocinas, como IL-8 y MCP-1, se demostró cuando las células se estimularon tanto con IFN- γ como con IL-17 (177, 178). Esta combinación de IFN- γ e IL-17 también podría generar una mayor actividad de unión a NF- κ B (175, 176). En este contexto, la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce un incremento en el microambiente peritoneal de citoquinas como IL-6, IFN- γ , TNF e IL-17A, que podrían modular la activación de macrófagos evitando la activación alternativa por los productos de secreción-excreción del parásito. El perfil Th1-Th17, que se genera durante la vacunación, se asocia a

respuestas protectoras previas a la infección contra la fasciolosis (4, 33). De igual forma este perfil de citoquinas se repite en relación a otros órganos analizados como es el caso del bazo, los MLN, ILN y PPs

Estudiando el estado de activación de las células peritoneales de los animales inmunizados FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 observamos una mayor expresión de las moléculas del MHC II, como así también un incremento en los niveles de ON en los sobrenadantes de cultivos de estas células. Ambos componentes, en conjunto con el aumento del número de macrófagos y de los títulos de anticuerpos en suero, propiciarían la generación de mecanismos de ADCC (42, 43). La alta concentración de anticuerpos específicos en sangre tanto de IgGs como IgA serían fundamentales en este proceso de citotoxicidad. También se podrían considerar los anticuerpos IgA provenientes de la localización intestinal puesto que como se ha visto en modelos de infección de *Trichinella*, estos anticuerpos pueden terminar derivando hacia el peritoneo donde actúan por un mecanismo de ADCC provocando la muerte de la larva (179-181). Por otra parte, se podría establecer una comparación entre la capacidad de depósito del adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16 con la capacidad de desarrollo de respuesta inmune del vector adenovirus, ya que la inmunización con este último genera una respuesta protectora sistémica y en la mucosa intestinal que se caracteriza por la presencia de células T productoras de IL-17 específicas del antígeno, que migran desde los ILN hasta el intestino (182, 183). En el caso de los sobrenadantes de esplenocitos fue detectada también una concentración de IL-5 similar a la del grupo infectado. La detección de esta citoquina podría asociarse a la presencia de una considerable concentración de anticuerpos de tipo IgG1, relacionados a un perfil de citoquinas Th2. De acuerdo con estos resultados, trabajos de otros autores han correlacionado un perfil mixto de anticuerpos con la protección contra este parásito (4, 33, 57).

La presencia de IL-17A e IFN- γ en sobrenadantes de cultivos en células de MLN y PPs serían relevantes en intestino durante las fases migratorias tempranas del parásito, ya que como fue reportado previamente es un sitio clave para la generación de una respuesta inmune inicial protectora contra el patógeno (4, 37, 184). La producción de IL-17A se ha postulado que está relacionada con los niveles de IgA secretados tanto en homeostasis como en distintos modelos de infecciones en el intestino (107, 149, 185). Se ha probado que en ratones IL-17A^{-/-} se encuentra disminuida la secreción de IgA en mucosas (112, 186, 187).

De acuerdo a nuestros hallazgos podemos suponer que la producción de IgA en este modelo experimental podría seguir los siguientes pasos: luego de la inmunización subcutánea ocurriría la migración de células T específicas de antígenos productores de IL-17 desde los ILN hacia el intestino, o bien células T y B que migran llevando el antígeno procesado hacia los órganos linfáticos asociados a mucosas. Una vez que el antígeno es procesado en los ganglios mesentérico, los centros germinales son activados generando células Th17 productoras de IL-17A que llegarán a las PPs, Aquí las células Th17 pierden su función secretora para inducir el switching de anticuerpos hacia el isotipo de IgA. La citoquina IL-17A en el ambiente intestinal sería responsable del traspaso de la IgA producida hacia el lumen a través de la generación de receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR), como así también podría mejorar la retención de células B en los centros germinales lo que aumentaría la posibilidad de producción de anticuerpos IgA de alta afinidad en las PPs (112, 176, 188). La producción de IL-17 también permitiría incrementar y mantener el número de células productoras de IL-17 por ejemplo células T CD4+. En nuestro caso no pudimos determinar la fuente de IL-17A en estos órganos, pero de acuerdo a las concentraciones y las poblaciones determinadas en otros sitios como el bazo (tanto CD4+ como CD4- resultaron productoras de IL-17), podríamos asociarlo a las células Th17 pudiendo aplicar el modelo propuesto por Hirota y Col. (107) Otros factores que pudieron determinarse en el presente trabajo y han sido reportados como señales que permiten la promoción de la producción de IgA fueron (IL-6) y ON en lavado peritoneal (172, 173, 176).

Es conocido que IL-17 puede participar en mecanismos de respuestas contra diferentes microorganismos ya sea generando memoria inmunológica mediada por células T a largo plazo o modular la secreción IFN- γ para prevenir enfermedades parasitarias provocadas por *Toxoplasma gondii* y *Eimeria falciformis*. En estos últimos casos no se conoce como se realiza este proceso, pero se encontró que los ratones infectados deficientes de IL-17 muestran una mayor mortalidad en comparación con los ratones con niveles normales de IL-17 (144, 145).

Para evaluar la importancia de IL-17A encontrada en nuestro modelo se utilizaron anticuerpos neutralizantes anti-IL-17A. El bloqueo de IL-17A producida durante la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 disminuyó la eficacia de la vacuna. Los animales infectados con *F. hepatica* que recibieron el tratamiento bloqueante para IL-17A murieron antes que aquellos que solo fueron infectados, demostrando la importancia de la respuesta de IL-17A para contener la infección. Estos resultados

podrían relacionarse a aquellos que muestran que ovejas infectadas con *F. hepatica* presentan una inhibición en la diferenciación y la estabilidad de las células Th17, disminuyendo la producción de IL-17 y sugiriendo que esta citoquina juega un papel importante en la protección contra *F. hepatica* (95).

