



TESIS DOCTORAL

**Impacto del inflammasoma NLRP3 en la  
respuesta inmune innata y adaptativa  
durante la infección experimental aguda  
con *Trypanosoma cruzi***

Tesista: Lic. Augusto F. Paroli

Directora: Dra. Susana Gea

2017



TESIS DOCTORAL

**Impacto del inflamasoma NLRP3 en la  
respuesta inmune innata y adaptativa  
durante la infección experimental aguda  
con *Trypanosoma cruzi***

Comisión de tesis

Dra. Alicia Degano

Dr. Ricardo Fretes

Dr. Fabio Cerbán

**Evaluadora externa:**

Dra. Gabriela Perdigón

**2017**



C I B I C I

# CIBICI

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

## INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	4
Objetivos	26
Resultados	27
Discusión	49
Conclusiones	54
Materiales y métodos	56
Bibliografía	60
Artículos publicados	71
Financiamiento	72

A mi familia

## ABREVIATURAS

CARD	Reclutamiento y activación de caspasa
CLR	Receptor de lectina tipo-C
CPA	Células presentadoras de antígenos profesionales
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IL-18BP	IL-18 <i>binding protein</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Rico en repeticiones de leucina
n.d.	No determinado
NLR	Receptores tipo Nod
NO	Óxido nítrico
NOD	Dominio de oligomerización nucleotídica
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de de patrones
PYR	Dominio de pirina
RIG	Retinoic acid-inducible gene-1
RNS	Reactive nitrogen species
Th	T helper
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral

## RESUMEN

El ensamblado de inflamomas ha sido ampliamente reportado como mecanismo de control frente a diversos agentes infecciosos durante la respuesta inmune innata y más recientemente durante la inmunidad adaptativa. En este trabajo de tesis se investigó el papel del inflamoma NLRP3 y caspasa-1/11 en la inducción de la resistencia a la infección. Además, su posible participación en el daño hepático en un modelo de infección aguda con *T. cruzi* - Tulahuén utilizando animales deficientes NLRP3 y caspasa-1/11 en comparación con ratones C57BL/6 WT. Los resultados obtenidos mostraron que la infección en ratones WT indujo un incremento de IL-1 $\beta$  e IL-18 en plasma sumado a un aumento de la expresión de NLRP3, casp-1 e IL-1 $\beta$  en el hígado indicando la activación del inflamoma NLRP3 en este tejido. La infección también indujo un incremento en el infiltrado de células inflamatorias incluyendo la presencia de macrófagos que co-expresan NLRP3 y TLR9 siendo capaces de producir IL-1 $\beta$ . Notablemente, en ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> se observó un incremento significativo de macrófagos que expresan TLR9, mientras que en los *casp-1/11*<sup>-/-</sup> este fenómeno no fue observado. A diferencia de los ratones WT, los *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados exhibieron un menor número de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> aunque presentaron un fuerte incremento en el número de macrófagos infiltrantes del hígado. A su vez, los macrófagos hepáticos de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> mostraron una alta producción intracelular de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico. Por otro lado, los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> tuvieron un marcado perfil Th2 a diferencia de los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> y WT que mostraron perfiles mezclados de linfocitos T helper (Th1, Th2 y Th17). En concordancia con los resultados descriptos, los receptores para IL-1 $\beta$  e IL-18 fueron detectados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y WT mientras que, en los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> su expresión fue significativamente menor. Por otra parte, la infección de ratones WT y *nlrp3*<sup>-/-</sup> indujo niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias además de IL-10, sugiriendo la activación de otros inflamomas independientemente de NLRP3. Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo fue demostrar la falta de

capacidad de inducción de células T CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  en animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup>. Otro aporte novedoso, fue demostrar en los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup> un retraso en la aparición de marcadores de daño tisular (ALT y LDH) asociado con la ausencia de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ /IL-18, IL-6 e IFN- $\gamma$ ). Por último, el análisis de las parasitemias y sobrevida reveló que los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> mostraron un comportamiento similar a los WT, mientras que los *casp-1/11*<sup>-/-</sup> presentaron elevadas parasitemias y menor sobrevida. Notablemente, la carga parasitaria fue mayor en las cepas *KO*, siendo la más elevada en *casp-1/11*<sup>-/-</sup>. En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran que el inflamasoma NLRP3 contribuye a la resistencia del huésped contra la infección aunque no es esencial. Es de destacar que la vía de caspasa-1/11 es clave para la producción de una efectiva inmunidad innata y adaptativa capaz de controlar la infección. Sin embargo, los mismos mecanismos efectores que participan en la defensa contra *T. cruzi* contribuyen al daño hepático entre otros tejidos.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Inflamación y respuesta inmune

La respuesta inflamatoria se inicia cuando sensores que están presentes principalmente en las células fagocíticas detectan agentes infecciosos, los principales inductores de la inflamación. También el daño tisular producido en una variedad de enfermedades autoinmunes, metabólicas, neurodegenerativas o el cáncer pueden alterar la homeostasis y promover la respuesta inflamatoria<sup>1</sup>.

Diferentes tipos de patógenos requieren de diferentes estrategias para su eliminación o control de la infección. Los principales mecanismos de inmunidad innata son la fagocitosis y la destrucción de microorganismos por células dendríticas, macrófagos, monocitos y granulocitos y la lisis de células infectadas por células NK.

Frente a un estrés como la infección aguda/crónica y procesos inflamatorios estériles, se induce la mielopoyesis con elevada producción de células de origen mielóide: macrófagos, neutrófilos y células supresoras mieloides en procesos dependientes de citoquinas como G-CSF y quimiocina como CCL2 que atrae células de médula ósea y del bazo a los tejidos<sup>2</sup>.

Entre los sensores de inmunidad innata se encuentran los receptores tipo *toll* (TLR) y los receptores tipo Nod (NLR), que producen determinados mediadores que influyen en la inmunidad adaptativa participando en la diferenciación de linfocitos T y B efectoras. Linfocitos T CD4 vírgenes se diferencian en células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , efectoras en la defensa contra microorganismos intracelulares y/o Th2, productoras de IL-4, IL-5 e IL-13, y/o Th17 productoras de IL-17 e IL-22<sup>11</sup>. El IFN- $\gamma$  producido además por células NK, activa macrófagos con fenotipo M1 (activación clásica) y también neutrófilos para destruir patógenos intracelulares. Macrófagos (M $\phi$ ) inflamatorios M1 producen altos niveles de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), TNF- $\alpha$  y metaloproteinasas (MMP)-2/MMP-9. La persistencia de una inflamación exagerada



conduce al reclutamiento de Th17 y neutrófilos que llevan a un sustancial daño tisular. Células epiteliales dañadas producen alarminas como IL-25 que inducen la diferenciación de M $\phi$  a M2 (activación alterna) y que producen, al igual que linfocitos Th2, la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Este fenotipo de M $\phi$  expresa Arginasa-1 y posee la capacidad de frenar la inflamación y favorecer la reparación tisular para mantener la homeostasis<sup>3</sup>.

La producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6) es una etapa esencial para la activación de la defensa innata del huésped y subsecuentemente para la modulación de la respuesta adaptativa. La IL-1 $\beta$  e IL-18 son también importantes citoquinas pro-inflamatorias que por una parte activan macrófagos y neutrófilos y por otra inducen Th1 y Th17<sup>4</sup>. Diferentes conjuntos de citoquinas y otros mediadores promueven la activación y función efectora de otras células de la inmunidad innata y adaptativa. La amplificación de una respuesta inflamatoria adecuada lleva a eliminar al patógeno o bien, como en la mayoría de las parasitosis, a la persistencia del mismo.

Aunque la inflamación representa un poderoso mecanismo para controlar la infección, puede generar efectos deletéreos en los tejidos del huésped si no hay mecanismos regulatorios apropiados que frenen la inflamación.

## **1.2. Receptores innatos en la respuesta inmune**

Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs) como los *Toll like receptors* (TLRs) se han identificado como receptores ancestrales que confieren cierta especificidad al sistema inmune innato del huésped y permiten detectar estructuras características, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en una variedad de microorganismos que incluyen a bacterias, hongos, parásitos y virus<sup>5</sup>. Se han descrito 10 y 13 miembros de TLRs en humanos y ratones respectivamente, que responden a diferentes ligandos y se expresan diferencialmente en células inmunes como células dendríticas, M $\phi$ , células B, ciertas sub-

poblaciones de células T<sup>6</sup> y diferentes tipos celulares entre ellos, los hepatocitos<sup>7</sup>. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se expresan en la superficie celular, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 en los endosomas. TLR4 y TLR5 son receptores que reconocen componentes de la pared de bacterias Gram negativas como el LPS y la flagelina, respectivamente. Los TLRs intracelulares como TLR3 y TLR9 son importantes en la respuesta anti-viral. TLR3 y TLR7/8, detectan la presencia de ARN de doble cadena derivado de virus o sintéticos y ARN de simple cadena, respectivamente; mientras que TLR9 interacciona con motivos CpG no metilados de ADN<sup>8</sup>. Los TLRs pueden también sensar la presencia de ligandos endógenos iniciando una señal de peligro. TLR4 detecta ligandos endógenos tales como un grupo de proteínas *box1* de movilidad elevada (HMGB1), hialuronidasas, proteínas de *shock* térmico 60 y ácidos grasos libres<sup>12</sup>.

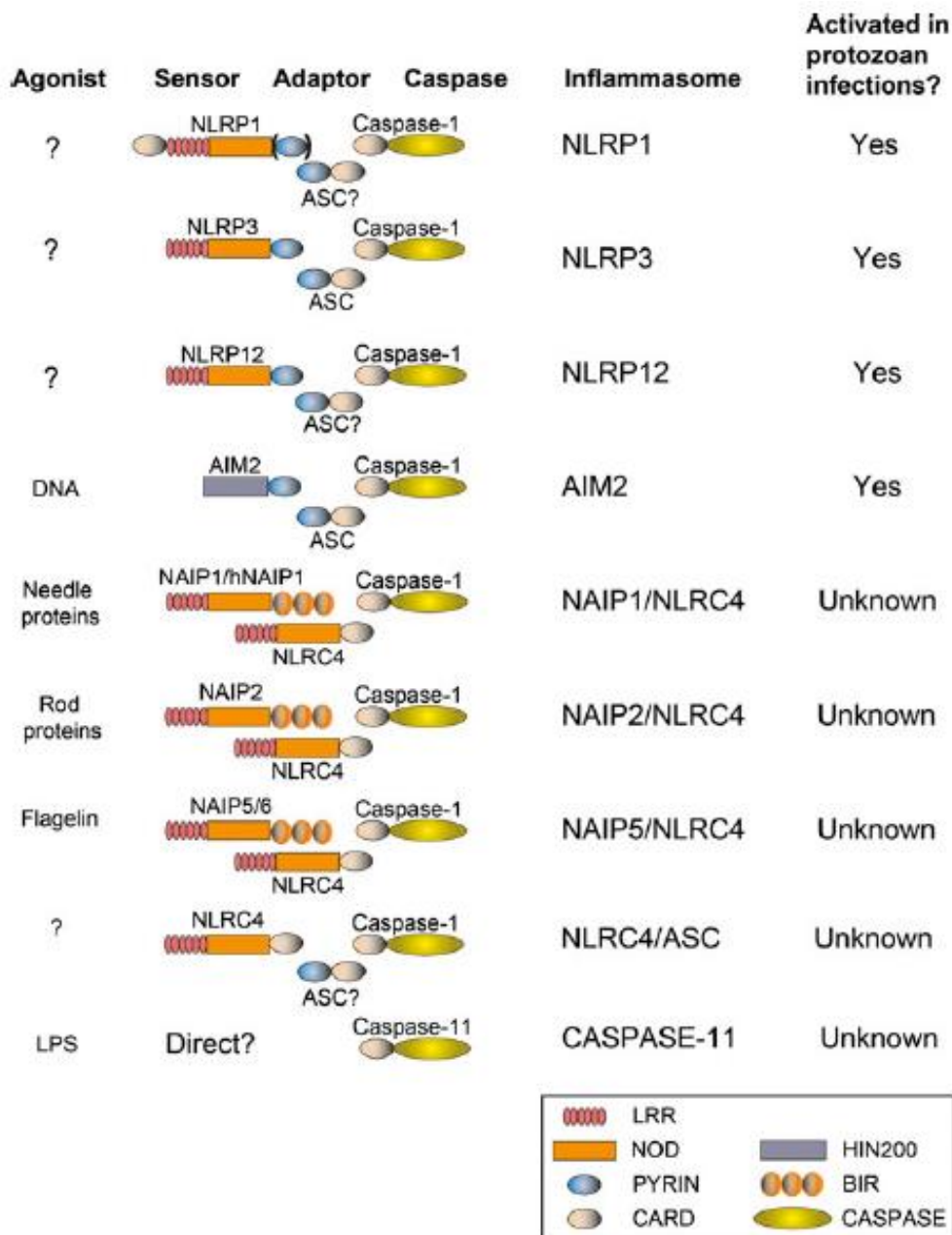
Además de los TLRs se han descrito las familias de receptores *Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs), la familia PYHIN, los receptores tipo *retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-1), los de lectina tipo-C (CLR), los de tipo oligoadenilatosintetasa y los relacionados a la GMP-AMP-sintetasa<sup>9</sup>. Estos diferentes PRRs responden activando vías de señalización específicas para producir mediadores inflamatorios, producir citoquinas pro-inflamatorias y desencadenar muerte celular. Permiten así, estimular al sistema inmune adaptativo, controlar infecciones e iniciar la reparación tisular<sup>10</sup>.

### **1.3. Estructura y función de los Receptores tipo NOD e Inflamasomas**

Los receptores que poseen un NOD son moléculas citosólicas de la inmunidad innata de los que, hasta la fecha, se identificaron 22 en humanos y 34 en ratones<sup>11</sup>. Aunque inicialmente se describió que responden a patógenos intracelulares, se ha demostrado que los NLR desempeñan papeles importantes en distintos procesos biológicos que incluyen la regulación de la presentación antigénica, la detección de cambios metabólicos en la célula,

la modulación de la inflamación, el desarrollo embrionario, la muerte celular y la diferenciación de la respuesta inmune adaptativa<sup>12</sup>.

En forma similar a los TLRs, los NLRs detectan PAMPs y DAMPs para activarse. Estructuralmente, poseen tres dominios característicos: 1) un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) que regula la activación del receptor; 2) el dominio central *NOD* responsable de la oligomerización en respuesta al ATP; y 3) un dominio N-terminal variable importante para el reclutamiento de moléculas accesorias y/o la señalización aguas abajo, por ejemplo, el dominio de pirina (PYR) o de reclutamiento y activación de caspasa (CARD). Esta familia incluye un subgrupo capaz de ensamblar inflamomas, que son complejos multiproteicos que promueven la activación de la caspasa-1 (Fig. 1). La formación de esta plataforma multimolecular suele estar facilitada por la molécula adaptadora denominada *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain* (ASC) gracias a las interacciones homotípicas de su dominio CARD con el CARD de la caspasa-1 y de su PYR con el PYR de los NLRPs con los que interactúa<sup>13</sup>. La actividad pro-inflamatoria de la caspasa-1 consiste en catalizar la maduración de las pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 a sus formas activas IL-1 $\beta$  e IL-18 e inducir un tipo específico de muerte celular programada: la piroptosis. Este tipo de muerte depende de caspasas inflamatorias pero a diferencia de la apoptosis, es altamente inflamatoria<sup>14, 15</sup>.

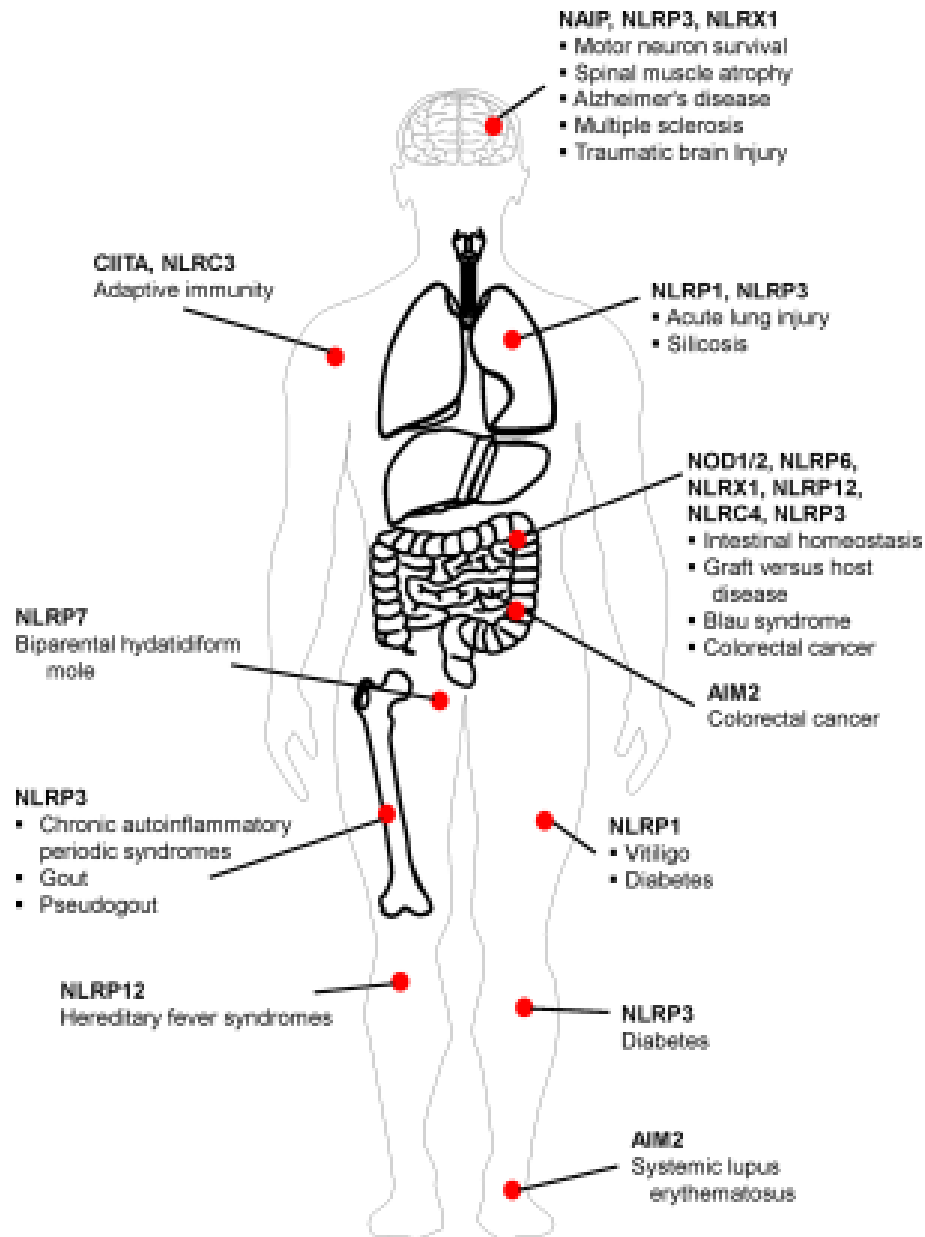


**Figura. 1.** Activación del Inflammasoma en respuesta a microbios y daño celular. Composición molecular de NLRP1, NLRP3, NLRP12, AIM2, NAIP1 / NLRC4, NAIP2 / NLRC4 y NAIP5 / NLRC4. Se indican la molécula agonista, el sensor, la proteína adaptadora y la caspasa efectora. Los dominios indicados son: repeticiones ricas en leucina (LRR), dominio de unión a nucleótidos y oligomerización (NOD, NBD o NACHT), Pyrin (PYD),

dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), dominio HIN200 de unión a ADN (HIN200), baculovirus con repeticiones IAP (BIR) y dominio de caspasa. La participación de ASC en el inflamasoma NLRC4 aún no es clara. Se ha demostrado que el lipopolisacárido bacteriano (LPS) se une directamente a la caspasa-11. La activación de esta última favorece la activación no canónica del inflamasoma NLRP3. Adaptado de Zamboni y Lima-Junior, 2015.

#### **1.4. Importancia de NLR- inflamasomas en la salud y en la enfermedad**

El descubrimiento de que mutaciones en algunos miembros de la familia de los NLRs son responsables de enfermedades auto-inflamatorias en humanos, revela el rol clave de estas moléculas en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune (Fig. 2)<sup>9</sup>. En este sentido, mutaciones del receptor NLRP3 causan pseudo-gota, gota, Fiebre mediterránea familiar y un conjunto de enfermedades agrupadas como Síndrome periódico asociado a criopirinas que incluye al Síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío, Síndrome de Muckle-Wells y la Enfermedad Auto-inflamatoria Multi-sistémica de Inicio Neonatal<sup>14</sup>.



