

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN
PARASITOLÒGIA HUMANA Y ANIMAL

**ANÁLISIS DE PROCESOS
INMUNORREGULADORES EN HELMINTIASIS
INTESTINALES MEDIANTE EL MODELO
ECHINOSTOMA CAPRONI-RATÓN**

MARÍA ÁLVAREZ IZQUIERDO

Directores

Prof. Dr. Rafael Toledo Navarro

Prof. Dra. Carla Muñoz Antoli

Valencia, 2021

**UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA**



**FACULTAT
DE
FARMÀCIA**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO “PARASITOLOGÍA HUMANA Y ANIMAL”

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I
PARASITOLOGIA, FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**ANÁLISIS DE PROCESOS
INMUNORREGULADORES EN HELMINTIASIS
INTESTINALES MEDIANTE EL MODELO
ECHINOSTOMA CAPRONI-RATÓN**

por

MARÍA ÁLVAREZ IZQUIERDO

Directores

Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO

Catedrático de Parasitología, Departament de Farmàcia, Tecnologia
Farmacèutica i Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI-CANDELA

Profesora Titular de Parasitologia, Departament de Farmàcia i Tecnologia
Farmacèutica i Parasitologia. Facultat de Farmàcia, Universitat de València

València, 2021

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA

Los abajo firmantes Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO y Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLÍ-CANDELA, Profesores Titulares del Área de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por la presente:

CERTIFICAN: que Doña MARÍA ÁLVAREZ IZQUIERDO, ha realizado íntegramente la Tesis Doctoral titulada “ANÁLISIS DE PROCESOS INMUNORREGULADORES EN HELMINTIASIS INTESTINALES MEDIANTE EL MODELO *ECHINOSTOMA CAPRONI*-RATÓN.” en el Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con el fin de optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia a 16 de abril de dos mil veintiuno.

RAFAEL
TOLEDO
NAVARRO

Firmado digitalmente por
RAFAEL[TOLEDO]NAVARRO
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=RAFAEL[TOLEDO]
NAVARRO,
serialNumber=19100865D,
givenName=RAFAEL,
sn=TOLEDO NAVARRO,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV,
c=ES
Fecha: 2021.04.13 11:21:49
+02'00'

Fdo: Dr. R. Toledo

CARLA TERESA
MUÑOZ
ANTOLI-
CANDELA -
NIF:25403182G

Firmado
digitalmente por
CARLA TERESA
MUÑOZ ANTOLI-
CANDELA -
NIF:25403182G
Fecha: 2021.04.13
11:32:53 +02'00'

Fdo: Dra. C. Muñoz

*“Me hiciste salir de mis males corriendo,
dejarte en la arena de un sueño.
Tu intento de captura acabó siendo nula.
Mi lucha consciente madura.
Hice tantos usos de mi habilidad extrema
que ahora que celebro mis logros,
miro atrás y no ensucio recuerdos.”*

H.C.

ÁLVAREZ IZQUIERDO, MARIA (2021).- ANÁLISIS DE PROCESOS INMUNORREGULADORES EN HELMINTIASIS INTESTINALES MEDIANTE EL MODELO *ECHINOSTOMA CAPRONI*-RATÓN. TESIS DOCTORAL (DIRS. Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO y Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI-CANDELA), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, 441 pp.

En la presente Tesis Doctoral se analizan diferentes parámetros que intervienen en las interacciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales mediante el empleo del modelo experimental *Echinostoma caproni*-ratón ICR. Para ello, se realizan diferentes estudios en los que se analiza y compara la respuesta inmunitaria en infecciones primarias, asociadas a susceptibilidad, y secundarias, asociadas a resistencia. Los resultados obtenidos demuestran que la susceptibilidad del ratón a la infección primaria con *E. caproni* se debe a su incapacidad de responder con producción de IL-25 lo cual determina que se genere una respuesta Th1 asociada a susceptibilidad. Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto que el parásito es capaz de desarrollar mecanismos que contrarrestan las respuestas tanto de anticuerpos como los efectos nocivos de la respuesta asociada a infecciones crónicas. La neutralización de los anticuerpos unidos a la superficie se produce a través de su captura y posterior degradación por las catepsinas. Estos resultados explican, en gran medida, la resistencia del parásito a la respuesta asociada a las infecciones crónicas. Por otra parte, la resistencia en infecciones secundarias está asociada a la producción de IL-25 y el desarrollo de respuestas Th2. Sin embargo, el papel de la IL-25 no es meramente regulador, como se ha pensado tradicionalmente. Los estudios realizados arrojan resultados que ponen de manifiesto que la respuesta Th2 no es capaz de generar resistencia frente al parásito en ausencia de IL-25. El papel efector de la IL-25 en la resistencia frente a *E. caproni* parece estar mediado por la activación alternativa de macrófagos, junto con la activación de procesos en el intestino que favorecen el mantenimiento de la homeostasis tisular. Por otro lado, los cambios en la microbiota intestinal inducidos

por la infección, parecen fundamentales para explicar la producción de IL-25 y la resistencia frente a *E. caproni*.

Palabras clave: Trematoda, Echinostomatidae, *Echinostoma caproni*, Th1, Th2, interleuquina-25, interleuquina-4, interleuquina-13, intestino, resistencia, susceptibilidad, cronicidad, captura de anticuerpos, catepsina, proteómica, macrófagos, activación alternativa, disbiosis, microbiota intestinal.

ÁLVAREZ IZQUIERDO, MARIA (2021).- ANALYSIS OF IMMUNEREGULATORY PROCESSES IN INTESTINAL HELMINTH INFECTIONS USING THE EXPERIMENTAL MODEL *ECHINOSTOMA CAPRONI*-MOUSE. TESIS DOCTORAL (DIRS. Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO y Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI-CANDELA). FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, 441 pp.

In the present PhD Thesis, different parameters involved in the host-parasite relationships in intestinal helminth infections are analyzed using the *Echinostoma caproni*-rodent model. To this purpose, several studies were carried out in which the immune response in primary infections associated with susceptibility, and secondary infections associated with resistance were analyzed and compared. Our results demonstrated that mouse susceptibility to primary infection with *E. caproni* is due to its inability to respond with IL-25 production, which determines a susceptibility-associated Th1 response. The results obtained showed that the parasite is capable of developing mechanisms that counteract both antibody responses and the harmful effects of the response associated with chronic infections. Neutralization of surface-bound antibodies occurs through their trapping and subsequent degradation by cathepsins. These results explain, to a large extent, the resistance to the response associated with chronic infections. On the other hand, resistance in secondary infections is associated with the production of IL-25 and the development of Th2 responses. However, the role of IL-25 is not merely regulatory, as has been traditionally thought. Our results show that Th2 response is not capable of generating resistance against the parasite in the absence of IL-25. The effector role of IL-25 in resistance against *E. caproni* appears to be mediated by the alternative activation of macrophages, together with the activation of processes in the intestine that favor the maintenance of tissue homeostasis. On the other hand, the changes in the intestinal microbiota induced by the infection appears to be essential to explain the production of IL-25 and the resistance against *E. caproni*.

Key words: Trematoda, Echinostomatidae, *Echinostoma caproni*, Th1, Th2, interleukin-25, interleukin-4, interleukin-13, intestine, resistance, susceptibility, chronicity, antibody trapping, cathepsin, proteomic, macrophages, alternative activation, dysbiosis, intestinal microbiota.

ÍNDICE

Agradecimientos	23
Abreviaturas	33
INTRODUCCIÓN	41
OBJETIVOS	55
CAPÍTULO I	63
ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS	65
1.1. LA ESPECIE PARÁSITA OBJETO DE ESTUDIO: <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	65
1.1.1. <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	66
1.1.2. CICLO BIOLÓGICO	67
1.1.3. <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO	71
1.1.3.1. EL SISTEMA <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> -ROEDOR	72
1.1.3.2. DESARROLLO EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO	74
1.1.3.3. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES	76
1.2. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES	78
1.2.1. RESPUESTA TH2 EN HELMINTIASIS INTESTINALES	80
1.2.1.1. VISIÓN GENERAL DE LA RESPUESTA TH2 EN HELMINTIASIS INTESTINALES	81
1.2.1.2. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES	85
1.2.1.3. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LOS BASÓFILOS	88
1.2.1.4. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS LINFOIDES INNATAS GRUPO 2	91
1.2.1.5. EL PAPEL DE OTRAS CÉLULAS INMUNITARIAS	93
1.2.1.6. MECANISMOS EFECTORES MEDIADOS POR LA RESPUESTA TH2	94
1.2.2. RESPUESTA TH1 EN HELMINTIASIS INTESTINALES	99
1.2.3. RECONOCIMIENTO E INICIACIÓN DE RESPUESTAS INMUNITARIAS FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES	101

1.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES Y MICROBIOTA INTESTINAL	103
1.3.1. LAS INTERACCIONES HOSPEDADOR–HELMINTO INTESTINAL–MICROBIOTA	103
1.3.2. IL-25, HELMINTOS INTESTINALES Y MICROBIOTA INTESTINAL	105
1.3.2.1. IL-25 Y RESISTENCIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES	106
1.3.2.2. IL-25 Y HOMEOSTASIS INTESTINAL	108
1.4. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	110
CAPÍTULO II	117
2.1. MATERIAL OBTENIDO A PARTIR DE LOS PARÁSITOS Y HOSPEDADORES DEFINITIVOS	119
2.1.1. <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> Y MATERIAL PARASITOLÓGICO	119
2.1.1.1. MANTENIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN EL LABORATORIO	120
a) Obtención de las metacercarias e infección de los hospedadores definitivos	120
b) Aislamiento de adultos de <i>Echinostoma caproni</i> y embrionación de los huevos obtenidos	121
c) Cría, mantenimiento e infección de los caracoles hospedadores intermediarios.	122
2.1.1.2. ANTÍGENOS COMPLETOS DE VERMES ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	124
2.1.1.3. ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE VERMES ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	125
2.1.1.4. CORTES HISTOLÓGICOS DE VERMES ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	126
2.1.2. HOSPEDADORES DEFINITIVOS Y MATERIAL DE HOSPEDADORES	126
2.1.2.1. MANTENIMIENTO DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS	127
a) Características particulares de mantenimiento y manipulación	128

b) Tratamiento farmacológico de la infección primaria por <i>Echinostoma caproni</i>	129
c) Sacrificio de los animales	129
2.1.2.2. MATERIAL DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS _____	130
a) ARN Total de intestino delgado	130
b) Muestras de suero	130
c) Cortes histológicos de intestino	130
d) Extracto proteico de células epiteliales intestinales.....	131
e) Recolección de heces.....	131
2.2. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA _____	132
2.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL _____	132
2.2.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN A ADNc _____	133
2.2.3. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL _____	133
2.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL PAPEL DE LAS CATEPSINAS EN LOS MECANISMOS DE EVASIÓN INMUNITARIA _____	136
2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS _____	136
2.3.1.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS COMPLETOS DE ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	137
2.3.1.2. OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN _____	138
a) Liofilización	138
b) Reconstitución de los antígenos.....	139
2.3.2. ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD CATEPSINA EN LOS ESPs ____	140
2.3.3. SDS-PAGE Y BLOTTING CON DCG-04 _____	141
2.3.4. WESTERN BLOT CATEPSINA L _____	143
2.3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L _____	144
2.3.6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD PEPTIDASA DE LOS ESPs FRENTE A INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN _____	145

2.3.6.1. INCUBACIÓN DE ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> CON INHIBIDORES DE PEPTIDASAS _____	145
2.3.6.2. ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE INDIRECTA _____	146
2.3.6.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE CATEPSINAS FRENTE A INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN _____	148
2.4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN RATONES INFECTADOS POR <i>Echinostoma CAPRONI</i> EN PRESENCIA DE IL-25 _____	149
2.4.1. AISLAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS _____	149
2.4.1.1. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO INTESTINAL _____	150
2.4.1.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ÍLEON _____	152
2.4.2. CUANTIFICACIÓN Y MARCAJE DE PROTEÍNAS _____	152
2.4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS _____	153
2.4.2.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS _____	153
2.4.2.3. MARCAJE DE PROTEÍNAS _____	154
2.4.3. ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE) _____	155
2.4.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS GELES 2D-DIGE _____	156
2.4.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DIFERENCIAL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 2D _____	157
2.4.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES 2D-DIGE _____	159
2.4.5. TINCIÓN DE LOS GELES CON PLATA _____	160
2.5. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN RATONES INFECTADOS POR <i>echinostoma CAPRONI</i> EN PRESENCIA DE IL-25 _____	162
2.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS _____	162
2.5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS) _____	163
2.5.3. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS _____	164
2.6. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE LA RESPUESTA TH2 E IL-25 EN LA RESISTENCIA FRENTE A <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	166

2.6.1. SENSIBILIZACIÓN DE LOS HOSPEDADORES CON ANTICUERPOS INOCULADOS INTRAPERITONEALMENTE _____	167
a) Administración intraperitoneal de $m\alpha$ -IL25	168
b) Administración intraperitoneal de rIL-4 y rIL-13	168
c) Administración intraperitoneal de $m\alpha$ -RIL4 α , rIL13R α s ₂ y rIL-25	168
2.6.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE MARCADORES HISTOLÓGICOS DE CÉLULAS INMUNITARIAS _____	169
2.6.2.1. PREPARACIÓN CORTES HISTOLÓGICOS _____	169
2.6.2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL MARCAJE DE CÉLULAS TUFT E ILC2S GATA3+ _____	170
2.6.2.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA LOCALIZACIÓN DE STAT6 _____	171
2.6.2.4. TINCIONES HISTOLÓGICAS _____	172
a) Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	172
b) Tinción con Azul Alcían	173
c) Tinción con Hematoxilina modificada de Mayer's.....	174
2.6.2.5. RECUENTO CELULAR _____	174
2.6.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN DE IL-25 _____	175
2.6.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN EN HECES _____	175
2.6.3.2. PRODUCCIÓN DE DISBACTERIOSIS EN RATONES _____	176
2.6.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN HECES _____	177
2.7. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN INFECCIONES POR <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	179
2.7.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN ADN _r 16S DE BACTERIAS INTESTINALES _____	179
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS _____	181
2.8.1. TEST T DE STUDENT _____	182
2.8.2. ANOVA DE UN FACTOR _____	182
2.8.3. TEST KRUSKAL-WALLIS _____	183

2.8.4. ANÁLISIS POST-HOC _____	184
2.8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 2D-DIGE _____	185
2.8.5.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) _____	186
2.8.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO _____	188
2.8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MICROBIOTA INTESTINAL _____	189
2.8.6.1. ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD- α Y RIQUEZA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS _____	190
2.8.6.2. ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD- β DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS _____	191
2.8.6.3. ANÁLISIS DE REDUNDANCIA DISCRIMINANTE (RDA) _____	192
2.8.6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL EFECTO TAMAÑO (LEfSe) _____	193
CAPÍTULO III _____	195
3.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CATEPSINAS DE ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA</i> <i>CAPRONI</i> EN LA EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA _____	197
3.1.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	197
3.1.2. ACTIVIDAD CISTEÍN-PEPTIDASA DE LOS ESPs DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	198
3.1.3. UNIÓN DE DCG-04 AL SITIO ACTIVO DE CATEPSINA L EN LOS ESPs DE ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	201
3.1.4. INMUNOLocalización DE CATEPSINA L EN ADULTOS DE <i>ECHINOSTOMA</i> <i>CAPRONI</i> _____	201
3.1.5. ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA CATEPSINA L DE LOS ESPs DE <i>ECHINOSTOMA</i> <i>CAPRONI</i> SOBRE LAS INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN _____	203
3.1.6. DEGRADACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS ANTICUERPOS UNIDOS A LA SUPERFICIE DE <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> POR LA CATEPSINA L DE LOS ESPs _____	205
3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN EL ÍLEON DE RATONES INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN PRESENCIA DE rIL-25 ____	209

3.2.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	211
3.2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR 2D-DIGE _____	212
a) Resultados de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Agrupamiento Jerárquico	215
b) Identificación por espectrometría de masas de las proteínas diferencialmente expresadas	218
3.3. ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS TH2 E IL-25 EN RESISTENCIA FRENTE A INFECCIONES CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN RATÓN _____	233
3.3.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	234
3.3.2. INFECCIÓN CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN PRESENCIA DE CITOQUINAS TH2 _____	235
3.3.3. BLOQUEO DE IL-25 EN INFECCIÓN SECUNDARIA CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN RATÓN _____	238
3.3.4. INFECCIÓN SECUNDARIA CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN PRESENCIA DE NIVELES BASALES DE IL-25 _____	243
3.3.5. EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS TUFT E ILC2S GATA3+ EN RESPUESTAS TH2 FRENTE A INFECCIONES CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	248
3.3.6. MECANISMOS EFECTORES MEDIADOS POR CITOQUINAS TH2 VÍA ACTIVACIÓN DE STAT6 EN RESISTENCIA FRENTE A <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	248
3.3.7. PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN DE IL-25 EN INFECCIONES RESISTENTES FRENTE A <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	255
3.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN INFECCIONES CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN RATÓN _____	257
3.4.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	258
3.4.2. RESULTADOS DE INFECCIÓN CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN RATÓN A DIFERENTES TIEMPOS EXPERIMENTALES _____	260

3.4.3. IMPACTO DE LA INFECCIÓN PRIMARIA CON <i>ECHINOSOTMA CAPRONI</i> EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATONES A DIFERENTES TIEMPOS EXPERIMENTALES _____	261
3.4.4. MODIFICACIONES EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DE HECES DE RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA POR <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> FRENTE A RATONES TRATADOS CON PRAZIQUATEL E INFECCIÓN SECUNDARIA _____	263
3.4.4.1. COMPARACIÓN DEL PERFIL MICROBIANO A NIVEL DE GÉNERO Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> FRENTE A TRATADOS CON PRAZIQUANTEL _____	269
3.4.4.2. COMPARACIÓN DEL PERFIL MICROBIANO A NIVEL DE GÉNERO Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> FRENTE A INFECTADOS SECUNDARIAMENTE _____	270
CHAPTER IV _____	275
4.1. IN RELATION TO THE ANTIBODY RESPONSE _____	278
4.2. IN RELATION TO THE REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE _____	289
4.3. IN RELATION TO THE ROLE OF MICROBIOTA IN THE IMMUNE RESPONSE _____	298
4.4. IN RELATION TO THE CHANGES IN <i>Echinostoma CAPRONI</i> infections INDUCED BY IL-25 _____	311
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES _____	327
BIBLIOGRAFÍA _____	339

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro de la línea de investigación “Relaciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales” dirigida por el **Prof. Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO**, Catedrático de Parasitología de la Universitat de València, al cual me gustaría expresar mi agradecimiento en primer lugar, por haberme dado la posibilidad de entrar a formar parte de su equipo de investigación aceptando la dirección de esta Tesis y asimismo, por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto con el que he podido crecer tanto a nivel científico como personal. Una vez más, gracias por contar conmigo, por apoyarme a lo largo de este camino y especialmente, por todo lo que me has enseñado. También me gustaría agradecer el esfuerzo y dedicación realizados para sacar adelante este trabajo y, sobre todo, por la plena dedicación en los últimos meses, a la elaboración de esta tesis.

A la **Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLÍ-CANDELA**, Profesora Titular de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, quien como codirectora ha sido parte fundamental e imprescindible en este proyecto y quien me ha brindado su apoyo incondicional en la realización de la presente Tesis Doctoral tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por tu gran profesionalidad y por compartir conmigo todos tus conocimientos en el campo de la Parasitología, pero, sobre todo, gracias por inculcarme tu pasión, carisma y paciencia en este mundo de la investigación. Gracias por la confianza depositada, por tus consejos, todo el apoyo y cariño recibido además del infinito tiempo compartido.

Me gustaría agradecer también al catedrático **Dr. JOSÉ GUILLERMO ESTEBAN SANCHÍS**, Catedrático de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València por haber sido una de las personas que hizo despertar en mí el interés y pasión por la Parasitología. Gracias por compartir tus amplios

conocimientos tanto dentro como fuera del aula y gracias por transmitirlos de la manera que lo haces.

Me gustaría expresar también mi agradecimiento al **Dr. RICK MAIZELS**. Profesor de Parasitología en el *Wellcome Trust Centre for Parasitology* del Instituto de Infección, Inmunidad e Inflamación de la Universidad de Glasgow (Reino Unido) por aceptar mi estancia en su Departamento, ofreciéndome su tiempo, conocimientos y medios para llevar a cabo todos los experimentos realizados. Asimismo, me gustaría extender mi agradecimiento a todo el equipo de laboratorio, en especial a **Dr. STEPHAN LOESER** por la cálida acogida y la atención que me dieron durante toda la estancia, por la ayuda profesional y personal que me ofrecieron.

Me gustaría mostrar mi agradecimiento al resto de profesores del Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, al **Dr. Dr. Honoris Causa SANTIAGO MAS-COMA**, catedrática **Dra. M^a DOLORES BARGUES CASTELLÓ**, catedrática **Dra. M^a ADELA VALERO ALEIXANDRE** por la amabilidad brindada y por todo los conocimientos transmitidos durante la realización del “Máster en Enfermedades Parasitarias Tropicales”, ya que fueron fundamentales para emprender el camino de la investigación en parasitología.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a todo el personal del SCSIE, con los que he podido contar en todo momento. En primer lugar, agradecer a todo el personal del animalario de la Facultat de Farmàcia la labor realizada y en especial, dar las gracias a **INMACULADA NOGUERA** y **JESÚS DEHESA** por su disponibilidad para ayudarnos en todo momento. Del mismo modo, agradecer a **Dra. LAURA CANTERO-SALAZAR** de la Unitat de Proteòmica, por el procesamiento de los geles 2D-DIGE y la identificación de proteínas. También me gustaría agradecer al personal de la Secció de Microscòpia, en especial a **M^a TERESA MÍNGUEZ**, por estar siempre atenta para que las muestras estuvieran

listas cuanto antes, y a **ENRIQUE NAVARRO** y **TONI IBÁÑEZ** por introducirme en el mundo de la microscopía confocal. Gracias a todos por su amabilidad, profesionalidad y capacidad de trabajo.

No me puedo olvidar de dar las gracias a la **Prof. Dra. MARI CARMEN COLLADO** investigadora del IATA, por su ayuda desde el minuto uno para el desarrollo del trabajo de microbiota, por todos los consejos y enseñanzas. También agradecer a **Dra. ARANTXA LÓPEZ LÓPEZ** investigadora del Departamento de Genómica y Salud del FISABIO por su amabilidad y ayuda para llevar a cabo las qPCR de bacterias.

Dar las gracias a la **Prof. Dra. EVA FRONTERAS CARRIÓN** de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura por darme la posibilidad de unirme a su grupo de investigación, aunque fuera por un breve periodo de tiempo debido a la pandemia porque a pesar de ello, he aprendido mucho junto a ella y el **Dr. DANIEL BRAVO**, quienes me abrieron las puertas de par en par y me transmitieron su pasión por la investigación del mosquito tigre.

Agradezco a mis compañeros de departamento, **Prof. Dra. ALBA CORTÉS**, **Prof. Dr. PATRICIO ARTIGAS**, **Dra. ALICIA GALIANO**, **Dra. ÁNGELA GARCÍA**, **ALEJANDRA DE ELIAS** y **CARMEN OLIVER** por todos los momentos compartidos. En especial, agradecer a **Dr. MARTA REGUERA**, **Dr. DAVID OSCA** y **YANINA LUCAS** por todo el apoyo, risas y consejos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Me gustaría, además, hacer un reconocimiento al Personal de Administración y Servicios, **ARACELI TERRONES**, **LUISA GOICOECHEA**, **CARMINA OLMOS**, **PILAR LASO** y a **CLEMENTE BAÑULS**, por su gran labor en el departamento.

También quiero agradecer a todas aquellas personas que, durante mi estancia en Glasgow, me ofrecieron su apoyo, su amistad, y, sobre todo, por abrirme las puertas de sus casas. Aquí debo mencionar a mis amigos **MARIA BALSERA, FELIX LOBO, AITOR BALLESTERO, MONTE CIERO**, a mi flatmate **IAN MURRAY**, a mis compañeros de laboratorio y amigos **ANTONIO JESUS CORTÉS, ANA BELÉN, RIMKE** y a otras muchísimas personas que esta magnífica experiencia me ha dado. Entre ellas, debo destacar a mi compañero de vida **HECTOR CORTÉS ORIVE**, gracias por hacer mi estancia tan especial, por cruzarte en mi camino y por seguir recorriéndolo juntos.

El mayor de todos los agradecimientos a mis padres, **MARI SOL IZQUIERDO MATEOS** y **CEFERINO ÁLVAREZ FERNÁNDEZ**, por la paciencia, comprensión e infinito apoyo en cada una de mis decisiones, tanto de manera personal como económica. Por hacer que los kilómetros que nos separan solo sea cuestión de números, por hacerme sentir en casa con solo una llamada, por tranquilizarme y hacerme reflexionar en inmensas ocasiones, por llenarme de fuerzas con un “María, nos has demostrado que eres capaz de eso y más”. Por su educación y amor incondicional porque me han enseñado que con constancia, perseverancia, trabajo duro y esfuerzo no existen imposibles. A mi hermana, **NOELIA ÁLVAREZ IZQUIERDO**, por darme siempre esa protección de hermana mayor, por poder contar con ella tanto en mis días buenos como en los no tan buenos, por ser mi confidente y mi gran apoyo. Gracias al clan de “Las Izquierdo”, de la primera a la última, mis tías **VIRTU IZQUIERDO, CARMEN IZQUIERDO** y **LUZMARI IZQUIERDO**, mis primas **SUSANA YUSTE, CAROLINA YUSTE, ELI YUSTE, ESTELA CLEMENTE** y **ALEJANDRA GAGO** por el cariño, apoyo y confianza depositados en mí. En especial, a mi prima **LUCÍA GAGO**, por su constancia, madurez, trabajo y empeño tanto dentro como fuera del campo de juego, por enseñarme y demostrarme miles de cosas con la edad

que tiene, no tengo duda que llegará tan lejos como te propongas. A las pequeñas de la casa, **INÉS** y **SARA** por llenarnos de amor y felicidad. A mis tíos, **JAIME YUSTE**, **JESÚS GAGO** y **AMADOR CLEMENTE**, una vez más, gracias. A mis segundos papis en tierras valencianas, mis tíos **ANTONIO ÁLVAREZ** y **ANGE ÁLVAREZ**, por darme techo, apoyo e infinito cariño, por compartir conmigo tantísimas cosas.

A mis chicas, **BEATRIZ TEJEDA**, **SARA VIVAS**, **AZAHARA SANTOS**, **DELIA CANELO**, **JEZABEL MARTÍN**, **EVA MORENO** gracias por el apoyo en la distancia, por haber crecido juntas y seguir haciéndolo, aunque ya un poquito más lejos.

En cumplimiento del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, en su Artículo 15. Mención Internacional en el Título de Doctor, una parte de la presente Tesis Doctoral ha sido redactada en inglés (concretamente el Capítulo IV y las Conclusiones). Asimismo, la doctoranda cumple el requisito de haber realizado una estancia en una institución de enseñanza superior fuera de España, habiendo realizado trabajos de investigación en la University of Glasgow.

El presente trabajo ha sido llevado a cabo gracias a la financiación obtenida de las siguientes Ayudas y Proyectos:

- PROMETEO2014-083 Fase II de Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana.

- Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, España) (Número de Beca: BFU2016-75639-P).

Agradecimientos

- Ministerio de Sanidad y Consumo (Madrid, España) (No. RD12/0018/0013).

- Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales - RICET, IV Programa Nacional de I + D + I 2008-2011, ISCIII - Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa y FEDER.

- La investigación en la Universidad de Glasgow fue financiada por el programa Erasmus de la UE y la Cámara de Comercio, Industria, Servicios y Navegación (Valencia, España)

ABREVIATURAS

ABBREVIATIONS

2D: Bidimensional

2D-DIGE: Electroforesis diferencial en geles bidimensionales/*Two-dimensional differential in gel electrophoresis*

ABC: Bicarbonato amónico

AC: Área cubierta

ACAT: *Acetyl-CoA C-acetyltransferase*

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AF: Ácido fórmico

AKR: *Aldo keto-reductase*

AMC: Aminometilcuramina

ANOVA: Análisis de la varianza

APCs: Células presentadoras de antígenos

AR: *Androgen receptor*

Arg: Arginasa/ *Arginase*

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

Asn: Asparagina

ATP: Adenosín trifosfato/*Adenosine triphosphate*

AVR: Proporción de volumen promedio/ *Average volumen ratio*

ARN: Ácido ribonucleico

Batf3: Factor de transcripción básico de cremallera de leucina 3 similar a ATF

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina/*5-bromo-2-deoxyuridine*

BSA: Albúmina de suero bovino

BVA: *Biological Variation Analysis*

CA-074: N-(L-3-trans-policarbamoiloxirano-2-carbonil). Inhibidor irreversible de catepsina B

CKB: Creatina kinasa tipo B/*Creatine kinase B-type*

CoA: *Coenzyme A*

CPB: Tampón citrato-fosfato

Cps: Cuentas por segundo

Cr: Creatina/ *Creatine*

Ct: Ciclo umbral

Cys: Cisteína

DAB: Diaminobencidina

DALY: *Disability-adjusted life year*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCG-04: Análogo biotinilao del inhibidor irreversible de cisteínpeptidasas E-64

DIA: *Difference in-gel analysis*

dNTPs: Desoxinucleósidos trifosfatos

DS: Desviación estándar

DTT: Ditioneitol

EBP1: ErbB3-binding protein 1

EDA: *Extended data analysis*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESPs: Productos de excreción/secreción / Excretory/secretory products

E-64: N-trans-(epox-isuccinil)-L-leucina 4 guanidinobutilamida. Inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas.