En el presente trabajo, nuestros experimentos corroboran que la ausencia de IL-17A conllevaba a la disminución de la generación de anticuerpos IgG2a e IgA, a lo que se suma también una disminución significativa de la concentración de IFN- γ . Estos datos sugieren que IL-17A se requiere para la secreción óptima de IgA, así como sucede en giardiasis donde IL-17A modula el mecanismo efector de la defensa anti-giardial mediado por la IgA secretoria en el intestino (103, 149). Con respecto a la producción disminuida de IFN- γ , al igual que en nuestro modelo, se ha observado una reducción de la expresión de IFN- γ de ratones con IL-17A^{-/-} e IL-17RA^{-/-} y el incremento de las respuestas de IFN- γ en ratones IL-17A^{-/-} e IL-23a^{-/-} tratados con IL-17A exógena. Existen numerosas referencias que respaldan la idea de un efecto sinérgico entre IFN- γ e IL-17A (110, 176, 189, 190). Estudios previos han mostrado que IL-17A induce la producción de IL-12 en macrófagos peritoneales (191), del mismo modo, se ha definido que IL-17A puede estimular respuestas de células Th1 a través de la inducción de IL-12 (110, 192). En conjunto, podemos hipotetizar que la IL-17A generada por la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 es necesaria para la generación de IFN- γ y que ambas citoquinas serán responsables de generar un mecanismo que elimine al parásito.

En otros aspectos, nos interesó investigar la participación de factores del suero, como podrían ser los anticuerpos, en la neutralización de la actividad inhibitoria de FhKTM. La hipótesis se basó en que la pérdida de la inhibición de las enzimas proteasas, tanto liberadas por el huésped como del propio parásito, podría resultar deletérea para el tegumento de la larva juvenil, puesto que su actividad enzimática no sería controlada por el inhibidor de proteasas FhKTM, quedando expuesta a este ambiente hostil.

Los resultados de los cultivos *in vitro* de la enzima FhCL3 con FhKTM en presencia o ausencia de suero inmune mostró que, el tratamiento previo de FhKTM con el suero de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 afecta la función inhibitoria puesto que FhCL3 generaba su acción proteolítica sobre el sustrato fluorescente. Por el contrario, cuando se incubaba sin el suero inmune o se hacía con suero proveniente de ratones del grupo SIN TRATAMIENTO, la fluorescencia disminuía por la acción de inhibitoria de FhKTM sobre FhCL3. Estos resultados sugieren que factores del suero de animales inmunizados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 estarían interfiriendo en la

acción enzimática de FhKTM y que podría tratarse de los anticuerpos específicos, ya que los factores de los sueros de los otros grupos no interfirieron en la interacción FhKTM-FhCL3. Aun sin haber detectado si los anticuerpos efectivamente serían los responsables de bloquear la acción inhibitoria de FhKTM, podríamos hipotetizar la participación de los mismos en los mecanismos de la vacuna FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16, que, sumado a la generación de una rápida respuesta inmune específica, participarían en conjunto en la eliminación de *F. hepatica* antes de que la larva migrante juvenil llegue al hígado.

Los resultados soportan las ideas previas que proyectábamos con respecto a la participación del adyuvante, ya sea mediante la protección y transporte del péptido como su papel de agente inmunoestimulante en la inducción de una respuesta tipo Th1-Th17, pudiendo complementar la reacción específica. Así como en otros trabajos en los que se utilizó el adyuvante incompleto/completo de Freund (FIA/FCA) (4, 33, 57), el grupo CpG-ODN/Coa-ASC16 mostró un background de protección con aumento de los días de sobrevivencia de algunos de los ratones evaluados en comparación con los infectados, que puede asociarse a sus propiedades inmunoestimuladoras.

Esta nueva estrategia adyuvante puede ser un punto clave en la capacidad protectora de la formulación, ya que los antecedentes previos en donde usaron FhCL1/FhHb como antígenos y AFI, conocido por la inducción de una potente respuesta inmune de tipo Th1, no pudieron generar un grado significativo de protección. La utilización de hidróxido de aluminio, el cual está admitido para el uso en humanos y animales, también mostró una pobre capacidad adyuvante para establecer una respuesta protectora (33). Los estudios para conocer los mecanismos involucrados con la actividad de CpG-ODN/Coa-ASC16, han propuesto que, en caso de la utilización de OVA como antígeno y utilizando un esquema experimental conformado por una dosis, se obtienen iguales resultados a los propuestos con tres dosis. Este efecto de depósito *in vivo*, hace posible reducir la dosis y/o la cantidad de inmunizaciones requeridas para una respuesta óptima, lo que en un futuro permitiría reducir los costos de producción y la accesibilidad-comodidad al personal encargado de administrarlo (91).

Podemos resaltar que en este trabajo se pudo avanzar con resultados prometedores en el planteo de una nueva herramienta para prevenir la fasciolosis, considerando que los distintos intentos previos tuvieron porcentajes de protección por debajo de los recomendados para avanzar en una nueva etapa de desarrollo de vacunas o adaptar los modelos a otros animales. También es importante destacar que hasta el momento,

ningún reporte previo de desarrollo de vacunas contra *F. hepatica* había sido efectivo en evitar la llegada del parásito al hígado de los animales infectados mientras que nuestros datos muestran que los animales vacunados FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 mantienen la estructura hepática conservada (4, 33, 57).

Debido a los reportes provenientes de distintos puntos de la provincia, en los que los productores informan importantes disminuciones en la producción ganadera debido a los decesos provocados por las hiperinfecciones, que provocan cuadros agudos de fasciolosis (6), hemos comenzado a implementar un modelo de vacunación en ovejas con resultados preliminares prometedores. Con la adaptación de la enfermedad a nuevos climas y la creciente demanda mundial de alimento debido al crecimiento de la población, es claramente un nuevo paso poder validar los resultados expuestos en la presente tesis en un nuevo modelo más avanzado y de impacto directo en la industria ganadera local (33).