**Figura 2.** NLRs inflammasomas en enfermedades humanas. Adaptado de Jha *et al.* 2017

#### 1.4.1. Citoquinas específicas de la respuesta de NLR- inflammasomas

La IL-1 $\beta$  madura es una citoquina con potente actividad pro-inflamatoria necesaria para montar una respuesta inmune efectiva, ya que potencia la expansión, diferenciación,

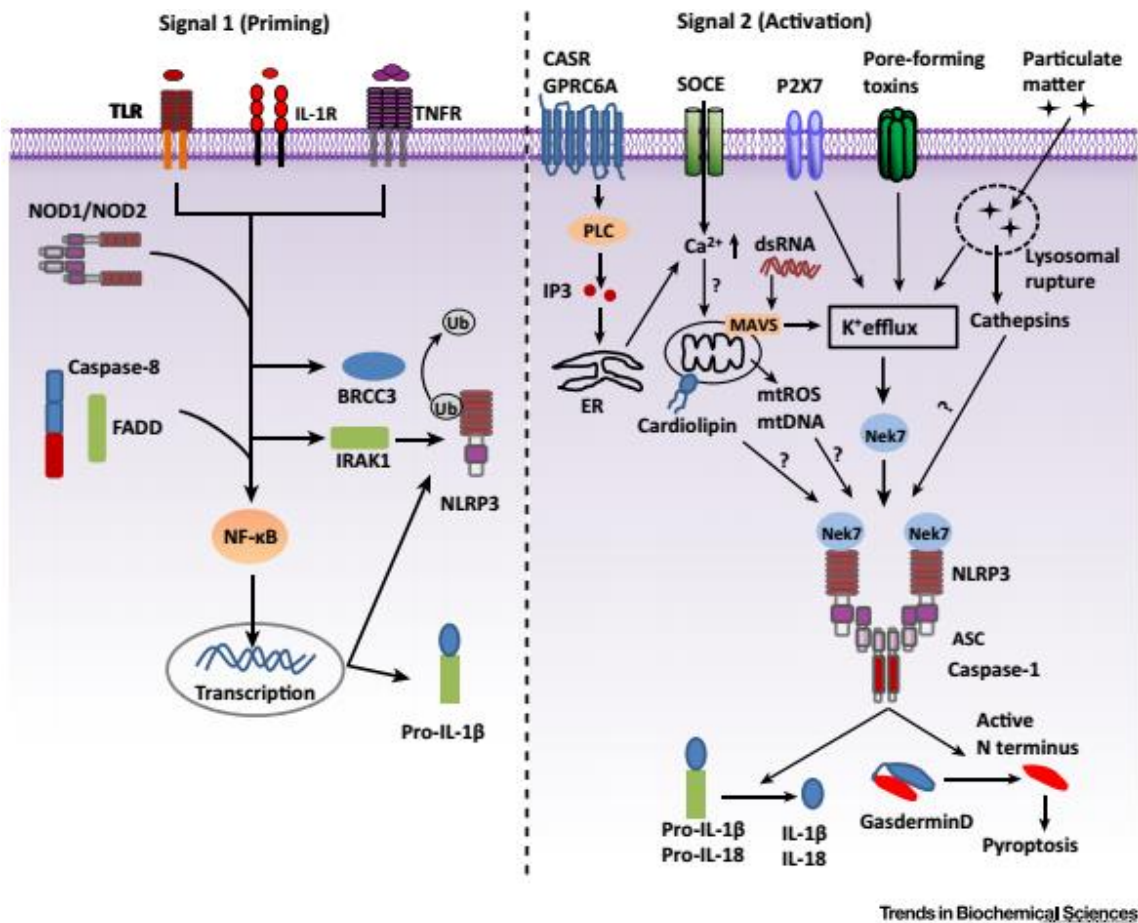
migración hacia la periferia y generación de memoria de linfocitos CD4+ y CD8+ antígeno-específicos *in vivo*, contribuyendo a la orquestación de la respuesta inmune adaptativa. Ambas poblaciones linfocitarias expresan el IL-1R para responder a su estímulo generando células CD4+ productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$  como también células citotóxicas CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  y granzima B. Además, a nivel hepático y pulmonar, la IL-1 $\beta$  es capaz de incrementar el número y diferenciación de células CD4+ y CD8+ activadas por su antígeno<sup>16</sup>. Es importante destacar que la pro-IL-1 $\beta$  inactiva también puede ser hidrolizada y generar IL-1 $\beta$  activa por enzimas como proteinasa-3 y elastasa presentes en los neutrófilos. Por otro lado, IL-1R2 se libera en forma soluble y regula negativamente la actividad de IL-1 por diferentes mecanismos. Las señales antiinflamatorias favorecen la expresión de IL-1R2, incluyendo hormonas glucocorticoides, prostaglandinas, citoquinas asociadas a células Th2 (IL-4 e IL-13), lo que sugiere que la inducción de IL-1R2 contribuye al efecto anti-inflamatorio<sup>17</sup>.

A diferencia de la pro-IL-1 $\beta$ , la pro-IL-18 es sintetizada en forma constitutiva por prácticamente todas las células del cuerpo en humanos y ratones, y una vez madurada por la caspasa-1, es clave para la producción de IFN- $\gamma$  y la potenciación de la actividad citotóxica de células NK y T así como la expresión de FasL. Sin embargo, su liberación sostenida ha sido asociada a la patogénesis en procesos crónicos y enfermedades autoinmunes<sup>18</sup>. Esta citoquina tiene efectos pleiotrópicos sobre los linfocitos según el microambiente de señales en el que es liberada. La IL-18 combinada con IL-12 o IL-15, ejerce su rol más conocido como inductora de un perfil Th1 al promover la producción de IFN- $\gamma$  en células T y NK. Sin embargo, en ausencia de IL-12 causa la producción de IgE y el desarrollo de un perfil Th2<sup>19</sup>. La importancia y el potencial terapéutico de esta interleuquina durante una infección parasitaria puede entenderse al observar que la infección con el protozoario *Toxoplasma gondii*, desencadena una fuerte respuesta Th1 con liberación de IL-18 y de uno de sus reguladores naturales, IL-18 *binding protein* (IL-18BP). Este protozoario produce en los animales una necrosis severa del intestino delgado

con pérdida de la estructura tisular. Notablemente, el tratamiento con IL-18BP logra revertir este fenotipo producido por la exacerbada inflamación<sup>20</sup>.

### 1.5. Inflamasoma NLRP3

El inflamasoma NLRP3 es un componente esencial para la defensa del huésped contra diversos patógenos. Posee tres dominios de pirina que le permiten interactuar con ASC durante su activación para reclutar a la caspasa-1. Esta activación ocurre en un proceso de dos señales en los macrófagos. La primera señal de este modelo está dada por un estímulo de PAMPs o DAMPs que activa a NF- $\kappa$ B para inducir la expresión de NLRP3 y de la pro-IL-1 $\beta$ ; la segunda señal (la activación *per se*) es desencadenada por ATP, toxinas formadoras de poros, ARN viral o materia particulada (Fig. 3).





**Figura 3.** Modelo de dos señales para la activación del Inflamasoma NLRP3. La señal- 1 (cebado, izquierda) está dada por moléculas microbianas o citoquinas que producen regulación positiva de NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$  a través de la activación del factor de transcripción NF-kB. La caspasa-8 y la proteína del dominio de muerte asociada con FAS (FADD) están implicadas en el cebado mediante activación de NF-kB. La deubiquitinasa BRC36 (BRCC3) y la kinasa- 1 (IRAK1) asociada al receptor de IL-1, regulan la activación del inflamasoma de NLRP3. La señal 2 (activación, derecha) es proporcionada por una plétora de estímulos, tales como ATP, toxinas formadoras de poros, ARN viral, materia particulada como microorganismos activan el inflamasoma NLRP3. La mayoría de los estímulos de NLRP3 inducen el flujo de K<sup>+</sup>, necesario para su activación, inducido por ruptura lisosomal y la liberación de catepsinas. La señalización por Ca<sup>2+</sup> también está implicada en activación de NLRP3 causa disfunción mitocondrial (mt). La misma se produce por ROSmt, ADNmt oxidado o externalización de la cardiolipina fosfolípida. La materia particulada, activa NLRP3 a través del flujo de K<sup>+</sup>. Adaptado de He *et al.*, 2016 - Tendencias en Inmunología.

No obstante la sencillez del modelo de dos señales, la activación del inflamasoma NLRP3 es mucho más compleja, pues el cebado está regulado tanto a nivel transcripcional por MyD88, IRAK-1 e IRAK-4 como a nivel post-transcripcional por TRIF, IRAK-1 y la deubiquitinasa BRCC3, haciendo más complejo el modelo. La diversidad de moléculas que dan la segunda señal, sugiere que NLRP3 liga un estímulo celular común a estos activadores. A nivel molecular, los eventos celulares que ensamblan a NLRP3 en su inflamasoma incluyen el eflujo de K<sup>+</sup>, la señalización por Ca<sup>2+</sup>, ROS, la disfunción mitocondrial y la disrupción de lisosomas<sup>21</sup>.

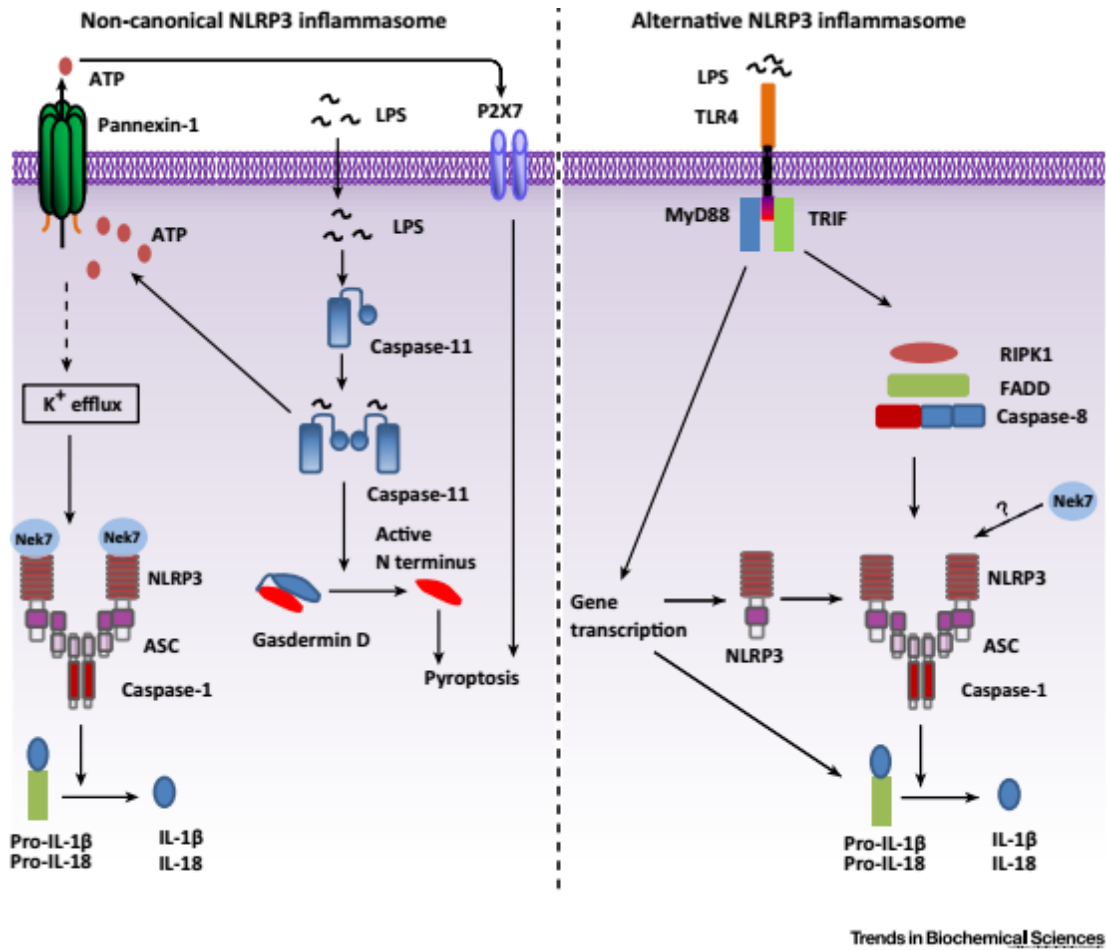
### 1.6. Vías no canónica y alternativa de activación del NLRP3 inflamasoma

Existen otras dos vías de activación del inflamasoma NLRP3: la activación no canónica (mediada por caspasa-11) y la activación alternativa (mediante Caspasa-8) que resaltan la complejidad de señales y respuestas desencadenadas por el inflamasoma NLRP3 *in vivo* (Fig. 4)<sup>21</sup>.

Vía no canónica de activación de NLRP3: Caspasa-11 reconoce directamente LPS de bacterias Gram-negativas a través de su dominio CARD en el citosol. Este fenómeno no

induce la maduración de pro-IL-1 $\beta$  ni pro-IL-18 pero desencadena la piroptosis independientemente de caspasa-1. Uno de los sustratos recientemente descubiertos de las caspasas asociadas a inflamomas es la Gasdermina D (GasD). La hidrólisis de GasD por la porción N-terminal de 31 kDa inicia la piroptosis uniéndose a la hemi-capa interna del plasmalema y forma poros de 10-33 nm de diámetro. Este fenómeno activa al inflamoma NLRP3 posiblemente por el flujo de K<sup>+</sup> facilitado por los poros. Se observó también que GasD tiene actividad microbicida al oligomerizar con cardiolipina y formar poros en las membranas de distintas bacterias<sup>15</sup>.

Vía alternativa de activación de NLRP3: Esta vía se caracteriza por no inducir piroptosis y ser independiente del eflujo de K<sup>+</sup>. En su mecanismo, responde al estímulo de LPS a través de TLR4-TRIF y culmina con Caspasa-8 propagando la activación de NLRP3 en un mecanismo que aún se desconoce. La ausencia de piroptosis se relaciona con la ausencia de hidrólisis de GasD aunque sí hay liberación de IL-1 $\beta$ . Esta vía sólo se encontró en PBMCs de humanos y cerdos pero no en ratones<sup>22</sup>.



**Figura 4:** Mecanismos de activación de NLRP3 inflammasomas no canónico y alternativo. La activación del No canónico (izquierda) es inducida por bacterias Gram-negativas. El LPS administrado en el citosol mediante transfección o infección, activa a la caspasa-11. La enzima activada produce la apertura del canal pannexina-1, lo que induce el flujo de K<sup>+</sup> y la liberación de IL-1β. La activación de la caspasa-11 también conduce a la piroptosis a través de la escisión de la gasdermina D. Ésta, altera las funciones celulares formando poros en la membrana. La activación de P2X7 por ATP liberado desde el canal pannexin-1 también contribuye a la piroptosis. La activación alternativa de NLRP3 (derecha) se activa en monocitos humanos en respuesta a LPS. En esta vía se puede prescindir del flujo de K<sup>+</sup>, se requieren las moléculas RIPK1, FAS asociadas a la proteína del dominio de muerte (FADD) y CASP8. Adaptado de He *et al.*, 2016 - Tendencias en Inmunología.

### 1.7. Características de la infección con *Trypanosoma cruzi*

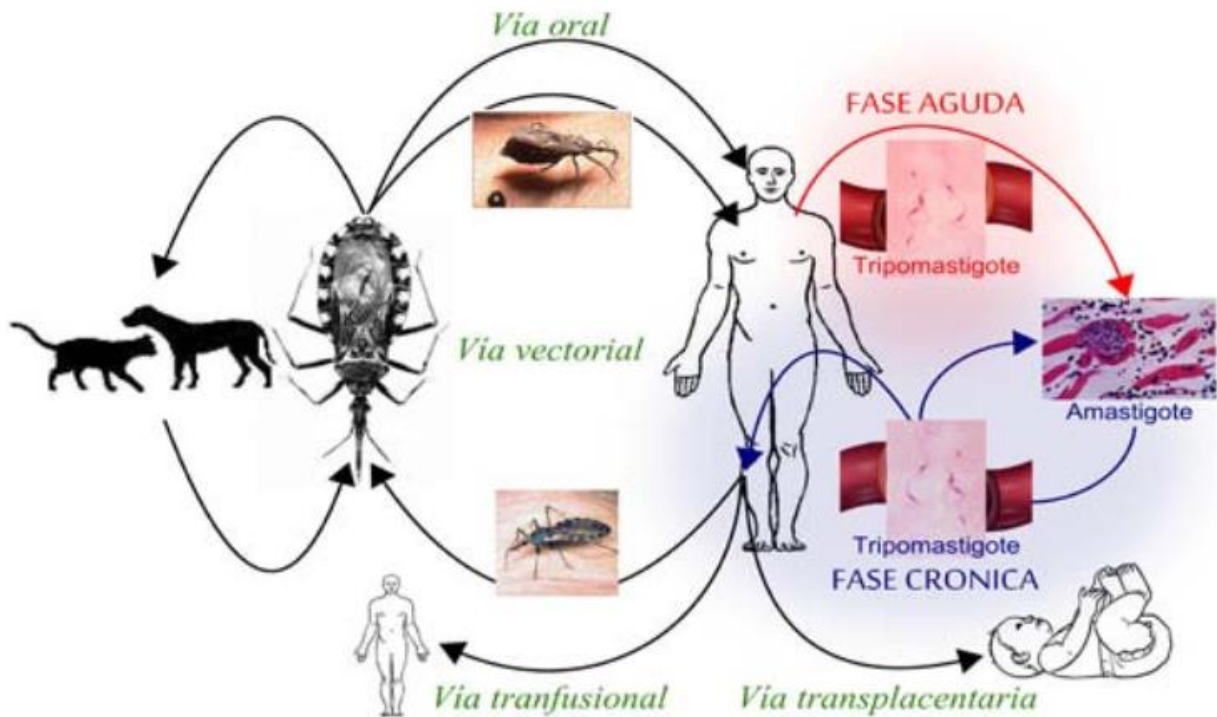
El parásito protozario intracelular obligado *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas y se transmite al ser humano a través de picaduras por insectos hematófagos como los triatomíneos. Otras vías alternativas incluyen la transmisión por vía congénita, infección oral por ingestión de líquidos o sólidos contaminados, transfusión sanguínea, transplante de órganos e inoculación accidental en laboratorios (Fig. 5). En la actualidad, la Organización mundial de la salud (OMS) estima que entre 6-7 millones de personas están infectadas a nivel mundial. Si bien la enfermedad de Chagas es endémica de América Central y del Sur, los fenómenos migratorios facilitaron la globalización de la patología con casos registrados en EEUU, Europa y Japón, ubicándola en el foco de la investigación a nivel global.

[<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>].

Clínicamente, la enfermedad de Chagas se caracteriza por una fase aguda y una crónica. En la fase aguda de la infección aparecen lesiones inflamatorias locales en el sitio de entrada de los tripomastigotes metacíclicos, donde además comenzaron su ciclo de replicación. Durante alrededor de los dos meses de esta fase, asintomática en la mayoría de los pacientes, se encuentra un elevado número de tripomastigotes en sangre (parasitemia) con altos niveles de citoquinas plasmáticas y gran activación de linfocitos T y B. Algunos individuos pueden presentar síntomas como fiebre prolongada, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, linfadenopatía, hepato- y esplenomegalia, y un intenso proceso inflamatorio asociado a nidos de parásitos en los tejidos. Entre el 5-10% de las personas infectadas puede desarrollar una condición más severa con miocarditis o meningoencefalitis que conducen a la muerte durante esta fase. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas permanecen asintomáticas (llamada “forma indeterminada”), durante años e incluso décadas constituyéndose la fase crónica de la infección. De este grupo, alrededor del 30% desarrollan complicaciones cardíacas o gastrointestinales propias de la enfermedad de Chagas. Durante esta fase no pueden detectarse parásitos en

sangre y es el corazón el órgano más severamente afectado dependiendo de las cepas del parásito que predominan en la región. En esta fase puede desarrollarse una cardiomiopatía característica que conduce a la falla cardíaca congestiva seguida de muerte. Las bases de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) han sido tema de debate durante muchos años. La inmunopatología como consecuencia de la persistencia del parásito es considerada un elemento clave en el desarrollo de la CCC aunque también existen numerosas evidencias que apoyan el concepto de que la respuesta inmune juega un rol clave en este proceso <sup>23, 24, 25, 26</sup>.