FCS: Suero de ternera fetal

FDR: False discovery rate

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FR: Benzoilcarbonil-fenilalanina-arginina

Fuc: Fucosa/Fucose

GB: *β subunit of G proteins*

Gln: Glutamina

GSK3 β : *Glycogen synthase kinase*

HBSS: Solución salina equilibrada de Hank

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HRP: Horseradish Peroxidase

HSP: Proteína de choque térmico/*Heat shock protein*

iCL: Inhibidor irreversible de catepsina L

IECs: Células epiteliales intestinales/*Intestinal epithelial cells*

IEE: Isoelectroenfoco

IFN- γ : Interferón gamma/*Interferon gamma*

Ig: Inmunoglobulina/*Immunoglobulin*

IL: Interleuquina/*Interleukin*

IL-4R: Receptor de IL-4/*IL-4 receptor*

IL-4R α : Cadena alfa del IL-4R

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible/*Inducible nitric oxide synthase*

IPG: Gradiente de pH inmovilizado

IRF: factores reguladores de interferón

Kat-1: *ketoacyl thiolase gene 1*

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LDA: Análisis discriminante lineal

LefSe: Análisis discriminante lineal efecto tamaño	PBS-TX: PBS con Triton™ X-100 al 0,2%
Lys: Lisina	PC: Componente principal
Met: Metionina	PCA: Análisis de componentes principales
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad	PCoA: Análisis de coordenadas principales
MLNs: Nódulos linfáticos mesentéricos/ <i>Mesenteric lymphatic nodes</i>	PCr: Fosfocreatina
MPP^{Type2}: Progenitores multipotentes de tipo 2/ <i>Multipotent progenitor type 2</i>	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
mRNA: <i>messenger RNA</i>	PCRrt: PCR a tiempo real
MS: Espectrometría de masas/ <i>Mass spectrometry</i>	PDB: <i>Protein data bank</i>
m/z: Relación masa/carga	PFA: Paraformaldehído
mαIL-25: Anticuerpo monoclonal anti IL-25	pI: Punto isoeléctrico
mα-RIL4α: Anticuerpo monoclonal anti IL-4	PIC: cóctel inhibidor de peptidasas
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido/ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	PIR: Protein Information Resource
NC: No clasificados	PM: Peso molecular
PA2G4: Proteína 2G4 asociada a proliferación/ <i>Proliferation-associated 2G4</i>	PRF: Protein Research Foundation
PBS: Tampón fosfato salino	PTT: Proteína palmitoil tiosterasa/ <i>palmitoyl protein thioesterase</i>
PBS-T: PBS con Tween®-20 al 0,05%	PVDF: Fluoruro de polivinilideno
	Pzq: Praziquantel
	RACK1: Receptor de proteína C quinasa 1 activada/ <i>receptor of activated protein C kinase 1</i>
	RDA: Análisis de redundancia discriminante

RELM- β : Molécula tipo resistina beta/ *Resistin-like β*

rIL: recombinante de interleuquina

rIL13R α s2: Recombinante del receptor IL-13 soluble

ROS: Especies reactivas de oxígeno/*Reactive oxygen species*

RPMI: Roswell park memorial institute 1640 medium

RQ: Cantidad relativa

RT-PCRrt: Retrotranscripción y PCRrt

SCSIE: Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: *Scanning electron microscopy*

Ser: Serina/*Serine*

SFB: Bacterias filamentosas segmentadas

spi: Semana postinfección

spip: Semana postinfección primaria

spis: Semana postinfección secundaria

Sptto: Semanas post tratamiento

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción/*Signal transducer and activator of transcription*

TBS: Tampón tris salino

TBS-T: TBS con Tween®-20 al 0,05%

TEM: Transmission electron microscopy

TFA: Ácido trifluoroacético

TGF- β : Factor transformador del crecimiento β /*Transforming growth factor β*

TPI: *Triose phosphate isomerase*

Treg: Linfocitos T reguladores/*T regulatory lymphocytes*

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

TSS: *Total sum scaling*

UTPGT: *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*

wppi: *Weeks post primary infection*

wppt: *Weeks post praziquantel treatment*

wpsi: *Weeks post secondary infection*

INTRODUCCIÓN

Actualmente se estima que más de 2000 millones de personas se encuentran infectadas con una o más especies de helmintos intestinales, siendo los niños el grupo de población más afectado (Hotez *et al.*, 2014; Weatherhead & Hotez, 2015; Weatherhead *et al.*, 2017). Alrededor de 270 millones de niños en edad pre-escolar y, sobre 600 millones, en edad escolar se encuentran infectados con alguna especie de helminto intestinal (Pullan *et al.*, 2014). Estas helmintiasis causan alrededor de 6 millones de muertes anuales y, en algunas áreas, la prevalencia alcanza el 100% (WHO, 2015). Cabe señalar que, además de causar graves problemas gastrointestinales, estos helmintos provocan enfermedades de carácter crónico y debilitante asociadas a anemia, retraso en el crecimiento, malnutrición, avitaminosis o desarreglos en la función cognitiva, entre otros problemas (Drake *et al.*, 2000; Bethony *et al.*, 2006; Hotez & Kamath, 2009; Pullan *et al.*, 2014). Un estudio puso de manifiesto que las pérdidas medidas en años de vida potencialmente perdidos por discapacidad (DALY o *Disability-adjusted life year*) cada año debido a las helmintiasis intestinales supone más de 39 millones, un valor superior al de la malaria y similar al de la tuberculosis (Hotez *et al.*, 2006, 2014).

Debido a la ausencia de vacunas efectivas frente a estas parasitosis, las estrategias de control de estas enfermedades, en la actualidad, están limitadas al tratamiento farmacológico. A pesar de que es difícil estimar el gasto que esto genera, se habla de un gasto anual de más de 10 billones de dólares sólo en anti-helmínticos, sin incluir gastos en medidas de control y pérdidas de producción ganadera (Hotez *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2013; Roeber *et al.*, 2013).

A pesar de que, en general, los tratamientos frente a estas helmintiasis son efectivos, las prevalencias continúan creciendo debido a factores como las continuas reinfecciones, internacionalización del comercio de alimentos, cambios demográficos o el incremento del turismo internacional (Alum *et al.*, 2010). Asimismo, la aparición de resistencias frente a los anti-helmínticos dificulta el control de estas infecciones (Steppek *et al.*, 2007). Estos hechos hacen que el

desarrollo de vacunas pueda ser un arma fundamental para el control de estas infecciones parasitarias.

En los últimos años, se viene señalando que uno de los principales factores que determina la ausencia de resultados son las estrategias empleadas para el desarrollo de vacunas (Vercruyssen *et al.*, 2004; Elliott & Weinstock, 2012). Estas estrategias se han basado en experimentos con animales de laboratorio empleando antígenos seleccionados de manera poco menos que aleatoria. Esto ha supuesto una gran inversión de tiempo y dinero sin una contrapartida en resultados. En diversos foros se viene señalando que una de las razones que explica la falta de resultados es el desconocimiento de los mecanismos que determinan la expulsión de estos helmintos. Como consecuencia, se viene postulando la necesidad de profundizar en los estudios sobre estos mecanismos para desarrollar estrategias que permitan dirigir las pruebas vacunales sobre la base del conocimiento de las alteraciones en el hospedador que conducen al control de los parásitos, permitiendo un ahorro importante de tiempo y dinero (Vercruyssen *et al.*, 2004; Toledo & Fried, 2005; Harris, 2011; Cortés *et al.*, 2017a)..

Los estudios realizados han puesto de manifiesto que la protección frente a los helmintos intestinales está basada en la activación de respuestas inmunitarias de tipo 2 y mediadas fundamentalmente por interleuquina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Cortés *et al.*, 2017a). La unión de la IL-4 y/o IL-13 a la cadena α de receptor de IL-4 (IL-4R α) sobre la superficie de numerosas células del sistema inmunitario y otras poblaciones celulares induce la activación del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)6 y una serie de mecanismos efectores que conllevan la expulsión de los parásitos (Grencis, 2015; Cortés *et al.*, 2017a). Sin embargo, la cronicidad de las helmintiasis intestinales se asocia con el desarrollo de respuestas Th1 (Klementowicz *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2017a).

En este contexto se enmarca la presente Tesis Doctoral, en la que se pretende analizar los procesos inmunomoduladores de estos helmintos asociados a

la generación de infecciones crónicas, la resistencia frente a los mismos y el desarrollo de inmunidad adquirida frente a estas infecciones. El objetivo es profundizar en el conocimiento de los factores que determinan que los hospedadores generen respuestas Th2 asociadas a resistencia frente a estos helmintos. Los resultados obtenidos pueden resultar de gran interés para el desarrollo de herramientas de control frente a estas infecciones, así como para alcanzar una mejor comprensión de los procesos inmunorreguladores e inmunopatológicos a nivel intestinal.

Para el desarrollo de este proyecto se emplea como modelo experimental al helminto intestinal *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) y al ratón ICR como hospedador definitivo. Este modelo se propone puesto que permite estudiar las situaciones descritas previamente. Las infecciones primarias en ratón ICR adquieren carácter crónico asociado a respuestas Th1 con intensas respuestas inflamatorias y patológicas. Sin embargo, estudios recientes de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que el ratón desarrolla inmunidad adquirida frente a la infección secundaria tras la cura farmacológica de una infección primaria, en un proceso mediado por IL-25 (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b; Cortés *et al.*, 2017b). Estos estudios permitirán profundizar en el conocimiento de los procesos que determinan cada tipo de respuesta y, como consecuencia, el curso de la infección.

Los miembros de la familia Echinostomatidae son, en general, parásitos de vertebrados incluido el ser humano (Toledo & Esteban, 2016). De forma más concreta, *E. caproni* es un trematodo digénido que parasita el intestino delgado de diferentes vertebrados, entre los que se encuentran varias especies de animales de laboratorio (Toledo *et al.*, 2009a). Sin embargo, la compatibilidad de este parásito es diferente en función de la especie hospedadora con un curso de la infección distinto en cada uno de ellos asociado a una respuesta inmunitaria diferente en cada caso (Toledo & Fried, 2005; Toledo *et al.*, 2009a). Por esta razón, este modelo

experimental se viene empleando desde hace tiempo para analizar los factores de los que depende el curso de las parasitosis intestinales.

En hospedadores susceptibles, como los ratones ICR, *E. caproni* establece infecciones crónicas caracterizadas por elevadas cargas parasitarias. En este tipo de hospedadores se observa, asimismo, una intensa patología intestinal (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2011). En cambio, las ratas Wistar son resistentes a *E. caproni* y las infecciones en este hospedador se caracterizan por un establecimiento y desarrollo deficiente del verme, seguida de una eliminación completa del parásito poco tiempo después de la infección. En estos hospedadores se observa una patología intestinal leve y una baja respuesta de anticuerpos (Toledo *et al.*, 2006a; Sotillo *et al.*, 2011).

Los análisis comparativos de los perfiles de expresión de citoquinas *in vivo* entre ratones y ratas infectados por *E. caproni* han servido para dilucidar el papel crucial de las respuestas locales en la determinación del resultado de la infección en estos hospedadores. Mientras que el establecimiento de infecciones crónicas en ratones ICR está asociado con la producción intestinal de interferón (IFN)- γ y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la resistencia en ratas está relacionada con un fenotipo local mixto Th2/Th17 en el que la IL-13 parece jugar un papel fundamental la expulsión de los parásitos mediante la activación de mecanismos efectores (Toledo *et al.*, 2006a; Sotillo *et al.*, 2007, 2011; Trelis *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2015).

En los últimos años, los estudios se han centrado en profundizar los factores que determinan que, en ratón ICR, se genere una respuesta Th1 causante de la susceptibilidad y cronicidad. En este sentido, Muñoz-Antoli *et al.* (2016a, b) demostraron que, tras una infección primaria, el ratón generaba una resistencia parcial frente a una infección homóloga secundaria. Tras la cura farmacológica de la infección primaria, la infección secundaria presentaba una carga parasitaria significativamente menor, asociada a una respuesta Th2 con elevados niveles de IL-

4 e IL-13. Asimismo, se pudo observar que la cura farmacológica de la infección primaria generaba un importante incremento de la producción de IL-25 incluso en ausencia de infección.

Esta resistencia está basada en el desarrollo de respuestas Th2 con elevados niveles de IL-13 e IL-4, en las que la IL-25 y las células *tuft* juegan un papel fundamental (Cortés *et al.*, 2016b, 2017a, 2018a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). El hecho de que un mismo hospedador genere respuestas Th1 (asociadas a susceptibilidad) en una infección primaria, y respuestas Th2 (asociadas a resistencia) en infecciones secundarias, ofrece la posibilidad de estudiar con detalle los factores que regulan estas respuestas y, por tanto, los factores que determinan el curso de la infección. A partir de este hallazgo, se ha realizado una serie de trabajos que demuestran que el modelo propuesto resulta excelente para conseguir los objetivos planteados y obtener datos de gran interés. Esta afirmación se basa en resultados previamente obtenidos que afirman lo siguiente:

- El parásito es capaz de modular el secretoma en un ambiente Th1 sobreexpresando proteínas detoxificantes y de respuesta a estrés favoreciendo su supervivencia (Cortés *et al.*, 2018b);

- La IL-25 resulta necesaria para generar respuestas protectoras Th2 en infecciones con *E. caproni*. La administración de IL-25 exógena previa a la infección protege a los ratones de la infección en relación a una intensa respuesta Th2 con elevados niveles de IL-13 e IL-4 (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; Cortés *et al.*, 2017a);

- En las infecciones primarias en ratón, el parásito no activa a las células *tuft*, lo que implica una escasa producción de IL-25 (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; Cortés *et al.*, 2017a); En estas condiciones, la producción temprana de IL-12 determina que se generen respuestas Th1 con elevados niveles de IFN- γ e

infecciones de carácter crónico, aunque se produzca IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP) (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b);

- A pesar de que se generen respuestas eminentemente Th1, en infecciones primarias se incrementan algunos marcadores Th2 (Arg I, Ym-I, IL-33 o TSLP) o Th9 (IL-9), lo cual parece debido a la activación de mecanismos de protección y regeneración del tejido por parte del hospedador que modulan el daño intestinal permitiendo el establecimiento crónico del parásito (Cortés *et al.*, 2016; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b);

- La cura farmacológica de la infección primaria induce una reducción de la producción de citoquinas y una activación de los mecanismos de regeneración de la mucosa intestinal, incluyendo la hiperplasia de células *tuft*. Este hecho determina un incremento de la expresión de IL-25 (Cortés *et al.*, 2016b, 2017a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b);

- Y, en estas condiciones, la infección secundaria tiene lugar en un ambiente con elevados niveles de IL-25, lo cual implica la activación de células linfoides innatas tipo 2 (ILCs2) que producen IL-13, determinando el desarrollo de respuestas Th2 y resistencia a la infección (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; Cortés *et al.*, 2017a, b).

Por tanto, estos resultados ofrecen la posibilidad de estudiar mediante el modelo experimental *E. caproni*-ratón los factores que regulan la producción de IL-25 y, consecuentemente, resistencia frente a estos parásitos, así como los mecanismos tisulares que determina esta resistencia. Estos resultados pueden ser extrapolables a otras helmintiasis de mayor impacto médico y/o veterinario.

En los últimos años, la IL-25 está considerada como la principal citoquina responsable de la resistencia frente a los helmintos intestinales. La mayoría de estudios coinciden en señalar que el papel de la IL-25 en la resistencia es debido a

que favorece el desarrollo de respuestas protectoras Th2 a través de la supresión de respuestas inflamatorias Th1 y Th17 (Owyang *et al.*, 2006; Kleinschek *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016). Esta respuesta Th2 activa mecanismos efectores como hiperplasia de células mucosecretoras, expresión de la molécula *Resistin-like β* (RELM- β), mastocitosis o hipercontractibilidad muscular, entre otros, que conducen a la eliminación del parásito (Fallon *et al.*, 2006; Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Angkasekwina *et al.*, 2013, 2017). La principal fuente de la IL-25 son las células *tuft* que se multiplican y activan tras la infección de un helminto. En estado fisiológico, estas células se encuentran poco representadas en el epitelio intestinal. Sin embargo, en numerosas infecciones causadas por helmintos intestinales, se expanden rápidamente una vez establecida la infección (Gerbe & Jay, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). La IL-25 producida por estas células, activa a las ILC2 que, a su vez, producen IL-13 y, junto con los basófilos, pueden presentar el antígeno a células CD4+, favoreciendo la polarización a Th2 (Neill *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010; Moro *et al.*, 2010; Cortés *et al.*, 2017a). Esta situación es la que se da en el caso de la mayoría de helmintos intestinales.

Los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que, a diferencia de otras helmintiasis, en infecciones con *E. caproni* en ratón ICR la generación de una respuesta Th1 asociada a susceptibilidad y cronicidad se debe a la ausencia de producción de IL-25 en respuesta a esta infección. A pesar de ello, la cura de esta infección primaria con praziquantel (pzq) inicia los procesos de hiperplasia de las células *tuft* y con ello, incrementos en la producción de IL-25 de forma que, una infección homóloga secundaria, genera una respuesta de tipo Th2 y resistencia frente a la misma (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b). Este hecho ofrece la posibilidad de estudiar, de forma comparada, una infección en la que no se genera IL-25 (infección primaria con respuesta Th1 y susceptibilidad) con otra en la que sí que se produce IL-25 (infección secundaria con respuesta Th2 y resistencia).

Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral se pretende estudiar el origen de la producción de la IL-25 y los mecanismos de acción que determinan la resistencia frente los helmintos intestinales. Para ello, el sistema biológico *E. caproni*-ratón ICR es un modelo experimental adecuado al permitir la comparación de respuestas en ausencia de IL-25 y mediadas por IL-25 en una misma especie hospedadora.

Estudios recientes, han sugerido que las bacterias que componen la microbiota intestinal son responsables de generar señales de activación y diferenciación de las células *tuft* (Nair *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2015; Buonomo *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). La activación de las células *tuft* en infecciones por helmintos intestinales podría estar asociada a cambios en la microbiota intestinal y metabolitos promovidos por la propia presencia del parásito en el intestino.

Por tanto, la interacción microbiota intestinal – IL-25 resulta determinante en los procesos de regulación de las respuestas Th2 así como, en los mecanismos efectores activados frente a infecciones por helmintos intestinales (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; von Moltke *et al.*, 2016). Asimismo, a pesar de que existen ciertos estudios que sugieren que las bacterias presentes en el medio de infección son seleccionadas por los propios helmintos intestinales para optimizar el medio interno en el que se desarrollan (Brosschot & Reynolds, 2018), también hay otros estudios que sugieren que el hospedador vertebrado puede haber seleccionado las poblaciones microbianas que presentan funciones protectoras frente a patógenos. En base a estos hechos, es posible que la IL-25 además de ser fundamental en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (Brosschot & Reynolds, 2018) y en la activación de las respuestas Th2, parece que esta citoquina puede intervenir en la activación de los mecanismos efectores que promueven la expulsión de los helmintos del intestino (Gerbe *et al.*, 2016; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b).

Todos estos hechos indican que la flora intestinal, podría ser una pieza clave en la activación de los procesos de regeneración tisular y resistencia frente a infecciones secundarias por *E. caproni* ya que se encuentra involucrada en las vías de señalización de la expresión de IL-25 (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). El modelo *E. caproni*-ratón se considera un modelo útil para el estudio del papel de la IL-25 en la reparación tisular y generación de resistencia, así como, para investigar las funciones desarrolladas por la microbiota intestinal en la regulación de estos procesos (Peachey *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018a). Asimismo, ya que los niveles de expresión de IL-25 se incrementan tras la cura farmacológica de la infección primaria por *E. caproni*, es posible que los factores de protección frente a infecciones secundarias producidas por este parásito, se encuentren relacionados con los mecanismos de reparación del tejido activados tras la eliminación de la infección primaria. Estos mecanismos promueven la expansión de poblaciones particulares de bacterias resistentes que participan en los procesos de cicatrización del tejido mediante la estimulación de la migración y proliferación de las células epiteliales intestinales. Esto genera un entorno local dentro de las heridas en el que subpoblaciones particulares de bacterias residentes se expanden y ayudan a la cicatrización del tejido estimulando la migración y proliferación de células epiteliales (Alam *et al.*, 2016). De este modo, es posible que las modificaciones en la composición microbiana que más perduran en el tiempo participen en los procesos de resistencia frente a la infección. Asimismo, los niveles de expresión de IL-25 disminuyen progresivamente a medida que pasa el tiempo desde la cura de la infección primaria (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a) por lo que esta disminución podría estar asociada a cambios en la composición microbiana intestinal una vez el parásito ha sido expulsado junto con una restauración progresiva de la microbiota que estaba presente antes de la infección primaria.

En este sentido, los helmintos intestinales pueden afectar a la presencia y abundancia de las poblaciones de microbios residentes por la actividad

antimicrobiana de algunos productos de excreción/secreción (ESPs) o por la alteración de la respuesta inmunitaria que puede afectar a la flora microbiana (Hewitson *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Brosschot & Reynolds, 2018) . En algunos estudios, se ha demostrado que la respuesta Th2 inducida por los helmintos intestinales afecta a la microbiota intestinal de manera cualitativa y cuantitativa (Fricke *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018).

Es por esto que, es necesario profundizar en el conocimiento del papel desarrollado por la IL-25 en la protección del tejido intestinal mediada por la inmunidad innata en las infecciones causadas por helmintos, así como la función de la microbiota intestinal en el iniciación de estos procesos.

En este contexto, el modelo *E. caproni* – ratón podría servir de gran ayuda para investigar el papel protector de IL-25 frente a infecciones secundarias por *E. caproni* y dilucidar si ésta citoquina además de polarizar las respuestas hacia un fenotipo Th2, se encuentra involucrada en la activación de los mecanismos innatos que favorecen la integridad epitelial, limitando de este modo, el daño tisular, la translocación bacteriana, y respuestas inflamatorias Th1 relacionadas con el desarrollo crónico de la infección.

Por todos estos hechos, en la presente Tesis Doctoral se trata de profundizar en el estudio del papel ocupado por la microbiota intestinal en infecciones resistentes frente a *E. caproni*, junto con otros aspectos que permitan explicar el origen y la funcionalidad de la IL-25 que, parece ser, la principal responsable de la resistencia frente a este trematodo intestinal.

Este estudio permitirá conocer con mayor detalle, los mecanismos que contribuyen eficazmente al establecimiento de infecciones de larga duración en el hospedador o, en cambio, a la generación de resistencia frente a la misma. Además, se podrán extraer también, conclusiones de interés acerca de los factores que determinan la inmunopatología asociada a las helmintiasis intestinales. Todos estos

resultados pueden ser de gran interés para una mejor comprensión de los mecanismos que rigen el curso de las helmintiasis intestinal.

OBJETIVOS

En la actualidad, las helmintiasis intestinales siguen afectando a millones de personas a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo y causan un gran impacto negativo en la salud pública y en el crecimiento socioeconómico de las poblaciones afectadas. Aunque el tratamiento de estas parasitosis es generalmente eficaz, presenta un coste elevado y resulta difícil de implementar. Además, se producen reinfecciones de manera continuada y han comenzado a aparecer cepas resistentes. Es por esto que, existe una necesidad urgente de ampliar los conocimientos acerca de las interacciones parásito-hospedador establecidas en estas infecciones. En este contexto, se ha demostrado que el empleo de modelos experimentales es útil para dilucidar los mecanismos que subyacen tras la iniciación de la respuesta inmunitaria, los cuales son determinantes para el establecimiento crónico del parásito o, por el contrario, la expulsión del mismo.

La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro de una línea de investigación que trata de profundizar en el conocimiento de las relaciones parásito-hospedador en infecciones causadas por helmintos intestinales mediante el empleo del modelo experimental *E. caproni*- ratón. El **objetivo general** de este trabajo se centra en:

Analizar los procesos inmunorreguladores que participan en el desarrollo diferencial de las respuestas inmunitarias observadas en el hospedador definitivo los cuales son determinantes para el establecimiento de infecciones crónicas o, por el contrario, generación de resistencia frente a estas infecciones parasitarias.

Por ello, los **objetivos específicos** planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1.- Estudiar el papel de las catepsinas presentes en los ESPs de los adultos de *E. caproni* como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria en ratón a través de la degradación de anticuerpos. Para ello se analizaron:

Objetivos

a) Actividad cisteín-peptidasa de los principales subtipos de catepsinas implicados en la degradación de los anticuerpos unidos a superficie.

b) Inmunolocalización de los diferentes subtipos de catepsinas presentes en los ESPs producidos por los adultos de *E. caproni*.

2.- Analizar las alteraciones proteómicas inducidas en el íleon de ratones infectados por *E. caproni* en presencia y ausencia de niveles elevados de IL-25 con la finalidad de identificar aquellas proteínas que se encuentran modificadas en presencia de IL-25 las cuales, pueden estar implicadas en la expulsión de los vermes del lumen intestinal.

3.- Estudiar el papel de la IL-25 en la activación de la respuesta Th2 y el desarrollo de resistencia frente a infecciones por *E. caproni* en ratón a partir del análisis de los factores involucrados en la modulación de la expresión de IL-25, el papel de la IL-25 en la regulación de la respuesta inmunitaria y los mecanismos efectores inducidos por la IL-25 responsables del desarrollo de resistencia. Para ello se determinaron:

a) La evolución del curso de la infección por *E. caproni* en diferentes condiciones experimentales.

b) La respuesta inmunitaria generada frente a la infección mediante el análisis de la producción de citoquinas a nivel local y marcadores de macrófagos.

c) Los cambios cualitativos y cuantitativos producidos a nivel intestinal por la activación de los mecanismos efectores responsables de la generación de resistencia frente a la infección.

4.- Estudiar el papel de la microbiota intestinal del hospedador definitivo en la protección frente a la patología causada por la infección y en la regulación de los niveles de expresión de IL-25, citoquina clave en la inmunidad antihelmíntica y

en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Para ello se analizaron los siguientes parámetros:

a) La evolución del curso de la infección por *E. caproni* en hospedadores susceptibles y resistentes.

b) La composición de la microbiota intestinal en hospedadores susceptibles y resistentes a la infección.

c) La respuesta inmunitaria generada frente a la infección mediante el análisis de la producción de citoquinas a nivel local en hospedadores susceptibles y resistentes.

Para alcanzar los objetivos planteados, la presente Tesis Doctoral se ha dividido en los siguientes capítulos:

- En el **Capítulo I** se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se recoge la información más destacable del estado actual de conocimientos de los estudios de las relaciones parásito-hospedador-microbiota intestinal empleando el modelo experimental *E. caproni*-ratón. Dentro de este capítulo se detallan las principales características de la especie parásita de estudio y las respuestas inmunitarias desarrolladas en ratones frente a helmintos intestinales y su posible relación con la microbiota intestinal.

- El **Capítulo II** se centra en la descripción de los materiales y métodos empleados para el desarrollo de los procesos experimentales planteados y tratamiento de los datos obtenidos a partir de los mismos.

Objetivos

- En el **Capítulo III** se muestra de manera detallada, los resultados obtenidos a partir de cada una de las aproximaciones experimentales llevadas a cabo en la presente Tesis.

- En el **Capítulo IV** se procede a realizar una discusión de los resultados obtenidos en nuestros estudios con respecto los datos arrojados por otros autores, relacionándolos entre sí.

- El **Capítulo V** recoge las conclusiones que se han podido extraer de los trabajos experimentales realizados para la presente Tesis.

Por último, todas las referencias bibliográficas citadas a lo largo de este trabajo se encuentran recogidas en un apartado final.

CAPÍTULO I

ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS

ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS

Este capítulo está destinado a plasmar los conocimientos más destacables en la actualidad en relación al objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Inicialmente, se van a describir los aspectos biológicos de la especie parásita empleada para este trabajo (*Echinostoma caproni*) así como, los aspectos vinculados a las relaciones parásito-hospedador lo cual, facilitará una mejor comprensión del contenido de este estudio. A continuación, se abordará los aspectos más relevantes de la respuesta inmunitaria frente a los helmintos intestinales, desde los principales tipos de respuestas inmunitarias (respuestas Th1/Th2) involucradas en infecciones por helmintos intestinales, hasta las células inmunitarias más destacables que participan en la activación y desarrollo de los mecanismos efectores mediados por estas respuestas. Asimismo, se tratará de profundizar en los conocimientos existentes acerca del papel que desempeña la microbiota intestinal en el desarrollo de las infecciones por helmintos y, del mismo modo, se describirá los principales aspectos de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollados por estos parásitos. Finalmente, se detallará con mayor profundidad las características de la respuesta inmunitaria generada frente al parásito de estudio, *E. caproni*.

1.1. LA ESPECIE PARÁSITA OBJETO DE ESTUDIO: *ECHINOSTOMA CAPRONI*

En este apartado se describe sucintamente, las características más reseñables de la especie empleada para el desarrollo de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral. El ciclo biológico de *E. caproni*, se viene manteniendo desde hace años en nuestro laboratorio, a partir de una cepa cedida originalmente por el

Prof. Dr Bernard Fried del Lafayette College (USA). Este hecho ha permitido realizar toda una serie de estudios tanto de índole biológica como de carácter inmunológico y molecular.

1.1.1. ECHINOSTOMA CAPRONI

E. caproni (Richard, 1964) se describió en la isla de Madagascar tras su hallazgo en el halcón *Falco newtoni*, que actuaba como hospedador definitivo. El gasterópodo pulmonado acuático *Biomphalaria pfeifferi* se identificó como primer hospedador intermediario y las metacercarias se encontraron en otras especies de moluscos y en el riñón de un anfibio, *Ptychadena mascareniensis*. Posteriormente, su ciclo biológico se reprodujo experimentalmente empleando especies hospedadoras distintas a las observadas en la naturaleza (Richard & Brygoo, 1978).

Los echinostomátidos se incluyen en el phylum Plathyelmyntes, clase Trematoda, subclase Digenea (formas adultas generalmente con una ventosa oral y otra ventral) y familia Echinostomatidae. Se caracterizan morfológicamente por presentar un collar de espinas rodeando la ventosa oral formando una o dos coronas de espinas, interrumpidas ventralmente, y cuya disposición es clave para la clasificación taxonómica de las especies (Kostadinova *et al.*, 2005). En cambio, la clasificación sistemática de los echinostomatidos a día de hoy, sigue siendo problemática ya que existe una gran homogeneidad entre especies en cuanto a las características morfológicas de las fases adultas y la identificación errónea de algunas especies o la falta de una descripción más precisa de otras, hacen difícil obtener una clasificación adecuada (Kostadinova & Gibson, 2000). Debido a esta controversia, este grupo de digénidos se está viendo sometido a continuas revisiones sistemáticas desde hace años (Iskova, 1985; Kanev, 1994; Kostadinova, 1995, 1999;

Kanev, *et al.*, 1995; Toledo *et al.*, 2000, 2009a; Kostadinova & Gibson, 2000; Fried & Toledo, 2004; Kostadinova *et al.*, 2005; Esteban & Muñoz-Antoli, 2009).

La especie empleada en este trabajo, *E. caproni*, está incluida dentro del género *Echinostoma Rudolphi*, 1809 y pertenece al complejo conocido como "*revolutum*", que agrupa las especies que presentan collar de 37 espinas. Las revisiones más actuales de este complejo describen, junto con los estudios publicados hasta este momento, la existencia de 10 especies distintas, a pesar de que la sistemática de este grupo es muy compleja y se encuentra en revisión de manera continua (Sorensen *et al.*, 1998; Kostadinova *et al.*, 2003; Fried & Graczyk, 2004; Fried & Toledo, 2004; Esteban & Muñoz-Antoli, 2009; Detwiler *et al.*, 2010, 2012; Georgieva *et al.*, 2013; Noikong *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2020; Heneberg, 2020; Le *et al.*, 2020; Ran *et al.*, 2020). Sin embargo, a pesar de la controversia ligada a la identificación de las diversas especies que conforman el complejo "*revolutum*", cabe destacar que la especie *E. caproni* es una de las que ha producido menor confusión y su validez ha sido aceptada por la mayoría de estos autores.