El análisis de las respuestas inmunes desarrolladas durante la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 muestra perfiles de anticuerpos y citoquinas que anteriormente habían sido asociadas a procesos efectivos para eliminar la infección por *F. hepatica*, aunque también se vieron novedosos sucesos como la respuesta IgA específica y la importante participación de IL-17A para el desarrollo de protección.

En resumen, hemos generado un nuevo aporte hacia el desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica* que debido a las condiciones ambientales y la manipulación indebida de los antiparasitarios en el ganado se hace cada vez más necesaria, y a su vez, permitiría plantearse tanto la disminución de la contaminación en los alimentos por trazas de medicamentos como acercarse a la posibilidad de erradicación de la enfermedad con el tiempo a través de este nuevo protocolo de cuidado.

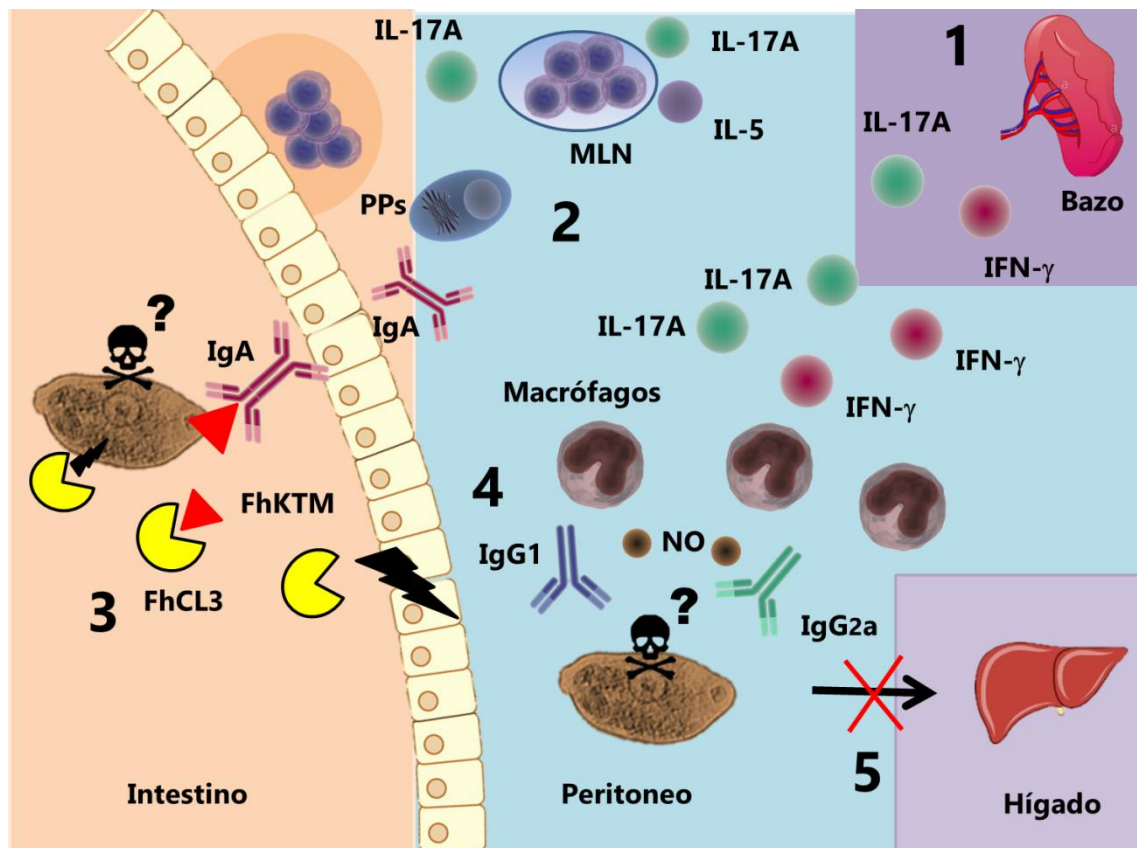


FIGURA 31: Mecanismos propuestos involucrados en la protección por la inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16. (1) La inmunización con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce la producción de citoquinas, especialmente IFN- γ e IL-17A, en el bazo y en ILN. Las células T, B y CD cercanas al sitio de inoculación podrían reconocer al antígeno FhKTM y transportarlo a los tejidos inmunes cercanos al intestino (2) Tanto en MLN como en PPs se genera una respuesta de citoquinas IFN- γ e IL-17A. El aumento de IL-17A posibilitaría el traspaso de los anticuerpos IgA hacia lumen intestinal desde las PPs ya que encontramos elevados los niveles de anticuerpos específicos IgA en materia fecal (3) En el intestino, IgA podría inhibir la función de FhKTM que bloquea la actividad de cistein-proteasas como FhCL3, exponiendo a la NEJ a las enzimas proteolíticas propias o del huésped. También podrían formar parte de esta función los anticuerpos IgG1-IgG2a. (4) En el caso que la larva migrante tenga la posibilidad de atravesar la pared del intestino llegando al peritoneo, los macrófagos reclutados en un ambiente peritoneal dominado por un perfil de respuesta inmune Th1 podrían, en conjunto con los anticuerpos específicos IgG1-IgG2a y el óxido nítrico detectado en los sobrenadantes peritoneales, eliminar al parásito (5) En consecuencia tanto los mecanismos propuestos en el intestino como el peritoneo impedirían la llegada del gusano al hígado.