El tratamiento aprobado sigue dependiendo de nitrofurano (Nifurtimox) y nitroimidazole (Benznidazole) ya que son las únicas drogas efectivas durante la fase aguda o reactivación de la enfermedad. Sin embargo, su empleo está limitado por su ineficacia durante la etapa crónica y por los marcados efectos adversos que acarrearán<sup>27</sup>. En un estudio prospectivo, multicéntrico y al azar en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica, el tratamiento con benznidazol (BENEFIT) no fue capaz de reducir el deterioro clínico cardíaco a través de 5 años de seguimiento de los pacientes.

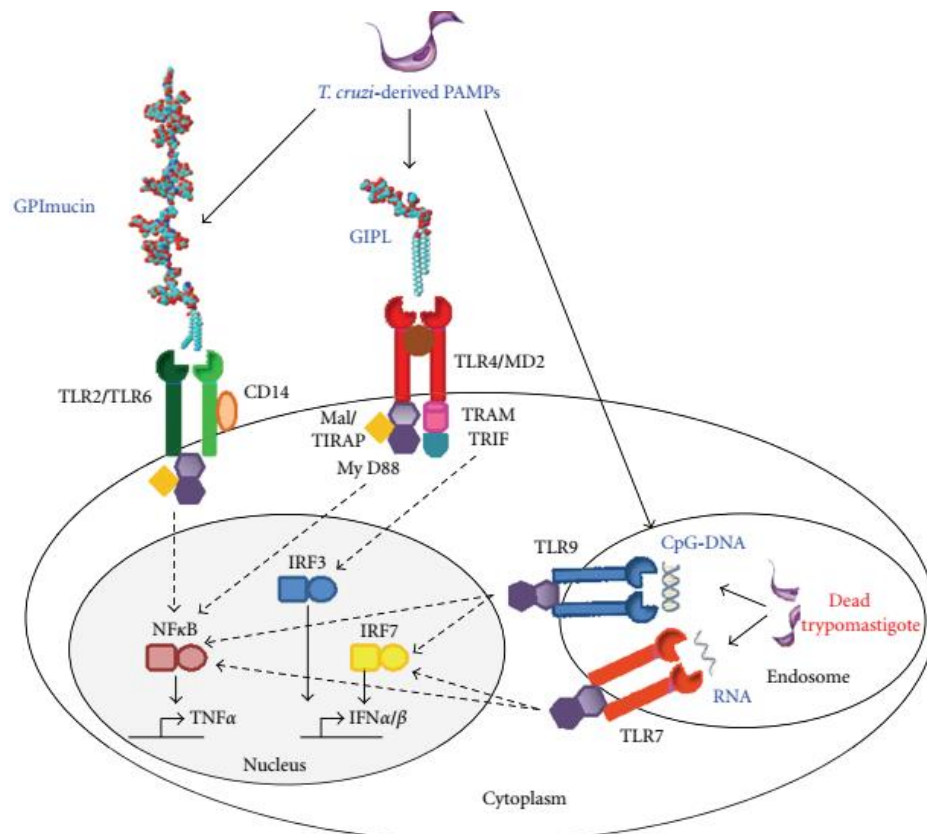


**Figura 5.** Ciclo de *Trypanosoma cruzi*: Extraído de Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* – Ministerio de Salud de la Nación Resolución Ministerial 1337/14. Rev. 2012.

### 1.8. Respuesta inmune en la fase aguda de la infección con *Trypanosoma cruzi*

La interacción entre el hospedador y el parásito *T. cruzi* es sumamente compleja e implica numerosos actores celulares y moleculares del sistema inmune cuyo balance puede resultar en un equilibrio entre el hospedador y parásito de la protección antiparasitaria y la patogénesis que desencadena la infección con este parásito intracelular. El entendimiento de las interacciones de los distintos receptores inmunes y la comunicación entre los mecanismos celulares y humorales de las inmunidades innata y adaptativa del hospedador, son esenciales para desarrollar nuevas terapias contra esta patología.

La inmunidad innata es la primera barrera que encuentra el parásito al contactar al huésped. El parásito atraviesa la barrera de la piel y luego se disemina a través de la sangre activando la defensa del complemento y de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, principalmente). Estas moléculas se unen a *T. cruzi* y median la endocitosis mediada por receptores. Por otro lado, macrófagos y células dendríticas expresan receptores de reconocimiento PRRs que ligan los PAMPs del protozoario. Se ha demostrado que los TLRs son claves para la respuesta contra *T. cruzi*<sup>28</sup>. Así, TLR2 media la activación de una proteína de unión a fosfonucleótido de guanina, Rab-5, que es necesaria para la internalización del parásito en los macrófagos<sup>29</sup>. El grupo de Gazzinelli *et al.*, 2006, observó que el parásito posee glicosilfosfatidilinositol-mucina que actúa como ligando de TLR2, y glicoinositolfosfolípido que es reconocido por TLR4. También TLR7 y TLR9 reconocen el ARN y el ADN del parásito respectivamente<sup>30</sup>.



**Figura 6.** PAMPs derivados de *T. cruzi* son reconocidos por TLRs. Diferentes moléculas del parásito tanto de superficie como nucleares son reconocidas por diferentes TLRs localizados en membranas plasmática y endosómica, respectivamente. Adaptado de Rodrigues *et. al.*, 2012<sup>31</sup>.

La activación de estos receptores genera la secreción de IL-12, NO y TNF- $\alpha$  por macrófagos. La IL-12 es un importante mediador de la producción de IFN- $\gamma$  a través de la inducción del desarrollo de células Th1 y activación de células NK. Los macrófagos son uno de los tipos celulares, blanco de la infección, al mismo tiempo que constituyen células efectoras claves para destruir al parásito cuando son activados clásicamente por IFN- $\gamma$  (M1). Uno de los mecanismos microbicidas empleados por los macrófagos es la producción de NO. La deficiencia de IFN $\gamma$ , IL-12 o NO desencadena una gran susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*<sup>32</sup>. Además, durante la infección aguda, los macrófagos producen grandes cantidades de NO a través de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que oxida L-arginina y transfiere electrones de NADPH. Una vez generado, el NO puede reaccionar con derivados del oxígeno para producir peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), potente oxidante y molécula citotóxica que es altamente eficaz contra *T. cruzi*<sup>33</sup>. Los peroxinitritos también pueden dañar tejidos del hospedador por la peroxidación lipídica (dañando la integridad de la membrana) así como la función mitocondrial y pueden dar lugar a la muerte celular por apoptosis o necrosis<sup>34, 35</sup>. Además, los radicales libres secundarios intermedios producidos a partir de ONOO<sup>-</sup>, tales como hidroxilo, dióxido de nitrógeno entre otros, pueden participar en la oxidación y nitración de proteínas, lípidos y ADN. El estrés oxidativo también puede ser perjudicial para el huésped habiéndose demostrado que conduce a la progresión de la enfermedad de Chagas y al desarrollo de miocarditis<sup>35</sup> y esteatohepatitis<sup>36</sup>.

La inmunidad adaptativa desencadenada durante la fase aguda de la infección involucra a la activación policlonal de linfocitos B con intensa producción de inmunoglobulinas. Esta respuesta necesita de la colaboración de células T CD4<sup>+</sup><sup>37</sup>. En este



sentido, tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ son importantes para controlar la infección. El parásito es capaz de infectar a casi todas las células del huésped<sup>38</sup> y una vez internalizado es capaz de escapar de las vacuolas parasitóforas hacia el citoplasma. Los antígenos son procesados y presentados en el contexto del MHC-I para ser reconocido por células T CD8+<sup>39</sup>. Si bien las células citotóxicas específicas son importantes para el control de la parasitemia y parasitismo tisular, la respuesta inmune no logra eliminar la infección y se establece la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Este control no es perjudicial para el *T. cruzi*, ya que reduce la mortalidad del hospedador mientras se mantiene el parásito en los tejidos del hospedador. Los estudios indican que las células citotóxicas tienen un papel protector para controlar al parásito, incluyendo la secreción de citoquinas que inducen la actividad microbicida de células del huésped como los macrófagos, además de la muerte de células infectadas mediante perforinas, granzimas y Fas<sup>40, 41</sup>.

Por otro lado, los antígenos parasitarios solubles de parásitos que no pudieron escapar de las vacuolas son presentados por células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) a través del MHC-II a los linfocitos T CD4+ colaboradores. Debido a que la infección con las formas amastigotes y tripomastigotes generan la síntesis de IL-12 por monocitos y macrófagos, e IFN- $\gamma$  por células NK, los clones de células T específicos para el parásito se diferencian hacia el fenotipo Th1. De acuerdo con esto, se ha reportado que linfocitos T CD4+ humanos y murinos producen elevados niveles de IFN- $\gamma$  acompañados de IgG2a (en ratones) e IgG1 (en humanos)<sup>42</sup>, durante la infección. Es decir, que los linfocitos Th1 específicos contribuyen a la defensa del huésped a través de la producción de IFN- $\gamma$ , la activación de macrófagos, la diferenciación y activación de linfocitos T CD8+ y la síntesis de isotipos de IgG que favorecen la activación del sistema del complemento y la opsonización o muerte celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por otra parte, la transferencia adoptiva de células T CD4+ productoras de IL-4 e IL-10 (fenotipo Th2) incrementa la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en ratones. Así, el balance de los perfiles Th1/Th2 determina la resistencia o la susceptibilidad a la infección<sup>43</sup>.

Una vez desencadenada la respuesta inmune para eliminar al parásito, es necesario que el huésped controle la respuesta inmune para evitar el daño a los tejidos propios. Las células T regulatorias representan uno de los mecanismos clave en este proceso de regulación inmune ya que previenen la patología inducida por la infección limitando la lesión tisular colateral que puede generarse por una respuesta antiparasitaria exacerbada<sup>44</sup>. Otras poblaciones capaces de reducir la inflamación y la mortalidad durante esta infección por diversos mecanismos, son los neutrófilos secretores de IL-10 (reclutados por IL-17RA)<sup>45</sup> y células supresoras mieloides (CSM)<sup>46</sup>.

A nivel experimental, el empleo de ratones es útil como modelo para el estudio de la enfermedad de Chagas debido a que los ratones son susceptibles a la infección con *T. cruzi* y desarrollan fases aguda y crónica similares a las desarrolladas por los seres humanos<sup>47</sup>.

La susceptibilidad y patogénesis de la enfermedad de Chagas en el modelo murino están determinadas por numerosos factores del parásito como la cepa empleada, su perfil genético, virulencia, tropismo, la magnitud del inóculo y la vía de infección además de la base genética del hospedador y su estado nutricional. Sin embargo, los ratones infectados evidencian claramente una fase aguda con parasitemia dentro de 7 a 30 días post-infección. Luego de ese periodo comienza la fase crónica caracterizada por una parasitemia nula y el desarrollo de una cardiomiopatía caracterizada por infiltrado de células inflamatorias revelado mediante estudios histopatológicos<sup>47</sup>.

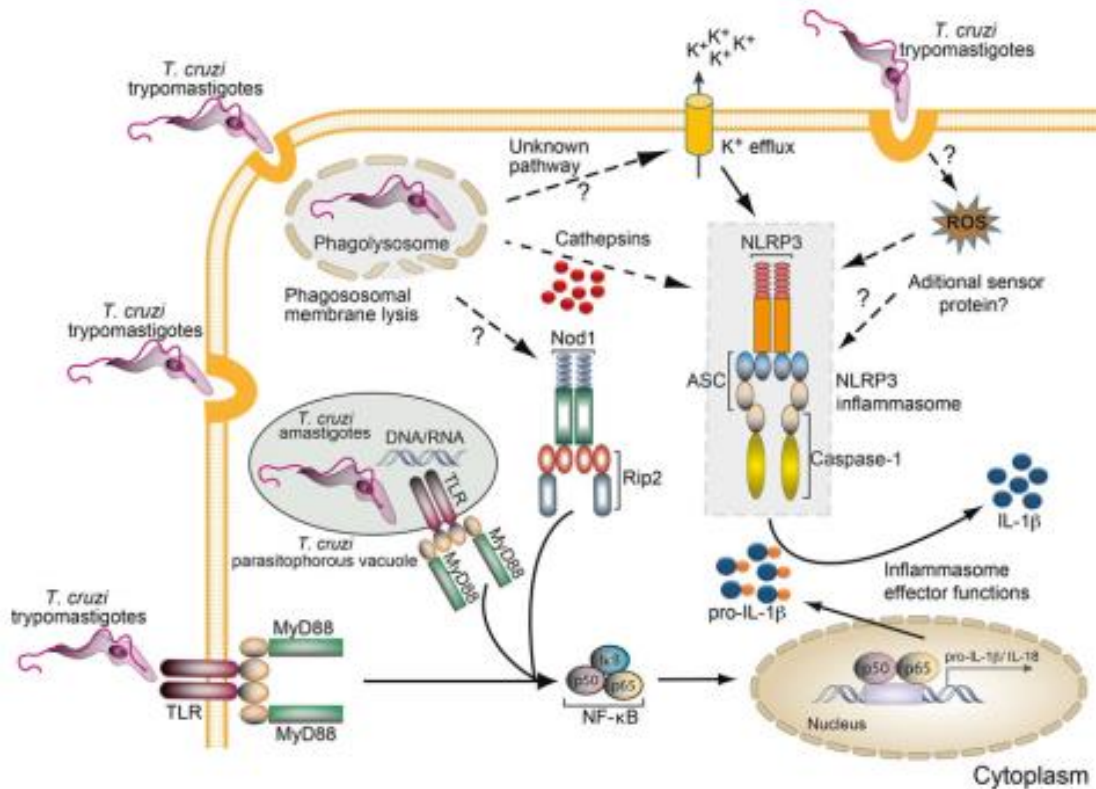
Nuestro grupo demostró previamente la influencia de la base genética del hospedador utilizando dos cepas de ratones BALB/c y B6 durante la infección aguda con *T. cruzi* (cepa Tulahuén). Los resultados demostraron que las parasitemias fueron significativamente menores en B6 comparadas con las de la cepa BALB/c y que, además, los ratones B6 desarrollaron un severo daño hepático además del cardíaco asociado con una elevada mortalidad durante el periodo agudo<sup>47</sup>. La infección incrementó la actividad de las transaminasas AST (GOT) y ALT (GPT) en ambas cepas, aunque fueron más elevadas

al igual que la tasa de apoptosis y necrosis hepática en B6. Estos resultados sugieren que la carga parasitaria no estaría relacionada con la severidad de la infección en la cepa B6. En el avance del estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la inmunidad innata, encontramos una expresión aumentada del ARNm para TLR2 y TLR4 en tejido hepático de ratones BALB/c infectados respecto de ratones B6<sup>47</sup>. Interesantemente, en el tejido hepático de ratones B6, observamos un aumento del mensajero de TLR9. Esta expresión diferencial del ARNm para TLR2, TLR4 y TLR9, en cepas con diferente grado de susceptibilidad a la infección y la enfermedad, nos podrían estar indicando una posible asociación entre el desbalance de las citoquinas y la señal dada por estos receptores de inmunidad innata. Interesantemente, el pre-tratamiento *in vivo* con Pam3CSK4, agonista sintético de TLR2 un día antes de la infección, redujo la inflamación en tejido hepático de ratones B6 evaluado por menores niveles de transaminasas hepáticas (ALT y AST) y focos inflamatorios. Estos resultados constituyeron una estrategia promisoriosa para disminuir la inflamación hepática en este modelo de infección aguda<sup>48</sup>.

Un fuerte perfil de citoquinas pro-inflamatorias fue observado en B6, mientras que la citoquina IL10, inmunoreguladora, sólo fue detectada en hígado de BALB/c. En línea con estas observaciones, se ha demostrado que ratones deficientes en IL-10 e infectados con otra cepa parasitaria, poseen menor número de parásitos en sangre y en tejidos con elevada producción de IFN- $\gamma$  y NO por parte de las células del bazo comparado con las de los ratones *WT*<sup>49</sup>. Para entender el mecanismo del daño hepático, hipotetizamos que la falta de IL-10 podría contribuir al exacerbado perfil pro-inflamatorio que conduciría a la injuria hepática severa en ratones B6. Las consecuencias deletéreas sobre los órganos blancos, entre ellos el hígado, podrían estar vinculadas con señales tempranas durante la infección, donde los receptores NLRs además de los TLRs podrían jugar un rol crítico. En este sentido, la modulación de la actividad de los NLRs y/o TLRs mediante agonistas/antagonistas podría abordarse como posible estrategia terapéutica durante la infección con *T. cruzi*<sup>48, 50</sup>.

### 1.9. Rol de NLRP3 inflammasoma durante la infección con *T. cruzi*

Los NLRs forman parte de la respuesta hacia *T. cruzi*, como primero se reportó para NOD1<sup>51</sup>. Si bien los animales *knock-out* para este receptor presentan mayor carga parasitaria y mortalidad que los *WT*, aún son capaces de producir citoquinas a nivel sistémico, sugiriendo que otros NLRs también aportarían para la resistencia contra el parásito. Evidencias indican que caspasa-1 y NLRP3 se activan frente a la infección liberando IL-1 $\beta$  tanto *in vitro* como *in vivo*. Puntualmente, NLRP3 se activa en respuesta al daño lisosomal que genera el escape del protozooario desde la vacuola parasitófora, pero es independiente del flujo de K<sup>+</sup> y de la generación de ROS. Además, estos trabajos demostraron que la producción de NO es anulada en macrófagos primarios de animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados con la cepa Y de *T. cruzi*<sup>53</sup>. Sin embargo, Silva *et al.*, 2013, propusieron que este fenómeno es dependiente de IL-1 $\beta$  e IL-1R, mientras que Goncalves *et al.*, 2013, postularon que es independiente de estas moléculas. Otro grupo demostró que NLRP3 estaría involucrado en la producción de ROS como respuesta antiparasitaria, ya que macrófagos primarios *nlrp3*<sup>-/-</sup> son incapaces de producir IL-1 $\beta$  pero mostraron mayores niveles de ROS que sus contrapartes *WT*<sup>52, 53, 54</sup>. En base a lo arriba descrito, el papel de NLRP3 y los mecanismos involucrados en su activación parecen variar según el diseño experimental empleado. Estos resultados enfatizan la complejidad de la respuesta antiparasitaria orquestada por el inflammasoma NLRP3 junto a otros receptores innatos y reflejada en los diversos mecanismos microbicidas montados contra *T. cruzi* (Fig. 7)<sup>14</sup>.



**Figura 7.** Activación del inflammasoma NLRP3 en respuesta a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares, como los TLRs, son activados por patrones moleculares de *T. cruzi*. La activación de TLRs y NOD1 desencadena el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 y el receptor de interacción serín-treonina quinasa-2 (RIP2), respectivamente. Esto activa la señalización aguas abajo, incluyendo la señalización NF-κB y MAPK. Se desconocen los mecanismos aguas arriba que median la activación de NOD1 en respuesta a *T. cruzi*. La infección de macrófagos conduce al eflujo de K<sup>+</sup>, la generación de ROS y ruptura de la membrana fagosomal llevando a la liberación de catepsinas vacuolares en el citoplasma de la célula huésped. Estos procesos culminan en el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3/ASC/caspasa-1, que conduce a la escisión de la caspasa-1 y procesamiento de pro-IL-1β para liberar la IL-1 madura. Las flechas punteadas con un signo de interrogación indican mecanismos desconocidos. Tomado de Zamboni y Lima-Junior, 2015.

El estudio del hígado es importante debido no sólo por su papel metabólico sino también por considerarse en los últimos años como un órgano clave en la defensa contra patógenos en los procesos inflamatorios agudos. De manera interesante, el hígado es uno de los tejidos blancos de la infección con *T. cruzi* siendo los macrófagos residentes (células de Kupffer), uno de los reservorios más importantes<sup>47,48</sup>.

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Investigar el papel de inflammasoma NLRP3 y caspasa-1/11 en la inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa a nivel hepático durante la infección experimental aguda con *T. cruzi* y su relación con el daño hepático.