1.1.2. CICLO BIOLÓGICO

Los echinostomátidos presentan un ciclo biológico complejo, caracterizado por la presencia de siete fases de desarrollo: adulto, huevo, miracidio, esporocisto, redia, cercaria y metacercaria; y la intervención de tres hospedadores, denominados como hospedador definitivo y primer y segundo hospedador intermediario (**Figura 1.1**). Como hospedadores definitivos actúan diferentes especies de animales

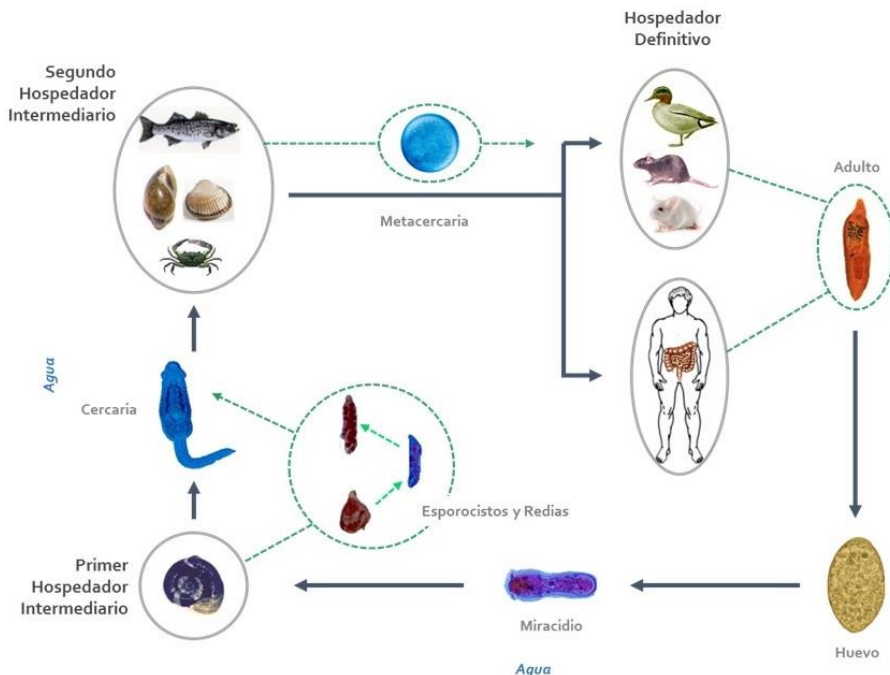


Figura 1.1.- Ciclo biológico de *Echinostoma* spp. Los huevos se eliminan al exterior con la heces del hospedador definitivo y deben alcanzar un medio acuático para su desarrollo; tras la eclosión de los huevos, los miracidios liberados buscan activamente y penetran en un primer hospedador intermediario apropiado; en este hospedador, el parásito produce una generación de esporocistos y dos de redias para, finalmente, producir cercarias que salen al exterior y buscan un segundo hospedador intermediario; una vez localizado, la cercaria penetra en él y se enquistada, dando lugar a la metacercaria; el hospedador definitivo se infecta al ingerir las metacercarias infectivas con el segundo hospedador intermediario y los vermes adultos se desarrollan en el intestino. (Figura modificada de Toledo & Esteban (2016)).

vertebrados en los que se desarrolla la forma adulta del parásito, normalmente a nivel del intestino delgado y a diferentes alturas dentro del mismo según la especie de echinostomátido de la que se trate (Toledo, 2009a). Como primer hospedador intermediario pueden actuar numerosas especies de moluscos gasterópodos acuáticos, encontrando una mayor especificidad por unas especies de caracoles que por otras según la especie de echinostomátido. Como segundos hospedadores intermediarios intervienen animales invertebrados y algunos anfibios en los que se

enquistan la forma infectante para el hospedador definitivo, la metacercaria. Todos estos aspectos relacionados con la biología de los *Echinostoma* spp. han sido revisados por Esteban & Muñoz-Antoli (2009).

En condiciones naturales, el ciclo de vida de los echinostomatidos se mantiene gracias a las especies que actúan como hospedadores definitivos (aves y mamíferos) que liberan mediante las heces los huevos del parásito en zonas de agua dulce tales como lagos, estanques o arroyos. Una vez en el agua, los huevos fértiles necesitan un tiempo de maduración en el ambiente para desarrollar el estadio miracidial ya que no están embrionados en el momento de la puesta. La eclosión de los huevos maduros se encuentra inducida por diferentes estímulos siendo la luz, el más relevante en el caso de *E. caproni* y muestra un patrón diurno entre las 11.00 y 16.00 h. Tras la eclosión de los huevos, los miracidios recién liberados nadan activamente hasta encontrar a un gasterópodo pulmonado primer hospedador intermediario, en el que penetran a través del tegumento. Estos miracidios constituyen la primera fase de vida libre del ciclo y se caracterizan por presentar una geotaxia negativa y fototaxia positiva (Haas, 2000). Como primer hospedador intermediario, actúan gasterópodos de los géneros *Biomphalaria* y *Bulinus* en el caso de *E. caproni*. En el interior del mismo, se desarrollan el estadio de esporocisto y varias generaciones de redias. La producción de redias comienza tras 5-8 días. Cada esporocisto da lugar en torno a 15 redias de primera generación (Ataev *et al.*, 1997). Las redias de primera generación, únicamente generan embriones rediales y se diferencian en redias de segunda generación. Estas redias, en la etapa inicial de vida, darán lugar a nuevos embriones rediales y, tras ello, formarán el siguiente estadio evolutivo, las cercarias.

Las cercarias forman la segunda fase de vida libre del ciclo y se encuentran muy influenciadas por la temperatura la cual afecta tanto a su capacidad de supervivencia en el exterior como a su capacidad infectiva. Estas cercarias, son liberadas al medio acuático por el primer hospedador intermediario, transcurridas

entre 4 y 6 semanas desde la infección miracidial y emergen del caracol infectado en busca de un segundo hospedador intermediario. Como segundo hospedador intermediario pueden actuar numerosas especies de gasterópodos, ranas, renacuajos y peces ya que las cercarias tienen escaso grado de especificidad por el hospedador. Una vez que se pone en contacto con el segundo hospedador intermediario, penetra activamente en él y se enquista en forma de metacercaria, fase infectiva para los hospedadores definitivos. Estas metacercarias se enquistan principalmente en las gónadas de los renacuajos y en el riñón y cavidades pericárdicas de moluscos gasterópodos de agua dulce, donde pueden permanecer viables por varios meses (Huffman & Fried, 1990). Los hospedadores definitivos se infectan al ingerir un segundo hospedador intermediario que albergue metacercarias en su interior. Las formas juveniles no realizan migración intraorgánica en el hospedador definitivo y los adultos establecen su nicho directamente en el intestino delgado donde se anclan gracias a las ventosas que presentan. Como hospedadores definitivos de estos digénidos, pueden actuar numerosos vertebrados, entre los que se encuentra el ser humano. No es hasta los 10-16 días postinfección, que los hospedadores definitivos comienzan a liberar huevos y, aunque se produce de manera continua desde el comienzo del periodo patente, la cantidad de huevos eliminados en heces durante el curso de la infección presenta variaciones significativas en este periodo (Christensen *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 2004a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007).

Existen numerosos factores hospedador-dependientes como el pH, el CO₂, los componentes biliares, disponibilidad de glucosa o presencia de determinadas enzimas, que pueden influir en el desenquistamiento de las metacercarias y el subsiguiente establecimiento de los vermes en la mucosa intestinal (Fried, 1994; Fried *et al.*, 2004). Además, existen conocimientos fehacientes acerca de la preferencia de los echinostomátidos por nichos concretos en el interior del intestino delgado de sus hospedadores definitivos (Nollen, 1996). Durante las primeras fases tras la infección del hospedador definitivo, los vermes se encuentran generalmente dispersos en el interior del intestino delgado, pero después tienden a ubicarse en una

pequeña zona del intestino. Se ha observado que, en roedores los adultos de *E. caproni* se establecen a nivel del íleon (Odaibo *et al.*, 1988, 1989; Yao *et al.*, 1991). En cambio, estudios recientes han mostrado la presencia de un patrón de migración a lo largo del intestino delgado, alojándose hacia la parte posterior durante el día y hacia la parte más distal durante la noche y primeras horas de la mañana (Platt *et al.*, 2010).

El curso de la infección producida por los echinostomátidos en sus hospedadores definitivos depende principalmente de factores propios de estos hospedadores. Más adelante, se pasará a describir con más detalles las relaciones parásito-hospedador pero es importante reseñar que existe diferente compatibilidad con los hospedadores definitivos. En los hospedadores de alta compatibilidad se generan infecciones de carácter crónico, sin embargo, en los hospedadores de baja compatibilidad los adultos se expelen rápidamente, afectando al mismo tiempo, a su desarrollo y crecimiento, además de influir en la tasa de fertilidad y emisión de huevos (Toledo & Fried, 2005).

1.1.3. ECHINOSTOMA CAPRONI EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

Durante años, los echinostomátidos han sido ampliamente utilizados para el estudio de las relaciones parásito-hospedador en infecciones producidas por helmintos mediante el empleo de modelos experimentales bien establecidos. El hecho de que este grupo de helmintos presenten la capacidad de desarrollarse en una amplia gama de hospedadores tanto intermediarios como definitivos, ha facilitado la implementación de estudios en condiciones de laboratorio. En este apartado, se describe el desarrollo de las formas adultas del parásito en el hospedador definitivo y, más concretamente, en los antecedentes del modelo experimental *E. caproni*-roedor, que ha sido el modelo utilizado en este trabajo.

1.1.3.1. EL SISTEMA *ECHINOSTOMA CAPRONI*-ROEDOR

El estudio de las relaciones parásito-hospedador requiere el desarrollo de modelos experimentales que permitan realizar análisis comparativos del desarrollo de una especie parásita en diferentes especies hospedadoras. Los echinostomátidos, y concretamente, *E. caproni*, constituyen un excelente modelo para este tipo de estudios. En numerosos trabajos se ha demostrado que la evolución de la infección y sus características están fuertemente condicionadas por la especie hospedadora. El modelo *E. caproni*-roedor permite estudiar una misma especie de parásito en diferentes especies hospedadoras experimentales en las que el curso de la infección es distinto. De tal modo, este modelo nos ofrece la posibilidad de estudiar los factores dependientes del hospedador que son responsables de determinar la expulsión de los parásitos del intestino o, por el contrario, del establecimiento crónico de los mismos. Asimismo, otra de las ventajas ofrecidas por este modelo experimental es que no presenta fases de migración intraorgánica en el hospedador definitivo y cuenta con una capacidad adaptativa muy grande ya que podemos mantener su ciclo biológico en condiciones de laboratorio fácilmente, haciendo más sencillo el manejo experimental e interpretación de resultados (Toledo & Fried, 2005).

El desarrollo de estudios comparativos con especies de roedores experimentales distintas en las que el curso de la infección presenta numerosas diferencias, se puede abordar a partir del establecimiento de tres estrategias (Toledo, 2009a): (i) empleo de ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos, ya sea genéticamente o por administración de inmunosupresores (Fujino & Fried, 1993; Fujino *et al.*, 1998; Frazer *et al.*, 1999; Ryang *et al.*, 2007); (ii) uso de cepas de ratones diferentes (Lee *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Ryang *et al.*, 2007) y (iii) el empleo de especies hospedadoras distintas (Toledo *et al.*, 2004a,b, 2006a,b; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2015a, 2016a). Las tres estrategias han generado información muy valiosa respecto

a las características inmunológicas de las infecciones generadas por las especies del género *Echinostoma*. Cabe reseñar, que las dos primeras aproximaciones tienen la limitación de que los ratones desarrollan infecciones crónicas con *E. caproni*, por lo que no pueden ser empleados para el estudio de los factores que determinan la expulsión del parásito de la luz intestinal. En cambio, la última estrategia mencionada resulta muy útil para analizar los factores dependientes del hospedador que son responsables de la expulsión y que pueden ser determinantes para describir las características tanto biológicas como patológicas e inmunológicas de las infecciones desarrolladas en cada especie hospedadora.

Por otra parte, el interés que subyace con el estudio de las características inmunológicas de las infecciones producidas por *Echinostoma* spp. se debe al desarrollo de resistencias por parte de sus hospedadores definitivos (Toledo, 2009a). Estas resistencias vienen determinadas por la respuesta inmunitaria que tiene lugar en el hospedador frente al parásito y pueden ser debidas a: (i) modificaciones morfológicas de los adultos (Fried *et al.*, 1996; Fujino *et al.*, 1997; Frazer *et al.*, 1999); (ii) disminución de la tasa de fecundidad de los echinostomátidos (Franco *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2004; Muñoz-Antoli *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2004a, 2006b); (iii) aumento de la carga parasitaria tras la inmunosupresión del hospedador (Fujino & Fried, 1993; McMaster *et al.*, 1995; Fried *et al.*, 1996; Ryang *et al.*, 2007); (iv) eliminación del parásito de forma natural en infecciones primarias (Hansen *et al.*, 1991; Weinstein & Fried, 1991; Muñoz-Antoli *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2004a, 2006b); y v) desarrollo de resistencia frente a infecciones secundarias (Sirag *et al.*, 1980; Christensen, Niels Ø *et al.*, 1986; Hosier *et al.*, 1988). Las características claves de la respuesta inmunitaria, así como, las consecuencias del curso de la infección por *E. caproni* en sus hospedadores definitivos se describe más adelante.

1.1.3.2. DESARROLLO EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

Numerosos estudios en relación al curso de las infecciones por *E. caproni* han sido desarrollados detalladamente en diferentes especies de roedores. Estos roedores se clasifican en hospedadores de alta o baja compatibilidad según la capacidad de albergar la infección (Toledo & Fried, 2005). Los ratones y hámsteres son hospedadores de alta compatibilidad ya que presentan tasas de infección próximas al 100% y se caracterizan por su cronicidad, pudiendo mantenerse más de 25 semanas desde el momento de la inducción de la infección (Hansen *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 2004a, 2009a). Por otro lado, las ratas y los jerbos se consideran hospedadores de baja compatibilidad en los que los parásitos son expulsados del intestino rápidamente (Hansen *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 2004a; Toledo, 2009b). Estudios realizados por Toledo *et al.* (2004a) pusieron de manifiesto que las metacercarias de *E. caproni* presentaban una capacidad infectiva en ratas del 100% pero el curso de la infección en estos hospedadores se veía limitado en el tiempo, reduciéndose drásticamente la tasa de recuperación de adultos a cada semana postinfección (spi) a diferencia de lo observado en hámster en los que el número de vermes recuperados fue significativamente mayor.

La especie hospedadora presenta una gran influencia tanto en el establecimiento como en el desarrollo de los adultos de *E. caproni*. El estudio comparativo llevado a cabo por Toledo *et al.* (2004a) sobre el desarrollo de *E. caproni* en hospedadores de diferente compatibilidad, puso de manifiesto que la especie hospedadora presenta una gran influencia sobre la mayoría de las características morfométricas analizadas, tales como área corporal, áreas ováricas, testiculares, área de la ventosa ventral y anchura del collar. Todas estas medidas mostraron una magnitud significativamente superior en los hospedadores de alta compatibilidad (hámster) que en los de baja compatibilidad (ratas). Asimismo, se observaron la presencia de variaciones tiempo-hospedador dependientes para

numerosas variables, reseñando que la cinética de desarrollo de los vermes adultos difiere en cada caso.

Sotillo *et al.* (2010) hallaron mediante microscopía electrónica de superficie, diferencias en la forma y densidad de las espinas de adultos de *E. caproni* recuperados de ratones y ratas. Los vermes recolectados de ratones presentaban una menor densidad de espinas tegumentarias en las áreas correspondientes a la ventosa oral y ventral. Sin embargo, la cantidad de espinas presentes en el área de la ventosa oral se incrementó con el tiempo en aquellos adultos procedentes de ratas. A estas diferencias se sumaron que las espinas del tegumento de los adultos recuperados de ratones eran de mayor tamaño y presentaban las puntas romas mientras que en los vermes de ratas infectadas estas no se encontraban recubiertas por tegumento y, además, eran afiladas. Estas diferencias morfológicas junto con el incremento en expresión de actina detectada en los adultos de ratas, invitan a pensar que el hábitat encontrado en el intestino delgado de los hospedadores de baja compatibilidad es responsable del incremento de la tasa de recambio de las espinas tegumentarias, promovido por la incapacidad de los vermes de permanecer fijados en el intestino de estos hospedadores.

Por último, varios estudios han puesto de manifiesto que la tasa de liberación de huevos por adultos de *E. caproni* también se encuentra influenciada por la especie hospedadora a la que parasitan, viéndose incrementada, generalmente, en hospedadores de alta compatibilidad. Estudios previos han mostrado que el número de huevos liberados por los adultos de *E. caproni* era significativamente superior en hámsteres que en jerbos (Mahler *et al.*, 1995). Toledo *et al.* (2004a) establecieron un estudio comparativo de la dinámica de liberación de huevos de *E. caproni* en ratas y hámster infectados de manera experimental y observaron que, el recuento de huevos en heces de hámsters era significativamente mayor que en ratas a pesar de que la cinética de liberación de huevos era semejante en ambos hospedadores. Más recientemente, Muñoz-Antoli

et al. (2013) realizaron estudios acerca de la influencia de la especie hospedadora sobre la viabilidad de los huevos medidos en base a la tasa de eclosión de los huevos y capacidad infectiva de los miracidios liberados, observando que los huevos de *E. caproni* recuperados de ratones y hámsteres presentaban una mayor viabilidad que aquellos obtenidos de parásitos adultos de ratas infectadas. No obstante, la infectividad de los miracidios no presentó ninguna variación por la variable hospedador.

1.1.3.3. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES

Los echinostomátidos, además de resultar una herramienta de gran utilidad para el establecimiento de modelos experimentales empleados para el estudio de las relaciones parásito-hospedador, son responsables del desarrollo de patologías en el hospedador definitivo, al igual que otros muchos helmintos intestinales. Dentro de las infecciones parasitarias causadas por helmintos intestinales, las trematodiasis se encuentran entre las infecciones más comunes presentes tanto en humanos como animales y son responsables de producir elevadas tasas de morbilidad principalmente entre la población infantil. Asimismo, muchas de las enfermedades producidas por trematodos intestinales se encuadran dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos y son las enfermedades tropicales más olvidadas (Chai, 2009; Fürst *et al.*, 2012; Toledo *et al.*, 2012).

Los daños generados en el hospedador definitivo por las infecciones causadas por echinostomátidos son muy diversas y complejas y dependen de una gran diversidad de factores tales como especie de echinostoma y compatibilidad con el hospedador definitivo al que parasita. Asimismo, la respuesta patológica y la clínica presenta numerosas variaciones en relación con la intensidad de la infección siendo ésta, dependiente de la carga parasitaria. Entre las manifestaciones clínicas

más comunes dadas en infecciones graves se encuentran debilidad, diarrea, pérdida de peso y retraso en el crecimiento (Huffman & Fried, 1990; Toledo *et al.*, 2006b; Toledo, 2009b). Cabe mencionar, que los conocimientos sobre la patología generada por las infecciones con echinostomátidos como agente causal, han sido principalmente desarrollados a partir de estudios experimentales realizados con distintas especies hospedadoras.

Estudios previos, han demostrado que las infecciones causadas por *E. caproni* en hospedadores de alta compatibilidad tales como hámsters y ratones, presentan un carácter crónico persistiendo incluso más de 25 semanas (Odaibo *et al.*, 1988, 1989; Christensen *et al.*, 1990). Las alteraciones histopatológicas generadas en estas infecciones se producen principalmente en el área de la mucosa intestinal en la que se encuentran anclados los vermes adultos. Es por esto que, los ratones sometidos a una infección experimental con *E. caproni*, presentan una marcada inflamación en las regiones del intestino en las que se localizan la mayoría de adultos (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007). Asimismo, en estas zonas se genera una atrofia de las vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas (Bindseil & Christensen, 1984; Weinstein & Fried, 1991; Fujino & Fried, 1993). En cambio, en hospedadores de baja compatibilidad en los que la infección presenta un desarrollo agudo, los adultos de *E. caproni* se eliminan a partir de la 4 semana tras la inducción de la infección experimental y, además, los daños provocados en las vellosidades intestinales se observan cuando comienzan a ser expulsados los parásitos (Toledo *et al.*, 2006a).

De manera general, las infecciones causadas por echinostomátidos producen alteraciones en las células intestinales siendo determinante para la carga parasitaria encontrada en el hospedador definitivo. Las principales alteraciones celulares observadas son: mastocitosis, infiltración eosinofílica, hiperplasia de células mucosecretoras y aumento en el número de neutrófilos hallados en la mucosa intestinal y de células inflamatorias mononucleares en el mesenterio

(Toledo *et al.*, 2006b; Toledo, 2009b). Concretamente, en las infecciones experimentales causadas por *E. caproni* en ratón, se ha observado infiltración de linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas en la lámina propia y submucosa (Weinstein & Fried, 1991; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007), además de un aumento en las fibras de colágeno y fibroblastos en las vellosidades atrofiadas (Bindseil & Christensen, 1984; Fujino & Fried, 1993). En cambio, en ratas solo se observa un incremento en el número de células mucosecretoras y eosinófilos durante el desarrollo de la infección (Toledo *et al.*, 2006a).

Las alteraciones patológicas causadas por las infecciones con echinostomátidos han sido bien estudiadas. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se producen estas alteraciones necesitan de más conocimientos. Los estudios de investigación mencionados en este apartado, apuntan a que las alteraciones generadas en la mucosa intestinal pueden ser causadas por el daño mecánico provocado por los vermes adultos a la hora de alimentarse y la irritación mecánica por su propia presencia, daño de origen químico debido a la liberación de sustancias tóxicas y/o ser producido por la respuesta inmunitaria desarrollada frente al trematodo por la presencia de estímulos antigénicos (Toledo *et al.*, 2006b).

1.2. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES

Actualmente se estima que cerca de 2000 millones de personas están infectadas con alguna especie de helminto intestinal, siendo los niños el colectivo más afectado por estas infecciones (Hotez *et al.*, 2014; Weatherhead & Hotez, 2015; Weatherhead *et al.*, 2017). Esta situación supone un gran impacto en salud pública, pero, además, las helmintiasis intestinales tienen una gran repercusión en sanidad veterinaria, generando grandes pérdidas de productividad, a lo que habría

que sumar los costes de los tratamientos farmacológicos (Roeber *et al.*, 2013). A día de hoy, las estrategias de control de estas parasitosis están exclusivamente basadas en el tratamiento con antihelmíntico. Sin embargo, estas estrategias no están resultando efectivas por diferentes razones: (i) en los últimos años están apareciendo resistencia frente a algunos de estos fármacos; (ii) las helmintiasis intestinales no suelen generar inmunidad frente a nuevas reinfecciones; y (iii) las condiciones higiénico-sanitarias en las áreas endémicas de estas enfermedades favorecen las continuas reinfecciones.

Todos estos hechos, ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar vacunas o estrategias inmunoproliféricas para el control de las helmintiasis intestinales. A pesar de los numerosos esfuerzos realizados, en la actualidad no existen vacunas efectivas frente a estas enfermedades. Las razones que justifican este hecho son muchas, si bien en diferentes foros se viene defendiendo la necesidad de un mayor conocimiento de la respuesta inmunitaria que promueven estos parásitos y de los procesos inmunoprotectores frente a ellos (Hewitson & Maizels, 2014). En este contexto, el empleo de modelos experimentales se está revelando como una herramienta de gran utilidad (Vercruysse *et al.*, 2004; Toledo & Fried, 2005; Harris, 2011; Cortés *et al.*, 2017a).

La protección frente a las infecciones por helmintos intestinales parece asociarse con el desarrollo de respuestas Th2 caracterizadas por la producción de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9 o IL-13. La unión de la IL-4 o IL-13 a la cadena alfa del receptor de IL-4 (IL-4R α) expresado en la superficie de diferentes células inmunes y no inmunes, activa una serie de mecanismos que conducen a la expulsión de estos parásitos (Grencis, 2015). A pesar de que los mecanismos efectores activados por la respuesta Th2 son bien conocidos, queda mucho por investigar acerca de los mecanismos inmunitarios activados en infecciones crónicas por helmintos intestinales. Estos parásitos, presentan una gran capacidad para modular la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador que, junto con su

potencialidad para activar respuestas T reguladoras (Tregs) y la consiguiente limitación de la respuesta Th2 podría ser uno de los principales mecanismos responsables de las infecciones crónicas (McSorley & Maizels, 2012). Asimismo, la cronicidad de estas infecciones también podría venir marcada por el desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo Th1 tras la infección por un helminto (Klementowicz *et al.*, 2012).

En este apartado se va a analizar los mecanismos por los cuales las respuestas protectoras (Th2) y no protectoras (Th1) regulan la respuesta inmunitaria frente a los helmintos intestinales. A pesar de que este planteamiento puede suponer una simplificación de la realidad, resulta de gran ayuda para comprender los procesos que determinan la susceptibilidad o la resistencia frente a las infecciones por helmintos intestinales.

1.2.1. RESPUESTA TH2 EN HELMINTIASIS INTESTINALES

A pesar de que existen numerosos estudios acerca del papel de las respuestas Th2 frente a las infecciones causadas por helmintos intestinales y su actividad es bien conocida (Grencis, 2015), los procesos inmunorreguladores responsables del desarrollo de este tipo de respuesta no se conocen en gran profundidad. Tras el establecimiento de los helmintos en el intestino, los productos derivados de los mismos sensibilizan y activan diferentes tipos celulares, tales como las células dendríticas (CDs), basófilos o células linfoides innatas (ILCs), así como a las propias células del epitelio intestinal impulsando de este modo, la respuesta Th2 que da lugar al desarrollo de toda una serie de mecanismos efectores que protegen frente a los helmintos intestinales (Cortés *et al.*, 2017a).

1.2.1.1. VISIÓN GENERAL DE LA RESPUESTA TH2 EN HELMINTIASIS INTESTINALES

La mayoría de los modelos experimentales establecidos con helmintos intestinales, muestran que las infecciones causadas por helmintos promueven el desarrollo de respuestas protectoras de tipo Th2, caracterizadas por la producción de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Patel *et al.*, 2009; Allen & Maizels, 2011; Filbey *et al.*, 2014). La producción de estas citoquinas se genera tras el establecimiento de los parásitos adultos en el intestino, previamente a la inducción de respuestas específicas frente al parásito. Es por ello que, aunque la eliminación de la infección necesita de respuestas adaptativas específicas, el desarrollo temprano de respuestas polarizadas es esencial para limitar la infección en su fase inicial. En la **Figura 1.2.** se muestra un esquema que representa a grandes rasgos, cómo se generan y activan las respuestas Th2 en infecciones por helmintiasis intestinales.

Tras el establecimiento de los helmintos intestinales, las células del epitelio intestinal (IECs) liberan citoquinas de tipo alarminas como la IL-25, IL-33 o TSLP, que activan diferentes células del sistema inmunitario promoviendo de este modo, la iniciación de una respuesta de tipo Th2.

El aumento de la producción de estas alarminas en respuesta a la infección, promueven la activación de ILCs del grupo 2 (ILC2s) las cuales son responsables de producir una gran cantidad de IL-13 que, a su vez activa a las CDs en la lámina propia, favoreciendo su migración a los nódulos linfáticos mesentéricos (MLNs) para polarizar a las células T CD4+ a Th2. La activación Th2 mediada por CDs ocurre en MLNs y depende de diversos factores como la afinidad entre las

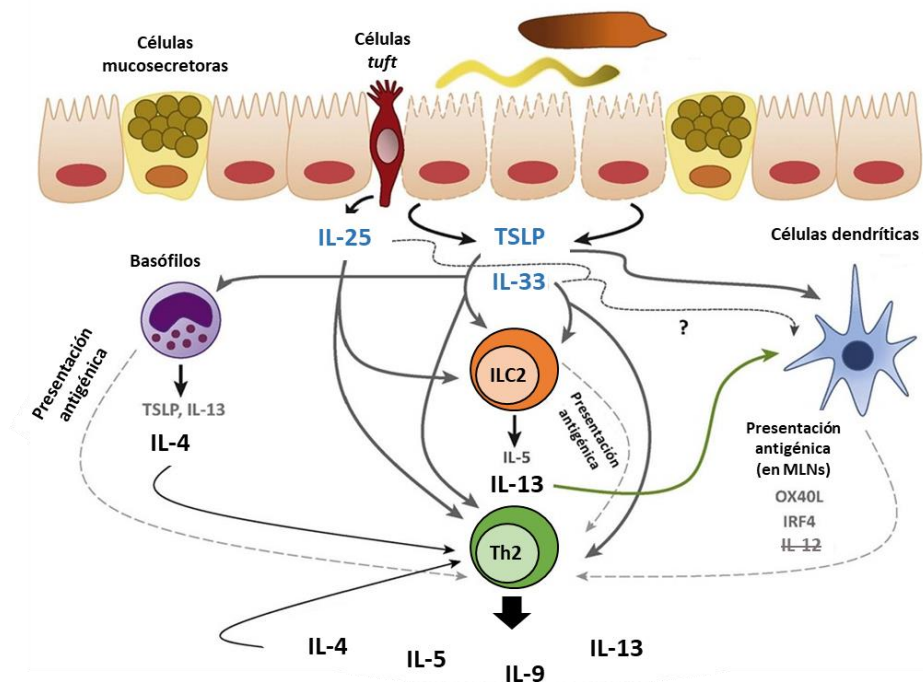


Figura 1.2.- Visión general del proceso de polarización a Th2 de la respuesta inmunitaria en helmintiasis intestinal, incluyendo la actividad de las células de carácter innato (flechas negras), de las citoquinas de tipo 2, de las alarminas (flechas grises oscuras, verde y negras discontinuas), de las células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2s), basófilos y células dendríticas (flechas grises discontinuas). IL: interleuquina; TSLP: linfopoyetina de estroma tímico; MLN: nódulo linfático mesentérico. (Figura modificada de Cortés *et al.* (2017a)).

moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el receptor de las células T, la inhibición de la producción de IL-12 mediada por el factor regulador de interferón (IRF)4 o la expresión del ligando OX40L. Las ILC2 y los basófilos pueden participar en la presentación antigénica a células T CD4, permitiendo la polarización a Th2. En este proceso, también puede participar la IL-4 producida por los basófilos. A su vez, las células que se polarizan a Th2 producen citoquinas de tipo 2 generando de este modo, una retroalimentación positiva del proceso (Cortés *et al.*, 2017a).

Las citoquinas de tipo 2 de origen innato, activan diferentes mecanismos efectores en el intestino que pueden eliminar a los helmintos. La IL-13 liberada por las ILC2s y, probablemente, por los linfocitos Th2, induce la expansión de las células *tuft* incrementando la producción de IL-25 y amplificando la respuesta Th2. Asimismo, la IL-13 también favorece la renovación del epitelio intestinal facilitando la eliminación de los parásitos anclados al intestino. Además, la hiperplasia de las células mucosecretoras y la producción de mucus por las mismas, junto con la producción de moléculas como RELM- β y el incremento de la contractibilidad muscular promovidos por la IL-4 e IL-13 favorecen la expulsión de estos parásitos. Por otro lado, los mastocitos, los macrófagos activados por la vía alternativa y los eosinófilos pueden favorecer este proceso (Cortés *et al.*, 2017a) (**Figura 1.3.**). Aunque algunos de los mecanismos efectores activados por las respuestas Th2 tempranas pueden resultar redundantes a los desarrollados por la inmunidad específica, para que se genere una respuesta inmunitaria efectiva frente a helmintos se necesita la activación de la inmunidad adaptativa dirigida por las células T específicas (Phythian-Adams *et al.*, 2010). Por ello, la inmunidad frente a helmintos intestinales se debe comprender como la puesta en marcha y coordinación de los mecanismos efectores activados tanto por la inmunidad innata como por la adquirida (Allen & Maizels, 2011).

Los basófilos, ILC2s y las IECs tienen un papel fundamental en la respuesta de resistencia frente a los helmintos, puesto que inician la producción de citoquinas de tipo 2, responsables de poner en marcha las respuestas Th2. Asimismo, las CDs también parecen contribuir al desarrollo de estas respuestas, si bien los mecanismos no son bien conocidos. En este sentido, la inhibición de la producción de IL-12 por medio del factor de transcripción IRF4 podría resultar fundamental (Hammad & Lambrecht, 2015).