CONCLUSIONES

- La vacunación con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue efectiva para prevenir el daño hepático en ratones infectados con *Fasciola hepatica*
- La vacuna propuesta provoca una respuesta de anticuerpos IgG1-IgG2a robusta y específica, que se mantiene con el tiempo.
- El tratamiento con FhKTM /CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo un aumento de la producción de anticuerpos IgA en la mucosa y a nivel sistémico.
- Se observaron altas concentraciones de citoquinas IL-17A-IFN- γ a nivel sistémico (ILN, MLNs, PPs y bazo), a cortos tiempos post-infección que son mantenidos durante 25 días.
- La administración de FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 promueve el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal y la producción de IL-5, IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17A en la zona.
- Las células peritoneales se encuentran activadas y producen óxido nítrico en los animales tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.
- El bloqueo de IL-17A disminuye la producción de anticuerpos IgG2a e IgA, como así también la de IFN- γ en ratones tratados con FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16.
- La eficacia de la prevención de la vacunación con FhKTM/CpG-ODN/ Coa-ASC16 en ratones es dependiente de la presencia de IL17A.
- La inmunización con FhKTM /CpG-ODN/Coa-ASC16 genera factores en el suero, posiblemente anticuerpos específicos, que actúan neutralizando la actividad enzimática del péptido FhKTM.
- El grado de protección inducido por la formulación FhKTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 contra fasciolosis en el modelo murino genera grandes perspectivas para su validación en el ganado ovino y/o bovino.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral

Silvane L, Celas DP, Romagnoli PA, Maletto BA, Sanchez Vallecillo MF, Chiapello LS, Palma SD, Allemandi DA, Sanabria RE, Pruzzo CI, Motrán CC and Cervi L. A Vaccine Based on Kunitz-Type Molecule Confers Protection Against *Fasciola hepatica* Challenge by Inducing IFN- γ and Antibody Immune Responses through IL-17A production. *Frontiers in Immunology*. 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.02087

Celas DP, Corvo I, **Silvane L**, Tort JF, Chiapello LS, Fresno M, Arranz A, Motrán CC and Cervi L Cathepsin L3 from *Fasciola hepatica* Induces NLRP3 Inflammasome Alternative Activation in Murine Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019 March 22;10 (552).

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

BIBLIOGRAFIA

1. Shimalov V V SVT. Findings of *Fasciola hepatica*, Linnaeus 1758, in wild animals in Belorussian Polesye. *Parasitol Res.* 2000;86: 342. .
2. L.S. SGDyR. *Foundations of parasitology.* 1977;MOSBY Co, pp 604.
3. S. A. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: J.P. D, editor. *Fasciolosis.* CABI Publishing 1999. p. 1–29.
4. 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;208(1-2):101-11.
5. 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.* 69: Academic Press; 2009. p. 41-146.
6. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International journal for parasitology.* 2005;35(11-12):1255-78.
7. Cawdery MJ, Strickland KL, Conway A, Crowe PJ. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. *The British veterinary journal.* 1977;133(2):145-59.
8. Wolff K, Eckert J, Schneyter G, Lutz H. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goats. *Veterinary parasitology.* 1983;13(2):145-50.
9. Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS medicine.* 2015;12(12):e1001920.
10. Hotez PJ, Diemert D, Bacon KM, Beaumier C, Bethony JM, Bottazzi ME, et al. The Human Hookworm Vaccine. *Vaccine.* 2013;31 Suppl 2(Suppl 2):B227-32.
11. Sabourin E, Alda P, Vázquez A, Hurtrez-Boussès S, Vittecoq M. Impact of Human Activities on Fasciolosis Transmission. *Trends in parasitology.* 2018;34(10):891-903.
12. H.R. Q. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.* Noriega editoriales 2005:pp 876.
13. Miguel Cordero del Campillo FARV. *Parasitología veterinaria.* 2000.
14. Mera y Sierra R, Agramunt VH, Cuervo P, Mas-Coma S. Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasites & vectors.* 2011;4:104.
15. Fox NJ, Marion G, Davidson RS, White PC, Hutchings MR. Livestock Helminths in a Changing Climate: Approaches and Restrictions to Meaningful Predictions. *Animals : an open access journal from MDPI.* 2012;2(1):93-107.
16. Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary parasitology.* 2009;163(4):293-7.
17. Bargues MD, Malandrini JB, Artigas P, Soria CC, Velásquez JN, Carnevale S, et al. Human fascioliasis endemic areas in Argentina: multigene characterisation of the lymnaeid vectors and climatic-environmental assessment of the transmission pattern. *Parasites & vectors.* 2016;9(1):306.
18. Hoyle DV, Dalton JP, Chase-Topping M, Taylor DW. Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Veterinary parasitology.* 2003;111(1):65-82.
19. Meusen E, Lee CS, Rickard MD, Brandon MR. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite immunology.* 1995;17(1):37-45.
20. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary parasitology.* 2011;178(3-4):364-6.
21. F.V. O. *Fasciola hepatica.* Trematodes y Cestodes. En: *Enfermedades*

- parasitarias de los ovinos y otros rumiantes roedores en el cono sur de América. Publicaciones técnicas EEA INTA, Anguil. 2007.:pp 296.
22. Rondelaud D, Dreyfuss G, Bouteille B, Dardé ML. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitol Res.* 2000;86(9):753-7.
 23. Ashrafi K, Bargues MD, O'Neill S, Mas-Coma S. Fascioliasis: a worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel medicine and infectious disease.* 2014;12(6 Pt A):636-49.
 24. 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;62(1):4-6.
 25. 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. *The Journal of infectious diseases.* 2012;205(3):506-14.
 26. W.R. K. The liver and biliary system. *Pathology of domestic animals.* 1993:pp. 319-407.
 27. Dalton JP. Fasciolosis. CAB International. 1998.
 28. Keiser J, Engels D, Büscher G, Utzinger J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert opinion on investigational drugs.* 2006;14:1513-26.
 29. Coles GC. Anthelmintic resistance--looking to the future: a UK perspective. *Research in veterinary science.* 2005;78(2):99-108.
 30. Fairweather I. Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? *Journal of helminthology.* 2009;83(2):139-50.
 31. Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in parasitology.* 2016;32(6):458-69.
 32. Claerebout E, Geldhof P. Helminth Vaccines in Ruminants: From Development to Application. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice.* 2020;36(1):159-71.
 33. Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary parasitology.* 2013;195(3-4):272-85.
 34. Finlay CM, Walsh KP, Mills KH. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological reviews.* 2014;259(1):206-30.
 35. Flynn RJ, Mulcahy G, Elsheikha HM. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Veterinary parasitology.* 2010;169(3-4):235-40.
 36. 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;137(1-2):36-46.
 37. Van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite immunology.* 1999;21(5):243-51.
 38. O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, Mills KH, et al. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite immunology.* 2000;22(3):147-55.
 39. Fainboim LG. Introducción a la inmunología humana 2011. Editorial Médica Panamericana. 2011.
 40. Gallagjer SS, Threadgold LT. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. II. The interrelationship of the parenchyma with other organ systems. *Parasitology.* 1967;57(4):627-32.
 41. Threadgold LT. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. 3. Further observations on the tegument and associated structures. *Parasitology.* 1967;57(4):633-7.