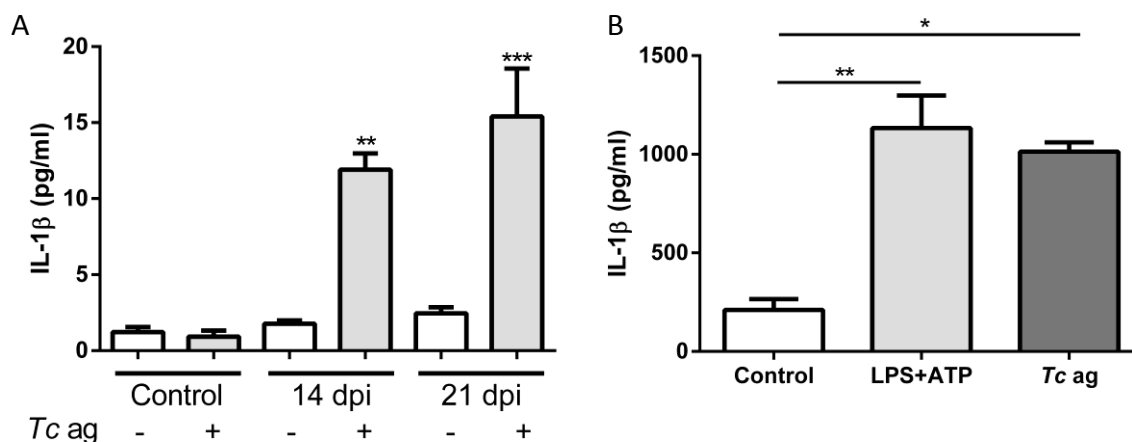
**Objetivos específicos:** Abordar los siguientes estudios en tres grupos de animales *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados con *T. cruzi* cepa Tulahuén:

- Analizar la producción de citoquinas características de la activación de inflammasomas, IL-1 $\beta$  e IL-18, en plasma y en macrófagos esplénicos de ratones *WT* infectados.
- Estudiar la expresión de los receptores de inmunidad innata NLRP3 y TLR9 en macrófagos hepáticos y la producción de IL-1 $\beta$  y agentes microbicidas.
- Caracterizar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ que infiltran el hígado.
- Determinar los niveles de citoquinas y transaminasas en plasma y analizar los cambios histológicos en hígados infectados.
- Relacionar la parasitemia, carga parasitaria y sobrevida de las tres cepas de ratones con los resultados anteriores.

## RESULTADOS

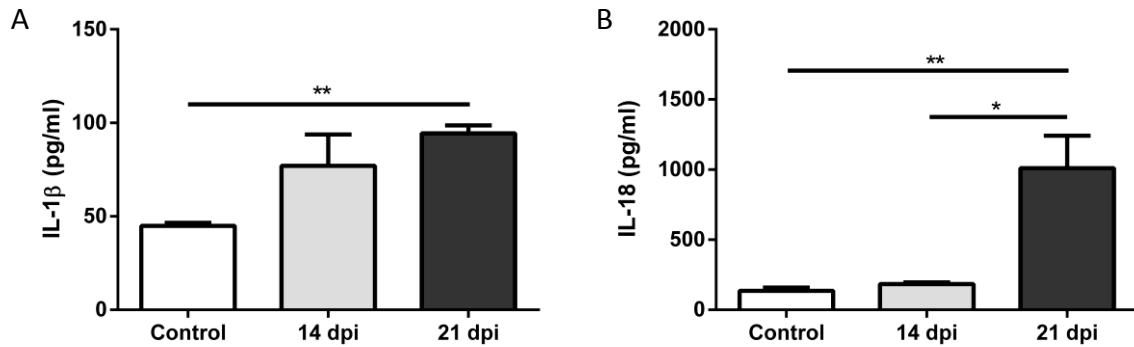
### La infección con *Trypanosoma cruzi* dispara la respuesta del inflamasoma NLRP3 en el hígado

Los inflamasomas promueven la maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18. Aunque la activación de inflamasoma en respuesta a la infección parasitaria con *T. cruzi* puede inducir una inmunidad protectora,<sup>52, 53, 54</sup> el papel que los inflamasomas juegan en la regulación de la respuesta inmune adaptativa anti-parasitaria aún no está bien caracterizada. A fin de estudiar esto, infectamos ratones B6 WT con *T. cruzi* (cepa Tulahuén) y encontramos que la estimulación *ex vivo* de esplenocitos de ratones infectados incrementó los niveles de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de cultivo respecto de los controles sin infectar. Se observó también que el extracto parasitario es suficiente para inducir este fenómeno en esplenocitos re-estimulados (**Fig. 1A**) y en esplenocitos enriquecidos en macrófagos, donde se estimuló con LPS+ATP como control positivo de activación del inflamasoma NLRP3 (**Fig. 1B**).



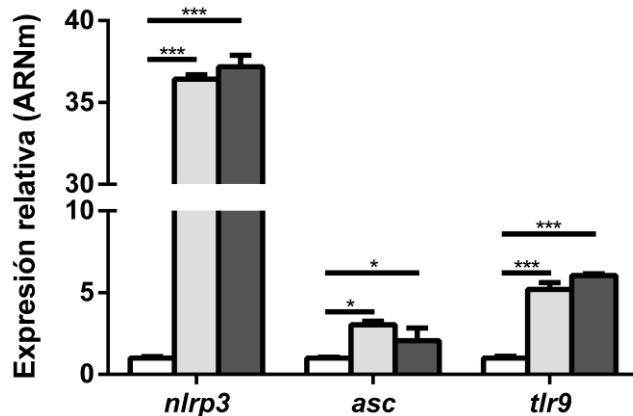
**Figura 1:** Niveles de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de esplenocitos totales (A) y enriquecidos en macrófagos (B), re-estimulados *ex vivo* con extracto parasitario (antígenos de *T. cruzi* o *Tc ag*) por 24 hs o sin estimular. LPS+ATP se empleó como control positivo de activación del inflamasoma NLRP3. n = 5 por grupo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Adicionalmente, el análisis *in vivo* a nivel sistémico de las citoquinas claves en la activación de inflamomas reveló que IL-1 $\beta$  e IL-18 alcanzaron un pico a los 21 dpi (**Fig.2A** y **2B**).



**Figura 2.** Niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$  (A) e IL-18 (B) en ratones B6 determinados por ELISA sándwich. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

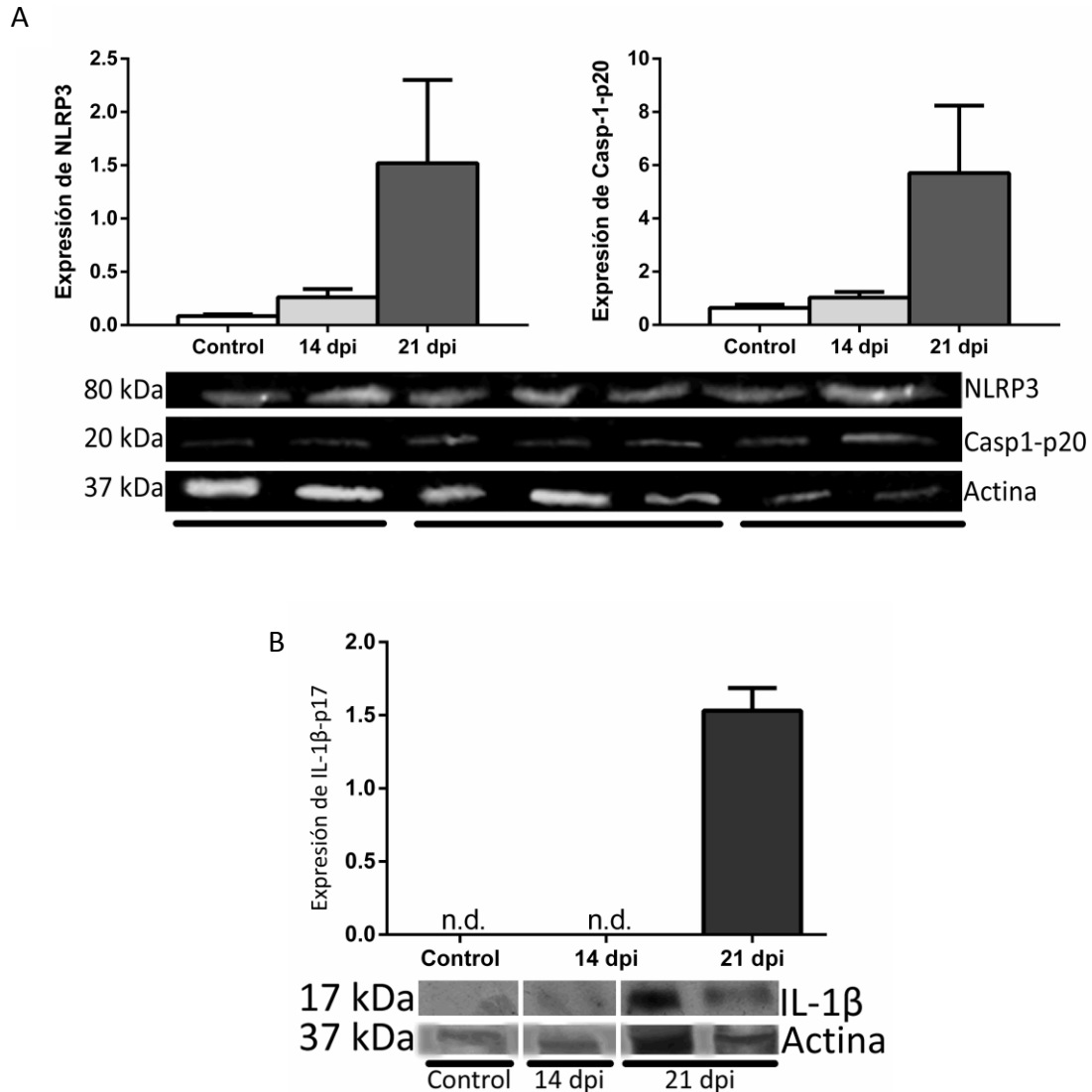
Considerando que resultados previos de nuestro grupo demostraron una elevada expresión de TLR9 en células hepáticas F4/80+ durante la infección aguda, analizamos los niveles de ARNm de TLR9, NLRP3 y ASC en el hígado. Los resultados muestran un fuerte incremento de los tres transcritos a 14 y 21 dpi en comparación con ratones no infectados (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Expresión génica de *nlrp3*, *asc* y *tlr9* a nivel hepático a diferentes tiempos post-infección. n = 4 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001.



También se observó a 21 dpi un incremento de NLRP3, de la subunidad enzimáticamente activa de caspasa-1-p20 (**Fig. 4A**) y de la citoquina activa IL-1 $\beta$ -p17, detectados mediante Western blotting (**Fig. 4B**). Estos resultados demuestran claramente que el inflamasoma NLRP3 e IL-1 $\beta$  son inducidos por la infección con *T. cruzi*.

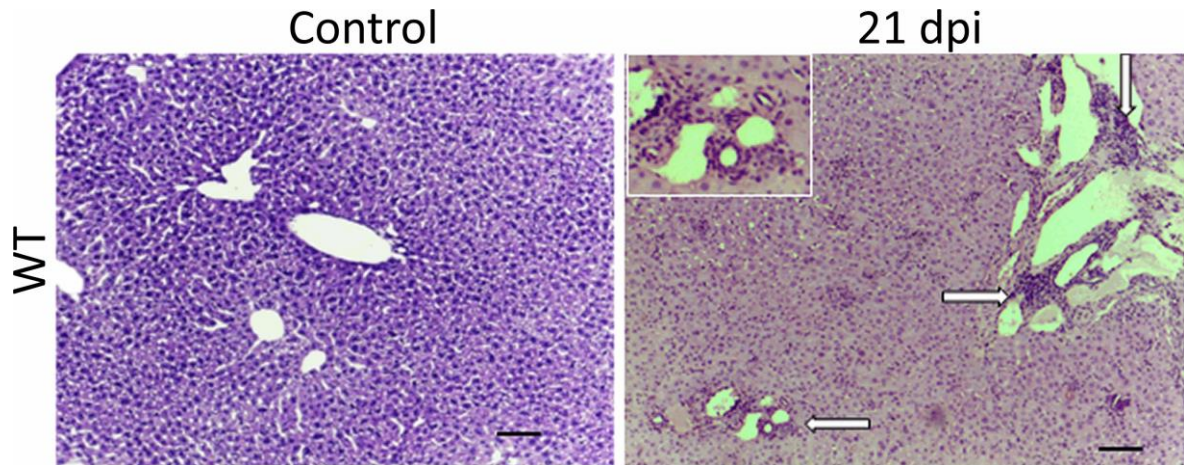


**Figura 4.** Expresión proteica de NLRP3, casp-1-p20 activa (A) e IL-1 $\beta$ -p17 activa (B) en lisado hepático de animales infectados y controles sin infectar detectadas mediante Western blot. Las barras representan la

cuantificación de las bandas. n = 4 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

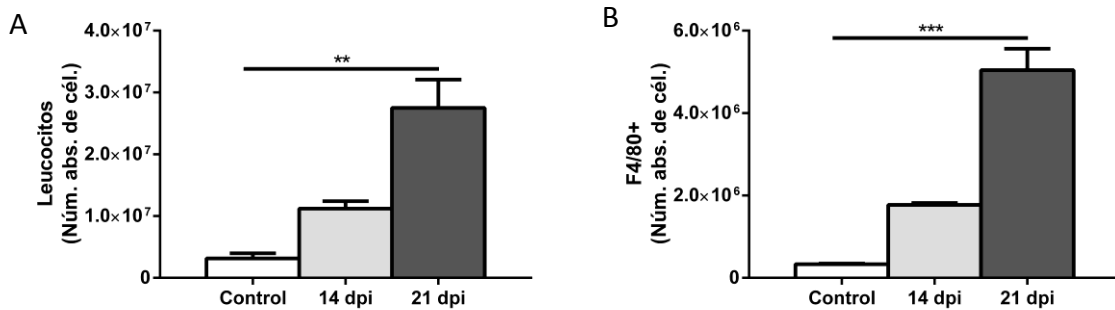
### La infección con *T. cruzi* induce la expresión de NLRP3 y TLR9 y la producción de IL-1 $\beta$ por macrófagos hepáticos

Un incremento de células inflamatorias infiltrantes, entre ellas macrófagos F4/80+, se encontraron a los 21 dpi en el hígado de ratones *WT* (Fig. 5)<sup>47</sup>.



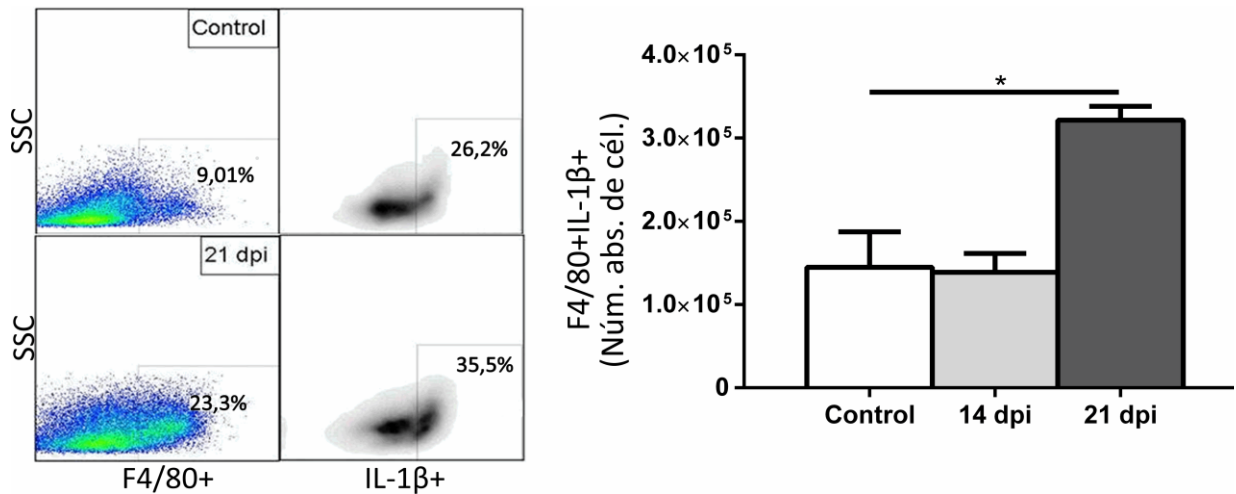
**Figura 5.** Cortes seriados de hígado representativos de ratones *WT* sin infectar (control) e infectados a 21 dpi teñidos con hematoxilina-eosina. Las microfotografías se observan a 100X y las barras de escala representan 50  $\mu$ m. Las magnificaciones muestran el infiltrado n = 5 por grupo.

Esto fue confirmado por análisis de citometría de flujo de leucocitos hepáticos purificados luego de seleccionar las células vivas (Fig. 6A y 6B).



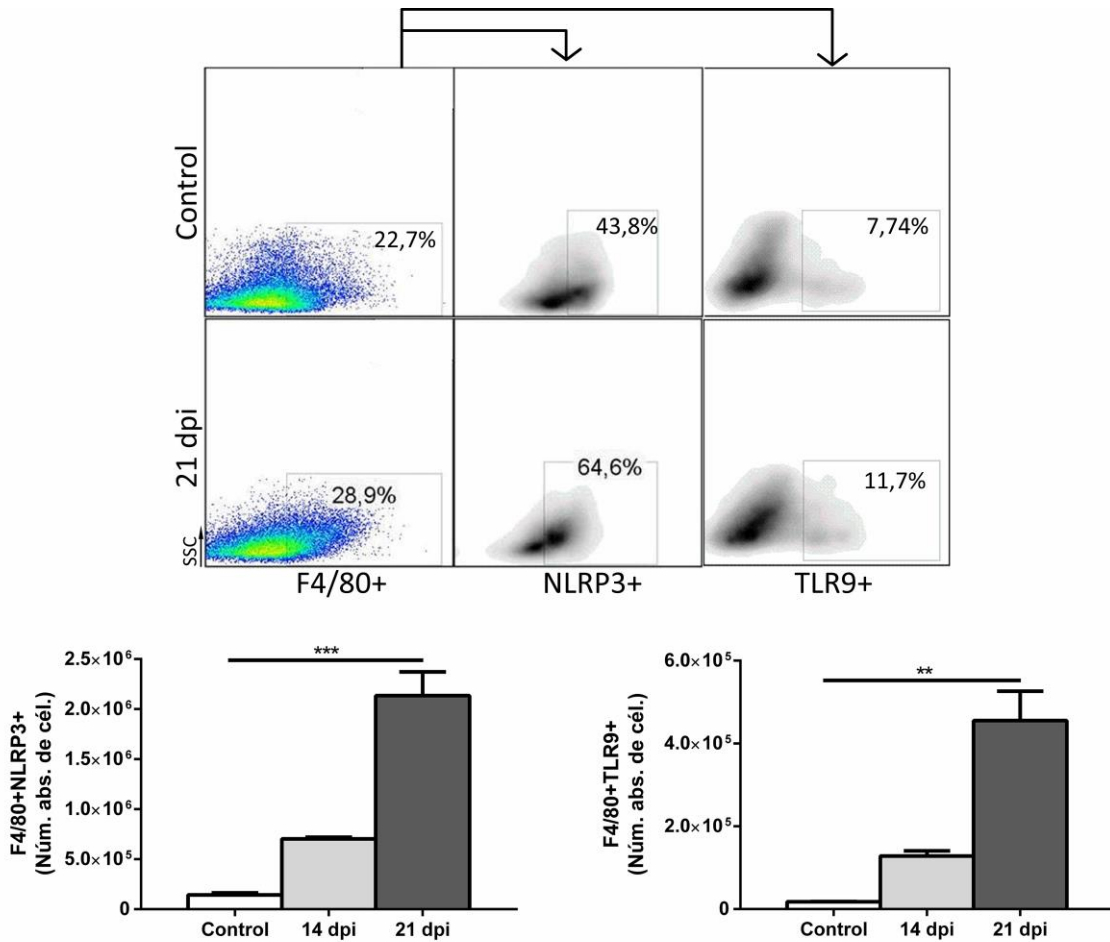
**Figura 6.** Número absoluto de leucocitos hepáticos (A) y células F4/80+ (B) de animales *WT* infectados y controles sin infectar determinados por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Los macrófagos son productores importantes de IL-1 $\beta$  y por lo tanto la activación del inflammasoma NLRP3 ocurriría principalmente en estas células *in vivo*. Por lo tanto, se evaluó la producción intracelular de IL-1 $\beta$  en células hepáticas F4/80+ y se observó que efectivamente el número de macrófagos productores de esta citoquina se incrementó luego de la infección (**Fig. 7**).