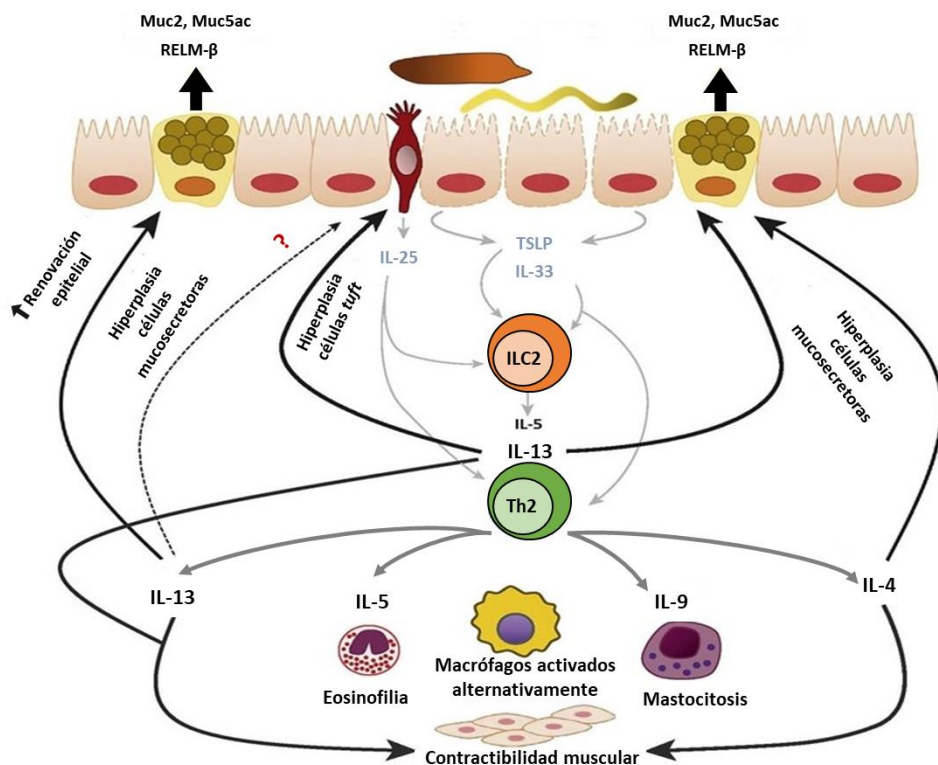


Figura. 1.3.- Visión general de los mecanismos efectores activados por la respuesta inmunitaria Th2 (flechas grises oscuras) en helmintiasis intestinales, incluyendo la actividad de las células de carácter innato (flechas grises claras), de las citoquinas de tipo 2 (flechas negras), de las alarminas y de las células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2s) (flechas grises claras). Muc: mucina; IL: interleuquina; TSLP: linfopoyetina de estroma tímico; RELM-β: *resistin-like β*. (Figura modificada de Cortés *et al.* (2017a).

De cualquier forma, el papel de cada uno de estos tipos celulares en la generación de la respuesta inmunitaria está todavía por determinar. A continuación, se realiza una breve revisión de los datos conocidos y que resultan de interés para entender cómo se generan las respuestas Th2.

1.2.1.2. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES

El epitelio intestinal está formado por una población heterogénea de, al menos, 7 tipos celulares y tiene capacidad de detectar infecciones por helmintos e iniciar respuestas inmunitarias de tipo Th2 (Bulek *et al.*, 2010). Las IECs son importantes en el inicio de estas respuestas por su capacidad para producir citoquinas como la TSLP, IL-33 e IL-25, las cuales son capaces de activar células del sistema inmunitario innato para producir respuestas de tipo Th2 y activar las células responsables de este tipo de respuestas (Hammad & Lambrecht, 2015). La TSLP es producida por las IECs tras producirse un daño como consecuencia de la infección por helmintos y ejerce un papel fundamental en la eliminación de las infecciones causadas por *Trichuris muris* (Zaph *et al.*, 2007). Esta alarmina, presenta la capacidad de modular a las CDs para que direccionen la diferenciación de los linfocitos T CD4+ inmaduros a linfocitos Th2. Además, la activación de las CDs inducidas por TSLP promueve la liberación de quimioquinas que atraen a neutrófilos, eosinófilos y linfocitos Th2 al lugar de la infección (Soumelis *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2005). Estudios previos han demostrado que la expresión reducida de TSLP en ratones modificados genéticamente induce respuestas inflamatorias de tipo Th1/Th17 lo que impide la expulsión del parásito. Sin embargo, la neutralización de la IL-12 o del IFN- γ en los ratones deficientes en TSLP restaura la capacidad de desarrollar una respuesta Th2 y, por tanto, la eliminación del parásito (Zaph *et al.*, 2007; Massacand *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009). Sin embargo, en otros modelos experimentales como *Nippostrongylus brasiliensis* o *Heligmosomoides polygyrus*, ratones deficientes en TSLP presentan la capacidad de generar respuestas Th2 que promueven la expulsión de los parásitos del intestino (Massacand *et al.*, 2009)

Por otro lado, la IL-33 es una citoquina nuclear que pertenece a la familia de la IL-1 y es producida por diversas células como células epiteliales, mastocitos y linfocitos Th2 (Ikeda *et al.*, 2003). Las células necróticas producen IL-33, que

actúa como alarmina, iniciando respuestas Th2. La IL-33 induce la producción de citoquinas de tipo 2 a partir de linfocitos Th2, basófilos, mastocitos, macrófagos e ILC2s favoreciendo la expulsión de los helmintos (Cayrol & Girard, 2009; Yang *et al.*, 2013; Hardman & Ogg, 2016). Asimismo, la administración exógena de IL-33 promueve la activación de los mecanismos efectores mediados por IL-13 tales como hiperplasia de células mucosectoras e incrementos de la expresión de RELM- β , que promueven la expulsión de diversos nematodos intestinales (Humphreys *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2013; Zaiss *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Bouchery *et al.*, 2015). En este sentido, cabe citar como ejemplo que los ratones deficientes en IL-33 son susceptibles a las infecciones primarias y secundarias con *N. brasiliensis* debido a la ausencia de la activación de estos mecanismos mediados por la IL-13 (Hung *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque esta citoquina presenta una gran capacidad para activar respuestas Th2 tempranas, no es fundamental para la expulsión de los parásitos adultos del intestino (Townsend *et al.*, 2000; Humphreys & Grecnis, 2009; Scalfone *et al.*, 2013).

El papel adoptado por la IL-33 en las infecciones por helmintos intestinales todavía no se conoce con detalle. Se ha observado que el receptor de IL-33 se encuentra altamente expresado en células Th2 y en ILC2 (Molofsky *et al.*, 2015). Este receptor está formado por un complejo compuesto por la subunidad ST2 y la cadena de señalización compartida IL-1RAcP y en infecciones causadas por *Trichinella spiralis*, se ha podido observar que la respuesta es dependiente de ST2, puesto que los ratones deficientes de esta subunidad no son capaces de eliminar al parásito y la administración exógena de IL-33 no mejora esta situación (Scalfone *et al.*, 2013; Grecnis *et al.*, 2014). El hecho de que, tras la infección, predomine la distribución nuclear de la IL-33 debido a la respuesta innata hace pensar en la existencia de rutas canónicas de señalización asociadas al receptor de membrana de la IL-33 (Grecnis, 2015). Los estudios realizados con *E. caproni* muestran un incremento en los niveles de IL-33 intestinal en un contexto de inflamación mediada por Th1 y establecimiento crónico del parásito (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a)

apuntando a que la regulación positiva de esta citoquina no es suficiente para impulsar el desarrollo de respuestas Th2 en este modelo experimental.

La IL-25, también conocida como IL-17E, es una citoquina fundamental en la inducción de respuestas de tipo Th2 a través de la activación de ILC2s (Moro *et al.*, 2010; Neill *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010; Saenz *et al.*, 2010). Recientemente, se ha podido demostrar que esta citoquina es producida por las células *tuft*, en penacho o caveoladas en respuesta a infecciones por helmintos (Mearns *et al.*, 2014; Gerbe & Jay, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). Esta alarmina promueve la producción de IL-4, IL-5 y IL-13 en ratón (Fort *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Asimismo, los ratones deficientes en IL-25 son más susceptibles frente a helmintos como, por ejemplo, *N. brasiliensis*, *H. polygyrus* o *T. muris*, si bien la administración exógena de esta citoquina protege a estos ratones frente a la infección (Fallon *et al.*, 2006; Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Zaiss *et al.*, 2013; Mearns *et al.*, 2014; Hewitson *et al.*, 2015; Pei *et al.*, 2016). Además, los ratones deficientes en IL-25 no producen respuesta de memoria frente a *H. polygyrus*, en cambio, la administración exógena de IL-25 restablece esta respuesta (Pei *et al.*, 2016). Sin embargo, la ausencia de IL-25 en ratones infectados con *N. brasiliensis* no afecta a la generación de respuestas Th2 protectoras (Mearns *et al.*, 2014). Por tanto, la expulsión de los helmintos intestinales mediada por la IL-25 parece ser debida a la activación de mecanismos efectores como la hiperplasia de células mucosecretoras, producción de RELM- β , cambios en la glicosilación del mucus, hipercontractilidad muscular o cambios en la función de las IECs (Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a; Pei *et al.*, 2016).

Tal y como hemos comentado previamente, la IL-25 es producida por las células *tuft* tras una infección por helmintos (Gerbe & Jay, 2016). En presencia de infección, estas células inician una rápida expansión dependiente de la unión de IL-13 a IL-4R α que inicia la vía de señalización que activa STAT6, independientemente de IL-4 (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et*

al., 2016). A pesar de estos, la correlación entre la expansión de las células *tuft* y activación de la respuesta adaptativa todavía no se conoce con detalle. En este sentido, cabe señalar que se ha obtenido datos contradictorios en relación a la hiperplasia de estas células y el desarrollo de respuesta adaptativa en ratones *Rag*^{-/-} infectados con *N. brasiliensis*. A pesar de esto, la expansión de células *tuft* fue superior en ratones infectados frente a lo observado en ratones control (Gerbe *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). Estos hechos sugieren que la hiperplasia de células *tuft* es inducida en la respuesta temprana a la infección mediada por la IL-13 innata pero no se puede descartar que la IL-13 producida por células Th2 pueda estar involucrada (Gerbe *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016; Cortés *et al.*, 2017a).

1.2.1.3. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LOS BASÓFILOS

Las CDs intestinales constituyen una población heterogénea de células que presentan diferentes requerimientos para su desarrollo. La multitud de funciones llevadas a cabo por las mismas y la relación establecida entre ellas no es bien conocida. Este hecho dificulta la interpretación del papel abordado por estas células en el desarrollo de respuestas inmunitarias. De cualquier forma, estudios previos han mostrado que las CDs se encuentran implicadas en diferentes mecanismos de inducción de respuestas Th2 (Hussaarts *et al.*, 2014; Hammad & Lambrecht, 2015). En cuanto al papel de los basófilos, se han identificado como células presentadoras de antígenos (APCs) productoras de citoquinas que favorecen la inmunidad protectora (Voehringer, 2011). Sin embargo y de acuerdo con algunos de los estudios publicados hasta el momento, el papel de estos dos tipos celulares parece ser redundante en la generación de respuestas de tipo Th2.

Estudios previos basados en infecciones por helmintos intestinales tales como *N. brasiliensis* y *H. polygyrus bakeri*, han mostrado que en presencia de estas

infecciones se produce una alteración en las poblaciones de CD4⁺ presentes en la lámina propia y los MLNs y este hecho parece tener relevancia en la diferenciación de las células T CD4⁺ (Balic *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011; León *et al.*, 2012; Connor *et al.*, 2014).

El papel de las CD4⁺ intestinales en la polarización de la respuesta inmunitaria específica depende de la expresión de IRF4 y 8 (Laffont *et al.*, 2017). En la respuesta inmunitaria frente a infecciones causadas por helmintos intestinales, las CD4⁺ dependientes de IRF4 se encuentran implicadas en la diferenciación de los linfocitos a células de tipo Th2. En ratones infectados con *N. brasiliensis*, la depleción de las CD4⁺ disminuye de manera significativa, la producción de citoquinas Th2 en los linfocitos de los MLNs (Gao *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que las CD4⁺ dependientes de IRF8 también están implicadas en la generación de respuestas Th2. Esta población celular se activa vía el factor de transcripción básico de cremallera de leucina 3 similar a ATF (Batf3). En este sentido cabe destacar que en ratones *Batf3*^{-/-}, las respuestas Th2 frente a *H. polygyrus bakeri* están incrementadas y presentan un número elevado de células Th2, células B productoras de IgG1 e incrementos en la producción de IL-13 intestinal, junto con una reducción significativa en la carga parasitaria (Everts *et al.*, 2016). Además, la supresión de la inmunidad Th2 inducidas por las CD4⁺ dependientes de Batf3 ha mostrado ser dependiente de la IL-12 producida por estas mismas células (Everts *et al.*, 2016).

La importancia de las CD4⁺ en la polarización de la respuesta inmunitaria, se ha puesto de manifiesto con el modelo experimental *T. muris*-ratón. En este caso, se ha observado el desarrollo de resistencia frente a infecciones crónicas por *T. muris*, asociadas a una respuesta Th2 inducida por las CD4⁺ incapacitadas de producir el factor transformador de crecimiento (TGF)- β (Worthington *et al.*, 2013). Por otro lado, la depleción del factor regulador de CD4⁺ SHIP-1 dio como consecuencia una sobreproducción de IL-12p40 por estas células junto con el

desarrollo de una respuesta Th1 asociada a infecciones crónicas. Sin embargo, el bloqueo de la IL-12p40 restauró el desarrollo de la respuesta inmunitaria Th2 y con ello, la resistencia frente a la infección por *T. muris* (Gold *et al.*, 2016). A pesar de todos estos hechos, algunos estudios sugieren que la actividad de las CDs, por sí sola, no es suficiente para la generación de respuestas Th2 protectoras y se requiere de la acción adicional de otras células del sistema inmunitario para el desarrollo de las mismas. En este sentido, Bowcutt *et al.*, (2014) pusieron de manifiesto que la resistencia frente a la infección por *T. muris* requiere de la producción de quimioquinas por parte de las IECs del colon para asegurar la migración de las CDs hacia la zona de infección. Sin embargo, la pérdida de la integrina CD103, necesaria para la migración de las CDs no impidió el desarrollo de respuestas Th2 ni resistencia frente al helminto (Coombes *et al.*, 2007; Mullaly *et al.*, 2011).

Asimismo, no se puede descartar la participación de otras APCs en la diferenciación de las células CD4+ a células de tipo Th2. Los ratones que expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII) exclusivamente en CDs no son capaces de desarrollar respuestas Th2 y son susceptibles a la infección por *T. muris*. En este caso, tras la infección, los basófilos expresan IL-4 y MHCII y dirigen la diferenciación a Th2, en un proceso que parece mediado por TSLP. De cualquier forma, el bloqueo de IFN- γ restaura la respuesta Th2 sugiriendo que los basófilos no son fundamentales en ausencia de factores activadores de células Th1 (Perrigou *et al.*, 2009).

En infecciones primarias por *N. brasiliensis* y *H. polygyrus bakeri*, los basófilos no parecen jugar un papel central en el control de la respuesta inmunitaria desarrollada frente a las mismas. En estas infecciones, los basófilos se reclutan en los MLNs por la acción de la IL-3 si bien, en ausencia de esta citoquina o de basófilos, no se observa una alteración en el desarrollo de la respuesta Th2, ni en la eosinofilia y producción de anticuerpos (Kim *et al.*, 2010; Ohnmacht *et al.*, 2010; Herbst *et al.*, 2012). Sin embargo, el papel de los basófilos parece cobrar más

relevancia en infecciones secundarias mediante la liberación de IgE y productos tóxicos frente a los parásitos (Ohnmacht *et al.*, 2010; Herbst *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2014).

Todos estos hechos sugieren que, tanto la TSLP como la IL-3 son fundamentales en la activación de basófilos y la polarización a Th2, siendo claves para la generación de resistencia frente a algunos helmintos intestinales (Zaph *et al.*, 2007; Massacand *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009; Cortés *et al.*, 2017a). Sin embargo, el papel de las CDs, no parece ser fundamental, aunque su actuación favorece el mantenimiento de la respuesta Th2 frente a estas infecciones (Kim *et al.*, 2010; Siracusa *et al.*, 2011; Giacomini *et al.*, 2012).

1.2.1.4. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS LINFOIDES INNATAS GRUPO 2

Numerosos estudios realizados recientemente han puesto de manifiesto que las células linfoides innatas grupo 2 (ILC2s) pueden ejercer un papel clave en la activación de respuestas protectoras frente a los helmintos intestinales. Las ILCs son un grupo heterogéneo de células linfoides diferentes a los linfocitos T y B ya que carecen de receptores específicos para antígenos (**Figura 1.1.**). Cuando estas células son estimuladas por alarminas como IL-33 o IL-25, liberan grandes cantidades de IL-5 e IL-13 (Saenz *et al.*, 2013; Artis & Spits, 2015). Asimismo, la vía de activación y expansión de estas células se mantiene a través de un ciclo de retroalimentación positiva en el que participan otras células (Hepworth *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013; Mirchandani *et al.*, 2014; Oliphant *et al.*, 2014). Además, se ha observado que otros tipos celulares como los progenitores multipotentes de tipo 2 (MPP^{Type2}), promueven la producción de citoquinas de tipo 2. Sin embargo, estas células sólo son estimuladas por la IL-25, ya que no presentan receptores para IL-33 (Saenz *et al.*, 2013).

En infecciones producidas por *N. brasiliensis* (Kang *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Oliphant *et al.*, 2014), *H. polygyrus bakeri* (Filbey *et al.*, 2014), *T. muris* (Grencis *et al.*, 2014; von Moltke *et al.*, 2016) y *T. spiralis* (von Moltke *et al.*, 2016) en ratón se ha observado una expansión de las ILC2s y MPP^{Type2} tanto en tejidos linfoides como en el intestino. La expansión de estas células generó un aumento en los niveles de IL-13 en el intestino lo cual resultó ser suficiente para la expulsión de *N. brasiliensis* del intestino sin la actuación de las células T CD4+ y la eliminación de las ILC2s intestinales conduce a la inhibición de las respuestas Th2 (Moro *et al.*, 2010; Neill *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010; Oliphant *et al.*, 2014). La expresión de MHCII en ILC2s parece ser clave en la interacción con las células Th2 así como, en la activación y expansión de ambos tipos celulares (Oliphant *et al.*, 2014). En este sentido, Oeser *et al.*, (2015) observaron que los ratones deficientes en IL-4 e IL-13 no presentaban la capacidad de expulsar los vermes adultos de *N. brasiliensis*, si bien los ratones carentes en células T específicas productoras de IL-4 e IL-13 sí podían eliminar al parásito. Teniendo en cuenta que las CD⁺ no producen IL-4 y que otras posibles fuentes de esta citoquina, como los basófilos, no intervienen en la expulsión de *N. brasiliensis*, la cuestión que surge es si el desarrollo de respuestas Th2 es fundamental para la eliminación de los parásitos o, por el contrario, estos pueden ser expulsados simplemente por la actividad mediada por la IL-13 de origen innato. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que la administración de IL-25 o IL-33 genera resistencia frente a helmintos, de manera independiente a la actividad de las células T o B. Por otro lado, se ha observado que la ausencia de IL-13 derivada de ILC2s en ratones deficientes en IL-33 inhibe los mecanismos efectores responsables de la expulsión de *N. brasiliensis* (Fallon *et al.*, 2006; Humphreys *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2013).

En el caso de las infecciones por *H. polygyrus bakeri*, se ha observado una mayor expansión de ILC2s en MLNs de aquellos ratones que fueron resistentes a la infección frente a la observada en los que fueron susceptibles a la misma (Filbey *et al.*, 2014). Asimismo, la presencia de infección, induce la hiperplasia de ILC2s tanto

en el bazo de ratones susceptibles como en el de ratones deficientes en IL-25 y esta hiperplasia se ve incrementada en ausencia de IL-1 β (Zaiss *et al.*, 2013). La expansión de ILC2s se pudo relacionar con un incremento significativo de las citoquinas IL-13 e IL-5 y, por consiguiente, de los mecanismos efectores mediados por las respuestas Th2 tales como hiperplasia de células mucoscretoras y eosinofilia. Sin embargo, el incremento en el número de ILC2s activadas en infección, no es suficiente, por sí mismo, para eliminar al parásito (Zaiss *et al.*, 2013). En infecciones por *T. muris*, también se genera una hiperplasia de ILC2s, en cambio, la resistencia frente a la infección está mediada por la IL-13 producida por las células Th2 (Molofsky *et al.*, 2015). Asimismo, la expulsión de los adultos de *T. muris* inducida por IL-25 parece ser dependiente de células T, ya que la administración exógena de esta citoquina en ratones inmunodeprimidos no indujo protección (Owyang *et al.*, 2006). Sin embargo, el tratamiento de ratones deficientes en IL-25 con ILC2s productoras de IL-25 generó protección en estos ratones gracias a la liberación de citoquinas Th2 (Saenz *et al.*, 2010).

1.2.1.5. EL PAPEL DE OTRAS CÉLULAS INMUNITARIAS

Las respuestas protectoras de tipo 2 frente a infecciones por helmintos intestinales pueden estar mediadas por otras poblaciones celulares además de las descritas previamente. Por ejemplo, los eosinófilos presentan la capacidad de modular la actividad de las CD4 responsables de dirigir y activar las respuestas Th2 mediante la desgranulación y liberación de toxinas como la peroxidasa (Chu *et al.*, 2014). Asimismo, los mastocitos pueden favorecer la polarización a Th2 en las etapas tempranas de la infección. En infecciones producidas por *H. polygyrus bakeri* y *T. muris* en ratón se ha visto que la ausencia de mastocitos disminuye la liberación de citoquinas Th2 y, con ello, la diferenciación a células Th2, viéndose reducida de manera significativa la resistencia frente a estos parásitos (Tsai *et al.*, 2011; Hepworth *et al.*, 2012). Este hecho parece encontrarse relacionado con la

producción limitada de citoquinas por parte de IECs y reducción de la hiperplasia de ILC2s en estos ratones carentes de mastocitos (Hepworth *et al.*, 2012).

Un hecho peculiar es que la inmunidad protectora frente a *H. polygyrus bakeri* está relacionada con bajos niveles de células Treg Foxp3⁺ (Smith *et al.*, 2016). Sin embargo, esta situación no se da en otras parasitosis. Por ejemplo, la infección con *T. muris* induce una respuesta Th1/Th2 y se han observado incrementos en las poblaciones de células Treg Foxp3⁺ en algunos casos (Chu *et al.*, 2014). Sin embargo, la depleción de las células Treg Foxp3⁺ no favoreció la expulsión de los adultos, sugiriendo que otras células inmunitarias se encuentran involucradas en el desarrollo de infecciones crónicas (Sawant *et al.*, 2014).

Por otro lado, los macrófagos también podrían presentar un papel relevante en la generación de respuestas de tipo 2 frente a infecciones por helmintos intestinales, si bien su función podría ser diferente de acuerdo con la especie de helminto de la que se trate. La resistencia frente a estos parásitos se asocia normalmente a la activación de los macrófagos por la vía alternativa la cual favorece el desarrollo de respuestas Th2 vía IL-4R α . Los macrófagos activados alternativamente pueden actuar tanto como mecanismos reguladores de la respuesta, como efectores y participar en la reparación de tejidos (Grencis *et al.*, 2014; Grecnis, 2015).

1.2.1.6. MECANISMOS EFECTORES MEDIADOS POR LA RESPUESTA TH2

Como hemos descrito previamente, numerosas células y moléculas intervienen en la diferenciación, activación y regulación de las respuestas Th2 mediadoras de la resistencia frente a infecciones por helmintos intestinales. En cambio, estas células de tipo 2 no presentan la capacidad de actuar de manera directa

sobre estos parásitos por lo que intervienen mediante la regulación de diversos mecanismos efectores (Maizels *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos efectores implicados en la expulsión de los helmintos intestinales se encuentran los denominados efectos incapacitantes que son aquellos que alteran el crecimiento y motilidad de los vermes. Estos efectos se encuentran mediados por anticuerpos o por moléculas procedentes de la respuesta innata de tipo defensas como la molécula RELM- β .

La molécula RELM- β es activada por la inmunidad de tipo Th2 y es producida y secretada por las células mucosectoras del intestino, las cuales son estimuladas por la presencia de niveles elevados de IL-4 e IL-13 en el medio interno. Los mecanismos de acción de esta molécula han sido poco estudiados en helmintiasis intestinales, aunque es bien sabido que presenta capacidad de unión al aparato quimiosensorial de los parásitos adultos y alterar los procesos de quimiotaxis de los mismos (Artis *et al.*, 2004). Estas alteraciones pueden causar dificultades en la nutrición de los helmintos que establecen su nicho en el lumen intestinal como es el caso de *N. brasiliensis* o *H. polygyrus* (Herbert *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha observado que en los helmintos intestinales que se desarrollan embebidos de manera parcial o completa en el epitelio intestinal de los hospedadores definitivos tales como, *T. spiralis* y *T. muris*, la liberación de RELM- β al lumen intestinal, no parece jugar un papel clave en la protección frente a la infección (Nair *et al.*, 2008; Herbert *et al.*, 2009).

En cuanto a los anticuerpos, son moléculas que pueden unirse a antígenos solubles como los ESPs, y a estructuras específicas de los parásitos adultos, pudiendo afectar tanto al crecimiento como a la migración de los vermes dentro del hospedador o incluso, impedir la actividad quimiosensorial de los mismos (Inaba *et al.*, 2003; McCoy *et al.*, 2008). En el caso de las infecciones producidas por echinostomátidos, la función ejercida por los anticuerpos en la limitación de infecciones primarias no ha mostrado ser relevante (Toledo, 2009b). Asimismo, las

respuestas de anticuerpos más intensas se han observado en infecciones que han tenido una larga duración. Esto puede invitar a pensar que las respuestas de anticuerpos circulantes se generan colateralmente a la presencia de la infección intestinal (Toledo *et al.*, 2006b; Toledo, 2009b). Por tanto, los anticuerpos locales producidos a consecuencia de la infección, son más relevantes a la hora de promover protección al hospedador puesto que pueden actuar directamente sobre el parásito (Agger *et al.*, 1993; Sotillo *et al.*, 2007). En cambio, estudios previos dirigidos por Andresen *et al.* (1989) mostraron que los anticuerpos procedentes de ratones infectados con *E. caproni*, presentaban la capacidad de unirse a la superficie de los parásitos, pero estos anticuerpos eran rápidamente eliminados debido a la renovación continuada de los antígenos de superficie pudiendo constituir este hecho, una estrategia por parte del parásito para evadir la respuesta mediada por anticuerpos (Andresen *et al.*, 1989; Simonsen *et al.*, 1990; Maizels *et al.*, 1993). Este hecho puede contribuir a la explicación, en grandes rasgos, del papel tan limitado ocupado por los anticuerpos en la generación de resistencia frente a helmintos intestinales (Agger *et al.*, 1993; Sotillo *et al.*, 2007)

Como se ha citado previamente, en infecciones por helmintos intestinales, ciertos granulocitos como basófilos, eosinófilos y mastocitos, participan en la generación de una respuesta protectora mediante la activación y regulación de la producción de citoquinas Th2. Además, estas células, pueden ejercer funciones efectoras sobre estos parásitos de manera directa, mediante el desarrollo de mecanismos de toxicidad celular activados por anticuerpos o por la modificación de la fisiología intestinal generando en última instancia, una respuesta capaz de eliminar la infección causada por estos helmintos intestinales (Cadman & Lawrence, 2010; Makepeace *et al.*, 2012).

Los mecanismos efectores que median la resistencia en infecciones causadas por helmintos intestinales son dependientes, en gran parte, de la actividad desarrollada por las citoquinas IL-4 e IL-13 (Finkelman *et al.*, 2004). Estas

citoquinas generan señales a través de su unión a receptores de membrana heterodiméricos los cuales, se caracterizan por tener en común la subunidad IL-4R α . La IL-4 tiene afinidad por los denominados receptores de tipo I formados por las subunidades IL-4R α y la cadena γ común (γc). Asimismo, los receptores tipo II son afines tanto a IL-4 como IL-13 y están constituidos por los complejos IL-4R α e IL-13R $\alpha 1$. Tras la unión de estas citoquinas a sus receptores, se accionan unas vías de señalización que promueven la activación del factor transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) 6 impulsando, finalmente, el desarrollo de los mecanismos efectores propios de las respuestas Th2. Por tanto, la señalización desencadenada por la unión de IL-4 e IL-13 a sus respectivos receptores es esencial para el establecimiento de las respuestas de resistencia Th2 (Urban *et al.*, 2000). Cuando el STAT6 se encuentra fosforilado, se transporta al núcleo para regular la expresión génica de diferentes células tales como los linfocitos T y macrófagos. En los linfocitos T estas señales inducen la expresión de genes involucrados en la activación de los procesos de diferenciación de estas células hacia un fenotipo Th2 y en macrófagos favorecen su activación por la vía alternativa (Walford & Doherty, 2013). Otros estudios han concluido que la producción de IL-13 e IL-4 resulta fundamental para la activación de los mecanismos de resistencia frente a helmintos intestinales y, además, demuestran que existe una correlación positiva entre la expresión de estas citoquinas y la capacidad de expulsión de los parásitos del intestino (Khan *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2007; Hasnain *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013).

Por otro lado, las células mucosecretoras que forman parte del epitelio intestinal, son glándulas especializadas en la producción y secreción de mucinas. Estas mucinas son proteínas que se liberan a la luz intestinal en respuesta a estímulos como puede ser el establecimiento de parásitos en el intestino (Specian & Oliver, 1991; McGuckin *et al.*, 2011). Tanto la hiperplasia de las células mucosecretoras como la secreción de moco por las mismas son mecanismos claves para la generación de protección en el hospedador definitivo frente a helmintiasis.

Experimentos realizados por (Ishikawa *et al.*, 1997) mostraron que la transferencia de linfocitos Th2 sensibilizados se encontraban implicados de manera directa en la diferenciación de las células madre intestinales en células mucosectoras y que tras la infección con *T. spiralis* se genera un incremento cuantitativo en estas células. Por otro lado, estudios realizados con ratones infectados con *S. mansoni* mostraron hiperplasia de células mucosectoras en ausencia de niveles elevados de IL-4 e IL-13, invitando a pensar en la existencia de vías alternativas implicadas en la hiperplasia de estas células (Marillier *et al.*, 2008).

Asimismo, las modificaciones producidas en la contractilidad intestinal por la presencia de los parásitos en el intestino presentan un papel clave en la eliminación de ciertos helmintos intestinales (Khan & Collins, 2004). Estas alteraciones en la musculatura lisa del intestino se encuentran asociadas al desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo 2 en presencia de infecciones por helmintos. Las células que componen el músculo liso del intestino expresan la subunidad IL-4R α de los receptores heterodiméricos de IL-4 e IL-13. Por tanto, el incremento de la contractilidad de las fibras intestinales en ciertas helmintiasis intestinales viene dado por las señales mediadas por la IL-4 e IL-13 mediante su unión a IL-4R α y concomitantemente, la activación de STAT6. De este modo, la musculatura lisa del intestino puede favorecer la expulsión de los helmintos intestinales a través de señales apropiadas dadas por los linfocitos que promueven la modificación de su fisiología contribuyendo así, a la defensa del hospedador (Akiho *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Finkelman *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios más recientes han manifestado que la interacción entre la respuesta desarrollada frente a la infección, las modificaciones dadas en la contractilidad del músculo liso intestinal y la expulsión de los helmintos presentes en el intestino es más compleja de lo establecido hasta el momento y que otras citoquinas, como la IL-25 (Zhao *et al.*, 2010), o los macrófagos activados por la vía alternativa (Zhao *et al.*, 2008) podrían estar implicados en la regulación de estos mecanismos.