42. Piedrafita D, Estuningsih E, Pleasance J, Prowse R, Raadsma HW, Meeusen EN, et al. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infection and immunity*. 2007;75(4):1954-63.
43. Piedrafita D, Parsons JC, Sandeman RM, Wood PR, Estuningsih SE, Partoutomo S, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite immunology*. 2001;23(9):473-82.
44. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and immunity*. 2005;73(1):166-73.
45. 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;22(11):4022-32.
46. 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. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;62(1):9-17.
47. Carranza F, Falcón CR, Nuñez N, Knubel C, Correa SG, Bianco I, et al. Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells. *PloS one*. 2012;7(7):e40356.
48. Frick JS, Grünebach F, Autenrieth IB. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2010;300(1):19-24.
49. Ferret-Bernard S, Curwen RS, Mountford AP. Proteomic profiling reveals that Th2-inducing dendritic cells stimulated with helminth antigens have a 'limited maturation' phenotype. *Proteomics*. 2008;8(5):980-93.
50. Hamilton CM, Dowling DJ, Loscher CE, Morphew RM, Brophy PM, O'Neill SM. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infection and immunity*. 2009;77(6):2488-98.
51. Piedrafita D, Raadsma H, Prowse R, Spithill T. Immunology of the host parasite relationship in Fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie - CAN J ZOOL*. 2004;82:233-50.
52. Doyle JJ. The relationship between the duration of a primary infection and the subsequent development of an acquired resistance to experimental infections with *Fasciola hepatica* in calves. *Research in veterinary science*. 1973;14(1):97-103.
53. Pleasance J, Raadsma HW, Estuningsih SE, Widjajanti S, Meeusen E, Piedrafita D. Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary parasitology*. 2011;178(3-4):264-72.
54. Martínez-Fernández AR, Nogal-Ruiz JJ, López-Abán J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-González Y, et al. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary parasitology*. 2004;126(3):287-98.
55. Muro A, Casanueva P, López-Abán J, Ramajo V, Martínez-Fernández AR, Hillyer GV. Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice. *The Journal of parasitology*. 2007;93(4):817-23.
56. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. *Parasitology*. 2014;141(14):1918-46.
57. Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International journal for parasitology*. 2014;44(12):915-27.
58. Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Pérez del Villar L, Vizcaíno C, Vicente B, Fernández-Soto P, et al. In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-

inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS one*. 2014;9(8):e105323.

59. Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Moreno-Pérez DA, Vicente B, Fernández-Soto P, Del Olmo E, et al. Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):94.
60. Wesołowska A, Zawistowska-Deniziak A, Norbury LJ, Wilkowski P, Januszkiewicz K, Pyziel AM, et al. Immune responses in rats and sheep induced by a DNA vaccine containing the phosphoglycerate kinase gene of *Fasciola hepatica* and liver fluke infection. *Acta parasitologica*. 2016;61(2):212-20.
61. Jayaraj R, Kumarasamy C, Norbury L, Piedrafita D, Smooker P. Protective efficacy of liver fluke DNA vaccines: A systematic review and meta-analysis: Guiding novel vaccine development. *Veterinary parasitology*. 2019;267:90-8.
62. 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. *Infection and immunity*. 2010;78(2):793-801.
63. Wesołowska A, Basalaj K, Norbury LJ, Sielicka A, Wedrychowicz H, Zawistowska-Deniziak A. Vaccination against *Fasciola hepatica* using cathepsin L3 and B3 proteases delivered alone or in combination. *Veterinary parasitology*. 2018;250:15-21.
64. Zawistowska-Deniziak A, Wasyl K, Norbury LJ, Wesołowska A, Bien J, Grodzik M, et al. Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2013;190(1):27-37.
65. 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. *Molecular and biochemical parasitology*. 2009;167(1):41-7.
66. 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. *The Journal of parasitology*. 1997;83(1):1-5.
67. McVeigh P, Maule AG, Dalton JP, Robinson MW. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes and infection*. 2012;14(4):301-10.
68. Donnelly S, Dalton JP, Robinson MW. How pathogen-derived cysteine proteases modulate host immune responses. *Adv Exp Med Biol*. 2011;712:192-207.
69. Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary parasitology*. 2009;160(3-4):230-6.
70. 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. *Infection and immunity*. 1999;67(4):1954-61.
71. Zawistowska-Deniziak A, Wasyl K, Norbury LJ, Wesołowska A, Bień J, Grodzik M, et al. Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2013;190(1):27-37.
72. Ranasinghe SL, McManus DP. Protease Inhibitors of Parasitic Flukes: Emerging Roles in Parasite Survival and Immune Defence. *Trends in parasitology*. 2017;33(5):400-13.
73. Di Maggio LS, Tirloni L, Pinto AFM, Diedrich JK, Yates JR, 3rd, Carmona C, et al. A proteomic comparison of excretion/secretion products in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles (NEJ) derived from *Lymnaea viatrix* or *Pseudosuccinea columella*. *Experimental parasitology*. 2019;201:11-20.
74. Grote A, Caffrey CR, Rebello KM, Smith D, Dalton JP, Lustigman S. Cysteine proteases during larval migration and development of helminths in their final host. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(8):e0005919.