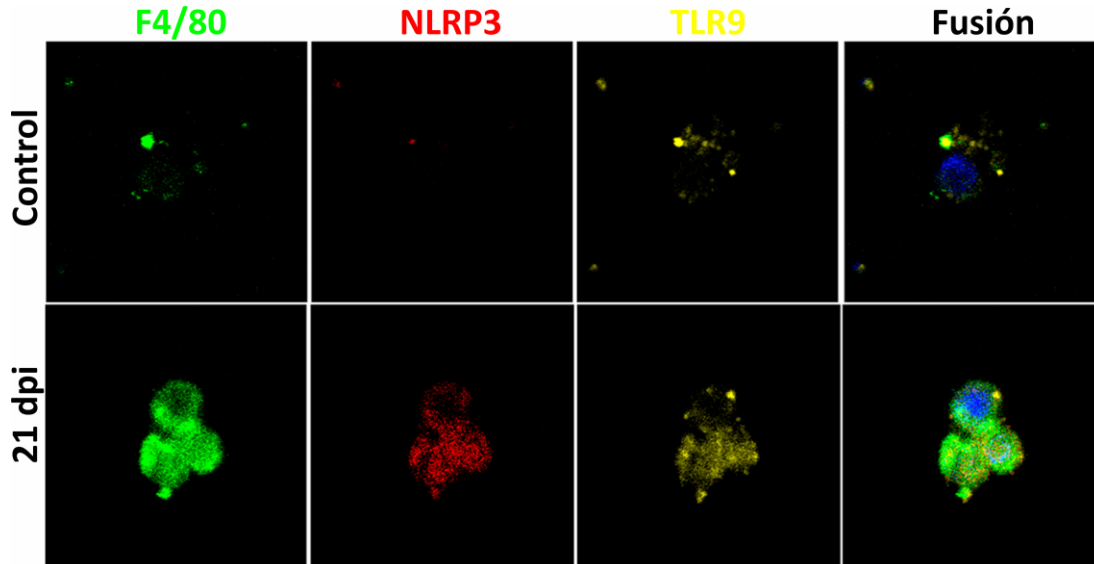
**Figura 7.** Dot plots representativos y número absoluto de células hepáticas F4/80+ productoras de IL-1 $\beta$  de animales *WT* controles (sin infectar) e infectados y analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ .

Asimismo, el estudio de la expresión intracelular de NLRP3 y TLR9 en células hepáticas reveló que los animales infectados incrementaron el número de macrófagos F4/80+NLRP3+ y F4/80+TLR9+ respecto de los controles no-infectados (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Dot plots representativos y número absoluto de células hepáticas F4/80+ que expresan NLRP3 y TLR9 en animales *WT* controles (sin infectar) y de 21 dpi analizadas por citometría de flujo. n = 5 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

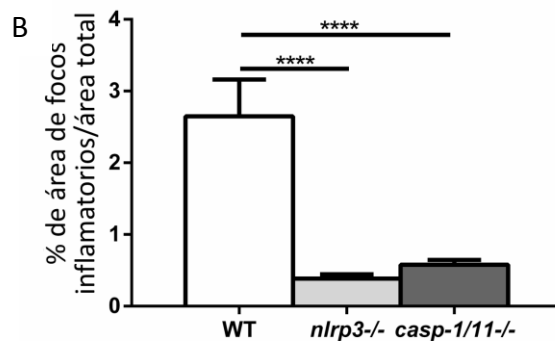
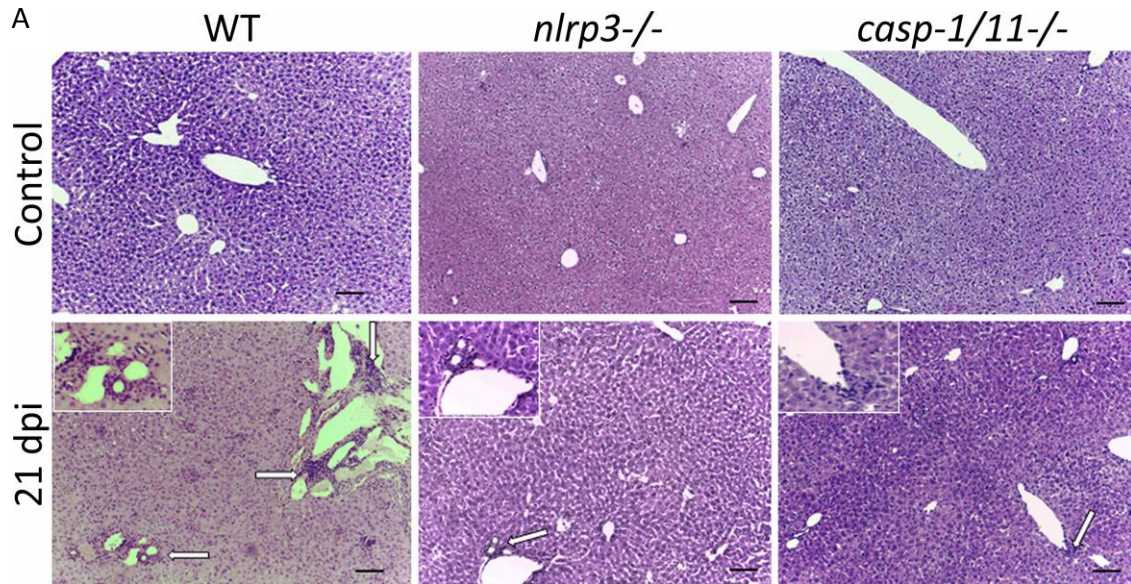
Con el propósito de confirmar estos hallazgos, evaluamos la expresión de estos receptores por microscopía confocal y encontramos que tanto NLRP3 como TLR9 son co-expresados en los macrófagos (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Co-expresión de F4/80 (verde), NLRP3 (rojo), TLR9 (amarillo) y núcleos (azul) analizados por microscopía confocal de fluorescencia en leucocitos hepáticos *WT* de animales control (sin infectar) e infectados a 21 dpi. Amplificación a 600X.

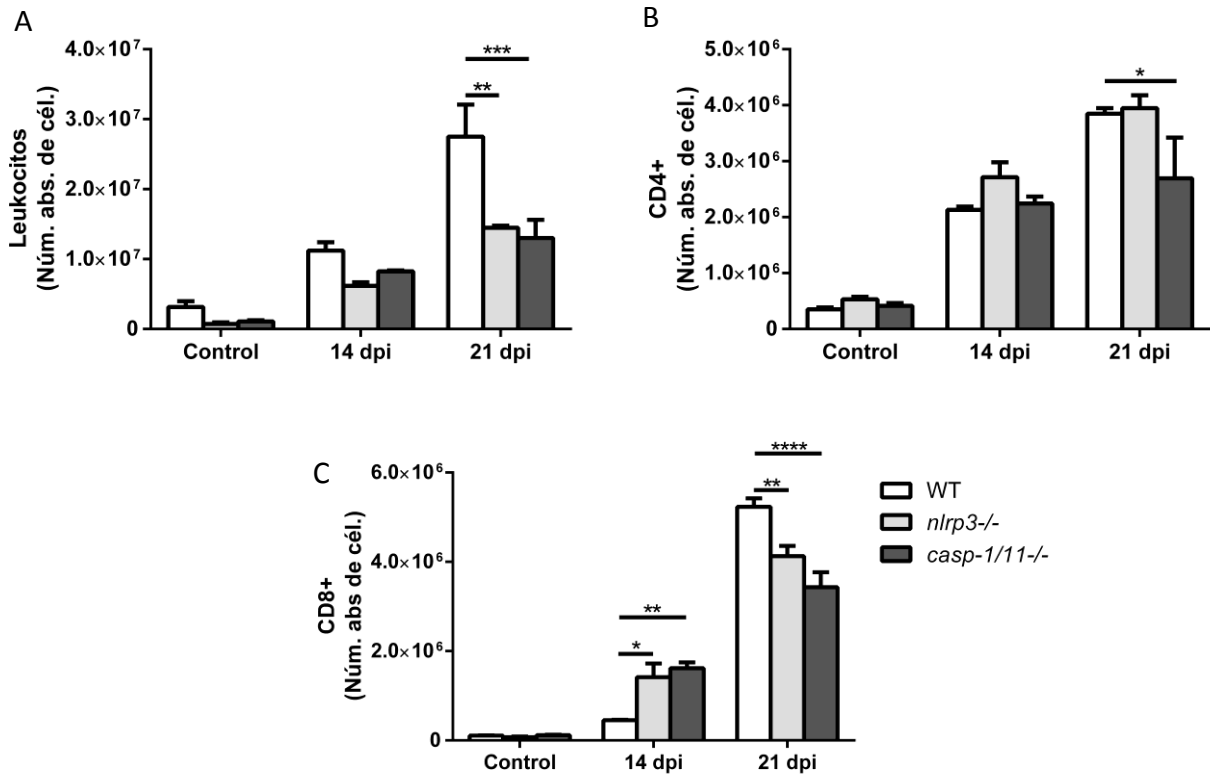
**Ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados exhiben menor número de células T CD8+ asociado a un incremento en el número de macrófagos infiltrantes en el hígado**

Con el objetivo de entender el impacto de NLRP3 y caspasa-1/11 sobre las respuestas inmunes innata y adaptativa en nuestro modelo de infección aguda, se infectaron ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> y se analizaron a los 21 dpi. Los ratones *KO* mostraron un menor número de células inflamatorias infiltrantes en secciones de hígado respecto de los animales *WT* (**Fig. 10**).



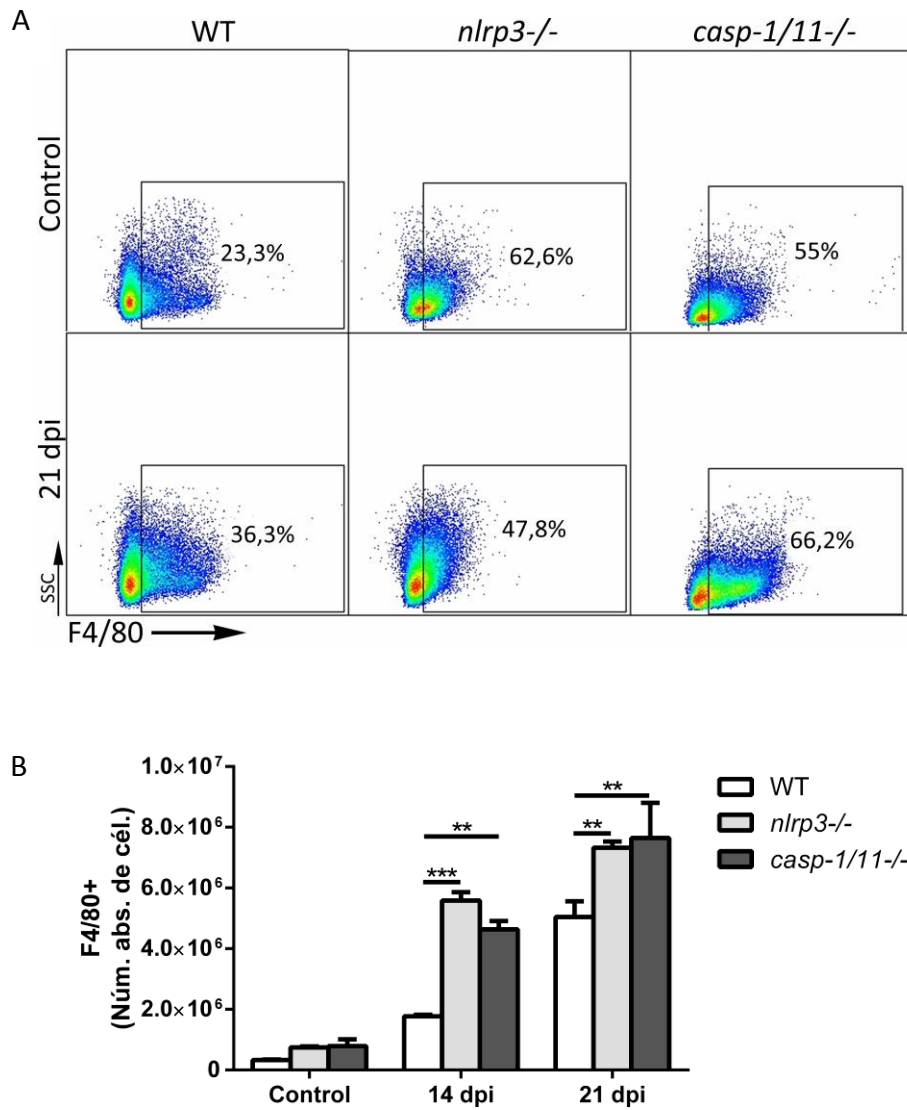
**Figura 10.** Cortes seriados de hígado representativos de ratones *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> sin infectar (control) e infectados a 21 dpi teñidos con hematoxilina-eosina. Las microfotografías (A) se observan a 100X y las barras de escala representan 50  $\mu$ m. Las magnificaciones muestran el infiltrado. El gráfico de barras (B) muestra los porcentajes de focos inflamatorios respecto del área total analizada. n = 5 por grupo.

El análisis de citometría de flujo permitió reforzar este resultado ya que se detectó un menor número de leucocitos en ambos ratones *KO* (**Fig. 11A**). El estudio de las poblaciones de células T hepáticas permitió encontrar a los 21 dpi, un menor número absoluto de células CD8<sup>+</sup> (**Fig. 11C**) en ambas cepas *knock-out* y menos células CD4<sup>+</sup> (**Fig. 11B**) sólo en los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup> comparadas con la *WT*.



**Figura 11.** Número absoluto de leucocitos hepáticos totales (A), células T CD4+ (B) y CD8+ (C) de ratones *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> sin infectar (control) e infectados a 14 y 21 dpi analizados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Notablemente, el número de células F4/80+ se incrementó en los ratones deficientes en comparación a los *WT* (Fig. 12A y 12B).

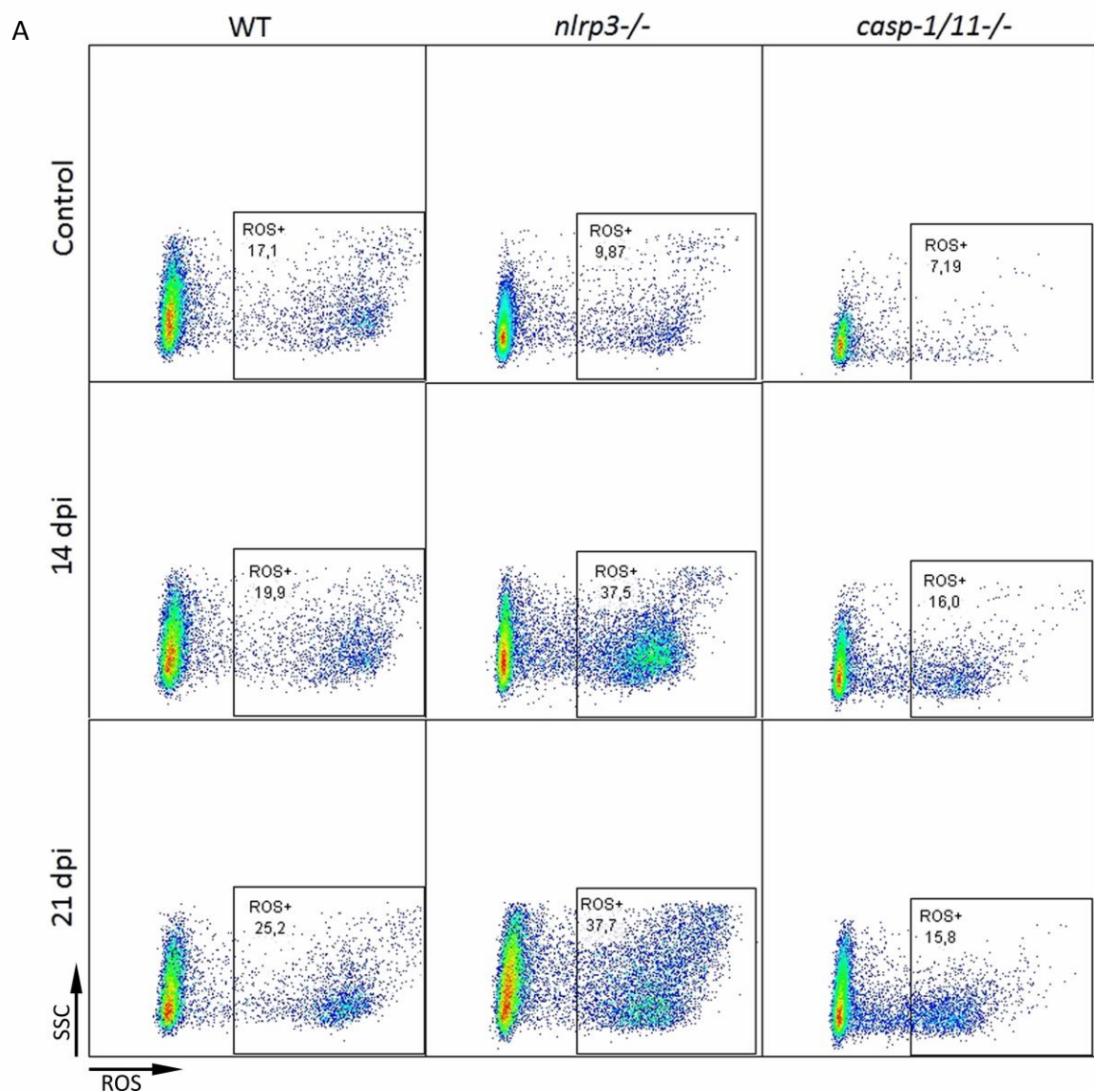


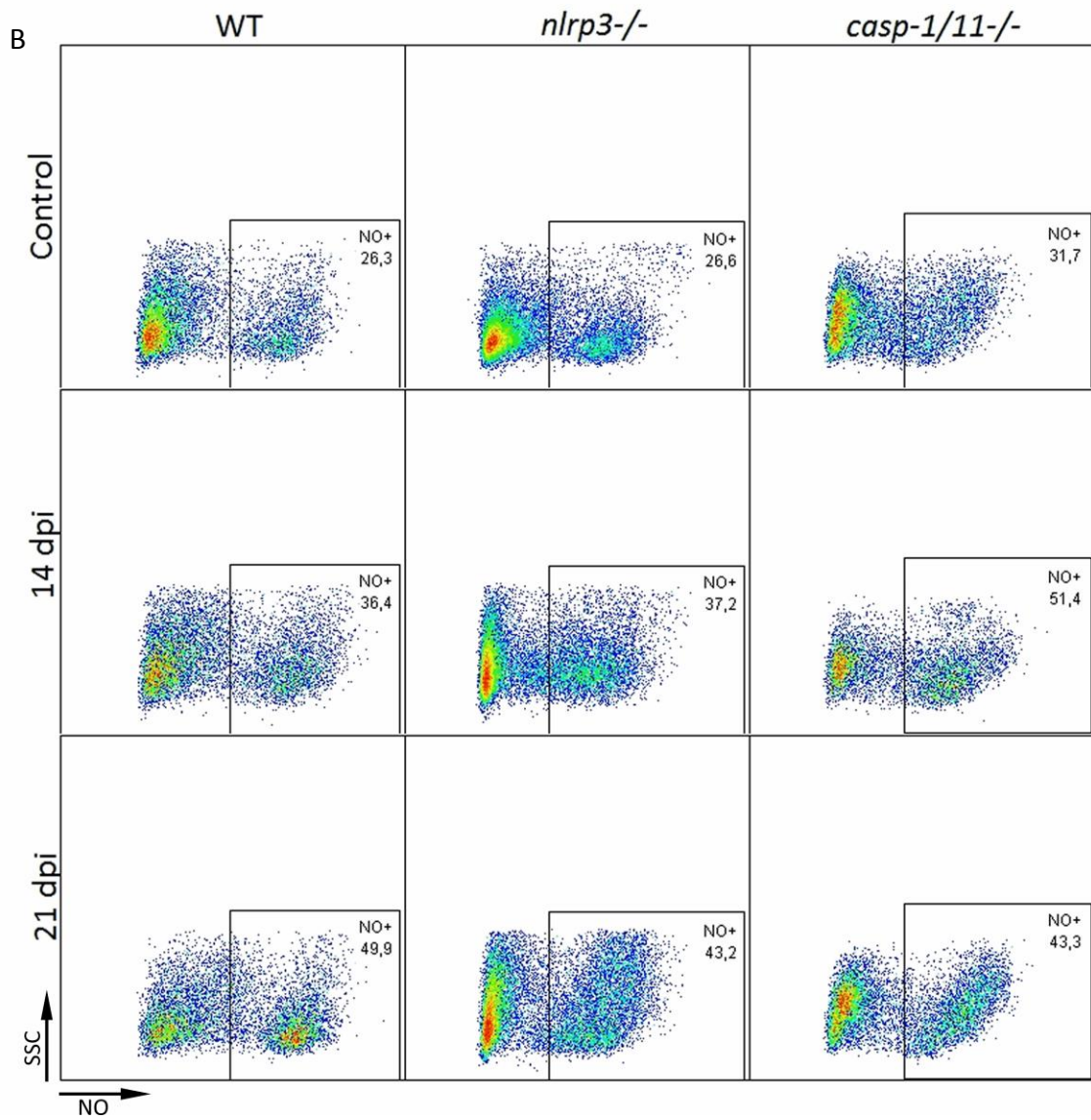
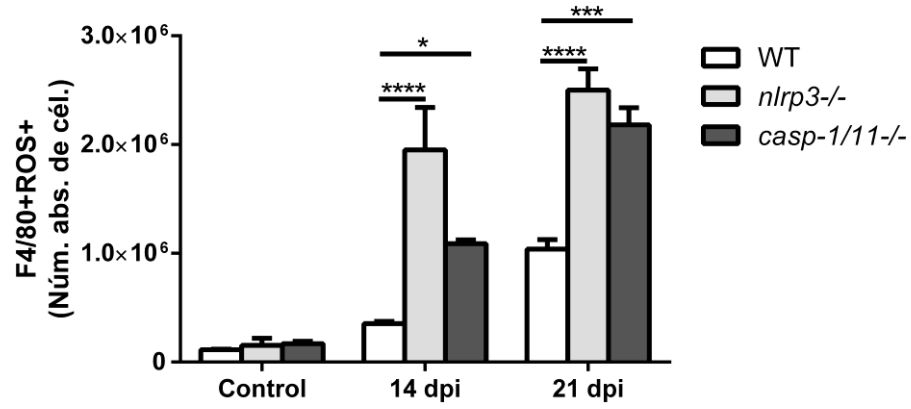
**Figura 12.** Dot plots representativos (A) y número absoluto (B) de células hepáticas F4/80+ que en animales WT, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> sin infectar (control) e infectados a 14 y 21 dpi analizados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