1.2.2. RESPUESTA TH1 EN HELMINTIASIS INTESTINALES

La mayoría de infecciones por helmintos intestinales se encuentran asociadas al desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo Th2 (Gabrie *et al.*, 2016). En cambio, en aquellos hospedadores en los que se produce un establecimiento crónico de la infección, ésta se relaciona con mecanismos parásito-dependientes tales como, hiperplasia de células Treg o el desarrollo de respuestas Th1 asociadas a niveles elevados de IFN- γ (**Figura 1.4.**). Estudios previos realizados con el modelo experimental *T. muris*-ratón asociado a cronicidad, han mostrado que el desarrollo de infecciones crónicas con este nematodo, se caracteriza por generar importantes respuestas inflamatorias asociadas a la producción de citoquinas propias de respuestas de tipo 1 como la IL-12 o IFN- γ (Klementowicz *et al.*, 2012).

La citoquina IL-12, juega un papel fundamental en la polarización de la respuesta Th1. Tras la presentación antigénica llevada a cabo por las CDs en los MLNs o por las CDs migratorias CD103⁺ dependientes de Baft-3, se generan niveles elevados de IL-12 que promueven la diferenciación de las células T CD4⁺ a Th1. Al mismo tiempo, estas células producen citoquinas que limitan la diferenciación a células Th2, facilitando el establecimiento crónico de los helmintos intestinales y la patología inflamatoria asociada. En este contexto, se ha observado que la citoquina más relevante es el IFN- γ aunque, en algunos modelos, la IL-18 y la IL-27 también juegan un papel primordial (**Figura 1.4.**) (Cortés *et al.*, 2017a).

En infecciones causadas por *T. spiralis* se ha demostrado que la IL-12 participa en la inhibición de las respuestas Th2 facilitando de este modo, la supervivencia del parásito. Asimismo, se ha observado que la IL-18 actúa también como regulador negativo de las respuestas Th2 en infecciones por helmintos, incluso en un medio carente de niveles elevados de IFN- γ (Helmby & Grecis, 2003). En cambio, en

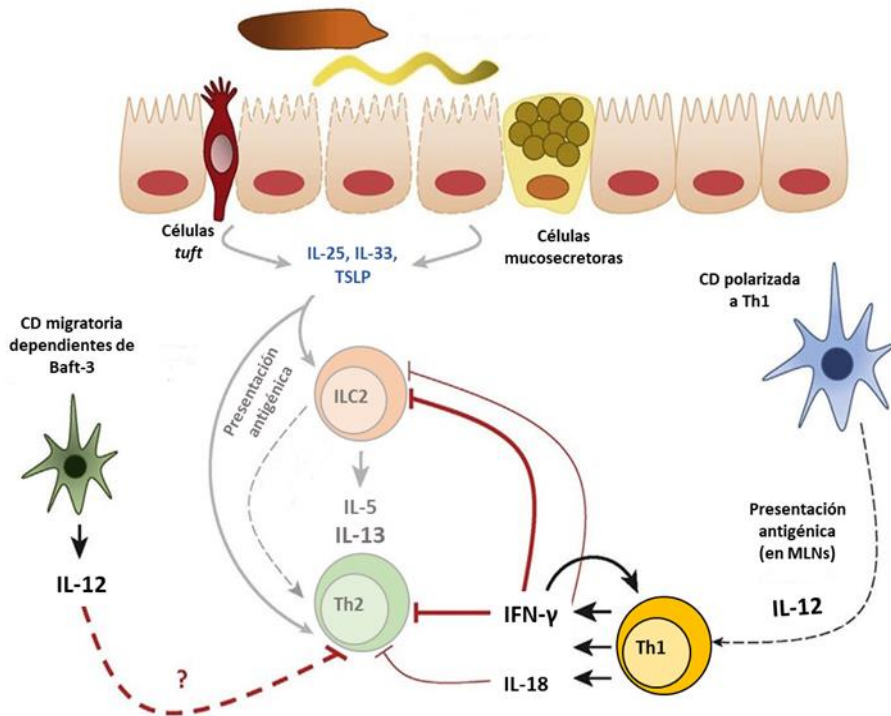


Figura 1.4.- Visión general del proceso de polarización a Th1 de la respuesta inmunitaria en helmintiasis intestinales, incluyendo la actividad de las células de carácter innato (flechas grises), de las citoquinas de tipo 1 (guiones rojos), de las alarminas (flechas grises discontinuas), de las células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2s) (flechas grises discontinuas). CD: célula dendrítica; MLNs: nódulos linfáticos mesentéricos; IL: interleuquina; IFN: interferón (Figura modificada de Cortés *et al.*, (2017a).

infecciones crónicas con *N. brasiliensis*, ésta se asocia a mecanismos dependientes del IFN- γ tras la inoculación de recombinante de (r)IL-12 (Finkelman *et al.*, 2004).

1.2.3. RECONOCIMIENTO E INICIACIÓN DE RESPUESTAS INMUNITARIAS FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES

Los mecanismos implicados en el reconocimiento e iniciación de la respuesta inmunitaria frente a los helmintos intestinales una vez que éstos entran en contacto con el epitelio intestinal, constituye una gran incógnita. En este sentido, las CD4⁺ parecen jugar un papel esencial. La capacidad inmunorreguladora de los helmintos depende, en gran medida, de su capacidad para modular las respuestas de las CD4⁺ (Moro *et al.*, 2010; Hussaarts *et al.*, 2014). En este sentido, la activación diferencial de las CD4⁺ por los productos derivados de los helmintos podría producir un efecto antiinflamatorio, sin necesidad de que las CD4⁺ reconozcan al patógeno a través de sus receptores de superficie. Sin embargo, la activación de la respuesta inmunitaria no parece depender exclusivamente de los productos derivados de los helmintos, sino que se requiere, además, de señales adicionales aportadas por el tejido que favorecen la polarización de las CD4⁺ y otras células para generar respuestas Th2 (Hussaarts *et al.*, 2014). Por ejemplo, los ESPs de algunos helmintos como *N. brasiliensis* o *H. polygyrus bakeri* modulan a las CD4⁺ inhibiendo la producción de IL-12 facilitando la generación de respuestas Th2 en ausencia de TSLP (Rzepecka *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013; Marple *et al.*, 2017). Sin embargo, los ESPs de otras especies, como *T. muris* o *T. spiralis*, estimulan el desarrollo de un perfil de citoquinas Th1/Th2 debido a las señales enviadas por las CD4⁺, si bien la producción de TSLP por parte de IECs actúa sobre las CD4⁺ y otras APCs favoreciendo la polarización a Th2 (Perrigou *et al.*, 2009; Siracusa *et al.*, 2011; Giacomini *et al.*, 2012).

La producción innata de IL-12 por parte de las CD4⁺ migratorias CD103⁺ dependientes de Baft3, supone una barrera para la activación de respuestas Th2. Sin embargo, todo parece indicar que las citoquinas producidas por el epitelio intestinal

neutralizan esta citoquina y favorecen el desarrollo de respuestas protectoras (Everts *et al.*, 2016; Cortés *et al.*, 2017a).

Otra posibilidad que se ha planteado es que los helmintos sean reconocidos por la emisión de exosomas que permite la transferencia de lípidos, proteínas o ácidos nucleicos al interior de las células del hospedador (Raposo & Stoorvogel, 2013). En este sentido, se ha observado que los exosomas producidos por *H. polygyrus bakeri* pueden reducir la expresión del receptor de IL-33 impidiendo la activación de las ILC2s y, por tanto, de la respuesta protectora (Buck *et al.*, 2014). Asimismo, la inoculación subcutánea de exosomas de *E. caproni* reduce la severidad de la infección producida por este trematodo en ratones debido a la inducción de una respuesta Th2/Treg (Trelis *et al.*, 2016). A pesar de todo, la regulación de la respuesta inmunitaria desarrollada en presencia de los exosomas, requiere de estudios más profundos.

En los últimos años, el papel de las células *tuft* en el reconocimiento de los helmintos intestinales está ganado protagonismo. Estas células expresan subunidades de gustducina proteína G gustativa específica y canales de cationes TRMP5 que son componente de la vía receptores quimiosensoriales. Los productos de diversos patógenos pueden ser reconocidos por esta vía afectando a la regulación de la respuesta inmunitaria. En este sentido, se ha observado que el bloqueo de esta vía de señalización inhibe la expansión de las células mucosecretoras y de otras células importantes en la generación de respuestas Th2 y, consecuentemente, incrementa la susceptibilidad frente a helmintos intestinales (Lee *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Howitt *et al.*, 2016).

1.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES Y MICROBIOTA INTESTINAL

Los microorganismos y los helmintos parásitos han co-evolucionado junto a sus hospedadores vertebrados y constituyen un elemento fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria de los hospedadores (Rook *et al.*, 2013). Es un hecho conocido que muchos helmintos parásitos tienen una gran capacidad para modular la respuesta inmunitaria Th2 de su hospedador, en muchos de los casos, a través de sus ESPs (McSorley & Maizels, 2012) y se ha realizado una gran cantidad de estudios en este sentido. Sin embargo, la mayoría de trabajos han considerado exclusivamente al helminto parásito y a su hospedador (Cortés *et al.*, 2018a). En cambio, en los últimos años, se han acumulado muchas evidencias referentes a la participación de la microbiota intestinal en la regulación de la respuesta inmunitaria. Asimismo, también se ha observado que las infecciones por helmintos tienen una gran capacidad para alterar las poblaciones que constituyen la microbiota del intestino, lo que parece tener una gran incidencia en la regulación de la respuesta inmunitaria (Peachey *et al.*, 2017; Brosschot & Reynolds, 2018; Cortés *et al.*, 2018a).

1.3.1. LAS INTERACCIONES HOSPEDADOR–HELMINTO INTESTINAL–MICROBIOTA

En los últimos años, se está acumulando una cantidad creciente de evidencias que sugieren que los cambios en la flora intestinal inducidos por las infecciones producidas por helmintos, juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria (Peachey *et al.*, 2017; Brosschot & Reynolds, 2018). Así, por ejemplo, se ha observado que el trasplante fecal en ratones infectados con

H. polygyrus bakeri induce la activación de células Treg afectando al resultado de la infección por este helminto y, al igual que, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro inhibe los efectos inflamatorios de la infección parasitaria (Zaiss *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2018). Sin embargo, los mecanismos por los que se afecta la respuesta inmunitaria son, actualmente, desconocidos.

En este sentido, los helmintos intestinales pueden afectar a la presencia y abundancia de las poblaciones de microbios residentes por la actividad antimicrobiana de algunos ESPs o por la alteración de la respuesta inmunitaria que puede afectar a la flora microbiana (Hewitson *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Brosschot & Reynolds, 2018). En algunos estudios, se ha demostrado que la respuesta Th2 inducida por los helmintos intestinales afecta a la microbiota intestinal de manera cualitativa y cuantitativa (Fricke *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018). Sin embargo, en otros estudios se sugiere que esta respuesta no afecta tanto a la microbiota, puesto que los cambios son idénticos en ratones que carecen de la cadena α del receptor de IL-4, lo cual es indispensable para la diferenciación a Th2 (McFarlane *et al.*, 2017; White *et al.*, 2018).

Por otro lado, también debe considerarse la interacción directa entre los helmintos y la microbiota residente. White *et al.* (2018) demostraron que la infección por *T. muris* ejerce un efecto directo sobre la microbiota incrementando las poblaciones de Firmicutes, Actinobacteria, Deferribacteres y Proteobacteria, mientras que se reduce la cantidad de Bacteroidales. Estas alteraciones tienen lugar tras la infección primaria y afectan a la eclosión de los huevos de los helmintos en una infección secundaria, contribuyendo a la persistencia de los adultos de infección primaria. Sin embargo, el hecho de que se observen alteraciones similares en ratones deficientes en células B y T funcionales sugiere que los cambios no dependen de la respuesta adaptativa, al menos en este sistema parásito-hospedador (White *et al.*, 2018).

Otros estudios indican que la microbiota intestinal puede favorecer o dificultar el establecimiento de helmintos intestinales a través de mecanismos dependientes de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la administración a ratones de *Lactobacillus* previamente a la infección con *H. polygyrus* resultó en un incremento de la susceptibilidad del ratón debido a la expansión de células Treg inducida por las bacterias (Reynolds *et al.*, 2014). Por el contrario, la administración como prebiótico oral de la especie *Lactobacillus rhamnosus* protegió frente a la infección por *T. muris* en una respuesta mediada por IL-10 (McClemens *et al.*, 2013).

A pesar de estas aparentes contradicciones, en los últimos años se ha puesto en evidencia que las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal son capaces de interactuar con células del sistema inmunitario. Por ejemplo, los miembros de la familia Lactobacillaceae inducen la expansión de las células T CD4+, regulando la respuesta inflamatoria (Wells, 2011), mientras que las bacterias filamentosas segmentadas (SFB) son indispensables para mantener la homeostasis Th17 en el intestino de ratón (Schnupf *et al.*, 2017). Recientemente, se ha observado que las infecciones en ratón por *N. brasiliensis* coinciden con poblaciones reducidas de SFB, junto con una desregulación de citoquinas Th17 en el intestino. Estas alteraciones parecen ser dependientes de la producción de IL-13 y la activación de STAT6 (Fricke *et al.*, 2015).

1.3.2. IL-25, HELMINTOS INTESTINALES Y MICROBIOTA INTESTINAL

Tal y como se ha comentado anteriormente, la IL-25 parece jugar un papel fundamental en la evolución de la infección por *E. caproni* (Muñoz-Antoli *et al.*,

2016b; Cortés *et al.*, 2017a). Por ello, se va a revisar brevemente el estado actual de conocimientos sobre esta citoquina y su relación con la microbiota intestinal.

Numerosos estudios, que han empleado tratamientos antibióticos en ratón y/o cepas de ratón libres de gérmenes, sugieren que la producción de IL-25 está regulada por la microbiota intestinal (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). El tratamiento de ratones con antibióticos de amplio espectro indujo una infraexpresión en el intestino grueso de la IL-25, sugiriendo que las señales para su producción son aportadas por la flora bacteriana (Zaph *et al.*, 2008). Asimismo, la expresión de IL-25 es baja en ratones libres de gérmenes, si bien su producción aumenta al exponer a los ratones a microbios del medio ambiente (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015).

1.3.2.1. IL-25 Y RESISTENCIA FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES

La IL-25 promueve las respuestas inmunitarias de tipo Th2 y desempeña funciones antiinflamatorias gracias a la inhibición simultánea de las respuestas Th1 y Th17 (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015). En general, la IL-25 se asocia a resistencia frente a los helmintos intestinales a través de este proceso, pudiendo activar, también, respuestas Th9. Todo ello conlleva la activación de mecanismos efectores como hiperplasia de células mucosecretoras, hipercontractibilidad muscular o mastocitosis que, en su conjunto, facilita la expulsión de los helmintos del intestino (Fallon *et al.*, 2006; Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Angkasekwinai *et al.*, 2013, 2017). Recientemente, se ha podido determinar que el origen de la IL-25 son las células en penacho, *tuft* o caveoladas del epitelio intestinal (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). En estado fisiológico normal, estas células se encuentran poco representadas en el epitelio intestinal. Sin embargo, en numerosas infecciones causadas por helmintos

intestinales, se expanden rápidamente una vez establecida la infección (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). Esta expansión, supone la producción de IL-25 que actúa como alarmina, activando las ILC2s que, a su vez, producen grandes cantidades de IL5 e IL-13 durante el establecimiento de la infección parasitaria (Neill *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010; Moro *et al.*, 2010). La IL-13 activa a progenitores en las criptas intestinales y aumenta el número de células *tuft* en un proceso de retroalimentación positiva que favorece la diferenciación de la respuesta inmunitaria a Th2 (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016).

En cuanto a las vías de activación y expansión de las células *tuft*, existen numerosas incógnitas por resolver. A día de hoy, se desconocen las moléculas señalizadoras que intervienen en la producción de la IL-25 mediada por estas células. Estudios recientes, han sugerido que las bacterias que componen la microbiota intestinal son responsables de generar estas señales (Nair *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2015; Buonomo *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). En cambio, cabe mencionar que la microbiota intestinal de los vertebrados está compuesta por diferentes organismos procariotas, virus y eucariotas, y estas comunidades pueden del mismo modo, participar en la mediación de estas señales. De hecho, la expansión y activación de las células *tuft* tiene lugar en respuesta a la colonización intestinal por organismos parásitos (Howitt *et al.*, 2016). Sin embargo, esta respuesta es inhibida por defectos genéticos en las vías quimiosensoriales del gusto en el epitelio intestinal las cuales se encargan de la transducción de señales celulares externas, en particular, de las señales de las células *tuft* en el intestino (Howitt *et al.*, 2016). No obstante, se ha sugerido que moléculas derivadas de bacterias y ácidos grasos de cadena corta pueden activar estas vías quimiosensoriales en otros tipos de células (Kim *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013) lo cual lleva a pensar que la activación de las células *tuft* en infecciones por helmintos intestinales podría estar asociada a cambios en la microbiota intestinal y metabolitos promovidos por la propia presencia del parásito en el intestino.

1.3.2.2. IL-25 Y HOMEOSTASIS INTESTINAL

Además del papel ya conocido de la IL-25 en las respuestas de resistencia frente a helmintos intestinales, esta citoquina también se encuentra involucrada en la regulación de las células linfoides ROR γ ⁺ o ILC3s (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011). Estas células, localizadas en la lámina propia, juegan un papel esencial en el mantenimiento de las relaciones simbióticas entre la microbiota y su hospedador y dificultan el desarrollo de infecciones causadas por patógenos. De hecho, la desregulación de estas células se asocia a enfermedades autoinmunes (Park & Eberl, 2018). Se ha observado, que la IL-25 producida en el intestino delgado reprime la expansión de las ILC3s y la producción de IL-22 por parte de estas células (Sawa *et al.*, 2011). IL-22 se caracteriza por intervenir en procesos de regeneración de las mucosas intestinales y en la defensa frente a infecciones, si bien también se encuentra implicada en la inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias que contribuyen en la patología intestinal (Dudakov *et al.*, 2015). Como consecuencia, la expresión de IL-25 protege a la mucosa intestinal de la patología, por lo que la microbiota juega, de esta forma, un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Sawa *et al.*, 2011; Buonomo *et al.*, 2016; Reyes *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). En este sentido, cabe destacar que la supresión de la expresión de IL-25 en ratones infectados con *Hymenolepis diminuta* exacerba los síntomas clínicos de la infección (Reyes *et al.*, 2016).

Los eosinófilos parecen jugar un papel fundamental en la protección mediada por IL-25, tanto en la defensa frente a patógenos como en el mantenimiento de la integridad tisular y, según lo observado, esta protección es ofrecida mediante un proceso independiente de la producción de citoquinas de tipo 2 (Buonomo *et al.*, 2016). Asimismo, los neutrófilos también parecen contribuir en la protección mediada por IL-25. Sin embargo, esta protección se encuentra inhibida al tratar con antibióticos de amplio espectro a los ratones, lo cual sugiere que se trata de un proceso mediado por la microbiota residente (Zindl *et al.*, 2013; Wang, 2018).

Todos estos hechos, confirman que la IL-25 se produce a través de la microbiota intestinal y resulta determinante para la resistencia frente a helmintos intestinales. Asimismo, esta citoquina parece actuar en la defensa frente a estos parásitos gracias a la activación de mecanismos innatos, además de la respuesta Th2, y protege frente a la patología causada por estos helmintos (Cortés *et al.*, 2018a).

Estos hallazgos, sugieren que la producción de IL-25 es dependiente de señales generadas por la microbiota (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Howitt *et al.*, 2016; Buonomo *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). Por tanto, la interacción microbiota intestinal–IL-25 resulta determinante en los procesos de regulación de las respuestas Th2, así como, en los mecanismos efectores activados frente a infecciones por helmintos intestinales (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; von Moltke *et al.*, 2016). Asimismo, a pesar que existen ciertos estudios que sugieren que las bacterias presentes en el medio de infección son seleccionadas por los propios helmintos intestinales para optimizar el medio interno en el que se desarrollan (Brosschot & Reynolds, 2018), también hay otros estudios que sugieren que el hospedador vertebrado puede haber seleccionado las poblaciones microbianas que presentan funciones protectoras frente a patógenos. En base a estos hechos, es posible que la IL-25 además de ser fundamental en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (Brosschot & Reynolds, 2018) y en la activación de las respuestas Th2, parece que esta citoquina puede intervenir en la activación de los mecanismos efectores que promueven la expulsión de los helmintos del intestino (Gerbe *et al.*, 2016; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b).

1.4. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Los echinostomátidos son trematodos digénidos que parasitan, como adultos, a nivel del intestino delgado de una gran cantidad de hospedadores vertebrados, incluyendo al ser humano (Toledo *et al.*, 2009a; Toledo & Esteban, 2016). En particular, *E. caproni* es capaz de infectar varias especies de roedores de laboratorio, si bien la infección es diferente en cada una de ellas en base al porcentaje de establecimiento, el desarrollo del parásito y su supervivencia (Toledo & Fried, 2005; Toledo *et al.*, 2009a). Estos hechos, han convertido al sistema *E. caproni*-roedor en un excelente modelo para el estudio de las relaciones parásito-hospedador (Toledo & Fried, 2005). Inicialmente, los estudios abordados con este modelo se basaron en la comparación de los factores hospedador-dependientes determinantes del desarrollo de resistencia frente a la infección por *E. caproni* a partir del empleo de diferentes especies hospedadoras.

En hospedadores susceptibles, como el ratón, *E. caproni* induce infecciones de carácter crónico con elevadas cargas parasitarias, junto con intensa patología intestinal y fuertes respuestas humorales, tanto a nivel local como sistémico (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007). Sin embargo, las ratas son parcialmente resistentes a la infección por lo que las cargas parasitarias resultan bajas y los pocos parásitos presentes son eliminados de forma natural a los pocos días de la infección. Asimismo, la patología intestinal en este hospedador es prácticamente inexistente, así como la respuesta de anticuerpos (Toledo *et al.*, 2006a; Sotillo *et al.*, 2007). Los estudios comparativos realizados de la expresión *in vivo* de citoquinas en cada especie hospedadora han servido para poner de manifiesto la importancia de la respuesta local para determinar el curso de la infección. El establecimiento de infecciones crónicas está asociado a la producción intestinal de IFN- γ e iNOS, mientras la resistencia en ratas se relaciona con el

desarrollo de un perfil Th2/Th17 en el que la IL-13 parece la principal citoquina responsable de la expulsión de los parásitos (Sotillo *et al.*, 2011; Trelis *et al.*, 2011). En este tipo de respuesta se genera una importante hiperplasia de células mucosecretoras, si bien la infección produce un marcado incremento en la producción de mucus en ambos tipos de hospedadores, por lo que no parece ser un sistema eficiente para la expulsión de los adultos de *E. caproni* (Cortés *et al.*, 2015a). Sin embargo, la infección, genera en cada especie hospedadora distintas alteraciones en la cinética de renovación de las células epiteliales que podrían estar relacionadas con las diferencias observadas en el curso de la infección en cada una de ellas. En cuanto a la expulsión temprana de los parásitos en ratas, parece estar asociada a un recambio acelerado del epitelio intestinal (Cortés *et al.*, 2015a).

Por otro lado, *E. caproni* modifica el metabolismo energético de los enterocitos y se observa un patrón diferente en hospedadores susceptibles y resistentes. La infección en ratón produce disfunción de las mitocondrias y un incremento anaeróbico del uso de la glucosa para obtener ATP (Cortés *et al.*, 2015b). En cambio, en rata se detectó una transición a un metabolismo más aeróbico y oxidativo, lo que conllevó a un flujo glicolítico reducido y mayor producción de ATP (Muñoz-Antoli *et al.*, 2014).

Más recientemente, los esfuerzos se han focalizado en el estudio de las respuestas locales generadas frente a infecciones primarias y secundarias por *E. caproni* mediante la comparación de estas respuestas en infecciones producidas en ratones. Estos estudios han permitido establecer que la IL-25 juega un papel clave en la resistencia contra la infección (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). Así, dichos autores demostraron que la infección crónica primaria en ratón está caracterizada por la presencia de niveles locales elevados de IFN- γ e iNOS, junto con una gran producción de IL-33 y TSLP y ausencia de producción de IL-25. Este hecho, sugiere que la producción de IFN- γ a causa de la infección inhibe la expansión de ILC2s y su funcionalidad, a pesar de la producción de IL-33

y TSLP, que no son suficiente para limitar la respuesta Th1, en ausencia de IL-25 (Cortés *et al.*, 2017a). Sin embargo, la cura farmacológica de esta infección primaria indujo una rápida expresión de IL-25 y, como consecuencia, el desarrollo de una respuesta Th2 que protege al ratón frente a infecciones homólogas secundarias (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). Estos datos resultan de gran interés puesto que, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de helmintos intestinales, la infección primaria con *E. caproni* no induce sobreexpresión de IL-25. La expresión de esta citoquina solo ocurre como consecuencia de los procesos de regeneración del epitelio intestinal que se inician tras la cura de la infección primaria y resulta fundamental para explicar la resistencia frente a infecciones secundarias (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a).

En base a estos datos, es posible que otros factores se encuentren involucrados en la iniciación de los procesos de regeneración tisular y resistencia en infecciones secundarias por *E. caproni*. La flora intestinal, podría ser una pieza clave en la activación de estos procesos ya que se encuentra involucrada en las vías de señalización de la expresión de IL-25 (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). El modelo *E. caproni*- ratón se considera un modelo útil para el estudio del papel de la IL-25 en la reparación tisular y generación de resistencia, así como, para investigar las funciones desarrolladas por la microbiota intestinal en la regulación de estos procesos. Estudios recientes sugieren que tras una infección primaria con *E. caproni* en ratón se puede generar cambios en la diversidad- α y/o diversidad- β de la microbiota intestinal los cuales, pueden ser responsables de la modulación de la respuesta inmunitaria desarrollada frente a infecciones secundarias (Peachey *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018a). En cambio, ya que los niveles de expresión de IL-25 se incrementan tras la cura farmacológica de la infección primaria por *E. caproni*, es posible que los factores de protección frente a infecciones secundarias producidas por este parásito, se encuentren relacionados con los mecanismos de reparación del tejido activados tras la eliminación de la infección primaria.

Los mecanismos de reparación tisular activados tras la eliminación del parásito del intestino, promueven la expansión de poblaciones particulares de bacterias resistentes que participan en los procesos de cicatrización del tejido mediante la estimulación de la migración y proliferación de las IECs (Alam *et al.*, 2016). Aunque las funciones desempeñadas por la microbiota en la reparación del daño pueden ser esenciales, su papel en la resistencia frente a infecciones por *E. caproni* podría no ser decisivo, ya que los cambios en la microbiota intestinal ligados al daño son locales y transitorios y, a medida que se va reparando el tejido, la flora asociada a la restauración tisular se parece nuevamente a la presente en una mucosa sana (Alam *et al.*, 2016). Por otro lado, es posible que las modificaciones en la composición microbiana que más perduran en el tiempo participen en los procesos de resistencia frente a la infección. Asimismo, los niveles de expresión de IL-25 disminuyen progresivamente a medida que pasa el tiempo desde la cura de la infección primaria (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a) por lo que esta disminución podría estar asociada a cambios en la composición microbiana intestinal una vez el parásito ha sido expulsado junto con una restauración progresiva de la microbiota que estaba presente antes de la infección primaria.

Por otro lado, la protección de la mucosa mediada por IL-25 se ha asociado a la infiltración de diversos granulocitos (Reyes *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017; Noor *et al.*, 2017). En respuesta a infecciones con *E. caproni*, las poblaciones de estas células ubicadas en la lámina propia experimentan ciertas modificaciones. A pesar de esto, su impacto en el resultado de la infección no se conoce por completo. En cambio, es bien conocido que la IL-25 se encuentra involucrada en la regulación de las vías de activación de los macrófagos, los cuales muestran un patrón de activación diferente en infecciones primarias y secundarias por *E. caproni* (Rizzo *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). Hay estudios que muestran un papel relevante ocupado por estas y otras células inmunitarias innatas en la función de barrera y reparación del tejido intestinal. Es por esto que, es necesario profundizar en los conocimientos del papel desarrollado por la IL-25 en

la protección del tejido intestinal mediada por la inmunidad innata en las infecciones causadas por helmintos, así como la función de la microbiota intestinal en el iniciación de estos procesos.

En numerosas infecciones causadas por helmintos intestinales se produce inflamación intestinal a causa del daño epitelial provocado lo cual, facilita la infiltración de bacterias y componentes microbianos en la lámina propia, estimulando así, a células inmunitarias innatas que contribuyen a la polarización de la respuesta (McDermott *et al.*, 2003; Farid *et al.*, 2008; George *et al.*, 2012; Rajamanickam *et al.*, 2020). En el caso de las infecciones con *E. caproni*, es bastante probable que se produzcan esta infiltración bacteriana tras la infección primaria ya que el daño epitelial producido es de importancia. Además, en hospedadores susceptibles se observa un mayor paso de antígenos de *E. caproni* a través de la lámina propia, pudiendo dar lugar a la activación de respuestas inflamatorias locales de tipo Th1 responsables del desarrollo crónico de la infección (Toledo *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2018a). En este contexto, el modelo *E. caproni*-ratón podría servir de gran ayuda para investigar el papel protector de IL-25 frente a infecciones secundarias por *E. caproni* y dilucidar si ésta citoquina además de polarizar las respuestas hacia un fenotipo Th2, se encuentra involucrada en la activación de los mecanismos innatos que favorecen la integridad epitelial, limitando de este modo, el daño tisular, la translocación bacteriana, y respuestas inflamatorias Th1 relacionadas con el desarrollo crónico de la infección.

En este sentido, la microbiota podría jugar un papel fundamental y será objeto de esta Tesis Doctoral, junto con otros aspectos que permitan explicar el origen y la funcionalidad de la IL-25 que, parece ser, la principal responsable de la resistencia frente a este trematodo intestinal.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL OBTENIDO A PARTIR DE LOS PARÁSITOS Y HOSPEDADORES DEFINITIVOS

En el presente apartado se detallarán los materiales utilizados para el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral. Para ello se han empleado materiales obtenidos a partir de ejemplares de *Echinostoma caproni*, así como, de los ratones hospedadores que intervienen en el ciclo biológico del mismo. Además, se describirán los procedimientos seguidos para el mantenimiento de este ciclo de vida en condiciones de laboratorio, paso crítico para el desarrollo de nuestra línea de investigación ya que nos permite disponer de todo el material biológico requerido en cada aproximación experimental planteada.

2.1.1. ECHINOSTOMA CAPRONI Y MATERIAL PARASITOLÓGICO

Para la realización del presente trabajo se ha empleado al trematodo intestinal *E. caproni*. A continuación, se describen los materiales parasitológicos utilizados, así como los procedimientos seguidos para el mantenimiento del ciclo biológico de esta especie en el laboratorio.

El establecimiento y reproducción del ciclo biológico de *E. caproni* de manera experimental fue posible gracias a las metacercarias cedidas originalmente por el Dr. Bernard Fried, del Departamento de Biología del Lafayette College (Easton, Pensilvania, EE.UU.). En concreto, la cepa empleada para el desarrollo de esta investigación ha sido descrita previamente por Fujino & Fried (1993). De este modo, se pudo mantener el ciclo biológico del parásito en nuestro laboratorio y disponer de los diferentes estadios evolutivos del mismo.