75. Bozas SE, Panaccio M, Creaney J, Dosen M, Parsons JC, Vlasuk GV, et al. Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995;74(1):19-29.
76. 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;291(37):19220-34.
77. Muiño L, Perteguer MJ, Gárate T, Martínez-Sernández V, Beltrán A, Romarís F, et al. Molecular and immunological characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. *Molecular and biochemical parasitology*. 2011;179(2):80-90.
78. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors*. 2015;8:408.
79. Ranasinghe SL, Duke M, Harvie M, McManus DP. Kunitz-type protease inhibitor as a vaccine candidate against schistosomiasis mansoni. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2018;66:26-32.
80. Morais SB, Figueiredo BC, Assis NRG, Homan J, Mambelli FS, Bicalho RM, et al. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in Mice. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1762.
81. Chu D, Bungiro RD, Ibanez M, Harrison LM, Campodonico E, Jones BF, et al. Molecular characterization of *Ancylostoma ceylanicum* Kunitz-type serine protease inhibitor: evidence for a role in hookworm-associated growth delay. *Infection and immunity*. 2004;72(4):2214-21.
82. Noon JB, Schwarz EM, Ostroff GR, Aroian RV. A highly expressed intestinal cysteine protease of *Ancylostoma ceylanicum* protects vaccinated hamsters from hookworm infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019;13(4):e0007345.
83. Laupèze B, Hervé C, Di Pasquale A, Tavares Da Silva F. Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 2019;37(38):5670-80.
84. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011;29(17):3341-55.
85. Maletto B, Rópolo A, Morón V, Pistoiresi-Palencia MC. CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *Journal of leukocyte biology*. 2002;72(3):447-54.
86. Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Rópolo A, Morón G, Pistoiresi-Palencia MC. Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(6):898-905.
87. Maletto BA, Rópolo AS, Liscovsky MV, Alignani DO, Glocker M, Pistoiresi-Palencia MC. CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2005;117(3):251-61.
88. Mutwiri G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(3):226-32.
89. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:2181-95.
90. Sanchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Harman MF, Chiodetti AL, Moron G, et al. Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*. 2014;35(8):2529-42.
91. Chiodetti AL, Sanchez Vallecillo MF, Dolina JS, Crespo MI, Marin C, Schoenberger SP, et al. Class-B CpG-ODN Formulated With a Nanostructure Induces Type I Interferons-Dependent and CD4(+) T Cell-Independent CD8(+) T-Cell Response Against Unconjugated Protein Antigen. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2319.

92. Sánchez Vallecillo MF, Minguito de la Escalera MM, Aguirre MV, Ullio Gamboa GV, Palma SD, González-Cintado L, et al. A liquid crystal of ascorbyl palmitate, used as vaccine platform, provides sustained release of antigen and has intrinsic pro-inflammatory and adjuvant activities which are dependent on MyD88 adaptor protein. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;214:12-22.
93. Mulcahy G, Dalton JP. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in veterinary science*. 2001;70(1):83-6.
94. Rojas-Caraballo J, Lopez-Aban J, Perez del Villar L, Vizcaino C, Vicente B, Fernandez-Soto P, et al. In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PloS one*. 2014;9(8):e105323.
95. Fu Y, Chryssafidis AL, Browne JA, O'Sullivan J, McGettigan PA, Mulcahy G. Transcriptomic Study on Ovine Immune Responses to *Fasciola hepatica* Infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(9):e0005015.
96. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI journal*. 2016;15:817-28.
97. Changklungmoa N, Phoinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Veterinary parasitology*. 2016;226:124-31.
98. Chen CC, Louie S, McCormick B, Walker WA, Shi HN. Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric *Citrobacter rodentium* and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5468-81.
99. Pasquevich KA, Ibanez AE, Coria LM, Garcia Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PloS one*. 2011;6(1):e16203.
100. Cervi L, Rossi G, Masih DT. Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 1999;119 (Pt 6):627-33.
101. Gladiator A, LeibundGut-Landmann S. Innate lymphoid cells: new players in IL-17-mediated antifungal immunity. *PLoS pathogens*. 2013;9(12):e1003763.
102. Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Fernández-Soto P, Vicente B, Collía F, Muro A. Gene Expression Profile in the Liver of BALB/c Mice Infected with *Fasciola hepatica*. *PloS one*. 2015;10(8):e0134910-e.
103. Paerewijck O, Maertens B, Dreesen L, Van Meulder F, Peelaers I, Ratman D, et al. Interleukin-17 receptor A (IL-17RA) as a central regulator of the protective immune response against *Giardia*. *Scientific reports*. 2017;7(1):8520.
104. Inaba T, Sato H, Kamiya H. Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *The Journal of veterinary medical science*. 2003;65(11):1227-31.
105. Sun GG, Lei JJ, Ren HN, Zhang Y, Guo KX, Long SR, et al. Intranasal immunization with recombinant *Trichinella spiralis* serine protease elicits protective immunity in BALB/c mice. *Experimental parasitology*. 2019;201:1-10.
106. McKay DM, Shute A, Lopes F. Helminths and intestinal barrier function. *Tissue Barriers*. 2017;5(1):e1283385-e.
107. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology*. 2011;12(3):255-63.
108. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(6):1015-26.
109. Gao Q, Liu Y, Wu Y, Zhao Q, Wang L, Gao S, et al. IL-17 intensifies IFN- γ -induced NOS2 upregulation in RAW 264.7 cells by further activating STAT1 and NF- κ B. *International journal of molecular medicine*. 2016;37(2):347-58.

110. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity*. 2009;31(5):799-810.
111. Skyberg JA, Rollins MF, Samuel JW, Sutherland MD, Belisle JT, Pascual DW. Interleukin-17 protects against the *Francisella tularensis* live vaccine strain but not against a virulent *F. tularensis* type A strain. *Infection and immunity*. 2013;81(9):3099-105.
112. Milpied PJ, McHeyzer-Williams MG. High-affinity IgA needs TH17 cell functional plasticity. *Nature immunology*. 2013;14(4):313-5.
113. Bossie A, Vitetta ES. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cellular immunology*. 1991;135(1):95-104.
114. Snapper CM, Peschel C, Paul WE. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1988;140(7):2121-7.
115. Celas DP, Corvo I, Silvane L, Tort JF, Chiapello LS, Fresno M, et al. Cathepsin L3 From *Fasciola hepatica* Induces NLRP3 Inflammasome Alternative Activation in Murine Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*. 2019;10:552.
116. Nyindo M, Lukumbagire AH. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed research international*. 2015;2015:786195.
117. Carmona C, Tort JF. Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of helminthology*. 2017;91(2):99-109.
118. Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*. 2019;55(12):743-52.
119. Gandhi P, Schmitt EK, Chen CW, Samantray S, Venishetty VK, Hughes D. Triclabendazole in the treatment of human fascioliasis: a review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;113(12):797-804.
120. Triclabendazole. *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006.
121. Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martinez-Moreno A, et al. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and emerging diseases*. 2018;65 Suppl 1(Suppl 1):199-216.
122. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of medicine*. 2018;50(2):110-20.
123. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2018;48(2):231-41.
124. Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera FM, Figueroa O, Suárez E. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity & disease*. 2010;20(1 Suppl 1):S1-17-23.
125. López-Abán J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Baños P, et al. Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary parasitology*. 2007;145(3-4):287-96.
126. Apostólico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*. 2016;2016:1459394.
127. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical pharmacology*. 2016;120:1-14.
128. De Brito RCF, Cardoso JMO, Reis LES, Vieira JF, Mathias FAS, Roatt BM, et al. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1043.
129. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical Reviews*. 2020;120(6):3210-29.
130. Herrera S, Fernández OL, Vera O, Cárdenas W, Ramírez O, Palacios R, et al. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides

- adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(2 Suppl):12-20.
131. Richert L, Hue S, Hocini H, Raimbault M, Lacabaratz C, Surenaud M, et al. Cytokine and gene transcription profiles of immune responses elicited by HIV lipopeptide vaccine in HIV-negative volunteers. *AIDS (London, England)*. 2013;27(9):1421-31.
132. Behrendt R, White P, Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2016;22(1):4-27.
133. Li W, Joshi MD, Singhania S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines (Basel)*. 2014;2(3):515-36.
134. Reche P, Flower DR, Fridkis-Hareli M, Hoshino Y. Peptide-Based Immunotherapeutics and Vaccines 2017. *Journal of immunology research*. 2018;2018:4568239-.
135. Reche P, Flower DR, Fridkis-Hareli M, Hoshino Y. Peptide-Based Immunotherapeutics and Vaccines 2015. *Journal of immunology research*. 2015;2015:349049-.
136. de Magalhães MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, Morais SB, Oliveira SC. Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microbes and infection*. 2018;20(9-10):606-9.
137. Ranasinghe S, McManus DP. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Developmental and comparative immunology*. 2013;39(3):219-27.
138. Sánchez VR, Fenoy IM, Picchio MS, Soto AS, Arcon N, Goldman A, et al. Homologous prime-boost strategy with TgPI-1 improves the immune response and protects highly susceptible mice against chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Acta tropica*. 2015;150:159-65.
139. Cuppari AF, Sanchez V, Ledesma B, Frank FM, Goldman A, Angel SO, et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine*. 2008;26(39):5040-5.
140. Ibañez AE, Coria LM, Carabajal MV, Delpino MV, Risso GS, Cobiello PG, et al. A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;220(Pt A):18-28.
141. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PloS one*. 2011;6(1):e16203.
142. Grote A, Caffrey CR, Rebello KM, Smith D, Dalton JP, Lustigman S. Cysteine proteases during larval migration and development of helminths in their final host. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(8):e0005919-e.
143. Caffrey CR, Goupil L, Rebello KM, Dalton JP, Smith D. Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(8):e0005840-e.
144. Sotillo J, Trelis M, Cortes A, Fried B, Marcilla A, Esteban JG, et al. Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Experimental parasitology*. 2011;129(3):307-11.
145. Bourke CD, Nausch N, Rujeni N, Appleby LJ, Mitchell KM, Midzi N, et al. Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(1):159-69.
146. Moreau E, Chauvin A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:428593.
147. Doligalska M, Laskowska M. Inhibition of the protective IgA response by ketotifen is related to the inflammatory reaction in the peritoneal cavity and intestinal mucosa of BALB/c mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*. 2000;86(6):480-5.
148. Inaba T, Sato H, Kamiya H. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology*. 2003;126(Pt 6):591-8.