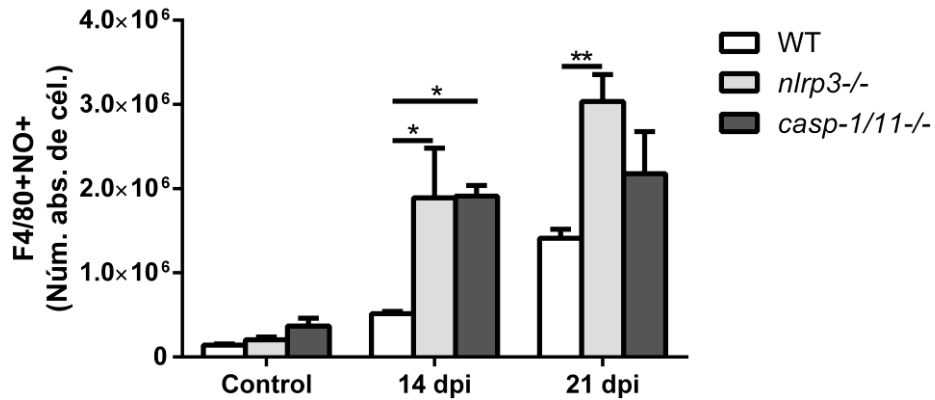


## Macrófagos hepáticos de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> exhibieron una producción intracelular incrementada de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico

Considerando que los ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados presentaron mayor infiltrado hepático de macrófagos, se examinó la capacidad de estas células para producir ROS y NO durante la infección aguda. Como se muestra en la **Fig. 13**, la infección incrementó el reclutamiento de macrófagos productores de ROS (**Fig. 13A**) y NO (**Fig. 13B**) en ratones deficientes y *WT*. Sin embargo, las mutaciones de *nlrp3* y *casp-1/11* provocaron una respuesta oxidativa exacerbada en comparación a la de los ratones *WT*.

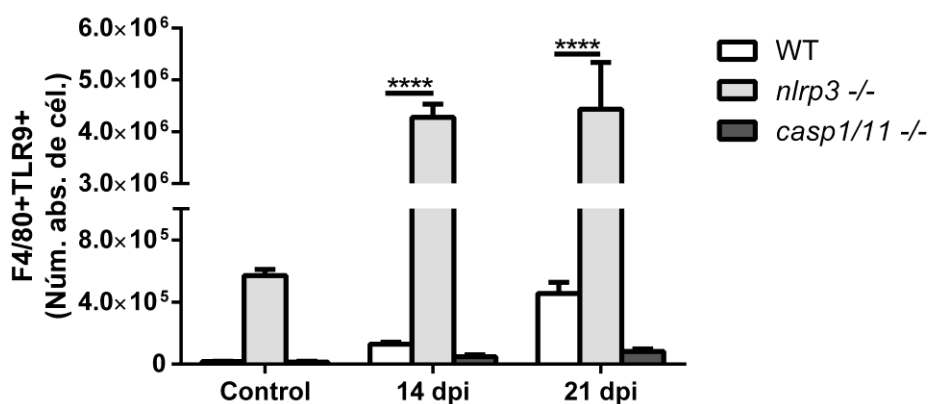






**Figura 13.** Leucocitos intrahepáticos de ratones infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> estimulados con PMA (30 ng/mL). Las ROS fueron detectadas con la sonda sensible al a oxidación H2DCFDA y el NO se determinó con la sonda DAF-FM. Dot plots representativos y número absoluto de macrófagos F4/80+ productores de ROS (A) y NO (B) determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Teniendo en cuenta que la expresión tanto de NLRP3 como de TLR9 estaban incrementada en los macrófagos de ratones *WT* infectados (**Fig. 8**) y que la activación del inflammasoma NLRP3 en modelos de injuria hepática ocurre a través de TLR9<sup>55, 56</sup>, se midió la expresión intracelular de TLR9 en macrófagos hepáticos de las tres cepas de ratones infectados. Los resultados mostraron que la máxima expresión de TLR9 ocurre en los ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados (**Fig. 14**).

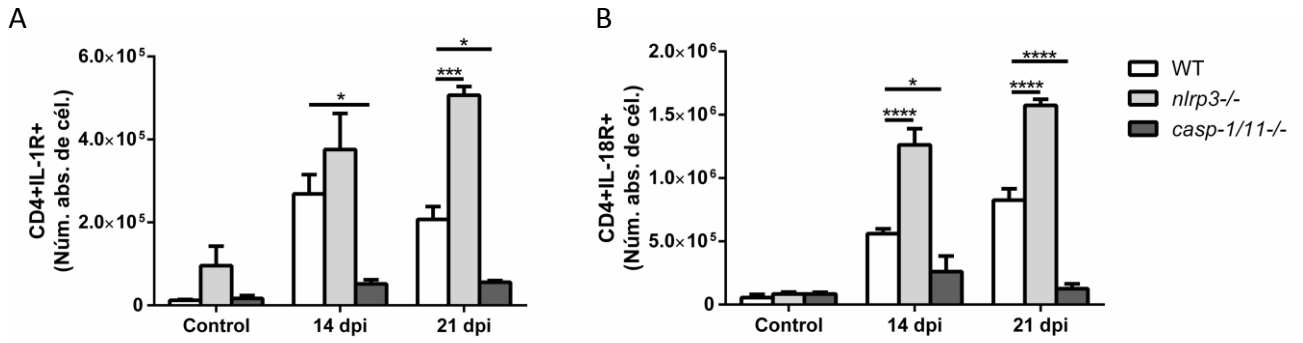


**Figura 14.** Número absoluto de células hepáticas F4/80+TLR9+ de animales infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*\*\*\*p<0.0001.

Estos resultados muestran las consecuencias deletéreas causadas por la ausencia de componentes de la vía de los inflammasomas en el balance inmune y la defensa innata del huésped.

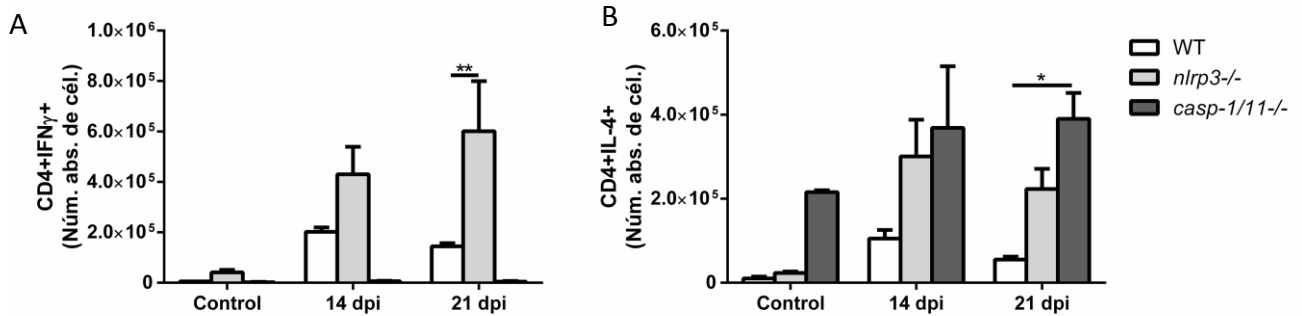
### **Ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> modulan diferencialmente los fenotipos de linfocitos T helper y T citotóxicos durante la infección con *T. cruzi***

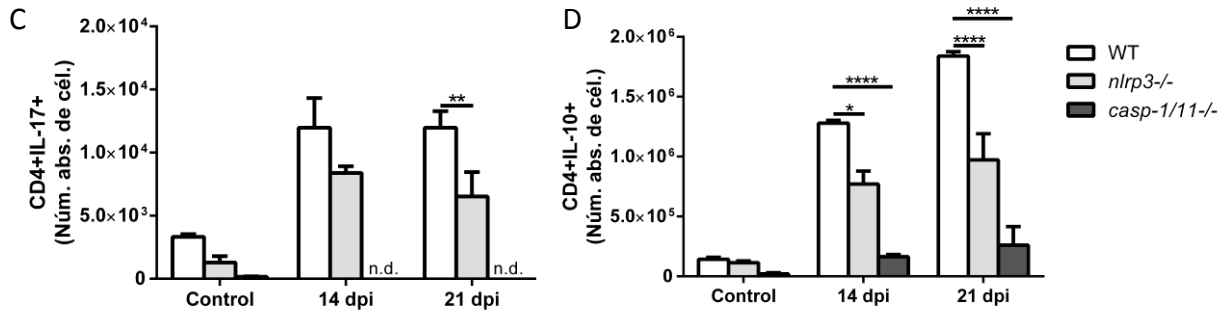
Con el objeto de avanzar en el estudio de la importancia de NLRP3 y *casp-1/11* en el desenlace de la inmunidad adaptativa, se analizó la expresión de IL-1R e IL-18R en linfocitos hepáticos CD4+ y CD8+. Se encontró que los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> tenían mayor número de linfocitos CD4+IL-1R+ (**Fig. 15A**) y CD4+IL-18R+ (**Fig. 15B**), mientras que los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup> eran incapaces de reclutar estas poblaciones en comparación a los *WT*.



**Figura 15.** Número absoluto de células hepáticas CD4+IL-1R+ (A) y CD4+IL-18R (B) de animales infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*<0.05; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Las funciones efectoras de los linfocitos CD4<sup>+</sup> se analizaron midiendo la producción intracelular de distintas citoquinas: CD4+IFN- $\gamma$  + (**Fig. 16A**), CD4+IL-4+ (**Fig. 16B**), CD4+IL-17+ (**Fig. 16C**) y CD4+IL-10+ (**Fig. 16D**).

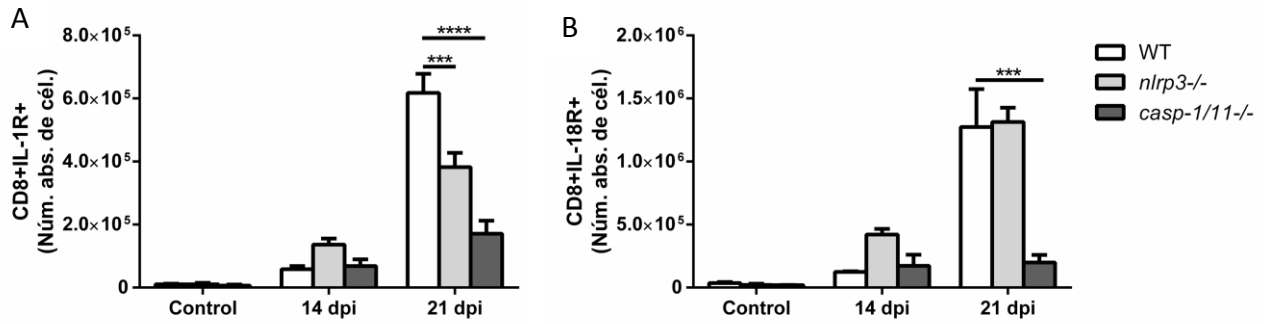




**Figura 16.** Número absoluto de células hepáticas CD4+IFN $\gamma$ + (A), CD4+IL-4+ (B), CD4+IL-17+ (C) y CD4+IL-10+ (D) de animales infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

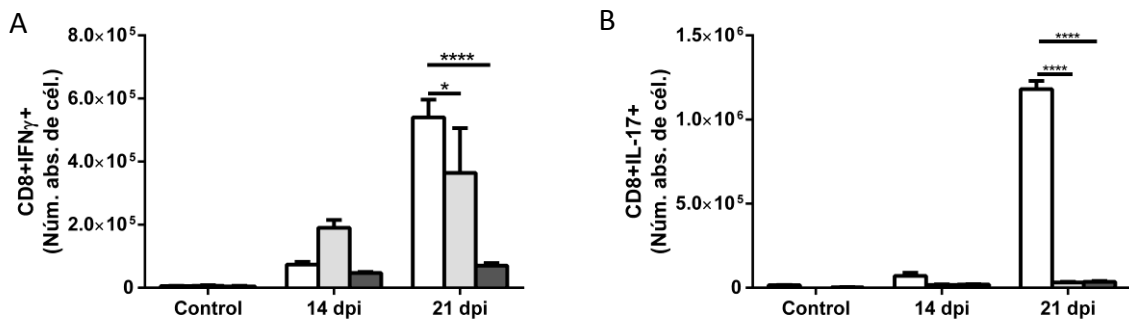
Se encontró así que los linfocitos hepáticos CD4+ de animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados mostraban un fenotipo predominante de tipo Th2, mientras que los *nlrp3*<sup>-/-</sup> mantenían un fenotipo mixto Th1/Th2/Th17.

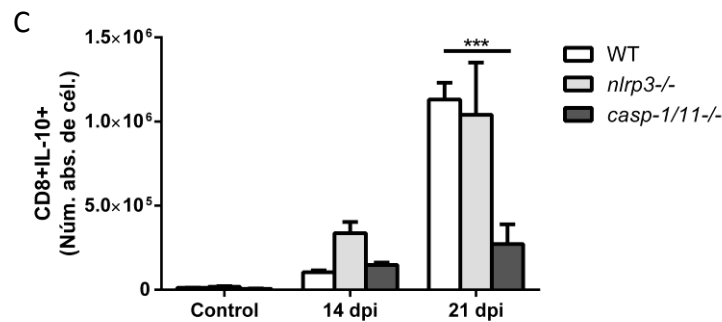
El análisis de linfocitos hepáticos CD8+ mostró que los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> poseían una dramática reducción en el número de células CD8+IL-1R+ (**Fig. 17A**) y CD8+IL-18R+ (**Fig. 17B**) en comparación a los ratones *WT*.



**Figura 17.** Número absoluto de células hepáticas CD8+IL-1R+ (A) y CD8+IL-18R (B) de animales infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Por otro lado, animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> fueron capaces de reclutar células CD8+IFN- $\gamma$  + (**Fig. 18A**) y CD8+IL-10+ (**Fig. 18C**) mientras que los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> mostraron muy bajo número de estas poblaciones celulares. Notoriamente, las células hepáticas CD8+IL-17+ estuvieron prácticamente ausentes tanto en ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> como *casp-1/11*<sup>-/-</sup> (**Fig. 18B**).





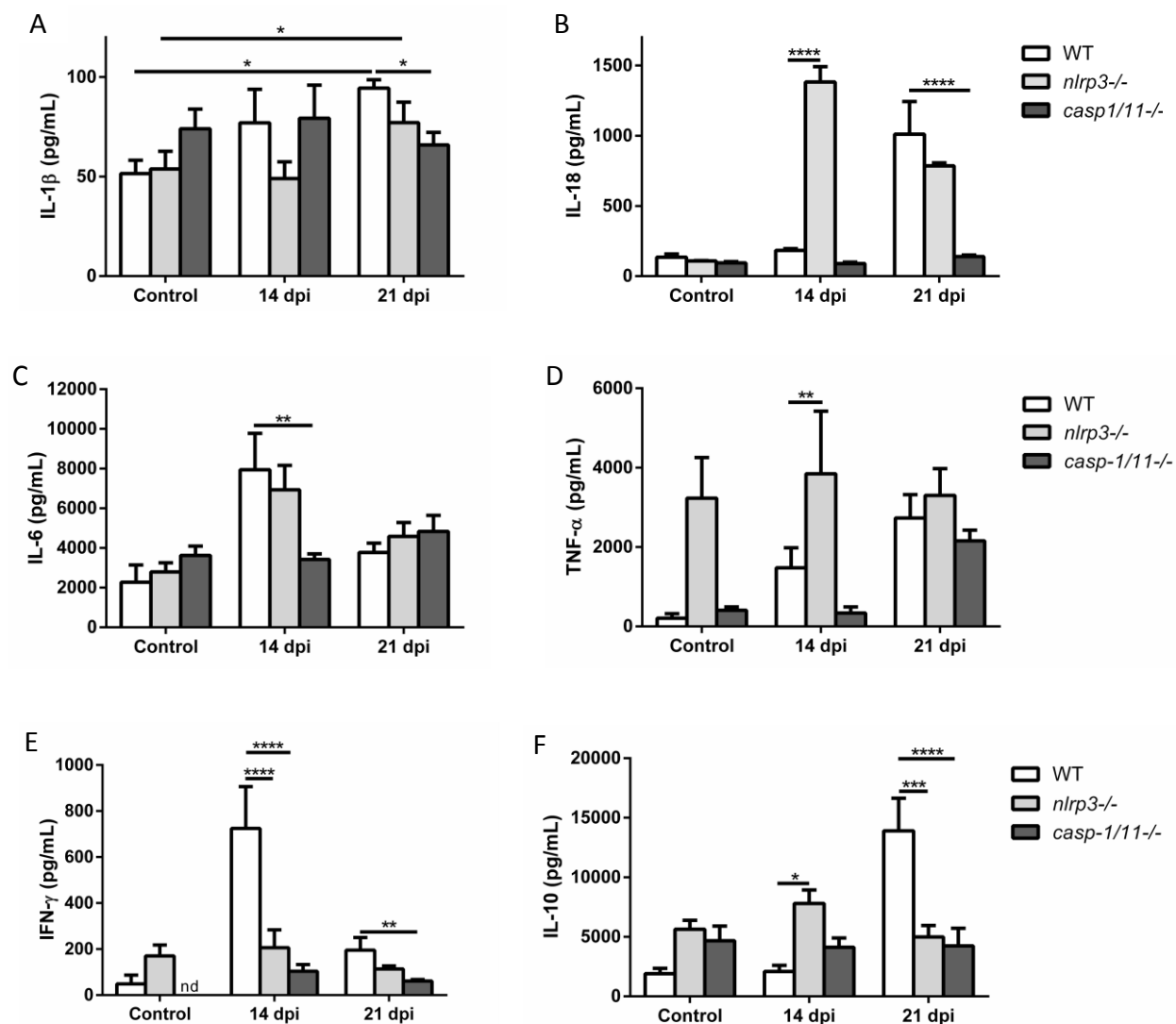
**Figura 18.** Número absoluto de células hepáticas CD8+IFN $\gamma$ + (A), CD8+IL-17+ (B) y CD8+IL-10+ (C) de animales infectados y controles sin infectar *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> determinados por citometría de flujo. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \*<0.05; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Estos resultados demuestran claramente que los ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> presentaron un balance alterado de los perfiles Th1, Th2 y Th17 en comparación a los animales *WT*.