2.1.1.1. MANTENIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN EL LABORATORIO

El trematodo intestinal *E. caproni*, cuenta con un ciclo biológico triheteroxeno acuático en el que intervienen dos hospedadores intermediarios y un hospedador definitivo. Como hospedadores intermediarios pueden actuar diferentes especies de animales de agua dulce tales como peces, gasterópodos y crustáceos. En el presente estudio se utilizó el gasterópodo pulmonado acuático *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) tanto de primer como de segundo hospedador intermediario ya que presenta la capacidad de albergar diferentes estadios evolutivos del parásito. Como hospedadores definitivos, pueden intervenir animales vertebrados, tanto aves como mamíferos. En este estudio concretamente, hemos utilizado ratones de la cepa ICR con tal fin.

a) Obtención de las metacercarias e infección de los hospedadores definitivos

Las metacercarias, estadio infectante de *E. caproni* para el hospedador definitivo, se albergan en la cavidad pericárdica y renal de ejemplares de caracoles *B. glabrata* previamente infectados de forma experimental con el estadio de cercaria por contacto directo. Estas metacercarias se extrajeron cuidadosamente de los caracoles segundos hospedadores intermediarios por disección bajo una lupa binocular. Seguidamente, con la ayuda de una aguja enmangada se realizaron agrupaciones de metacercarias en la dosis seleccionada para la infección de los ratones hospedadores definitivos según la aproximación experimental a desarrollar. Con una pipeta Pasteur, se procedió a succionar las metacercarias agrupadas y se depositaron en pequeñas placas Petri para individualizar la dosis que sería posteriormente administrada a cada ratón. A continuación, con ayuda de una jeringa de 1 mL provista de una cánula metálica de 0,8 x 25 mm estas metacercarias se

administraron por vía oral a los ratones experimentales con el menor volumen de agua posible. Para comprobar que se administraba el total de la dosis se realizaron varios lavados de la cánula, asegurando que no quedasen metacercarias en su interior. En tal caso, las metacercarias remanentes eran reagrupadas y se realizaba de nuevo el mismo proceso.

b) Aislamiento de adultos de *Echinostoma caproni* y embrionación de los huevos obtenidos

Los adultos de *E. caproni* se extrajeron del intestino delgado a la altura del íleon de los hospedadores definitivos experimentales. Para ello, se procedió al sacrificio y disección de los ratones hospedadores definitivos y se aisló el intestino delgado en una placa Petri. Seguidamente, el intestino delgado se abrió longitudinalmente con la ayuda de finas tijeras y pinzas de disección para no dañar a los adultos parásitos, a la luz de una lupa binocular. Los adultos recuperados se recogían con ayuda de un pincel fino y se depositaban en una placa Petri conteniendo solución fisiológica [0,9% NaCl (p/v)].

En cuanto a la recuperación de huevos a partir de los parásitos adultos, existen diferentes protocolos de aislamiento. Concretamente, se realizó mediante dilaceración del útero. Esta técnica consiste en realizar una incisión en la porción final del útero grávido de los vermes adultos con ayuda de dos agujas emangadas, a la luz de una lupa binocular. De este modo, se extrajeron todos los huevos presentes en el interior del útero del verme los cuales, se podrían encontrar en diferentes estadios de maduración. Una vez obtenidos los huevos, éstos se recogían en viales de vidrio conteniendo agua natural y se pasaba a la fase de embrionación. Para ello, estos viales eran envueltos en papel de plata para evitar la entrada de luz y se utilizaba una tapa perforada para que el oxígeno difundiera hacia su interior. Finalmente, los viales fueron incubados en una estufa a una temperatura de 25 °C

durante 15 días, tiempo que tarda en formarse el siguiente estadio evolutivo, el miracidio.

c) Cría, mantenimiento e infección de los caracoles hospedadores intermediarios.

A continuación, se describe los métodos malacológicos de laboratorio empleados para la cría y mantenimiento de los gasterópodos pulmonados acuáticos que intervienen tanto de primer como de segundo hospedador intermediario (Brygoo, 1965) en el ciclo biológico de *E. caproni*. Asimismo, se comentará la metodología aplicada para la infección de estos gasterópodos los cuales juegan un papel fundamental en la perpetuación del ciclo biológico *in vitro* de este trematodo intestinal.

Los moluscos empleados como hospedadores intermediarios experimentales se sometieron a diversos análisis para asegurar que se encontraban libres de cualquier tipo de parásito, así como, que eran individuos aptos para generar nuevas crías para su posterior mantenimiento como hospedadores intermediarios en condiciones de laboratorio. Estos ejemplares de caracoles fueron cedidos originalmente por el Dr. Pointier, del Laboratorio de Biología Marina y Malacología del Centro de Biología y Ecología Tropical y Mediterránea de la Universidad de Perpiñán (Francia).

Para que los caracoles se sigan desarrollando y completen su ciclo de vida en el laboratorio, es necesario establecer unos parámetros ambientales lo más ajustado posible a los que se dan en el medio ambiente. De este modo, con unas 24-48 h tras su captura se facilita el periodo de aclimatación de los caracoles al nuevo hábitat artificial (Rondelaud & Barthe, 1978). Para este fin, se dispone de una cámara climática que permite programar las condiciones adecuadas para el mantenimiento y desarrollo de estos vectores y estandarizar, de forma

ininterrumpida, la temperatura ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad (humedad relativa $80\pm 5\%$), oxigenación (permanente) y fotoperiodo (12 h luz-12 h oscuridad, con una intensidad luminosa máxima de 3.500 lx). Una vez seleccionados los caracoles que cumple con las condiciones sanitarias y de cría adecuadas, se disponían en recipientes de plástico transparentes conteniendo una capa fina y constante de grava calcáreo margoso cubierto por una capa de agua natural de 4-5 cm de altura y, como alimento, lechuga lavada en régimen *ad libitum* (Rondelaud & Barthe, 1978; Bouix-Busson *et al.*, 1985; Audoussat *et al.*, 1989). Todos los recipientes eran revisados semanalmente, renovándoles el agua y añadiéndoles lechuga fresca. Asimismo, periódicamente se recolectaban los clusters de huevos formados por estos gasterópodos adheridos a las paredes del recipiente, y se trasladaban a nuevas cubetas de plástico de menor tamaño en las que no se renovaba el agua hasta que se hubieran desarrollado las crías, a fin de generar poblaciones de caracoles nuevas y evitar posibles pérdidas poblacionales.

Los caracoles empleados como hospedadores del ciclo biológico de *E. caproni* en el laboratorio se mantienen también en dicha cámara climática. La eclosión de los huevos embrionados del parásito, se consigue mediante estimulación lumínica con una lámpara de 60 W. Los viales que contienen los huevos son vaciados en placas Petri de unos 5 cm de diámetro. Periódicamente, la placa era revisada para detectar miracidios recién emergidos, que son succionados uno a uno con ayuda de una pipeta Pasteur acoplada a una goma y depositados en una placa Petri pequeña (3 cm de diámetro) a una dosis de 5 miracidios por caracol primer hospedador intermediario. Seguidamente, se introducía en la placa el gasterópodo, el cual debía presentar un tamaño adecuado para albergar y mantener la infección, y se añadía 2 ml de agua natural. Se mantenía toda la noche en contacto el caracol y los miracidios a una temperatura de 20°C e iluminación constante. Era importante que el caracol permaneciera dentro del agua durante todo el tiempo de exposición frente a los miracidios para facilitar la penetración activa de los mismos a través del tegumento del caracol primer hospedador intermediario. Tras este periodo, el

caracol se aislaba en una nueva placa Petri con agua natural y lechuga. Este medio era revisado periódicamente con el fin de detectar la emisión cercariana que notificaba el éxito de la infección.

La infección en el caracol segundo hospedador intermediario tiene lugar cuando éste entra en contacto con un caracol primer hospedador intermediario emisor activo de cercarias. Para ello, los caracoles primeros hospedadores intermediarios se dispusieron individualmente en recipientes de plástico, con las mismas condiciones de agua y lechuga a las descritas anteriormente, debidamente etiquetados, indicando: la especie de gasterópodo, la especie parásita y la fecha de infección. Además, en este mismo recipiente se introdujo un segundo caracol que presentaba la capacidad de actuar como segundo hospedador intermediario albergando en su interior el estadio de metacercaria. Ambos hospedadores intermediarios se mantuvieron en contacto por 15 días para permitir que el segundo caracol almacenase una cantidad suficiente de metacercarias pero sin llegar a provocar la muerte del mismo. Pasado este periodo, se cambiaba este segundo gasterópodo por uno nuevo.

Los métodos empleados para llevar a cabo la infección experimental de los moluscos pueden ser consultadas con mayor profundidad en los trabajos de (Toledo, 1992; Muñoz-Antoli, 1998; Pérez, 2002; Trelis, 2004).

2.1.1.2. ANTÍGENOS COMPLETOS DE VERMES ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Los antígenos completos son una mezcla proteica heterogénea que procede de la homogenización de vermes adultos del parásito. En concreto, estos antígenos son soluciones proteicas generadas a partir de productos del parásito. Estas proteínas antigénicas fueron empleadas para el desarrollo de técnicas inmunológicas

direccionadas a analizar la especificidad de reacción de los anticuerpos generados por el hospedador definitivo frente a los antígenos de *E. caproni*.

2.1.1.3. ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE VERMES ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Los antígenos de excreción/secreción están formados por una mezcla de proteínas procedentes de los productos excretados y secretados por los parásitos adultos vivos. Para su obtención, los adultos fueron incubados a 37°C en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium), *GlutaMAX™* (Life Technologies™), que contenía 100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina, en agitación. Este medio de cultivo líquido está formado por glucosa y sales minerales, suplementado con vitaminas y aminoácidos y presenta glutatión como agente reductor. De este modo, se simulan las condiciones del medio interno intestinal y se facilita la producción de estas proteínas antigénicas por los vermes adultos. Estos antígenos se emplearon para la realización de técnicas moleculares e inmunológicas aplicadas al estudio de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria por *E. caproni* en ratones susceptibles a la infección. Asimismo, se desarrolló un análisis de la actividad ejercida por proteínas de tipo catepsinas presentes en los ESPs en la limitación de la respuesta de anticuerpos generada en hospedadores susceptibles.

2.1.1.4. CORTES HISTOLÓGICOS DE VERMES ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Se emplearon cortes histológicos de vermes adultos para llevar a cabo experimentos de inmunohistoquímica que permitieran localizar la expresión de catepsinas en los tejidos del parásito.

En primer lugar, los adultos obtenidos tras la disección de los hospedadores, se pasaron a una placa Petri con la ayuda de un pincel. Seguidamente, se realizaron un par de lavados en solución fisiológica previamente a ser fijados por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% (v/v). Finalmente, los adultos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes seriados de 4 μm de espesor previamente a su fijación en portaobjetos *Apex™ Superior Adhesive Slide* (Leica Biosystems) en la Secció de Microscopia del SCSIE (Universitat de València).

2.1.2. HOSPEDADORES DEFINITIVOS Y MATERIAL DE HOSPEDADORES

Entre las especies que pueden actuar como hospedadores definitivos de *E. caproni* en condiciones naturales encontramos numerosos vertebrados, principalmente aves y mamíferos. En cambio, en cuanto a nivel de laboratorio se refiere, este abanico de hospedadores definitivos es más estrecho, habiéndose descrito la infección experimental en pollos y varias especies de micromamíferos (Brygoo, 1965). Sin embargo, el empleo de diferentes especies de roedores experimentales permite realizar aproximaciones más fehacientes para el estudio de las relaciones parásito-hospedador a partir de especies que muestran diferente compatibilidad con el parásito, así como, para el estudio de los factores relativos al hospedador determinantes en el curso y evolución de la infección (Toledo & Fried,

2005). En este sentido, estudios previos han mostrado que los ratones y hamsters son hospedadores de alta compatibilidad desarrollando infecciones de carácter crónico tras la exposición a *E. caproni*. En cambio, las ratas, son hospedadores de baja compatibilidad expulsando al parásito al poco tiempo tras la infección. En cuanto a hospedadores de baja compatibilidad, las ratas de la cepa Wistar han sido las más utilizadas para el estudio de los factores determinantes de la expulsión de los adultos del intestino presentando tasas de infección menores y de menor duración. En cambio, para el estudio de los factores involucrados en el desarrollo de infecciones crónicas en hospedadores de alta compatibilidad, se han empleado principalmente ratones de la cepa ICR (CD-1R). No obstante, esta cepa de ratones ha mostrado una resistencia parcial frente a una segunda exposición a *E. caproni*. Es por ello que, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado ratones (*Mus musculus*) de la cepa ICR como hospedadores definitivos para analizar los elementos involucrados en el desarrollo de susceptibilidad o, por el contrario, de resistencia.

2.1.2.1. MANTENIMIENTO DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS

Para el desarrollo de los estudios experimentales llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral se ha requerido el empleo de numerosos ratones de la cepa ICR como hospedadores definitivos. Todos los procedimientos que contribuyen al presente trabajo cumplen con los estándares éticos de relevancia nacional y guías institucionales relacionadas con el cuidado y empleo de animales de laboratorio. En particular, los procedimientos desarrollados con animales de experimentación cuentan con la aprobación del Comité d'Ètica i Benestar Animal de la Universitat de València (Ref. N° A18348501775). Los protocolos se ajustan a la regulación de la normativa nacional (Real decreto 53/2013) y de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo).

Los animales experimentales empleados en este trabajo fueron importados desde laboratorios especializados en la cría y distribución de animales de experimentación (Charles River Laboratories o The Jackson Laboratory). Tras recibirlos en nuestro centro, los animales se mantenían estabulados en una zona de ambiente controlado de roedores y lagomorfos en el animalario de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València [Secció de Producció Animal del SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental)]. Concretamente, los ratones eran establecidos en jaulas de plástico, surtidas de una cama seca de serrín, en régimen de alimentación *ad libitum* a base de pienso (Harlan) y agua natural autoclavados.

a) Características particulares de mantenimiento y manipulación

En algunas aproximaciones experimentales se necesitaron condiciones de estabulación más concretas. Los animales empleados para el estudio de la microbiota intestinal presente en heces de ratones sometidos a infecciones por *E. caproni* fueron mantenidos en jaulas cubiertas con una tapa filtrante y manipulados en cabinas de flujo laminar vertical (clase II), apropiadamente desinfectadas tanto previamente como después de la manipulación, con la finalidad de evitar la aparición de variables externas que pudieran alterar los resultados experimentales. Asimismo, estos animales permanecieron aislados en sus respectivas jaulas y no mantuvieron ningún tipo de contacto con otros animales durante todo el experimento.

b) Tratamiento farmacológico de la infección primaria por *Echinostoma caproni*

El tratamiento farmacológico de la infección primaria por *E. caproni* en ratón, se realiza con el antihelmíntico praziquantel (pzq). La dosis efectiva establecida es de 100 mg/kg de peso y se suministró por vía oral en dos días alternos a las 4 semanas después de la inducción de la infección primaria (spip) (Cortés *et al.*, 2016b). Todos los ratones tratados con pzq revirtieron la infección como se pudo confirmar mediante examen coprológico por Kato-Katz siguiendo el protocolo previamente descrito por Muñoz-Antoli *et al.* (2004). Brevemente, a partir de las heces recogidas de los animales tratados con el antihelmíntico se procede al raspado de las mismas sobre una superficie dura con una espátula plana hasta que atraviesen un tamiz con una luz de malla de 500 μm . Una vez tamizadas, se recogió la cantidad necesaria para rellenar un molde de 6 x 1,5 mm, con ayuda de una espátula. El tamaño de este molde equivale a 41,7 mg de muestra. Sobre las heces se colocaba un trozo de papel de celofán empapado con el colorante verde malaquita, glicerina y agua, extendiéndolo mediante compresión. Estas preparaciones se examinaban al microscopio a 400x aumentos en busca de huevos del parásito. La ausencia de huevos confirmaba la efectividad alcanzada por el tratamiento en todos los animales experimentales.

c) Sacrificio de los animales

Los animales hospedadores definitivos fueron sacrificados en cumplimiento de la normativa vigente mediante la aplicación del compuesto isoflurano. El isoflurano es un éter halogenado que, vaporizado en aire, actúa como anestésico inhalatorio induciendo en primer lugar la anestesia del animal y seguidamente, parada cardiorespiratoria y muerte por sobredosis.

2.1.2.2. MATERIAL DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS

A continuación, se describe los materiales obtenidos a partir de los ratones hospedadores definitivos y ratones controles, tras su sacrificio y disección los cuales difieren de acuerdo a los requerimientos marcados por cada estudio experimental realizado.

a) ARN Total de intestino delgado

Se aislaron porciones de intestino delgado de los ratones controles e infectados experimentalmente y, a partir de ellas, se procedió a realizar la extracción de ARN total de tejido. La fracción de ARNm obtenida, fue seguidamente retrotranscrita a ADNc y empleada para la cuantificación relativa de la expresión génica de diversas citoquinas y del enzima iNOS mediante RT-PCRt.

b) Muestras de suero

Se obtuvieron muestras de suero de ratones controles e infectados experimentalmente con *E. caproni* para la realización de técnicas moleculares y de inmunofluorescencia, para el estudio del papel ejercido por la respuesta humoral generada frente a la infección con *E. caproni*.

c) Cortes histológicos de intestino

Se realizaron secciones histológicas de íleon de 4 µm de espesor, para la ejecución de diferentes técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Los cortes de tejido intestinal procedentes de los animales

sometidos a diferentes condiciones experimentales fueron empleados para evaluar cuantitativamente diferentes poblaciones celulares y la expresión de sus receptores en ratones que desarrollan susceptibilidad o, por el contrario, resistencia frente a infecciones por *E. caproni*.

d) Extracto proteico de células epiteliales intestinales

Los cambios generados en el proteoma de los ratones a nivel del fleon por la infección experimental con *E. caproni* fueron examinados sobre un complejo extracto proteico intestinal, obtenido a partir del aislamiento y lisado de las células del epitelio intestinal de estos animales experimentales. De este modo, este material fue empleado para estudiar los cambios producidos en la expresión de proteínas en ratones infectados con *E. caproni* en presencia o ausencia de rIL-25.

e) Recolección de heces

Las muestras fecales se emplearon para analizar los posibles cambios inducidos en la microbiota intestinal en los diferentes escenarios de infección por *E. caproni* así como, para analizar el papel de la microbiota residente sobre la producción de IL-25 en infecciones secundarias por *E. caproni*. Además, se realizó secuenciación masiva *Illumina* a partir de heces con el fin de conocer las poblaciones bacterianas presentes en los diferentes ambientes de infección y su papel en el desarrollo de susceptibilidad o, por el contrario, resistencia frente a estas infecciones.

2.2. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los métodos para el estudio de la expresión génica se aplicaron para el análisis de la cinética de expresión de diversas citoquinas, a nivel del íleon de ratones, en respuesta a diferentes ambientes de infección por *E. caproni*. Se empleó la técnica PCRrt para cuantificar la expresión relativa de estos genes que no es más que una variante de la PCR que posibilita la amplificación y cuantificación al mismo tiempo del producto amplificado debido a la emisión de fluorescencia producida tras este proceso. La intensidad de esta fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado y, por tanto, a la cantidad de ADNc de partida presente en la muestra.

2.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para la ejecución de varios estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral se realizó la extracción del ARN procedente de muestras de íleon mediante el empleo del kit *Real Total ARN Spin Plus Kit* (Duviz), que permite aislar el ARN total del tejido, libre de ADN, gracias a la filtración del material obtenido a través de columnas que presentan una membrana de sílica.

El procedimiento de extracción de ARN total se realizó siguiendo las indicaciones facilitadas por el fabricante. De manera resumida, el protocolo de extracción consta de los siguientes pasos: (i) Incubación del tejido en una solución que facilita la lisis celular y que contiene agentes caotrópicos que neutralizan las ARNsas y promueven la unión óptima del ARN a la membrana de sílica; (ii) homogenización y filtración del lisado; (iii) captación de los ácidos nucleicos libres

sobre la membrana de sílica; (iv) tratamiento directo de la membrana con DNasa I para eliminar el ADN contaminante; y (v) adición de agua libre de nucleasas para eluir el ARN total purificado. A lo largo del protocolo de extracción se aplicaron diferentes soluciones tampón de lavado con el fin de eliminar los componentes celulares, sales y metabolitos que pueden provocar reacciones inespecíficas en la PCR.

2.2.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN A ADNc

Para realizar la retrotranscripción del ARNm a ADNc se empleó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®). Este kit viene dotado de todos los componentes necesarios para el desarrollo del protocolo: tampón de reacción, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), mix aleatorio de cebadores, enzima transcriptasa reversa e inhibidor de ARNsas. Las cantidades ajustadas de los componentes que conforman la mezcla y la reacción de retrotranscripción fueron elaboradas según las directrices del fabricante, con las siguientes condiciones de termociclador: un paso inicial de 10 min a 25°C, seguido de 120 min a 37°C, un paso de 5 min a 85°C y ciclo final “forever” a 4°C. Las muestras de ADNc obtenido tras la retrotranscripción fueron conservadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.2.3. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL

Para preparar la reacción de PCR cuantitativa se partió de una dilución de ADNc 1/10 en agua estéril. La mezcla de reacción estaba compuesta por 9 µl de

ADNc diluído, 10 µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2x)* y 1 µl del *TaqMan® Gene Expression Assay* oportuno (todos los productos de Applied Biosystems®), obteniendo un volumen final de reacción de 20 µl. Las reacciones de amplificación se realizaron con el termociclador *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems®), con las condiciones citadas a continuación: un paso inicial de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C y 40 ciclos de desnaturalización de 15 s a 95°C y 1 min de templado/extensión a 60°C. En cada placa de 96 pocillos se analizaron por duplicado los controles endógenos, controles negativos y muestras de estudio. Los cebadores y sondas empleados están diseñados por Applied Biosystems® y se ofrecen como ensayos inventariados. La **Tabla 2.1** alberga, los ensayos inventariados empleados para la β-actina, las diversas citoquinas y marcadores examinados. Cada ensayo está compuesto por dos cebadores que no se encuentran marcados y una sonda que sí presenta marcaje [6-FAM™ (carboxifluoresceína) dye-labeled, TaqMan® MGB probe]. Las secuencias de los cebadores y la sonda marcada con FAM™ son:

5'-ACCCACAACAGACCAGTATATACCA-3' (sentido)

5'-CATTTC AAGATCTCCCTGAGAACA-3' (antisentido)

5'-CACAAGTCGGAGGCTTA-3' (sonda)

El cálculo del ciclo umbral (Ct) a partir del cual se detecta fluorescencia en una muestra dada, se llevó a cabo para el control endógeno, control negativo y muestras problema. Como control endógeno se empleó el gen β-actina, que nos permite normalizar las posibles diferencias procedentes del proceso de extracción de ARN y/o síntesis de ADNc entre las distintas muestras. A fin de valorar diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria de resistencia frente a *E. caproni* en ratón se utilizó un método de cuantificación comparativo (método 2-ΔΔCt) (Livak & Schmittgen, 2001) para medir los niveles de expresión de numerosos genes,

Tabla 2.1. Ensayos inventariados de las sondas TaqMan®

Gen	Referencia del ensayo
Control endógeno	
B-actina	Mm01205647_g1
Citoquinas	
IL-4	Mm00445259_m1
IL-13	Mm99999190_m1
IL-12p35	Mm00434165_m1
IL-12p40	Mm00434174_m1
IL-25	Mm00499822_m1
IFN- γ	Mm99999071_m1
ARG I	Mm00475988_m1
ARG II	Mm00477592_m1
iNOS	Mm01309897_m1
Ym-1	Mm00657889_mH
RELM- β	Mm00445845_m1

basado en que la expresión del gen de interés es proporcional a la diferencia obtenida entre el ciclo umbral (ΔCt) del gen de interés y del control endógeno. Para calcular la cuantificación relativa de los niveles de expresión en las muestras analizadas, expresada como cantidad relativa (RQ), la variación en la expresión del gen de interés se normalizó con respecto a la de β -actina y se relativizó frente a su

expresión en animales control (Klein, 2002). Los resultados se muestran como la RQ media junto con su desviación estándar (DS) correspondiente.

2.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL PAPEL DE LAS CATEPSINAS EN LOS MECANISMOS DE EVASIÓN INMUNITARIA

Los helmintos parásitos presentan numerosas enzimas patógenas que ejercen una interacción parásito-hospedador crucial para su viabilidad y crecimiento (Robinson *et al.*, 2008). Entre estas enzimas se encuentran las catepsinas, peptidasas de tipo papaína que presentan la capacidad de cortar los extremos N- y/o C- terminal de las proteínas encontradas en el medio de parasitación, pudiendo provocar alteraciones en la estructura macromolecular de las mismas (Hasnain *et al.*, 2013). Estudios recientes, han mostrado un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria en *E. caproni* que consiste en la degradación de los anticuerpos de superficie por las catepsinas presentes en los ESPs impidiendo de este modo, la respuesta humoral del hospedador (Cortés *et al.*, 2017b). En este contexto, se realizó el análisis del papel ejercido por los distintos subtipos de catepsinas en la limitación de la respuesta de anticuerpos desarrollada por el hospedador frente a la infección por *E. caproni*.

2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los análisis realizados para la caracterización del papel de las catepsinas presentes en los ESPs de *E. caproni* en la evasión de la respuesta inmunitaria, requirieron el empleo de tres materiales: (i) obtención de antígenos completos de

adultos de *E. caproni*; (ii) antígenos de excreción/ secreción; y (iii) secciones de los parásitos adulto. Los métodos aplicados para obtener los materiales requeridos se explican a continuación.

2.3.1.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS COMPLETOS DE ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Para aislar los antígenos completos de ejemplares adultos de *E. caproni*, se recuperaron vermes del intestino delgado de ratones infectados experimentalmente. Tras obtener los adultos, se realizaron varios lavados en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM y KH₂PO₄ 2 mM) en una placa Petri y seguidamente, se pasaron a tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y se mantuvieron en una solución que contenía PBS, antibióticos (100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina) junto con inhibidor de proteasas a la concentración pertinente. Como inhibidor de proteasas se empleó el *cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), que presenta una capacidad inhibitoria de amplio espectro frente a la actividad serín- y cisteín- proteasa de diferente naturaleza. Después, con ayuda de un pistón acoplado a un rotor eléctrico se homogenizaron los adultos parásitos contenidos en los microtubos junto a la solución inhibitoria. A continuación, se realizó una centrifugación suave de 5 min para eliminar las partículas de mayor tamaño y el sobrenadante obtenido se centrifugó de nuevo a 15.000 g por 30 min a 4°C y finalmente se filtró por una malla con poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

2.3.1.2. OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN

Como se ha comentado previamente, los adultos de *E. caproni* se extrajeron del intestino de los hospedadores definitivos para el aislamiento de los ESPs. Los vermes fueron seguidamente lavados en solución fisiológica y se incubaron en medio RPMI que contenía 100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (Cortés *et al.*, 2016a). Los vermes adultos se mantuvieron a una concentración de 20 adultos/ml de medio durante 12 h en una estufa a 37°C en agitación suave. Tras este periodo de incubación, el medio de cultivo fue filtrado en un nuevo vial para separarlo de los vermes. Seguidamente, se eliminaron las partículas de mayor tamaño remanente mediante un paso de centrifugación de 30 min a 15.000 g y 4°C. La solución obtenida tras la centrifugación se filtró por un poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

a) Liofilización

La liofilización consiste en desecar un producto húmedo mediante la eliminación del agua por congelación y subsiguiente sublimación del producto congelado en condiciones de vacío. Este cambio de estado se produce en un medio con baja presión donde el agua cambia directamente de sólido a gas al aplicar calor, saltándose el paso de sólido a líquido. Los extractos proteicos liofilizados presentan mayor estabilidad química, disminuyendo la posibilidad de ser degradados. Por ello, se realizó este proceso con el fin de que las muestras se encontraran en buen estado hasta el momento de su manipulación.

Las condiciones de liofilización aplicadas para el almacenamiento de los ESPs fueron de $52 \pm 3^\circ\text{C}$ y 30 mBa de presión hasta el secado completo a las 24 h (liofilizador Hetosicc CD 4) y se conservaron a -80°C .

b) Reconstitución de los antígenos

Previamente a su empleo, los ESPs liofilizados se rehidrataron en agua destilada y se filtraron mediante una membrana Amicon Ultra-4 (corte de 10 kDa) por centrifugación a 7500 xg durante 10 min a 4°C. Este paso se repitió por segunda vez antes de que la muestra fuese lavada en 4 ml de un tampón citrato-fosfato [C6H8O7 25 mM y Na2HPO4·12H2O 50 mM (CPB)] pH 5,5, diluido al 10% (v/v) en agua destilada. Los pasos de lavados se hicieron por centrifugación a 7.500 g durante 12 min a 4°C. Esto permitió concentrar la muestra y deshacernos de los restos de aminoácidos presentes en el medio de cultivo que pudieran provocar interferencias a la hora de medir la concentración de proteínas en muestra.

Una vez reconstituídos los ESPs, se procedió a cuantificar la concentración de proteínas mediante el *Quant-iT™ Protein Assay Kit* (Invitrogen™). El principio de este ensayo se basa en el empleo de un fluorocromo que desprende fluorescencia cuando se une a las proteínas solubles presentes en la muestra de modo que, la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo formado fluoróforo-proteína es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Todos los productos de reacción fueron utilizados en las cantidades recomendadas por el fabricante. La fluorescencia emitida fue medida con el espectrofotómetro *Infinite M200* (Tecan), empleando el software *Magellan v7.1* (Tecan), a unas longitudes de onda de excitación de 470 nm y de lectura de 570 nm. La concentración de proteínas de la muestra examinada se obtiene por interpolación del resultado en una recta patrón, constituida mediante una serie de diluciones de concentración creciente y conocida de BSA (albúmina de suero bovino) bajo las mismas condiciones de longitud de onda.

2.3.2. ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD CATEPSINA EN LOS ESPs

Se utilizó un sustrato proteico sintético asociado a un fluorocromo aminometilcumarina (AMC) (Bachem) para medir la actividad peptidasa de los ESPs de los vermes adultos de *E. caproni*. En concreto, se empleó el sustrato Z-Phe-Arg-AMC (FR; Z: benzoiloxicarbonil, como grupo bloqueante del grupo amino libre) el cual posibilita examinar la actividad catepsina de los subtipos B y L (Kašný *et al.*, 2007). Los experimentos se realizaron en placas negras de 96 pocillos (Nunc). Las muestras empleadas se analizaron por duplicado y a cada pocillo se adicionaron 200 µl de una solución de CPB que contenía 50 µM de Z-FR-AMC, 2 mM de DTT y 5 µg de ESPs de los adultos parásitos. Se monitorizó la liberación del fluorocromo por un tiempo de 60 minutos y a una temperatura de 30°C mediante el espectrofotómetro *Infinite M200* (Tecan), asociado al software *Magellan v7.1* (Tecan), a longitudes de onda de excitación y lectura de 355 nm y 460 nm, respectivamente. Se emplearon los inhibidores CA-074 [N-(L-3-trans-propilcarbamoiloxirano-2- carbonil], inhibidor selectivo irreversible de catepsinas tipo B (Towatari *et al.*, 1991); y iCL (Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂), inhibidor selectivo de catepsinas L a una concentración de 10 µM en ambos casos, para determinar la especificidad de la actividad peptidasa. Por otro lado, se utilizaron muestras de ESPs obtenidas de adultos de *E. caproni* asilados de ratones a 4 semanas postinfección para determinar el pH óptimo de la actividad enzimática de las catepsinas.