149. Dann SM, Manthey CF, Le C, Miyamoto Y, Gima L, Abraham A, et al. IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Experimental parasitology*. 2015;156:68-78.
150. Guthrie T, Hobbs CGL, Davenport V, Horton RE, Heyderman RS, Williams NA. Parenteral Influenza Vaccination Influences Mucosal and Systemic T Cell-Mediated Immunity in Healthy Adults. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(11):1927-35.
151. Su F, Patel GB, Hu S, Chen W. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(4):1070-9.
152. Underdown BJ, Strober W. Chapter 70 - Parenteral Immunization and Protection from Mucosal Infection. In: Mestecky J, Strober W, Russell MW, Kelsall BL, Cheroutre H, Lambrecht BN, editors. *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 1391-402.
153. Rossi A, Michelini Z, Leone P, Borghi M, Blasi M, Bona R, et al. Optimization of Mucosal Responses after Intramuscular Immunization with Integrase Defective Lentiviral Vector. *PloS one*. 2014;9(9):e107377.
154. Cristillo AD, Ferrari MG, Hudacik L, Lewis B, Galmin L, Bowen B, et al. Induction of mucosal and systemic antibody and T-cell responses following prime-boost immunization with novel adjuvanted human immunodeficiency virus-1-vaccine formulations. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 1):128-40.
155. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, Kodama S, Suzuki M, Mogi G, et al. Nasal Immunization Induces *Haemophilus influenzae*—specific Th1 and Th2 Responses with Mucosal IgA and Systemic IgG Antibodies for Protective Immunity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(1):122-32.
156. Wu HY, Abdu S, Stinson D, Russell MW. Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infection and immunity*. 2000;68(10):5539-45.
157. Cheng C, Pal S, Bettahi I, Oxford KL, Barry PA, de la Maza LM. Immunogenicity of a vaccine formulated with the *Chlamydia trachomatis* serovar F, native major outer membrane protein in a nonhuman primate model. *Vaccine*. 2011;29(18):3456-64.
158. Tada R, Muto S, Iwata T, Hidaka A, Kiyono H, Kunisawa J, et al. Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-chol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):68-.
159. 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;148(4):373-84.
160. Knott ML, Matthaei KI, Giacomini PR, Wang H, Foster PS, Dent LA. Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *International journal for parasitology*. 2007;37(12):1367-78.
161. Svensson M, Bell L, Little MC, DeSchoolmeester M, Locksley RM, Else KJ. Accumulation of eosinophils in intestine-draining mesenteric lymph nodes occurs after *Trichuris muris* infection. *Parasite immunology*. 2011;33(1):1-11.
162. Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*. 2006;108(7):2420-7.
163. Inclan-Rico JM, Siracusa MC. First Responders: Innate Immunity to Helminths. *Trends in parasitology*. 2018;34(10):861-80.
164. Huang L, Appleton JA. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends in parasitology*. 2016;32(10):798-807.
165. Huang L, Beiting DP, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lee NA, et al. Eosinophils and IL-4 Support Nematode Growth Coincident with an Innate Response to Tissue Injury. *PLoS pathogens*. 2015;11(12):e1005347.

166. Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lee NA, Lee JJ, et al. Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2014;193(8):4178-87.
167. Allen JE, Sutherland TE, Rückerl D. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*. 2015;34:99-106.
168. Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Nur S, Diethelm P, LeibundGut-Landmann S. IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunology*. 2015;8(2):221-31.
169. Burstein VL, Guasconi L, Beccacece I, Theumer MG, Mena C, Prinz I, et al. IL-17-Mediated Immunity Controls Skin Infection and T Helper 1 Response during Experimental *Microsporum canis* Dermatophytosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2018;138(8):1744-53.
170. de Bruin AM, Libregts SF, Valkhof M, Boon L, Touw IP, Nolte MA. IFN γ induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood*. 2012;119(6):1543-54.
171. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(11):2251-62.
172. Das S, Khader S. Yin and yang of interleukin-17 in host immunity to infection. *F1000Res*. 2017;6:741-.
173. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol*. 2017;38(5):310-22.
174. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4):a028522.
175. de Kleijn S, Langereis JD, Leentjens J, Kox M, Netea MG, Koenderman L, et al. IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS one*. 2013;8(8):e72249-e.
176. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nature immunology*. 2017;18(6):612-21.
177. Andoh A, Takaya H, Makino J, Sato H, Bamba S, Araki Y, et al. Cooperation of interleukin-17 and interferon-gamma on chemokine secretion in human fetal intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(1):56-63.
178. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2000;115(1):81-7.
179. Doligalska M, Laskowska M. Inhibition of the protective IgA response by ketotifen is related to the inflammatory reaction in the peritoneal cavity and intestinal mucosa of BALB/c mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res*. 2000;86(6):480-5.
180. Brodaczewska K, Wolaniuk N, Lewandowska K, Donskow-Łysoniewska K, Doligalska M. Biodegradable Chitosan Decreases the Immune Response to *Trichinella spiralis* in Mice. *Molecules*. 2017;22(11):2008.
181. Gu Y, Zhan B, Yang Y, Yang X, Zhao X, Wang L, et al. Protective Effect of a Prime-Boost Strategy with the Ts87 Vaccine against *Trichinella spiralis* Infection in Mice. *BioMed research international*. 2014;2014:326860.
182. Hemmi M, Tachibana M, Fujimoto N, Shoji M, Sakurai F, Kobiyama K, et al. T Helper 17 Promotes Induction of Antigen-Specific Gut-Mucosal Cytotoxic T Lymphocytes following Adenovirus Vector Vaccination. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1456-.
183. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity*. 2002;17(3):375-87.

184. Milligen F, Cornelissen J, Bokhout B. Fasciola hepatica: An Antigen Fraction Derived from Newly Excysted Juveniles, Containing an Immunoreactive 32-kDa Protein, Induces Strong Protective Immunity in Rats. *Experimental parasitology*. 2000;94:163-71.
185. Paerewijck O, Maertens B, Gagnaire A, De Bosscher K, Geldhof P. Delayed development of the protective IL-17A response following a *Giardia muris* infection in neonatal mice. *Scientific reports*. 2019;9(1):8959.
186. Wang L, Zhu L, Qin S. Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. *Journal of immunology research*. 2019;2019:4735040.
187. Karmaus PWF, Chen X, Lim SA, Herrada AA, Nguyen TM, Xu B, et al. Metabolic heterogeneity underlies reciprocal fates of T(H)17 cell stemness and plasticity. *Nature*. 2019;565(7737):101-5.
188. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature immunology*. 2008;9(2):166-75.
189. Sjökvist Ottsjö L, Flach C-F, Nilsson S, de Waal Malefyt R, Walduck AK, Raghavan S. Defining the Roles of IFN- γ and IL-17A in Inflammation and Protection against *Helicobacter pylori* Infection. *PloS one*. 2015;10(7):e0131444.
190. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:3908061.
191. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*. 2009;30(1):108-19.
192. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009;30(1):92-107.