### La infección con *T. cruzi* induce elevados niveles tanto de citoquinas pro- como anti-inflamatorias en ratones *WT* y *nlrp3*<sup>-/-</sup>

La infección con *T. cruzi* indujo la activación de los inflammasomas como se observó por el incremento plasmático de IL-1 $\beta$  e IL-18 en los ratones *WT* (**Fig. 2**). Como era de esperarse los animales deficientes en *caspasa-1/11* fueron incapaces de incrementar estas dos citoquinas. En forma inesperada, los ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados produjeron mayores cantidades de IL-18 que los *WT* (**Fig. 19A y 19B**).





**Figura 19.** Niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$  (A), IL-18 (B), IL-6 (C), TNF- $\alpha$  (D), IFN- $\gamma$  (E) e IL-10 (F) determinadas por ELISA Sandwich en ratones *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp1/11*<sup>-/-</sup>. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

El análisis de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 en el plasma de ambos ratones deficientes reveló que sólo la cepa *nlrp3*<sup>-/-</sup> podía incrementar esta citoquina en

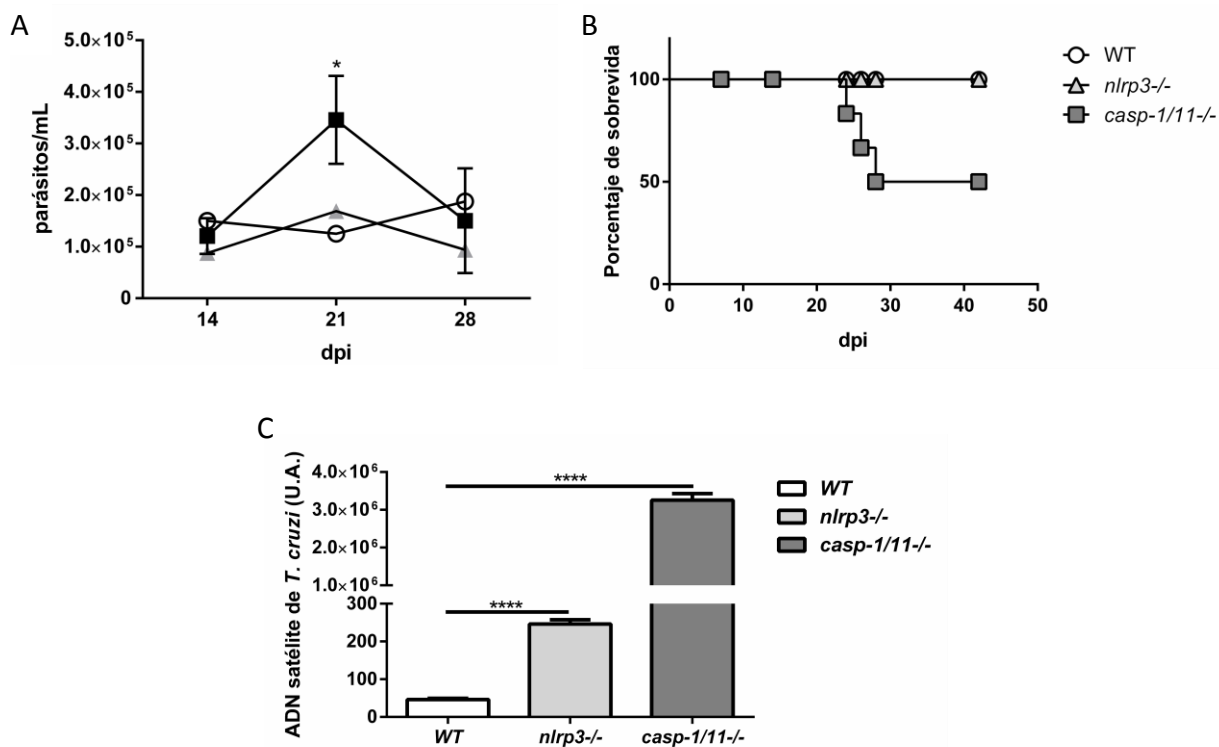
forma similar a la *WT* (**Fig. 19C**). Además, también se encontraron altas concentraciones de TNF- $\alpha$  en los ratones *WT* y *nlrp3*<sup>-/-</sup>. En el grupo *casp-1/11*<sup>-/-</sup> esta citoquina se incrementó sólo a los 21 dpi. (**Fig. 19D**).

La infección indujo una fuerte producción de IFN- $\gamma$  a nivel sistémico en ratones *WT*, mientras que los animales *KO* no mostraron cambios significativos en esta citoquina. (**Fig. 19E**).

Por último, los niveles plasmáticos de IL-10 se incrementaron tanto en ratones *WT* como *nlrp3*<sup>-/-</sup> aunque con diferente cinética, mientras que los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> no mostraron cambios en las concentraciones de IL-10 a lo largo de la infección aguda. Cabe destacar, que los animales no-infectados deficientes en caspasas poseían mayores niveles basales de IL-10 respecto de los *WT* (**Fig. 19F**).

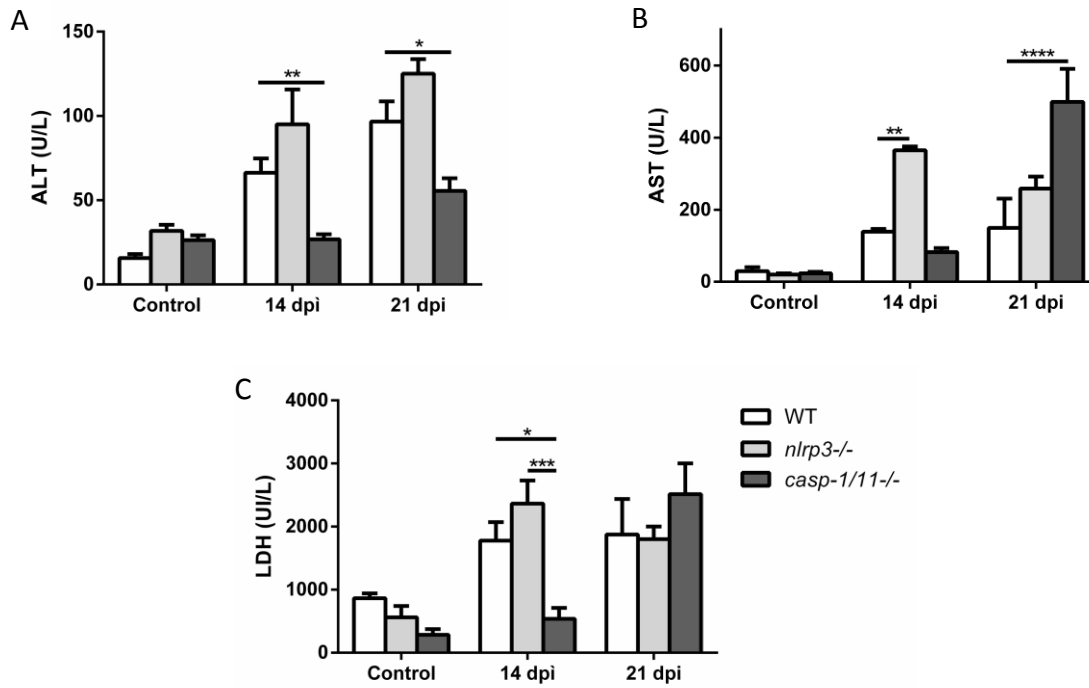
### **Las caspasa-1/11 son requeridas para la sobrevida luego de la infección pero contribuyen a la injuria hepática**

Con el objetivo de evaluar los roles de NLRP3 y *casp-1/11* en el control de la infección parasitaria se estudió la parasitemia hasta los 28 dpi. Como se observa en la **Fig. 20A** la parasitemia y la curva de sobrevida (**Fig. 20B**) de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *WT* fueron similares y el 100% de los animales sobrevivieron la fase aguda. Notablemente, los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup> alcanzaron un pico de parasitemia estadísticamente significativo a los 21 dpi y mostraron un 50% de sobrevida a los 28 dpi comparados con los grupos *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *WT*. Al analizar la carga parasitaria en el hígado (ADNsat) se observó que los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> y en mayor medida los *casp-1/11*<sup>-/-</sup> presentaron un fuerte incremento en los niveles de ADN parasitario en el hígado (Fig. 20C).



**Figura 20.** Curva de parasitemia (A), porcentaje de sobrevivencia (B) y carga parasitaria hepática (C) de ratones *WT*, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> sin infectar (controles) e infectados. La carga parasitaria (ADNsat) se determinó a los 21 dpi en unidades arbitrarias (U.A.) n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.  $p^* < 0.05$ ;  $p^{****} < 0.0001$ .

Adicionalmente, se midió la actividad de las transaminasas hepáticas ALT (**Fig. 21A**) y AST (**Fig. 21B**) y LDH (**Fig. 21C**) como bio-marcadores plasmáticos de daño tisular. Se observaron altos niveles de estos marcadores tanto en ratones *WT* como *nlrp3*<sup>-/-</sup> a 14 y 21 dpi. Notablemente, los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup> fueron incapaces de incrementar la actividad de ALT y AST, y la LDH mostró un marcado incremento recién a los 21 dpi.



**Figura 21. Niveles plasmáticos de la actividad de las transaminasas hepáticas ALT (A) y AST (B), y LDH (C) de ratones WT, *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> sin infectar (controles) e infectados. n = 6 por grupo. Los datos se muestran como la media +/- SEM y la significancia estadística se evaluó por ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. p\* < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001.**

## DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estudió el papel del inflamasoma NLRP3 y caspasa-1/11 en el control de la infección aguda de ratones C57BL/6 *WT* con el parásito *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) y cómo afecta la vía del inflamasoma en la respuesta inmune innata y adaptativa. Asimismo, se buscó determinar cómo la respuesta inmune inducida en este modelo experimental se vincula con una respuesta patogénica en el hígado, uno de los tejidos blancos de la infección aguda. Los resultados obtenidos ilustran que el parásito induce la expresión de NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en tejido hepático durante la infección. Los estudios histológicos demostraron la presencia de infiltrados inflamatorios compuestos principalmente por leucocitos mononucleares en los hígados de ratones *WT* infectados y en menor grado en ratones deficientes para NLRP3 y caspasa-1/11. De manera sorprendente, los macrófagos hepáticos de animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> mostraron un pronunciado aumento de la expresión de TLR9. Se ha propuesto la existencia de una interacción entre las vías de señalización dadas por TLR9 y NLRP3 en diferentes modelos de daño hepático. El receptor TLR9 señalaría junto con NLRP3 a través del reconocimiento del ADN mitocondrial, un conocido ligando de este receptor endosomal<sup>56</sup>, mientras que NLRP3 reconocería las histonas de los hepatocitos dañados<sup>52</sup>. En base a los resultados obtenidos en este trabajo y los mecanismos propuestos en la interacción de estos receptores innatos, se podría especular que la falta de activación del inflamasoma NLRP3 podría mediar una mayor expresión de TLR9 como un posible mecanismo compensatorio en los ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup>.

Por otro lado, se conoce que entre las células fagocíticas, los macrófagos son actores claves en el sistema inmune innato en la lucha contra los patógenos. Estas células producen ROS y NO por diversos mecanismos celulares, incluyendo la respiración mitocondrial. Hay evidencia que demuestra que en concentraciones bajas estos metabolitos desempeñan papeles claves como mensajeros durante procesos como la señalización celular y la proliferación. Sin embargo, en condiciones de estrés como durante la infección, una producción excesiva o descontrolada de ROS/RNS pueden resultar en

daño del ADN y el ARN de tejidos del hospedador<sup>57</sup>. Otros grupos de investigación entre ellos Dey *et al.*<sup>52</sup> y Silva *et al.*<sup>54</sup> demostraron previamente que la activación del inflamasoma a través de la vía mediada por NLRP3-ASC-caspasa-1 en macrófagos purificados de médula ósea u obtenidos de peritoneo e infectados con *T. cruzi*, dispara la producción de IL-1 $\beta$  y depende de ROS. En este estudio, se demuestra por primera vez que macrófagos infiltrantes de hígado de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados produjeron mayores cantidades de ROS y NO a nivel intracelular que los ratones *WT* infectados. Simultáneamente, se encontraron altos niveles de TNF- $\alpha$  en plasma en las tres cepas de ratón, pero los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> produjeron los valores más elevados. Por lo tanto, la señalización de TNF-NOX2 y TNF-iNOS son parte de los mecanismos responsables tanto de la inflamación como de la respuesta efectora de células fagocíticas contra el parásito<sup>58, 59, 60, 61, 62</sup>. Además, se ha informado recientemente un mecanismo microbicida en el que los macrófagos activados por TNF- $\alpha$  destruyen patógenos intracelulares acidificando los fagolisosomas, mecanismo independiente de las caspasa-1 y caspasa-11<sup>59</sup>. Sin embargo, cuando los agentes microbicidas se producen en exceso o las moléculas antioxidantes no son suficientes para inhibir la acción de estas especies reactivas, se produce un estrés oxidativo que da lugar a daños tisulares que pueden ser irreversibles.

La conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa es importante tanto para los mecanismos efectores contra el patógeno como para los mecanismos de reparación tisular y el mantenimiento de la homeostasis. Los resultados presentados en este trabajo describen por primera vez cómo la ausencia de la señalización de NLRP3 y caspasa-1/11 modifica el fenotipo de las sub-poblaciones de células T inducidas durante la infección parasitaria. Los resultados obtenidos demuestran que animales infectados *WT* al igual que los *nlrp3*<sup>-/-</sup> produjeron una respuesta de diferentes fenotipos Th1, Th2 y Th17. Además, los animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados mostraron niveles sistémicos de IL-1 $\beta$  similares a los *WT*. Es ampliamente conocido que la IL-1 $\beta$  en combinación con IL-6, IL-23 y TGF- $\beta$  es capaz de conducir la diferenciación de células T vírgenes hacia el fenotipo Th17<sup>60, 61</sup> y el IFN- $\gamma$  es además, un inhibidor del desarrollo de células Th17<sup>45</sup>. Al mismo tiempo, linfocitos

T de animales *nlrp3*<sup>-/-</sup> presentaron un mayor número de células T CD4 productoras de IFN- $\gamma$ , fenómeno que se corresponde con los altos niveles de IL-18 encontrados en el plasma de esos animales<sup>14</sup>. De manera consistente con los resultados descritos anteriormente, en este estudio se encontró un mayor número de linfocitos infiltrantes con fenotipo T CD4+IL-1R+, CD4+IL-18R+, CD8+IL-1R+ y CD8+IL-18R+ en el hígado de ratones tanto *WT* como *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados pero, como era de esperarse, no en los ratones *casp-1/11*<sup>-/-</sup>. De acuerdo con estas observaciones, se ha descrito que la pérdida de la señalización por IL-1R redujo el infiltrado de macrófagos en tejido cardíaco en otro modelo de infección con *T. cruzi*<sup>54</sup>.

Es sabido que la producción de IFN- $\gamma$  por las células Th1 y linfocitos T citotóxicos Tc-1 está implicada en los mecanismos de protección contra el parásito intracelular *T. cruzi*<sup>63</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia de un subconjunto de células T CD8+ productoras de IL-17 (Tc17), además de las células Th17. Esta sub-población de células citotóxicas también ha sido encontrada en otras enfermedades hepáticas<sup>64, 65, 66</sup>. Las células Tc17 y algunos subtipos de células T CD4 suelen expresar dos o más citoquinas, siendo las más frecuentemente encontradas las que co-expresan IFN- $\gamma$  e IL-17<sup>67</sup>. En este contexto, se ha propuesto un papel potencial de las células T CD8+IL-17+ en la patogénesis de ciertas enfermedades inflamatorias aunque aún esto no ha sido dilucidado<sup>68</sup>. De manera interesante, los resultados encontrados en este trabajo muestran que los linfocitos T hepáticos CD4+ provenientes de animales *caspasa-1/11* deficientes exhiben un perfil de linfocitos Th2 polarizado. Estos resultados se sustentan en hallazgos previos que demuestran que la ausencia de IL-1 $\beta$  activa conduce a una disminución marcada de células T productoras de IFN- $\gamma$  así como de células T productoras de IL-17<sup>69, 70</sup>. Estos resultados ponen de relieve la importancia de IL-1 $\beta$  principalmente, además de la IL-18, en el inicio de la inmunidad adaptativa a nivel hepático.

Por otra parte, también se observó en nuestro modelo experimental que el número de linfocitos T CD4+ productores de IL-10 de animales *WT* infectados fue mayor que los de animales *nlrp3 KO* mientras que los *caspasa-1/11 KO* no mostraron cambios

significativos en comparación con controles no infectados de la misma cepa de ratón. En concordancia con los resultados descriptos, sólo se observó una fuerte producción de IL-10 sistémica en ratones *WT* y *NLRP3 KO* infectados; esto estaría de acuerdo con hallazgos de otros autores que también reportaron que la inhibición *in vivo* de la caspasa-1 redujo la síntesis de citoquinas inflamatorias aunque no modificó los niveles de IL-10.<sup>71</sup> Asimismo, los altos niveles de IL-18 sumado a la producción de IL-1 $\beta$  hallados en la cepa deficiente en *nlrp3* sugieren que la infección indujo la activación de otros inflamasomas independientes de NLRP3, mostrando que éste no sería esencial para el control de la parasitemia durante la fase aguda. Estos resultados fueron concordantes con los hallazgos de otro grupo de investigación infectando macrófagos *in vitro*.<sup>54</sup> Además de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18, altos niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  encontradas se asociaron con un aumento de la actividad de las transaminasas ALT y AST además de la enzima LDH en plasma de ratones *WT* y *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados. Por el contrario, en ratones *caspasa-1/11*<sup>-/-</sup> los niveles de IL-6 fueron bajos y la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 fue muy escasa o nula. Estos resultados se asociaron con un retraso en los niveles de actividad de ALT y LDH en este último grupo de animales. Los hallazgos obtenidos al evaluar la supervivencia después de la infección muestran que los ratones que carecían de NLRP3 tienen una tasa de supervivencia de 100% similar al grupo *WT* infectado. Por el contrario, los ratones *caspasa-1/11 KO* con fenotipo Th2 polarizado sumado a la deficiencia de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas mostraron una comprometida capacidad para controlar la parasitemia y fueron susceptibles a la muerte, con una tasa de supervivencia de 50%. Estos resultados sugieren que los ratones *caspasa-1/11*<sup>-/-</sup> podrían morir debido al parasitismo no controlado por el sistema inmune adaptativo. En efecto, el análisis de la carga parasitaria en el hígado demostró que esta cepa de ratones es incapaz de controlar la infección reflejada por los elevados niveles de ADN de *T. cruzi*. En este sentido, el grupo de Silva *et al.*, 2013 observó que el 100% de los ratones *caspasa-1/11 KO* sucumbieron a la infección con la cepa Y<sup>53</sup>. La discrepancia encontrada podría deberse a las diferentes cepas del parásito empleadas además de otras condiciones experimentales. Paralelamente, los hallazgos histopatológicos revelaron que



los ratones NLRP3 *KO* y caspasa-1/11 *KO* infectados presentaron menor número de infiltrados inflamatorios en el hígado, lo que sugiere que la vía de inflamasomas sería importante en el reclutamiento celular dado por quimiocinas y sus receptores hacia este órgano.

Resumiendo, nuestros resultados enfatizan la relevancia de otras vías del inflamasoma independientemente de NLRP3 y proporcionan la primera evidencia del requerimiento de caspasa-1/11 *in vivo* como un actor clave en la orquestación de la inmunidad adaptativa anti-*T. cruzi*, aunque estos mecanismos también promoverían la lesión hepática.

Actualmente, las estrategias que utilizan anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  o su antagonista han tenido un gran impacto en la terapia de los trastornos inflamatorios sostenidos por la activación del inflamasoma<sup>15</sup>. Se postula que una mayor comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos de la IL-1 $\beta$  y la IL-18 como componentes de las respuestas innatas y adaptativas de tipo 1, así como el conocimiento de sus reguladores negativos (IL-1R2 y IL-18BP), no abordados en este trabajo, serían potenciales e innovadoras herramientas terapéuticas.