2.3.3. SDS-PAGE Y BLOTTING CON DCG-04

Para preparar la mezcla proteica, se empleó DCG-04 como un análogo del inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas E-64 [N-trans-(epox-isuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida], que forma un enlace covalente con el centro activo de estas enzimas (Greenbaum *et al.*, 2000). La transferencia de este ligando se llevó a cabo según lo publicado por (Mike & Man, 2003). Se precipitaron 15 µg de ESPs de *E. caproni* y se incubaron durante 20 min a una concentración de DCG-04 5 µM disueltos en CPB a pH 5,5 y DTT 1 mM. Previamente, se elaboró un control negativo con el inhibidor E-64 a una concentración 50 µM en solución tampón anteriormente descrita, para examinar la especificidad de unión. Todos los pasos de incubación se realizaron a temperatura ambiente.

Tras la preparación de la mezcla proteica, se procede a realizar la técnica de electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). En primer lugar, se mezclaron la muestra y el control negativo con la cantidad pertinente de tampón Laemmli concentrado [2-mercaptoetanol al 0,1% (v/v), glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v) en Tris [tris(hidroximetil)aminometano] /HCl 63 mM (pH 6,8) con trazas de azul de bromofenol], y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 min. De este modo, se consigue desnaturalizar las proteínas de la muestra gracias a la acción del tampón Laemmli sin tener que pasar por el calentamiento previo de las muestras, lo cual podría provocar alteraciones en la unión del inhibidor enzimático. A continuación, se emplearon geles SDS-PAGE al 10% prefabricados (*Mini-PROTEAN® TGXTM*, Bio-Rad) para correr las muestras y el marcador de peso molecular (PM) (*Precision Plus Protein™ WesternCTM Standards*, Bio-Rad). La separación de las proteínas se realizó en tampón de corrido (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v)) en una fuente vertical de electroforesis *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Bio-Rad), a un potencial en cadena en dos fases: I) 80 V por

10 min; II) 180V por 45 min. Una vez parada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (*Immuno Blot® PVDF Membrane*, Bio-Rad) tras activarla por incubación en metanol, mediante el sistema de electrotransferencia en semiseco *Trans- Blot® Turbo™ Transfer Starter System* (Bio-Rad). Las condiciones de transferencia fueron 12 min a una intensidad de 1,3 A en tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% (p/v) y metanol 20% (v/v)].

Se realizaron 3 lavados de la membrana de 5 min cada uno en tampón Tris salino [Tris 0,05 M y NaCl 0,15 M, a pH 7,5 con HCl (TBS)] con Tween®-20 al 0,05% (v/v) (TBS-T). Acto seguido, se incubó por 1 h en una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y BSA al 2% (p/v) en TBS-T para bloquear las uniones inespecíficas. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en agitación a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo la membrana con TBS-T durante 5 min para eliminar apropiadamente el exceso de la solución bloqueante y se incubó por 1 h en 2,5 µg / ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich®), a una dilución 1/1.000 en TBS-T. Finalmente, la membrana se lavó con TBS-T por 3 veces seguido de un último lavado con TBS previo al paso de revelado mediante reacción colorimétrica con el escáner *Opti-4CN Substrate Kit* (Bio-Rad), según las indicaciones facilitadas por el fabricante. Este kit comercial está basado en la capacidad de la peroxidasa de catalizar la oxidación del 4-cloronaftol en presencia de H₂O₂, formando un precipitado visible de color oscuro. El revelado de la membrana se lleva a cabo en dos pasos de incubación: A) Solución sustrato durante 30 min (reacción colorimétrica); B) Agua destilada durante 15 min (parada de reacción).

2.3.4. WESTERN BLOT CATEPSINA L

Tras confirmar la presencia catepsina L en los ESPs de *E. caproni*, se utilizaron anticuerpos anti-catepsina L heterólogos para el desarrollo de estudios mediante la técnica *Western blot*. Se cargaron 15 µg de antígenos por pocillo en gel monodimensional SDS-PAGE al 10%, se sometieron a electroforesis y después, se transfirieron a una membrana de PVDF, siguiendo las indicaciones del apartado anterior. A continuación, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y BSA al 2% (p/v) por 2 h, seguido de un lavado de 5 min en TBS-T y un periodo de incubación de 1 h con el anticuerpo primario seleccionado a una dilución 1/100 en TBS-T. Como anticuerpos primarios se emplearon tres anticuerpos anti-catepsina L aislados de tres especies distintas de trematodos: (i) anti-catepsina L de ratón frente a *Diplostomum pseudospathaceum* (Monogenea), producido por el grupo del Dr. Libor Mikeš [Univerzita Karlova v Praze (Praga)] (Mike & Man, 2003); (ii) anti-catepsina L de rata frente a *Fascioloides magna* (Digenea), producido por el grupo del Dr. Martin Kašný [Univerzita Karlova v Praze (Praga)] (no publicado); y (iii) anti-catepsina L de oveja frente a *Fasciola hepatica* (Digenea), producido por el grupo del Profesor John Dalton [Queen's University Belfast] (Piacenza *et al.*, 1999). Los controles negativos se obtuvieron del mismo modo, incubando con suero no inmunizado de ratón, rata y oveja, respectivamente. Seguidamente, las membranas se lavaron por 3 veces durante 5 min con TBS-T antes de ser incubadas con el anticuerpo secundario pertinente durante 1 h a dilución 1/1.000 en TBS-T. Como anticuerpos secundarios conjugados con HRP se seleccionaron: (i) anti-IgG de ratón, producido en conejo (Sigma-Aldrich®); (ii) anti-IgG de rata, producido en cabra (Alpha Diagnostic Intl. Inc.); y (iii) anti-IgG de oveja, producido en burro (Sigma-Aldrich®). Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en agitación. Por último, las membranas se revelaron con *Opti-4CN Substrate Kit* de Bio-Rad (véase 2.3.3. SDS-PAGE Y BLOTTING CON DCG-04) tras realizar los lavados oportunos.

2.3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L

Para realizar el protocolo de inmunohistoquímica para la localización de catepsina L, se fijaron adultos de *E. caproni* en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y seguidamente, se realizaron secciones de los adultos de 4 μm de espesor. En primer lugar, los cortes se incubaron a una temperatura de 55°C durante 30 min en estufa para eliminar la parafina presente del tejido y se rehidrataron mediante una cadena de alcoholes que constaba de los siguientes pasos: Xilol durante 5 min por 2 veces; etanol 100° durante 5 min por una vez; etanol 96° durante 5 min por una vez; etanol 70° durante 5 min por una vez; y finalmente, agua destilada durante 1 minuto en agitación.

Tras pasar por el protocolo de rehidratación, los cortes histológicos se incubaron en solución de bloqueo durante 1h y 30 min (BSA al 5% (p/v) en TBS-T) y se lavaron en TBS por 5 min. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en agitación a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución 1/50 en TBS durante 1 h y 30 min. Como anticuerpo primario anti-catepsina L, se empleó el mismo anticuerpo de *F. hepatica* utilizado en los estudios de *Western blot*. Los controles negativos se prepararon a partir de suero no inmune de oveja para configurar posteriormente, los parámetros de adquisición de imagen. Después, las secciones se lavaron en TBS durante 5 min por 3 veces y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG-FITC anti-oveja de burro (Sigma-Aldrich) diluido 1/200 en TBS en oscuridad. En último lugar, los cortes se lavaron en TBS, siguiendo la metodología ya descrita, y se montaron con glicerina 1:1 (v/v) en agua destilada para su posterior examen bajo microscopio de fluorescencia Olympus *BX51* acoplado a una cámara digital que permite la captura de imágenes. Se utilizaron los controles negativos para detectar el posible marcaje inespecífico y autofluorescencia producida por algunas de las estructuras

del verme, así como para ajustar los parámetros de ganancia y tiempo de exposición para la captura de imágenes. De este modo, conseguimos ajustar los parámetros a unos valores en los que la fluorescencia de la imagen para el control negativo fuese nula, de modo que el ruido de fondo de las secciones de interés fue eliminado y nos permitió detectar únicamente, el marcaje específico presente en las secciones incubadas con el anticuerpo seleccionado.

2.3.6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD PEPTIDASA DE LOS ESPs FRENTE A INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN

2.3.6.1. INCUBACIÓN DE ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI* CON INHIBIDORES DE PEPTIDASAS

Se emplearon inhibidores de cisteín-peptidasas para estudiar la actividad ejercida por las catepsinas en la degradación de los anticuerpos unidos a superficie. Para ello, se recolectaron adultos del íleon de 5 ratones infectados con *E. caproni* a las 4 semanas post-infección y se incubaron *in vitro* dos adultos pertenecientes a cada ratón, en presencia o ausencia de los inhibidores de peptidasas elegidos para el presente estudio. Estas incubaciones se realizaron en un medio de cultivo RPMI GlutaMAX (Gibco, Life Technologies), suplementado con 100 U de penicilina, 100 mg / ml de estreptomycin durante 3 h a una temperatura de 37°C y agitación horizontal suave. Los inhibidores de peptidasas seleccionados fueron: (i) cóctel inhibidor de peptidasas (PIC) cOplete-mini, libre de EDTA (Roche), inhibidor reversible/irreversible de amplio espectro de serín-proteasas y cisteín-proteasas; (ii) E-64 [N-trans- (epoxisuccinil) -L-leucina 4-guanidinobutilamida], inhibidor irreversible de amplio espectro de cisteín-peptidasas; (iii) iCL (Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂), inhibidor reversible de catepsina L; (iv) CA-074 [N- (L-3-

transpropilcarbamoiloxirano-2-carbonil) -Ile-Pro-OH], inhibidor irreversible de la catepsina B. La concentración a la que se utilizaron estos inhibidores fue de 100 μM , en el caso de E-64, iCL y CA-074 (todos pertenecientes a Sigma-Aldrich) y el PIC se diluyó a una concentración de trabajo 1X según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Adicionalmente, se aislaron otros 4 vermes adultos por ratón de los cuales, 2 fueron incubados durante 3 h en medio de incubación RPMI en ausencia de inhibidor, y otros 2 se fijaron rápidamente tras ser aislados del intestino sin pasar previamente por medio de incubación y se emplearon como controles a tiempo cero para su posterior examen. Tras el periodo de incubación, los vermes adultos se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% y se analizaron por inmunofluorescencia doble indirecta. Esta aproximación experimental se llevó a cabo en dos ocasiones definidas por: (i) adultos incubados con los inhibidores E-64 o PIC, respectivamente; (ii) adultos incubados con todos los inhibidores anteriormente descritos, de manera individualizada.

2.3.6.2. ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE INDIRECTA

Los adultos de *E. caproni* incubados con las diferentes condiciones de inhibidores, se sometieron a inmunofluorescencia doble indirecta siguiendo el protocolo descrito por Cortés *et al.*, (2017b). Resumidamente, los adultos fijados en PFA al 4% se incubaron en una solución de BSA al 5% en PBS durante 1h para bloquear las uniones inespecíficas. Seguidamente, se incubaron durante 1h 30 min en una solución compuesta por dos anticuerpos primarios distintos: i) suero de conejo frente a ESP de *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2008; Marcilla *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2016a) y ii) suero de cabra frente a IgG de ratón (Nordic) o suero de cabra frente a IgA de ratón (Jackson ImmunoResearch) ambos conjugados con HRP a una dilución de trabajo 1/50 en PBS. Se realizaron las combinaciones del anticuerpo anti-ESP de *E. caproni* con los anticuerpos anti-IgG y anti-IgA de ratón para

comprobar que la tinción de los parásitos se produce de manera independiente a los isotipos de inmunoglobulinas y, por tanto, distintos isotipos de inmunoglobulinas presentan el mismo patrón en el proceso de captura de anticuerpos.

Tras realizar el lavado de los parásitos adultos por 3 veces durante 10 min en PBS, se incubaron por 1h con 2 anticuerpos secundarios al mismo tiempo: (i) IgG de cabra frente a conejo conjugado con Alexa Fluor 647, que marcó los anticuerpos de conejos unidos de manera específica a los ESPs del parásito del paso previo; (ii) anti-HRP de cabra conjugado con FITC, marcando los anticuerpos de cabra conjugados con HRP unidos a las inmunoglobulinas de ratón (todos los anticuerpos de Jackson ImmunoResearch), cada uno de ellos preparados a una dilución 1/250 en PBS. En última instancia, los vermes adultos se lavaron en agitación suave con PBS a temperatura ambiente antes de proceder al análisis de imagen. Asimismo, se realizaron controles negativos para ajustar los parámetros iniciales de adquisición de imagen, los cuales, no fueron incubados con los anticuerpos primarios permitiendo de este modo, eliminar la señal emitida por marcaje inespecífico. Los adultos de *E. caproni* se obtuvieron a partir de varios ratones infectados experimentalmente y se asignaron por parejas de manera aleatoria a cada una de las condiciones experimentales (incubación con los diferentes inhibidores de proteasas), empleando un total de 10 ejemplares adultos de cada ratón. Tras la toma de imágenes, se procedió a su análisis mediante los softwares FV10-ASW 4.2 e Imaris.

Se tomaron micrografías confocales de los adultos de *E. caproni* a lo largo del eje Z a una magnitud de 400X desde la base de las espinas del parásito hasta la punta de las mismas para obtener una proyección completa del área analizada. La degradación de los anticuerpos unidos a la superficie durante las diferentes condiciones de cultivo *in vitro* se calculó mediante el porcentaje de área cubierta (AC) del parásito por el marcaje de cada uno de los fluorocromos empleados (FITC o Alexa Fluor 647) con el software ImageJ (Cortés *et al.*, 2017b). Este software nos

permite convertir las imágenes obtenidas por confocal en imágenes binarias (blanco y negro) y analizarlas para cada fluorocromo de manera independiente. La densidad integrada sin procesar (RawIntDen), que es la suma de los valores de todos los píxeles de la imagen, se midió y se utilizó para calcular el porcentaje de área cubierta por el marcaje fluorescente (% AC) de acuerdo con la siguiente fórmula, en la que 255 es el valor de densidad de un píxel positivo (marcado) en la imagen binaria y las áreas se expresan en píxeles:

$$\% \text{ AC} = \frac{\text{RawIntDen}/255}{\text{Área total}} \times 100$$

2.3.6.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE CATEPSINAS FRENTE A INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN

Se empleó suero de ratón purificado para obtener pruebas que constataran la capacidad de las proteasas presentes en los ESPs, de degradar los anticuerpos de los hospedadores definitivos. Los sueros de ratones utilizados no necesitaron ningún tratamiento previo a la purificación de anticuerpos. Este proceso se llevó a cabo mediante el kit *Nab Protein L Aspin* (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se prepararon soluciones de inmunoglobulinas purificadas y ESPs a razón ESP: Ig 25 µg/15 µg eluídas en RPMI. A estas soluciones se les añadieron de manera individual, cada uno de los inhibidores de peptidasas (E-64, iCL, CA-074 y PIC) a una concentración 100 µM y se incubaron a 37°C durante 3 h en agitación suave. Como control negativo, se preparó una quinta solución ESPs y anticuerpos purificados en ausencia de inhibidor. Todas las soluciones fueron preparadas por duplicado obteniendo un total de 10 soluciones. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membrana PVDF mediante *Western blot* como se

ha detallado previamente. Seguidamente, las membranas se lavaron con TBS-T durante 5 min por una vez y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con HRP pertinente [IgG anti-ratón de conejo (Sigma-Aldrich) e IgA anti-ratón de cabra (Nordic Mubio)]. Los pasos de incubación se realizaron a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min antes de ser reveladas con el kit de sustrato *Opti-4CN* (Bio-Rad).

2.4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN RATONES INFECTADOS POR *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN PRESENCIA DE IL-25

Con la finalidad de identificar las proteínas que se encuentran involucradas en el desarrollo de los mecanismos de resistencia en presencia de IL-25, se estudiaron los cambios proteicos producidos a nivel del íleon de ratones infectados por *E. caproni* e inoculados con rIL-25. Estas modificaciones proteicas se analizaron mediante la técnica 2D-DIGE (electroforesis diferencial en geles bidimensionales).

2.4.1. AISLAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para llevar a cabo el análisis de las modificaciones proteicas producidas en el íleon de ratones infectados con *E. caproni* en presencia de rIL-25, se aislaron las células del epitelio intestinal y a partir de las mismas, se obtuvo una solución compleja de proteínas mediante un proceso de lisis.

En el presente estudio, se emplearon un total de 12 ratones que se agruparon de manera aleatoria en 4 grupos de 3 animales cada uno. Los ratones pertenecientes al primer grupo se infectaron con 50 metacercarias de *E. caproni*. Los animales del segundo grupo se trataron con una dosis de rIL-25 (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.) por vía intraperitoneal a una concentración de 0,2 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ en PBS durante los 4 días anteriores a la inducción de la infección con *E. caproni* como se describió previamente. El tercer grupo de animales se sometió únicamente, a tratamiento con rIL-25 como se indica anteriormente y se emplearon como controles de la inoculación de rIL-25. Los 3 ratones restantes se utilizaron como grupo control y no se trataron con rIL-25 ni se expusieron a las metacercarias de *E. caproni*. Todos los animales se sacrificaron dos semanas después de la inducción de la infección con *E. carponi*. Durante el periodo de estabulación, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alimentación y bebida *ad libitum*.

2.4.1.1. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO INTESTINAL

Para el aislamiento de las células del epitelio intestinal, todos los animales experimentales se diseccionaron para recuperar la porción del íleon del intestino delgado. Una vez aislado, se procedió a la extracción de las células epiteliales intestinales mediante el método descrito por Hansson *et al.* (2011), aplicando ciertas modificaciones.

Los segmentos de intestino se depositaron en una placa Petri y se abrieron longitudinalmente con ayuda de unas pinzas y tijeras de disección. En los animales infectados, se recuperaron cuidadosamente los vermes de *E. caproni* anclados a las paredes intestinales con ayuda de un pincel. Seguidamente, los segmentos intestinales se pasaron a tubos falcons de 50 ml y se realizaron varias rondas de lavado con una solución tampón, mantenida a 4°C en hielo, formada por HBSS

(solución salina equilibrada de Hank) (Life Technologies™) enriquecida con FCS (suero de ternera fetal) al 2% (v/v) inactivado por calor. La solución salina HBSS es un medio de cultivo líquido compuesto por glucosa y numerosas sales inorgánicas (CaCl₂ anhidro, 140,0 mg/l; MgCl₂-6H₂O, 100,0 mg/l; MgSO₄-7H₂O, 100,0 mg/l; KCl, 400,0 mg/l; KH₂PO₄, 60,0 mg/l; NaHCO₃, 350,0 mg/l; NaCl, 8.000,0 mg/l; Na₂HPO₄ anhidro, 48,0 mg/l; y D-Glucosa, 1.000,0 mg/l) que proporciona un pH estable y permite mantener el equilibrio osmótico en tejidos y suspensiones celulares. Se realizaron al menos, 4 lavados de 3 min en 45 mL de solución HBSS en hielo y agitación vigorosa, hasta que el sobrenadante quedaba claro.

Una vez se obtuvo un sobrenadante claro, se procedió a cortar el intestino en segmentos de 1 cm de longitud aproximadamente, y se introdujeron en nuevos tubos falcons que contenían 20 ml de un tampón de disociación (HBSS con FCS al 10% (v/v), EDTA 1mM, DTT 1mM y antibióticos: 100 U de penicilina y 10 µg/ml de estreptomycin). Seguidamente, se incubaron en estufa a 37°C durante 20 min, en agitación horizontal. El sobrenadante obtenido tras la incubación se transfirió a un nuevo falcon y se dejó en hielo. Se añadieron de nuevo otros 20 mL de tampón de disociación al falcon que contenía el tejido y se repitió el paso de incubación. Después, se eliminaron los segmentos de intestino y se pasó todo el sobrenadante por un filtro de células de 100 nm, para retener las partículas de mayor calibre y disponer solamente de la suspensión celular. Una vez filtrado, se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C y se lavó por 3 veces en PBS bajo las mismas condiciones de centrifugación para retener cualquier residuo. Por último, el sobrenadante se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur y las células se resuspendieron en 2 ml de PBS a 4°C.

2.4.1.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ÍLEON

La lisis celular y la extracción de proteínas se realizó con el reactivo *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.), según las indicaciones facilitadas por el fabricante. El reactivo *M-Per* se encuentra formulado a base de un detergente no desnaturalizante capaz de disolver las membranas celulares, facilitando de este modo, la extracción de las proteínas solubles. Para ello, la suspensión de células epiteliales intestinales se transfirió a un falcon de 15 ml y se lavó por 2 veces por centrifugación a 250 g durante 5 min en 2 ml de PBS a 4°C. Seguidamente, con una pipeta Pasteur se eliminó el PBS y se incorporó el reactivo de lisis, en una proporción 20:1 (v/v) con respecto al volumen del *pellet* celular, e inhibidor de proteasas [*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail* (Thermo Scientific)] a la concentración correspondiente. Esta solución se incubó durante 20 min en agitación por vórtex a temperatura ambiente y a continuación, se centrifugó a 18.000 g por 15 min a 4°C, para que el lisado quedara claro. Por último, el sobrenadante obtenido se pasó a tubos eppendorf de 2 ml y las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de uso.

2.4.2. CUANTIFICACIÓN Y MARCAJE DE PROTEÍNAS

Las diferencias encontradas en el perfil proteómico arrojado por los diferentes grupos experimentales, se analizaron mediante 2D-DIGE utilizando 4 réplicas biológicas por grupo experimental, con la finalidad de incrementar el significado biológico y evitar conclusiones erróneas relativas a variaciones individuales. En concreto, tres réplicas correspondían individualmente a cada animal del grupo y la cuarta réplica se obtuvo por la mezcla de las tres réplicas anteriores añadiendo la misma cantidad de proteína de cada una de ellas (20 µg /

muestra) para aumentar el poder del análisis (Muñoz-Antoli *et al.*, 2014). Por último, dicha mezcla homogenizada fue cuantificada nuevamente antes de realizar el marcaje de las proteínas.

2.4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas de las muestras individuales y de las muestras mezcladas, se cuantificaron mediante el ensayo de proteínas *RC-DC* (Bio-Rad, Hercules, EE. UU), basado en el método descrito por Lowry *et al.* (1951). En este método colorimétrico se producen dos reacciones consecutivas: (i) reacción de las proteínas con iones Cu^{2+} en medio alcalino, pasando a cobre reducido Cu^+ , por la formación de un complejo de coordinación entre éste y el nitrógeno de las proteínas; (ii) oxidación de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano, catalizada por el Cu^+ , y reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdotúngstico) que genera un complejo azul oscuro medible por espectrofotometría y que tiene diferente intensidad según la concentración de proteínas presente en la muestra.

La reacción de cuantificación se llevó a cabo según las indicaciones facilitadas por el fabricante. La absorbancia de reacción se midió a una longitud de onda de 750 nm y la concentración de proteínas en las muestras se extrapolaron a partir de una recta patrón realizada con BSA bajo las mismas condiciones.

2.4.2.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Tras cuantificar la concentración de proteínas, se precipitaron 50 μg de cada réplica biológica con el kit *2-D Clean-Up* (GE Healthcare). Además, este kit permite deshacernos de los compuestos y sustancias contaminantes presentes en las

muestras tales como detergentes, sales, lípidos, compuestos fenólicos y ácidos nucleicos los cuales, pueden producir problemas de interferencia en la electroforesis.

La precipitación se realizó según las instrucciones del fabricante. En resumen, se prepara un eppendorf en el que se añade el volumen de muestra necesario para contar con 50 µg de proteína y 300 µl del agente precipitante suministrado en el kit. La muestra homogenizada se incuba a 4°C durante 15 min y se vuelve añadir de nuevo 300 µl de coprecipitante, se mezcla bien mediante vórtex y se centrifuga a 16.000 g durante 5 min. Rápidamente, se elimina el sobrenadante antes de que se produzca la resuspensión de las proteínas en el líquido de precipitación. Se añaden 40 µl de coprecipitante al *pellet* obtenido y se mantiene en hielo durante 5 min antes de ser centrifugando de nuevo con las mismas condiciones anteriormente descritas. En el eppendorf que contiene el precipitado se añade 25 µl de agua desionizada, 1 ml de tampón de lavado y 5 µl de aditivo de lavado. A continuación, el precipitado resultante se incuba durante 30 min a -20°C y se agitan con *vortex* cada 10 min. Finalmente, se centrifuga a 16.000 g por 5 min, se desecha todo el sobrenadante posible asegurándonos que no retiramos nada de *pellet* y se deja secar a temperatura ambiente antes de resuspenderlo en el tampón correspondiente.

2.4.2.3. MARCAJE DE PROTEÍNAS

El kit utilizado para el marcaje de las proteínas fue *AmershamTM CyDye DIGE Fluor, minimal dye, labeling kit* (GE Helathcare). Los fluoróforos proporcionados por este kit se caracterizan por presentan un grupo éster N-hidroxisuccinamida que les permite unirse mediante enlace covalente de tipo amida al grupo amino ε de los residuos de lisina (Lys). El paso limitante de la reacción de marcaje viene dado por la cantidad añadida de fluoróforo asegurando de este modo,

que el marcaje fluorescente se une en torno al 1-2% de Lys disponibles y, por tanto, a un solo residuo de Lys por molécula de proteína. Asimismo, estos fluorocromos presentan un PM de 500 Da y una carga +1, la cual sustituye a la carga +1 de Lys tras la formación del enlace amida, reduciendo los cambios en el PM y punto isoelectrico (pI) de las proteínas marcadas.

Antes de proceder al marcaje de las muestras, los fluoróforos *CyDyeTM* se reconstituyeron con dimetilformamida siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad de 50 µg de cada réplica biológica, se ajustaron a 18 µl de volumen final por adición de tampón de marcaje (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v) y Tris 25 mM, pH 8,5) y 1 µl de fluoróforo Cy3 o Cy5 400 pmol. Las muestras se mantuvieron por 30 min en hielo en oscuridad y, seguidamente, se añadió 1 µl de la disolución de parada compuesta por Lys 10 mM. Se empleó el fluoróforo Cy2 para marcar los estándares internos, formados por la mezcla de la misma cantidad de proteína de todas las muestras que conforman el experimento.

2.4.3. ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)

Con la finalidad de analizar el efecto de IL-25 en el curso de la infección por *E. caproni*, se compararon extractos de proteínas ileales de ratones pertenecientes a los cuatro grupos experimentales comentados anteriormente: (i) infectados con *E. caproni*; (ii) tratados con rIL-25 e infectados; (iii) tratados con rIL-25; (iv) controles. Asimismo, se llevaron a cabo 2D-DIGE para estudiar los cambios producidos en la expresión de proteínas intestinales. Estos ensayos tuvieron lugar en la Unitat de Proteòmica del SCSIE y fueron supervisados por la Dra. Laura Cantero Salazar.

2.4.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS GELES 2D-DIGE

La técnica 2D-DIGE permite la separación de las proteínas por electroforesis en dos dimensiones a partir de proteínas marcadas con fluoróforos *CyDyeTM* simplificando de este modo, los procesos de detección e identificación de proteínas además de permitir la diferenciación de hasta incluso tres muestras de proteínas pertenecientes a distintas condiciones experimentales, en el mismo gel.

Tras realizar el marcaje de las muestras con el fluoróforo correspondiente, las tres muestras se mezclan y se separan en la misma tira de isoelectroenfoque (IEE) y seguidamente, se realiza la electroforesis en gel SDS-PAGE. La ventaja que ofrece la posibilidad de correr diferentes muestras en el mismo gel es que se encuentran sometidas a idénticas condiciones de corrido tanto en la primera como en la segunda dimensión reduciéndose de este modo, la variabilidad experimental. Además, esto no compromete al posterior análisis de imagen ya que cada muestra viene marcada con un fluoróforo *CyDyeTM* que permite visualizarlas de manera independiente al seleccionar la longitud de onda de excitación y emisión del fluoróforo que queramos observar.

La separación de proteínas por el método 2D-DIGE permite reducir la cantidad de geles necesarios para obtener un mismo número de réplicas, eliminando de este modo, una de las variables experimentales más importante que se da en este tipo de experimentos. Asimismo, como se ha comentado previamente, para eliminar variaciones individuales de las propias muestras, se preparó una cuarta réplica biológica por grupo experimental mezclando la misma cantidad de proteína de las muestras proteicas de cada uno de los tres animales correspondientes a cada grupo. Por tanto, se pudo examinar 4 réplicas biológicas por grupo experimental.

Por otro lado, en los geles 2D-DIGE también se cuenta con un estándar interno, compuesto por la mezcla de las muestras que conforman el análisis. De este

modo, al correr el estándar interno podemos observar todas las proteínas presentes en cada muestra y en cada gel aumentando así, la reproducibilidad del experimento en cada gel y obtener unos resultados estadísticos con mayor confianza al comparar *spots* de geles diferentes.

En la **Tabla 2.2.** se resume el diseño experimental seguido, para la realización de los experimentos 2D-DIGE en muestras de proteínas intestinales aisladas de ratones infectados con *E. caproni* en presencia o ausencia de rIL-25 a las 2 spi, tratados con rIL-25 y control. Para minimizar las posibles diferencias ocasionadas por el marcaje con el fluoróforo, en cada caso, las 4 muestras de cada se marcaron indistintamente con los fluoróforos Cy3 o Cy5, mientras que el estándar interno se marcó siempre con Cy2.

2.4.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DIFERENCIAL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 2D

La electroforesis de los extractos proteicos marcados con los fluoróforos se llevó a cabo como se explica a continuación. En primer lugar, las proteínas se separaron en la primera dimensión en función de su pI a lo que se denomina IEE. Para ello, se utilizaron tiras con gradiente de pH inmovilizado (IPG) *Immobilized Dry Strips* (GE Healthcare) de 24 cm de longitud y pH no lineal de 3 a 11. Estas tiras se rehidrataron durante toda la noche con tampón urea 8M, CHAPS al 4% (p/v), anfolitos al 1% (v/v) y *DeStreakTM*, 12 µl/ml, como agente reductor (GE Healthcare, Merck, St. Louis, EE. UU). Las muestras marcadas se cargaron en las tiras en el extremo anódico, después de la adición de DTT 65mM y anfolitos 1% (v/v). El IEE se realizó a 20°C en el *Ettan Sistem IPGphor 3* (GE Healthcare), según las etapas que se describen a continuación: (I) 300 V durante 4 h; (II) gradiente lineal a

Tabla 2.2.- Diseño experimental del marcaje y ensayos 2D-DIGE

Réplicas biológicas por grupo experimental*

Infectados	Tratados rIL-25 + infección	Tratados rIL-25	Control
INF1	rIL25-INF1	rIL25-1	C1
INF2	rIL25-INF2	rIL25-2	C2
INF3	rIL25-INF3	rIL25-3	C3
Pool INF	Pool rIL25-INF	Pool rIL25	Pool C

Diseño experimental de cada gel

Número de gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	EI**	INF1	rIL25-INF1
2	EI	INF2	rIL25-INF2
3	EI	rIL25-INF3	INF3
4	EI	Pool rIL25-INF	Pool INF
5	EI	rIL25-1	C1
6	EI	rIL25-2	C2
7	EI	C3	rIL25-3
8	EI	Pool C	Pool rIL25

* Cada réplica biológica de cada grupo experimental está compuesta por la misma cantidad de proteínas.

** EI: Estándar Interno. Está compuesto por la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras sometidas a análisis 2D-DIGE.