## CONCLUSIONES

- El incremento de IL-1 $\beta$  e IL-18 en plasma sumado a un aumento de la expresión de NLRP3, casp-1 e IL-1 $\beta$  en el hígado indicó que la infección con *Trypanosoma cruzi* – Tulahuén, dispara la respuesta del inflammasoma NLRP3 en este tejido.
- La infección indujo un incremento en el infiltrado de células inflamatorias, revelándose que los macrófagos co-expresan NLRP3 y TLR9 y son capaces de producir IL-1 $\beta$  en ratones *WT*. Notablemente, en ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> se observó un incremento significativo de macrófagos que expresan TLR9, mientras que en los *casp-1/11*<sup>-/-</sup> este fenómeno no fue observado.
- A diferencia de los ratones *WT*, los *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> infectados exhibieron menor número de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> asociado a un fuerte incremento en el número de macrófagos infiltrantes del hígado a los 21 dpi.
- Macrófagos hepáticos de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp-1/11*<sup>-/-</sup> mostraron una alta producción intracelular de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.
- En forma similar a animales *WT*, ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> infectados mostraron perfiles mezclados de linfocitos T *helper* (Th1, Th2 y Th17) mientras que notablemente, los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> exhibieron un marcado perfil Th2.
- En concordancia con los resultados descriptos, los receptores para IL-1 $\beta$  e IL-18 fueron detectados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *WT*, mientras que en los animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup> la expresión de estos receptores fue significativamente menor.
- La infección de ratones *WT* y *nlrp3*<sup>-/-</sup> indujo niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias además de IL-10, sugiriendo la activación de otros inflammasomas independientemente de NLRP3.
- Uno de los hallazgos importantes de este trabajo fue demostrar la falta de capacidad de inducción de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en animales *casp-1/11*<sup>-/-</sup>.

- Otro aporte novedoso, fue demostrar en ratones *casp-1/11-/-* un retraso en la aparición de marcadores de daño tisular (ALT y LDH) asociado a la ausencia de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ /IL-18, IL-6 e IFN- $\gamma$ ).
- El análisis de las parasitemias y sobrevida reveló que los animales *nlrp3-/-* mostraron un comportamiento similar a los *WT*, mientras que los *casp-1/11-/-* presentaron elevadas parasitemias y menor sobrevida. Notablemente, la carga parasitaria fue mayor en las cepas *KO*, siendo la más elevada en la cepa *casp-1/11-/-*.

**En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran que el inflamasoma NLRP3 contribuye a la resistencia del huésped contra la infección aunque no es esencial. Es de destacar que la vía de caspasa-1/11 es clave para la producción de una óptima inmunidad innata y adaptativa capaz de controlar la infección. Sin embargo, los mismos mecanismos efectores que participan en la defensa contra *T. cruzi* contribuyen al daño hepático, entre otros tejidos del hospedador.**

#### **Perspectivas:**

Los resultados obtenidos alientan a profundizar el conocimiento de otros inflamasomas y sus mecanismos de acción con el fin de generar una inmunidad innata y adaptativa efectiva contra el parásito minimizando el efecto deletéreo en los tejidos del hospedador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ratones, infección y parasitemia:** Ratones C57BL/6 (B6) se adquirieron en la Universidad Nacional de La Plata, Bs. As., Argentina. Ratones *nlrp3*<sup>-/-</sup> y *casp1*<sup>11</sup><sup>-/-</sup> se compraron en Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA. Los animales se mantuvieron en el Bioterio del CIBICI-CONICET (NIH-USA assurance number A5802-01) siguiendo las recomendaciones en la Guía para el cuidado y empleo de animales de experimentación (Canadian Council on Animal Care) y aprobado por el CIBICI-CONICET. Ratones machos de seis a ocho semanas se inyectaron intraperitonealmente con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén. La parasitemia se midió según Carrera-Silva *et al.*<sup>48</sup>. Ratones no infectados de cada cepa de animal se emplearon como controles. Los parásitos se mantuvieron por pasajes periódicos de ratón a ratón.

**Carga parasitaria:** El ADN genómico se purificó a partir de muestras de hígado empleando TRIzol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN satélite (ADNsat) de *T. cruzi* (GenBank AY520036) se cuantificó por real-time PCR empleando el *Custom Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores y sonda usadas fueron descritas por Piron *et al.*, 2007. Brevemente, Cruzi 1 (Fw) 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3'; Cruzi 2 (Rv) 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'; Cruzi 3 (sonda) 5'-CACACACTGGACACCAA-3'; donde S = C/G. Se amplificó 1 µg de ADN genómico y se expresó en unidades arbitrarias en función de la expresión del gen endógeno 18S (*Taqman Endogenous Controls*). Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo Step One Plus (Applied Biosystems).

**Aislamiento de leucocitos hepáticos:** Los ratones se sacrificaron y perfundieron lentamente por punción cardíaca y flujo constante de PBS hasta el clarificado del hígado. Los hígados se homogeneizaron a través de una malla metálica y se centrifugaron 20 minutos (600 g) en un gradiente de 35% y 70% de Percoll (Sigma) para obtener los

leucocitos intrahepáticos (LIH). Las células vivas se contaron en Cámara de Neubauer por exclusión de Azul de tripán.

**Citometría de flujo:** Las suspensiones de células se lavaron en buffer FACS frío (PBS – SFB 2%) e incubaron con anticuerpos marcados durante 20 min. a 4 °C. Para las tinciones superficiales de las células se emplearon APC-eFluor780-anti-CD4, FITC-anti-CD8, APC-eFluor780-anti-F4/80, PE-anti-IL-1R, APC-anti-IL-18R $\alpha$ . Las citoquinas intracelulares se detectaron luego de estimular a las células durante 4 horas con 30 ng/ml PMA y 500 ng/ml Ionomycina (Sigma) en presencia de GolgiStop y GolgiPlug (BD Biosciences). Luego, las células se fijaron y permeabilizaron con BD Cytofix/Cytoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) según las instrucciones de los fabricantes. Las células se incubaron con PerCp-Cy5.5-anti-IFN $\gamma$ , PE-anti-IL-17A, PeCy7-IL-anti-10, APC-anti-IL-4, PeCy7-anti-GATA3, FITC-anti-TLR9 (Abcam). Goat anti-NLRP3 (Abcam) y AF633-anti-goat (Thermo-Fisher), Biotin-anti-IL-1 $\beta$  y Streptavidin-PE (eBioscience). Las sondas sensibles a la oxidación DCFDA y DAF-FM (Molecular Probes) se usaron para detectar la producción de ROS y NO, respectivamente<sup>46</sup>. Luego de lavarse, las muestras se procesaron en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

**Determinación de citoquinas por ELISA:** Los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA sándwich en el plasma y el sobrenadante de cultivos celulares suplementados con RPMI 1640 bajo distintas condiciones. Las células se estimularon con 5  $\mu$ g/mL LPS por 23 hs seguido de 5 mM ATP durante 1 hora o, alternativamente, con 10  $\mu$ g/mL de extracto parasitario total obtenido por sonicación de tripomastigotes a 4°C. Las IL-1 $\beta$  e IL-18 se cuantificaron con kits específicos de ELISA (eBioscience). Los antígenos parasitarios empleados como estímulo específico se obtuvieron por sonicación de tripomastigotes a 4°C.

**Medición de la actividad de transaminasas AST/GOT (glutámico oxalacética) y ALT/GPT (glutámico pirúvica):** Se utilizó el kit de Wiener Transaminasa 200 (método colorimétrico), que provee el sustrato para las enzimas (L-alanina 200mM y  $\alpha$ -cetoglutarato 2 mM en

buffer fosfato), el reactivo de coloración 2,4-DNFH (2,4-dinitrofenilhidrazina 1mM), el diluyente y los estándares para realizar la curva de calibración (Piruvato de Sodio). Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron según el protocolo indicado por el proveedor. Procedimiento: 1) En tubos colorimétricos marcados como blanco (B) y desconocido (D) colocar 0,5 ml del sustrato GOT o GPT e incubar en baño de agua a 37°C por unos minutos. 2) Adicionar las muestras de plasma 100ul en cada tubo correspondiente y en el blanco agregar agua destilada. Mezclar por agitación suave e incubar 30 min en baño a 37°C. 3) Agregar 0,5ml del reactivo de coloración 2,4-DNFH. Mezclar e incubar 10 minutos. 4) Agregar el diluyente de la enzima 5ml, mezclar por inversión y retirar del baño. Reposar 2 minutos y leer en espectro a 505 nm.

**Microscopía de fluorescencia:** Los leucocitos hepáticos se colocaron sobre un porta-objetos mediante la técnica de citospin, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se bloquearon con SFB-PBS 1% y marcaron con FITC-anti-F4/80, goat-anti-NLRP3 (Abcam), rabbit-anti-TLR9 (Abcam), A633-anti-rabbit, A495-anti-goat (Thermo-Fisher) y se visualizaron con un microscopio confocal FV1000 (Olympus). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (2 µg/ml).

**Análisis histológicos:** Porciones de hígado fueron fijadas con paraformaldehído al 10%, embebidas en parafina, cortadas sobre porta-objetos y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Se cuantificó el área de infiltrados inflamatorios con respecto al área total analizada por campo en 5 fotos de cortes seriados de diferentes lóbulos hepáticos, tomadas aleatoriamente en 2 ratones de cada grupo. Se utilizó el software Axiovision 4.8 (Zeiss).

**Western Blot:** Muestras de hígado se lisaron (Triton X-100 1%, deoxicolato de Na 0.5%, SDS 9%, ortovanadato de Na 1mM, PMSF 10 µg y aprotinina 30 µg en PBS), se separaron por SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Luego del bloqueo, se incubaron con rabbit anti-p20-Caspase-1 (Santa Cruz), goat anti-NLRP3 (Abcam) y rabbit anti-IL-1β (Abcam), seguido de HRP-anti-rabbit o -goat Ab (Sigma) y se detectaron con el sistema de ECL de quimioluminiscencia. Alternativamente, los anticuerpos primarios

fueron detectados con IRDye-anti-goat and IRDye-anti-rabbit y analizados con Oddisey CLx Imaging System (Li-cor). Los controles de carga proteica se hicieron empleando un anticuerpo policlonal anti-actina (Santa Cruz).

**Análisis estadístico:** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con análisis paramétricos de la varianza (one way o two way-ANOVA) seguidos de test de comparaciones múltiples de Bonferroni para determinar la significancia estadística. Se empleó el software Graph Pad Prism Inc., La Jolla, CA. A p-value  $< 0.05$  fue considerado significativo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).
2. Serbina, N.V. & Pamer, E.G. Coordinating innate immune cells to optimize microbial killing. *Immunity* **29**, 672-674 (2008).
3. Murray, P.J. & Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* **11**, 723-737 (2011).
4. Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576-587 (2009).
5. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-725 (2006).
6. Underhill, D.M. Toll-like receptors and microbes take aim at each other. *Curr Opin Immunol* **16**, 483-487 (2004).
7. Matsumura, T. *et al.* TRAF6-NF-kappaB pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology* **109**, 127-136 (2003).



8. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
9. Jha, S., Brickey, W.J. & Ting, J.P. Inflammasomes in Myeloid Cells: Warriors Within. *Microbiol Spectr* **5** (2017).
10. Vajjhala, P.R., Ve, T., Bentham, A., Stacey, K.J. & KObe, B. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Mol Immunol* **86**, 23-37 (2017).
11. Gurung, P. & Kanneganti, T.D. Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. *Cell Mol Life Sci* **73**, 3035-3051 (2016).
12. Motta, V., Soares, F., Sun, T. & Philpott, D.J. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiological reviews* **95**, 149-178 (2015).
13. Mascarenhas, D.P. & Zamboni, D.S. Inflammasome biology taught by Legionella pneumophila. *J Leukoc Biol* **101**, 841-849 (2017).
14. Zamboni, D.S. & Lima-Junior, D.S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunological Reviews* **265**, 156-171 (2015).

15. Man, S.M., Karki, R. & Kanneganti, T.D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev* **277**, 61-75 (2017).
16. Ben-Sasson, S.Z., Wang, K., Cohen, J. & Paul, W.E. IL-1beta strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **78**, 117-124 (2013).
17. Dinarello, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**, 3720-3732 (2011).
18. Dinarello, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-550 (2009).
19. Allam, O. *et al.* Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 Binding Protein from human platelets and their implications for HIV infection. *Cytokine* **90**, 144-154 (2017).
20. Struck, D. *et al.* Treatment with interleukin-18 binding protein ameliorates *Toxoplasma gondii*-induced small intestinal pathology that is induced by bone marrow cell-derived interleukin-18. *European Journal of Microbiology & Immunology* **2**, 249-257 (2012).
21. He, Y., Hara, H. & Nunez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* **41**, 1012-1021 (2016).

22. Gaidt, M.M. & Hornung, V. Alternative inflammasome activation enables IL-1 $\beta$  release from living cells. *Curr Opin Immunol* **44**, 7-13 (2016).
23. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**, 92-100 (2001).
24. Girones, N., Cuervo, H. & Fresno, M. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Current topics in microbiology and immunology* **296**, 89-123 (2005).
25. Tarleton, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International journal for parasitology* **31**, 550-554 (2001).
26. Guinazu, N. *et al.* Immunisation with a major Trypanosoma cruzi antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. *International journal for parasitology* **37**, 1243-1254 (2007).
27. Rassi, A., Jr., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *Lancet (London, England)* **375**, 1388-1402 (2010).
28. Pellegrini, A., Guiñazu, N., Giordanengo, L., Cano, R.C. & Gea, S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the Trypanosoma cruzi protozoan. *Future Microbiology* **6**, 1521-1533 (2011).

29. Maganto-Garcia, E., Punzon, C., Terhorst, C. & Fresno, M. Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 is Required for Trypanosoma cruzi Internalization and Replication in Macrophages. *Traffic* **9**, 1299-1315 (2008).
30. Gazzinelli, R.T. & Denkers, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews. Immunology* **6**, 895-906 (2006).
31. Rodrigues, M.M., Oliveira, A.C. & Bellio, M. The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res* **2012**, 507874 (2012).
32. Holscher, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* **66**, 1208-1215 (1998).
33. Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A. & Fresno, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. *European journal of immunology* **22**, 301-307 (1992).
34. Radi, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of biological chemistry* **288**, 26464-26472 (2013).

35. Gupta, S. *et al.* Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free radical biology & medicine* **47**, 1414-1421 (2009).
36. Onofrio, L.I. *et al.* Trypanosoma cruzi infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003464 (2015).
37. Acosta Rodriguez, E.V. *et al.* Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? *Scandinavian journal of immunology* **66**, 137-142 (2007).
38. Lenzi, H.L., Oliveira, D.N., Lima, M.T. & Gattass, C.R. Trypanosoma cruzi: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Experimental parasitology* **84**, 16-27 (1996).
39. Martin, D. & Tarleton, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Immunol Rev* **201**, 304-317 (2004).
40. Silverio, J.C. *et al.* CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. *PLoS pathogens* **8**, e1002645 (2012).
41. Padilla, A.M., Bustamante, J.M. & Tarleton, R.L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Curr Opin Immunol* **21**, 385-390 (2009).

42. Cerban, F.M., Gea, S., Menso, E. & Vottero-Cima, E. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clinical immunology and immunopathology* **67**, 25-30 (1993).
43. Machado, F.S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology* **34**, 753-770 (2012).
44. de Araujo, F.F. *et al.* Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e992 (2011).
45. Tosello Boari, J. *et al.* IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS pathogens* **8**, e1002658 (2012).
46. Arocena, A.R. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *European journal of immunology* **44**, 184-194 (2014).
47. Carrera-Silva, E.A. *et al.* TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol Immunol* **45**, 3580-3588 (2008).

48. Carrera-Silva, E.A. *et al.* Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e863 (2010).
49. Abrahamsohn, I.A. & Coffman, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental parasitology* **84**, 231-244 (1996).
50. Cuervo, H. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. *J Infect Dis* **197**, 1772-1782 (2008).
51. Silva, G.K. *et al.* Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **184**, 1148-1152 (2010).
52. Dey, N. *et al.* Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1 $\beta$ -ROS-NF- $\kappa$ B pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in *NLRP3*<sup>-/-</sup> macrophages. *PLoS One* **9**, e111539 (2014).
53. Goncalves, V.M. *et al.* NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2469 (2013).

54. Silva, G.K. *et al.* Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **191**, 3373-3383 (2013).
55. Huang, H. *et al.* Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol* **191**, 2665-2679 (2013).
56. Imaeda, A.B. *et al.* Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* **119**, 305-314 (2009).
57. Garcia-Martinez, I. *et al.* Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest* **126**, 859-864 (2016).
58. Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W. & Brenner, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in cell biology* **26**, 249-261 (2016).
59. Morgan, M.J. & Liu, Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell research* **21**, 103-115 (2011).
60. Ziltener, P., Reinheckel, T. & Oxenius, A. Neutrophil and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Immune Control of *Legionella pneumophila* Lung Infection via TNF and ROS. *PLoS pathogens* **12**, e1005591 (2016).
61. Dostert, C., Ludigs, K. & Guarda, G. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Curr Opin Immunol* **25**, 359-365 (2013).



62. Martins, G.A., Cardoso, M.A., Aliberti, J.C. & Silva, J.S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology letters* **63**, 113-120 (1998).
63. Kelchtermans, H. *et al.* Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma. *Arthritis research & therapy* **11**, R122 (2009).
64. Dhiman, M. & Garg, N.J. P47phox<sup>-/-</sup> mice are compromised in expansion and activation of CD8<sup>+</sup> T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS pathogens* **10**, e1004516 (2014).
65. Billerbeck, E. *et al.* Analysis of CD161 expression on human CD8<sup>+</sup> T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3006-3011 (2010).
66. Liang, Y., Pan, H.F. & Ye, D.Q. Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity. *International reviews of immunology* **34**, 318-331 (2015).
67. Cachem, F. *et al.* The proportion of different interleukin-17-producing T-cell subsets is associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Immunology* **151**, 167-176 (2017).

68. Ortega, C. *et al.* IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol* **86**, 435-443 (2009).
69. Srenathan, U., Steel, K. & Taams, L.S. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunology letters* **178**, 20-26 (2016).
70. Hitzler, I. *et al.* Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in Helicobacter infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1beta and IL-18. *J Immunol* **188**, 3594-3602 (2012).
71. Zielinski, C.E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* **484**, 514-518 (2012).

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

**Paroli, A. F.**; Patricia V. Gonzalez, Cintia Díaz-Luján, Sabrina Rizzo, Luisina I. Onofrio, Alfredo Arocena, Roxana C. Cano, Eugenio A. Carrera-Silva & Susana Gea. Caspase-1/11 inflammasomes play a critical role in Th1 and Th17 anti-parasite mechanisms but enhance hepatic injury in *Trypanosoma cruzi* infection. Enviado para su publicación (2017).

Onofrio, L. I. Arocena A. R., **Paroli A. F.**, Cabalén M. E., Andrada M. C., Cano R. C., Gea S. *Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**, e0003464 (2015).

Arocena, A.R. Onofrio L. I., Pellegrini A. V., Carrera Silva A. E., **Paroli A.F.**, Cano R. C., Aoki M. P., Gea S. Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol* **44**, 184-94 (2014).

## FINANCIAMIENTO

Se agradece a las siguientes instituciones por el financiamiento otorgado, los cuales permitieron el desarrollo de la tesis:

- “Bases celulares y moleculares de la inflamación: la inmunidad innata y adquirida en la patogénesis de la infección experimental aguda con *Trypanosoma cruzi* y su efecto en la aterosclerosis”. AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCyT), PICT 2010 Nº PICT-2010-1696. 2011-2014.
- “La inflamación: Integración de señales de la inmunidad innata y adquirida en un modelo de infección aguda con *Trypanosoma cruzi* y su efecto en un modelo de inflamación crónica con desórdenes metabólicos”. AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCyT) PICT 2013 – 2104.
- “Caracterización de células supresoras mieloides en ratones con diferente susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma cruzi*”. CONICET - PIP 2012.
- “La inmunidad innata y adquirida en la patogénesis de la inflamación aguda y crónica inducidas experimentalmente por la infección con *Trypanosoma cruzi* y en desórdenes metabólicos”. SECyT - UNC, 2014.
- “Las células supresoras mieloides como reguladoras de la respuesta inmune en un modelo de infección aguda: compromiso de receptores tipo *toll* en su expansión y función supresora”. SECyT - UNC, 2016.

Se agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca interna de doctorado otorgada. 2012 – 2017.