Tabla 2.2.- Diseño experimental del marcaje de proteínas y ensayos en geles 2D-DIGE realizados a partir de muestras obtenidas de células epiteliales intestinales de ratones infectados con *E. caproni* (INF), tratados con recombinante de (r)IL-25 e infectados (rIL25-INF), tratados con rIL-25 (rIL25) y control (C).

1.000 V durante 6 h; (III) gradiente lineal hasta 8.000 V 3 h; y (IV) gradiente de 8.000 V hasta 32.000 Vh. Una vez enfocadas las muestras en la primera dimensión,

se equilibraron las tiras en 2 pasos de incubación de 15 min cada uno en tampón Tris 50 mM, urea 6 M, glicerol 30% (v/v) y SDS 2% (p/v), conteniendo DTT al 2% (p/v) (paso de reducción) o yodoacetamida al 2,5% (p/v) (alquilación de cisteína (Cys)), respectivamente. Por último, las proteínas se separaron en la segunda dimensión de acuerdo con su PM mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5% (25 cm x 21 cm x 1 mm), utilizando la solución tampón descrita previamente (véase Apartado 2.3.3 SDS-PAGE Y BLOTTING CON DCG-04.). Este paso se realizó en un sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare) aplicando las siguientes condiciones de corrido: 1 W/gel durante 1 h seguido de 15 W/gel a las 5 h, aproximadamente.

2.4.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES 2D-DIGE

Una vez finalizada la electroforesis 2D-DIGE, los geles se escanearon en el sistema *TyphoonTM 9400 Variable Mode Imager* (GE Healthcare), a las longitudes de onda de excitación/emisión apropiadas para cada fluoróforo a una resolución de 50 μm : Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (633/670 nm). La información redundante para el análisis diferencial de proteínas, tal como carril de carga, contornos de geles etc., se eliminó con el software *ImageQuant Tools* (GE Healthcare, Applied Biomics Inc., Hayward, EE.UU.) para el análisis cuantitativo de imágenes. Con el módulo *Difference In-Gel Analysis* (DIA) del software *DeCyderTM 2D Differential Analysis v7.0* (GE Healthcare), se procesaron los resultados obtenidos en las imágenes capturadas de los geles 2D-DIGE. El módulo DIA permite captar la imagen del estándar interno y de hasta dos muestras por gel para producir una única imagen por superposición de las imágenes obtenidas de cada muestra, a partir de la que se puede cuantificar e identificar los *spots* detectados. Esto es posible gracias a la aplicación de numerosos algoritmos que posibilitan la codetección de los fluoróforos *CyDyeTM* y generan como resultado, el

emparejamiento de los *spots* detectados en un gel, cuantifica la abundancia de cada *spot* en cada gel individual, normaliza la relación de volúmenes de cada *spot* de una muestra marcada con Cy3 o Cy5 con la señal Cy2 correspondiente al estándar interno y elimina la información innecesaria.

Para la realización del análisis estadístico de las proteínas detectadas en los geles, se emplearon los módulos *Biological Variation Analysis* (BVA) y *Extended Data Analysis* (EDA) del software previamente citado y se aplicó un filtro para que solo tuviera en cuenta aquellas proteínas que mostraban un 85% de presencia en todos los geles que formaban parte del experimento. El módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) permite solapar la información integrada en cada gel analizado y hace cálculo de las proporciones de volumen promedio (AVR) estandarizadas para cada *spot* de todos los geles que componen el estudio mostrando una imagen de referencia de los resultados bastante ajustada que debe ser posteriormente revisada y validada de manera manual para mayor seguridad. Este módulo, incluso nos facilita realizar numerosos test estadísticos de comparación entre grupos experimentales que permite dar valor estadístico a cada *spot* de manera individual. Los métodos estadísticos aplicados para el análisis de la expresión diferencial de proteínas entre grupos se describen posteriormente en el apartado 2.8.5.

2.4.5. TINCIÓN DE LOS GELES CON PLATA

Tras estudiar las diferencias encontradas en la expresión de proteínas en los 4 grupos experimentales comparados, se tiñeron todos los geles 2D-DIGE con plata para poder visualizar sin ayuda de ningún aparato, los *spots* de las proteínas. Esta tinción es ampliamente empleada para el estudio visual de los geles 2D-DIGE ya que facilita la visualización de los *spots* mediante el desarrollo de una técnica colorimétrica. Además, cuenta con la ventaja de ser una técnica con alta

sensibilidad, detectando una cantidad de proteína del orden de 10 ng, siendo compatible con el posterior análisis por espectrometría de masas. El principio de esta técnica está sujeto a la interacción y unión de iones de plata (Ag^+) del nitrato de plata (AgNO_3) (reactivo de tinción) con ciertos grupos funcionales de las proteínas. El ácido carboxílico, ácido glutámico y ácido aspártico son los grupos funcionales que generan las interacciones más fuertes, pero también se producen interacciones con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas, imidazol de las histidinas y amina de las lisinas. Una vez que se forma el enlace, el ion Ag^+ se reduce a plata metálica, generando un producto de reacción de color marrón oscuro en los *spots*. Además, existen kits comerciales con reactivos que incrementan la sensibilidad y especificidad de unión de Ag^+ y su reducción a plata metálica en el revelado aumentando de este modo, la coloración tomada por los *spots*. En este caso, la tinción con plata se llevó a cabo con el kit *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. En resumen, los geles se fijaron en una solución de etanol al 30% (v/v) durante una hora y seguidamente, se incubaron en ácido acético glacial al 10% (v/v), durante 1h en agitación. Después, se sensibilizaron los geles en una solución compuesta por etanol al 30% (v/v), tiosulfato de sodio al 0,2% (p/v) y acetato de sodio al 6,8% (p/v) durante 2h y se realizaron 5 lavados de 8 min en agua destilada. Para la tinción de los geles con plata, se empleó una solución de AgNO_3 al 0,25% (p/v) donde se incubaron durante 1 h. Previa a la reacción de revelado, los geles se lavaron 4 veces durante un minuto en agua destilada, se revelaron con una solución de carbonato sódico al 2,5% (p/v) y formaldehído al 0,03% (p/v), durante 2- 5 min y se paró la reacción con EDTA disódico hidratado al 1,46% (p/v). Finalmente, se lavaron de nuevo los geles por 2 veces durante 30 min y se mantuvieron en agua destilada hasta su análisis.

2.5. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN RATONES INFECTADOS POR *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN PRESENCIA DE IL-25

Tras realizar los análisis de expresión de proteínas en los diferentes grupos experimentales incluidos en el presente trabajo, se procedió a la identificación de aquellas proteínas de interés. En concreto, se seleccionaron proteínas que revelaron diferencias en los niveles de expresión de unos grupos con respecto a otros. Se realizaron las siguientes comparaciones entre grupos: (i) ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a infectados con *E. caproni*; (ii) ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a tratados con rIL-25; (iii) ratones tratados con rIL-25 frente a control.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la identificación de proteínas y se basa en la transformación de los analitos en moléculas ionizadas con el subsiguiente análisis de estos iones y los productos de fragmentación generados en función de las proporciones masa/carga (m/z). A día de hoy, se aplican diversas técnicas para la ionización y análisis de los mismos, ofreciendo diferentes clases de espectrómetros de masas por combinaciones de estas técnicas (Pitt, 2009). Concretamente, en este experimento se empleó la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de las proteínas.

2.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los *spots* de proteínas que mostraron diferencias significativas de abundancia entre grupos experimentales, fueron manualmente extraídos del gel y

sometidos a análisis de MS para su identificación. Las identificaciones se llevaron a cabo en la Unitat de Proteòmica del SCSIE bajo la supervisión de la Dra. Luz Valero.

Las proteínas de interés, fueron lavadas por dos veces en agua destilada y se redujeron en una solución de bicarbonato amónico (ABC) 100 mM con DTT 10 mM durante 30 min a 56 °C, alquiladas con yodoacetamida 55 mM en ABC 100 mM durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad y, por último, digeridas in-gel con tripsina (Promega, Madison, USA) en exceso a 37°C durante toda la noche, como se describió previamente (Shevchenko *et al.*, 2006). La digestión de proteínas se paró con ácido trifluoroacético (TFA) al 1% (v/v) y los péptidos se centrifugaron al vacío y se resuspendieron en 7 µl de 0,1% (v/v) TFA a pH 2.

2.5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)

Se realizó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de los *spots* seleccionados. En primer lugar, los *spots* se separaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La técnica HPLC se basa en la retención de los componentes de la muestra que están disueltos en la fase móvil, de manera diferente al pasar por la fase estacionaria y necesita ser ejecutada a elevada presión para lograr una velocidad adecuada de la fase móvil.

Se cargaron un total de 5 µl de la mezcla peptídica en una columna trampa NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 350 µm x 0,5 mm (Eksigent, AB Sciex, Old Connecticut Path, EE. UU.) y se desalaron con TFA al 0,1% (v/v) a un flujo de 3 µl/min durante 5 min. Seguidamente, los péptidos se cargaron en una columna

analítica LC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm x 12 cm (Nikkyo, Technos, Tokio, Japón) y se equilibraron con una solución de acetonitrilo (ACN) al 5% (v/v) y ácido fórmico (AF) al 0,1% (v/v). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal: 5-40% (v/v) de ACN al 0,1% (v/v) en AF 0,1% (v/v) durante 15 min a un flujo constante de 300 nl/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas híbrido, cuádruplo tiempo de vuelo, nanoESI QqTOF (5600 TripleTOF; AB Sciex, Old Connecticut Path, EE. UU.) operado en modo de adquisición dependiente de información. La muestra se ionizó aplicando 2,8 kV y se empleó nitrógeno como gas de colisión. La sensibilidad de la fuente se controló con 2 fmol de 6 proteínas de una mezcla comercial de proteínas digeridas con tripsina (LC Packings, Thermo Fisher Scientific, San Diego, EE.UU.). El análisis se llevó a cabo en un modo dependiente de los datos.

Para la adquisición de los resultados se llevó a cabo un barrido de los productos MS1 entre 350-1.250 m/z durante 250 ms, seguido de un barrido de los productos de ionización MS2 entre 100-1.500 m/z durante 50 ms, seleccionando el modo de “alta intensidad”. Se seleccionaron hasta 50 iones que cumplían los siguientes criterios: carga de 2+ a 5+ e intensidad mínima 70 cuentas por segundo (cps).

2.5.3. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

Las secuencias proteicas obtenidas tras realizar la técnica de separación LC-MS/MS, fueron analizadas para la identificación de proteínas mediante la comparación de estas secuencias frente a las disponibles en las bases de datos, aplicando diversos motores de búsqueda.

Las secuencias resultantes del análisis se enfrentaron a secuencias depositadas en la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information. Esta base de datos recoge la información de secuencias no idénticas procedentes de numerosas bases de datos diferentes tales como, PDB (Protein Data Bank), PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation), Swiss-Prot y traducción de secuencias codificantes depositadas en GenBank.

La carbamidometilación de Cys se definió como modificación fija, mientras que la oxidación de metionina (Met) y la deamidación de asparagina (Asn) y glutamina (Gln) se establecieron como modificaciones variables. La taxonomía se fijó en Metazoa.

La búsqueda en la base de datos se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda ProteinPilot v5.0. (AB Sciex). La búsqueda fue llevada a cabo con especificidad triptica, permitiendo una sola pérdida de sitio de corte, y con una tolerancia en la medición de la masa de 100 ppm en modo MS y de 0,8 Da para los iones MS/MS. Se emplearon los parámetros predeterminados de ProteinPilot para generar una lista directamente a partir de 5600 archivos TripleTof wiff y se utilizó el algoritmo Paragon de ProteinPilot v5.0 (Shilov *et al.*, 2007) para buscar en la base de datos de Uniprot (versión 01-2017; <https://www.uniprot.org>) con los siguientes parámetros: especificidad de tripsina; cys-alquilación; taxonomía restringida a ratones; y el esfuerzo de búsqueda establecido. Las identificaciones se consideraron correctas cuando al menos coincidían dos péptidos diferentes y la puntuación “Unused” arrojada por ProteinPilot era >1.3 . El parámetro “Unused”, es una medida de la confianza de que la proteína identificada corresponda con la proteína detectada en la muestra y se calcula a partir de la confianza del péptido para péptidos de espectro que no están aún completamente “usados” por las “proteínas ganadoras” de mayor puntuación. Por tanto, gracias a estos parámetros podemos identificar las proteínas con una confianza $\geq 95\%$. La información sobre la función de las proteínas identificadas se obtuvo mediante la base de datos Uniprot.

La agrupación de proteínas se realizó mediante el algoritmo de *Pro Group*. Un grupo de proteínas en un informe de *Pro Group* es un conjunto de proteínas que comparten alguna evidencia física. A diferencia de los análisis de alineación de secuencias en los que se comparan secuencias teóricas de longitud completa, la formación de grupos de proteínas en el *Pro Group* está guiada por completo únicamente por los péptidos observados. Dado que los péptidos observados se determinan realmente a partir de espectros adquiridos experimentalmente, se puede considerar que la agrupación está guiada por el uso de espectros. Por tanto, las regiones no observadas de la secuencia de proteínas no juegan ningún papel en la explicación de los datos.

2.6. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE LA RESPUESTA TH2 E IL-25 EN LA RESISTENCIA FRENTE A *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Estudios previos han revelado que la IL-25 es un factor crucial para la activación de las respuestas Th2 que promueven los mecanismos efectores (hiperplasia de las células mucossecretoras, hipercontractibilidad del músculo liso, expresión de RELM- β , mastocitosis intestinal, entre otros) responsables de la limitación de las infecciones producidas por helmintos (Cortés *et al.*, 2017a). En infecciones primarias por *E. caproni* en ratón, la susceptibilidad se encuentra asociada con bajos niveles de IL-25 mientras que, tras la cura de la infección con pzq, se produce un incremento en la expresión de IL-25 dando lugar al desarrollo de respuestas Th2 que impiden el establecimiento de infecciones secundarias (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b). En cambio, existen numerosas dudas acerca de la implicación de la IL-25 en la generación de esta resistencia. No se conoce muy bien si la participación de esta citoquina se limita a su capacidad de generar respuestas

Th2 o si se encuentra directamente involucrada en la activación de los mecanismos efectores responsables de la resistencia.

Con el fin de esclarecer el papel ejercido por la IL-25 y las respuestas Th2 en la generación de resistencia en ratones infectados por *E. caproni*, en la presente Tesis Doctoral se analiza las respuestas Th2 y los mecanismos efectores activados por las mismas en presencia de infección, así como, los factores determinantes de la producción de IL-25 y su implicación en la expulsión de los helmintos intestinales.

2.6.1. SENSIBILIZACIÓN DE LOS HOSPEDADORES CON ANTICUERPOS INOCULADOS INTRAPERITONEALMENTE

Para estudiar los mecanismos de acción de la IL-25 y las citoquinas propias de respuestas Th2 en infecciones con *E. caproni*, se inoculó por vía intraperitoneal diversos anticuerpos en diferentes aproximaciones experimentales. Los anticuerpos suministrados en los experimentos desarrollados fueron: (i) α -IL25 (anticuerpo monoclonal anti-IL-25) para neutralizar la IL-25 endógena producida en infecciones secundarias con *E. caproni*; (ii) rIL-4 o rIL-13 en infección primaria para analizar el desarrollo de la infección en presencia de citoquinas propias de respuestas Th2 y ausencia de niveles elevados de IL-25; (iii) α -RIL4 α (anticuerpo monoclonal anti-receptor IL-4) y rIL13R α s₂ (receptor IL-13 recombinante soluble) en presencia de infección primaria y rIL-25 para evaluar el desarrollo de la infección en un medio con niveles elevados de IL-25 y bloqueo de los receptores de las citoquinas de tipo 2 para impedir los mecanismos efectores mediados por las mismas.

A continuación, se explicará con más detalles, los procedimientos seguidos para el tratamiento de los animales con los anticuerpos anteriormente mencionados.

a) Administración intraperitoneal de α -IL25

Para bloquear la IL-25 endógena que se produce de manera inespecífica en el intestino de ratones tras la cura con pzq de una infección primaria por *E. caproni*, se inoculó por vía intraperitoneal, el anticuerpo α -IL25 (*LEAFTM Purified anti-mouse IL-25*, BioLegend) previamente a la inducción de una infección secundaria (véase apartado 3.3.1). A cada animal se le administró una dosis de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del anticuerpo α -IL25 8 h antes de la inducción de la infección secundaria.

b) Administración intraperitoneal de rIL-4 y rIL-13

Con el fin de estudiar el papel ejercido por las citoquinas características de las respuestas inmunitarias de tipo 2 (IL-4 e IL-13) en infección primaria con *E. caproni*, se inoculó por vía intraperitoneal rIL4 o rIL-13 (*Recombinant murine IL-13/IL-4*, Preprotech®) de manera independiente, en animales expuestos a infección primaria (véase apartado 3.3.1). La concentración a la que se administraron estas recombinantes fue de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en ambos casos, en un volumen final de 150 μL en PBS durante los primeros 4 días tras la inducción de la infección primaria.

c) Administración intraperitoneal de α -RIL4 α , rIL13R α s₂ y rIL-25

Para estudiar el papel desarrollado por la IL-25 en infección secundaria en presencia y/o ausencia de los mecanismos efectores mediados por la IL-13, bloqueamos la cadena IL4R α del receptor de esta citoquina mediante la inoculación intraperitoneal del anticuerpo α -RIL4 α (*LEAFTM Purified anti-mouse IL-4*, BioLegend®) y, además, inoculamos el receptor soluble rIL13R α s₂ (*Recombinant mouse IL13R α 2 Fc Chimera*, R&D Systems®) que actúa como silenciador de la

misma (véase apartado 3.3.1). Se administró una dosis diaria de $m\alpha$ -RIL4 α y rIL13R α s₂ a una concentración de 0,1 μ g/ μ L durante todo el experimento (6 días desde el comienzo del experimento, 3 días antes de la inducción de la infección). Asimismo, se inoculó rIL25 a una concentración de 0,2 μ g/ μ L desde el segundo día del comienzo del experimento hasta el momento del sacrificio. Todos los productos se administraron en un volumen final de 150 μ L en PBS.

2.6.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE MARCADORES HISTOLÓGICOS DE CÉLULAS INMUNITARIAS

Con la finalidad de evaluar cualitativamente y cuantitativamente varios marcadores histológicos característicos de las infecciones con *E. caproni*, se desarrollaron diferentes protocolos para la realización de tinciones histológicas generales y selectivas a partir de cortes de tejido intestinal de los hospedadores definitivos.

2.6.2.1. PREPARACIÓN CORTES HISTOLÓGICOS

Para la obtención de las preparaciones histológicas se cortaron segmentos de íleon, de 0,7-1 cm de longitud, a partir de ratones bajo diferentes condiciones experimentales en presencia y/o ausencia de infección por *E. caproni*. Los segmentos recuperados se fijaron mediante inmersión en formalina al 4% (v/v) y, una vez embebidos en parafina, se realizaron cortes seriados de 4 μ m de espesor que fueron inmediatamente fijados sobre portaobjetos ApexTM Superior Adhesive Slide (Leica Biosystems) y cubiertos por una sustancia adhesiva que incrementa la hidrofilia del tejido, proporcionando una cobertura más homogénea al someterse a tinciones con colorantes y reactivos acuosos.

2.6.2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL MARCAJE DE CÉLULAS TUFT E ILC2S GATA3+

Con el fin de analizar los cambios producidos en la expresión de células *tuft* e ILC2s GATA3+ en el epitelio intestinal de ratones infectados, tratados con pzq y sometidos a infección secundaria por *E. caproni*, se llevó a cabo inmunohistoquímica enzimática a partir de secciones de fleon correspondiente a las diferentes condiciones experimentales mencionadas. Se examinaron 5 preparaciones distintas por grupo experimental y 3 campos por preparación. En primer lugar, los cortes histológicos se desparafinaron a 60°C durante 20 min y se rehidrataron en una cadena de alcoholes que consistía en los siguientes pasos: 4 pasos en xileno de 5 min; 2 pasos en etanol 100° de 3 min; 2 pasos de etanol 90° de 3 min; 2 pasos de etanol 70° de 3 min. Para mejorar la detección de antígeno, los cortes histológicos fueron incubados en tampón de citrato de sodio 10 mM, previamente llevado a ebullición, durante 8 min en el microondas. Una vez enfriados, se mantuvieron bajo agua corriente durante 10 min y se lavaron en Tris Buffer Saline (TBS) + Triton X-100 al 0,1% y pH 7,6 por 2 veces durante 5 minutos en agitación. A continuación, las secciones se incubaron con Suero Normal de Cabra al 2,5% (Vector) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, las preparaciones se mantuvieron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a una dilución 1/1000 en TBS y BSA al 1%. Como anticuerpos primarios se emplearon: a-DCLK-1 (Abcam) para marcar las células *tuft* y a-GATA3+ (Abcam) en el caso de ILC2s GATA3+. Al día siguiente, para aumentar la especificidad de la técnica, los cortes fueron incubados en Dual Endogenous Enzyme Block (Dako) durante 10 min a temperatura ambiente con el fin de eliminar la autofluorescencia propia del tejido. Después, se incubaron con el anticuerpo secundario HRP-Policlonal Inmunoglobulinas de Cabra a-Conejo (Dako) a una dilución 1/1000 en TBS + Triton X-100 al 0,1% y BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 2 lavados de 5 min cada

uno con TBS + Triton X-100 al 0,1% en agitación suave. Se seleccionó Diaminobencidina (DAB) como cromógeno para revelar la reacción (*Liquid DAB + Substrate Chromogen System*, Dako). El tiempo de revelado debe ser controlado visualmente una vez que comienzan a aparecer precipitados marrones generados por la reacción de la DAB con el anticuerpo secundario HRP. Para parar la reacción de revelado las preparaciones se colocan bajo agua corriente del grifo.

2.6.2.3. INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA PARA LA LOCALIZACIÓN DE STAT6

Para confirmar el bloqueo efectivo de los mecanismos efectores desarrollados por la IL-13 en infecciones por *E. caproni*, se llevó a cabo la localización del factor de transcripción del RIL-13, conocido como STAT6, mediante inmunofluorescencia indirecta a partir de secciones de tejido intestinal ya que, cuando este factor está activo, se transloca desde el citoplasma hacia el núcleo celular y se fosforila. Las preparaciones embebidas en parafina fueron rehidratadas en una cadena de alcoholes de acuerdo a los siguientes pasos: 2 pasos en xileno de 5 min; 2 pasos en etanol 100° de 3 min; 2 pasos de etanol 90° de 3 min; 2 pasos de etanol 70° de 3 min y un paso final en agua corriente.

Como anticuerpos primarios, se emplearon α STAT6 para marcar el STAT6 citoplasmático y α STAT6p para marcar el STAT6 fosforilado (STAT6p) del núcleo (ThermoFisher Scientific, en ambos casos), los dos anticuerpos obtenidos de conejo. Se prepararon diluciones 1/200 y 1/20 para α STAT6 y α STAT6p respectivamente, en PBS con Triton X-100 al 0,3% y FCS al 10% y se incubaron durante 2 h. Todos los pasos de incubación se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente y agitación horizontal suave. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min y se incubaron durante 2 horas en oscuridad con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 647 (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 1/600 para α STAT6 y 1/100 para α STAT6p en el mismo buffer empleado anteriormente. A continuación, se realizó un lavado en PBS durante 5 minutos y se incubaron por 10 min con el fluoróforo de contraste para núcleos DAPI a dilución 1/1000 en PBS. Por último, las preparaciones se montaron sobre el medio de montaje acuoso Fluoromount (Sigma-Aldrich) previamente a ser analizadas bajo microscopio confocal. Se examinaron un total de 5 campos por preparación y 3 preparaciones por condición experimental.

2.6.2.4. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Tras obtener las secciones intestinales embebidas en parafina se realizaron tinciones histológicas, selectivas para el recuento de diferentes poblaciones celulares.

a) Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para la tinción con hematoxilina-eosina se emplearon secciones intestinales de ratones control, sometidos a infección primaria con *E. caproni* y tratados con pzq con la finalidad de estudiar las alteraciones inducidas por la infección en el tejido intestinal y analizar la regeneración del mismo tras la cura con pzq. Una vez en medio acuoso, los cortes se tiñeron con una solución de hematoxilina (Dako®) por inmersión durante 15 min y se lavaron en una cubeta con agua natural para eliminar el exceso de colorante. Seguidamente, se realizó un pase en HCl al 3,25% (v/v) en etanol absoluto por 2 segundos y se lavaron bajo agua corriente por 5 min antes de ser teñidas con eosina (Dako®) por inmersión durante 10 min. Por último, los cortes se sometieron a una cadena de deshidratación que constaba de los siguientes pasos: etanol 70° durante 3 min; etanol 96° durante 3 min; etanol 100° durante 3 min; y

paso final en xilol durante 5 min. Finalmente, se montaron con el medio de montaje para microscopía óptica *Eukitt* (Sigma-Aldrich®).

Los cortes histológicos y la tinción de las muestras se llevaron a cabo en la Secció de Microscòpia del SCSIE (Universitat de València).

b) Tinción con Azul Alcían

Antes de llevar a cabo la tinción de los cortes histológicos, se incubaron durante 30 min en estufa a 55°C para eliminar la parafina del tejido. Seguidamente, se hidrataron en una cadena de alcoholes que consistió en los siguientes pasos: 2 pasos en xilol de 5 min; 1 paso en etanol 100° de 5 min; 1 paso en etanol 96° de 5 min; 1 paso en etanol 70° de 5 min y 1 paso final en agua destilada de 1 min, en agitación. Para la tinción selectiva de células mucosecretoras se empleó el colorante azul alcían que, a pH 2,5, tiñe los mucopolisacáridos ácidos (sulfatados y carboxilados) presentes en estas células. El protocolo de tinción fue el siguiente: tras llevar las secciones a medio acuoso, se sumergieron durante 30 min en la solución colorante [azul alcían al 1% (p/v) en ácido acético glacial al 3% (v/v)] ajustada a un pH de 2,5. A continuación, se lavaron con agua destilada y se contrastaron tiñendo los núcleos celulares con rojo nuclear al 1% (p/v) durante 1 min y se lavaron de nuevo con agua destilada. Una vez teñidas, se sometieron a una cadena de deshidratación y se montaron tal y como se describen en el apartado anterior.

Tanto los cortes histológicos como la tinción de las muestras, se realizaron en la Secció de Microscòpia del SCSIE (Universitat de València).

c) Tinción con Hematoxilina modificada de Mayer's

La Hematoxilina modificada de Mayer's es un reactivo de tinción histológica utilizado para visualizar los núcleos en cortes de tejido. Este producto es apropiado para su uso con todos los cromógenos habitualmente aplicados en inmunohistoquímica. Por ello, este reactivo se empleó para contrastar las preparaciones sometidas a inmunohistoquímica para el recuento de células *tuft* e ILC2s. Una vez que se revelaron las preparaciones con DAB, se realizó un pase por Hematoxilina modificada de Mayer's (Dako) y se deshidrataron en una cadena de alcoholes del siguiente modo: 1 paso en Scott running tap water de 30 segundos; 2 pasos en etanol 90° de 30 segundos; 2 pasos en etanol 100° de 3 min; 2 pasos en xileno de 3 min. Finalmente, se montaron en medio líquido DPX para su posterior análisis en microscopio óptico a una magnitud de 200 aumentos. Estas poblaciones celulares se analizaron en 10 campos por preparación y 3 preparaciones por condición experimental elegidas al azar.

Los cortes histológicos se realizaron con ayuda de un microtomo manual (Leica) y fueron teñidos en el Laboratorio del Prof. Rick Maizels de la Universidad de Glasgow durante la estancia realizada en el *Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology*.

2.6.2.5. RECUENTO CELULAR

Con el fin de evaluar las modificaciones producidas en ciertas poblaciones celulares de interés histopatológico e inmunopatológico en infecciones causadas por *E. caproni*, se llevó a cabo el recuento de células mucossecretoras, células *tuft* e ILC2s GATA3+ en secciones de tejido intestinal en diferentes condiciones experimentales. Se analizó cuantitativamente las poblaciones de células mucossecretoras presentes en el tejido intestinal de ratones infectados por *E. caproni*

en presencia de rIL-4 o rIL-13 con el fin de estudiar los mecanismos efectores mediados por las citoquinas Th2 y el desarrollo de resistencias. Asimismo, se estudiaron las células *tuft* e ILC2s GATA3+ en animales sometidos a infección primaria, tratados con pzq e infección secundaria por *E. caproni*. Para cada condición experimental de las dos aproximaciones desarrolladas, se sacrificaron un total de 5 ratones y se realizaron secciones de la porción del íleon de aproximadamente 0,7 cm de longitud y se fijaron en PFA al 4%. Tras incrustar las secciones en parafina, se obtuvieron cortes seriados de 4 µm de espesor de cada muestra. En el caso de las células mucossecretoras, se procedió a la tinción con azul alcian. El recuento de células se calculó como número de células mucossecretoras por unidad de cripta analizadas sobre 10 campos aleatorios por muestra a una magnitud de 400x bajo microscopio óptico. Por otro lado, para el recuento de células *tuft* e ILC2s GATA3+, una vez obtenidos los cortes, se realizó inmunohistoquímica enzimática revelada con DAB y finalmente, las secciones se contrastaron con Hematoxilina modificada de Mayer's. para su análisis en microscopio. El recuento de estas poblaciones celulares se realizó sobre 10 campos por muestra elegidos al azar y examinados a una magnitud de 200x bajo microscopio óptico.

2.6.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN DE IL-25

2.6.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN EN HECES

Para el desarrollo de varios estudios contenidos en el presente trabajo, se realizó la extracción del ADN de muestras fecales de ratón mediante el empleo del kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen), que permite una purificación rápida de ADN genómico de alta calidad (humano y bacteriano) a partir de muestras de

heces frescas o congeladas. El tampón InhibitEX reemplaza y elimina de manera eficiente los inhibidores de PCR comúnmente presentes en las muestras de heces.

El procedimiento de extracción de ADN a partir de heces se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el protocolo consta de los siguientes pasos: (i) se pesa 200 mgr de heces en eppendorf de 2 mL y se deja en hielo; (ii) se añade 1mL del buffer InhibitEX y se da vortex hasta que la solución quede homogénea; (iii) se calienta la suspensión durante 5 min a 70°C en agitación y seguidamente, se centrifuga por 1 min; (iv) se pasan 200 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior a un eppendorf de 1,5 mL y se añade 15 µl de Proteinasa K; (v) se añaden 200 µl de Buffer AL y se da vortex durante 15 s; (vi) se incuba a 70°C durante 10 min y posteriormente, se añade 200 µl de etanol absoluto al lisado y se mezcla por vortex; (vii) se aplica 600 µl del lisado del paso anterior a la columna de unión de ADN y se centrifuga durante 1 min (repetiendo este paso hasta filtrar todo el lisado); (viii) se añade 500 µl del Buffer AW1 a la columna y se centrifuga durante 1 min; (ix) se añaden 500 µl del Buffer AW2 a la columna y se centrifuga durante 3 min por 2 veces; (x) se transfiere la columna a un eppendorf de 1,5 mL y se añade 50 µl del buffer de elución ATE directamente sobre la membrana; (xi) se incuba durante 1 min a temperatura ambiente y seguidamente, se centrifuga durante otro minuto. Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a temperatura ambiente y 20.000 g. Finalmente, la concentración de ADN en las muestras fue determinada por fluorometría con Qubit™ 2.0 (Life Technology, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y a continuación, se guardaron a -20°C hasta su empleo en el análisis de PCRrt del gen ARNr 16S o secuenciación masiva.

2.6.3.2. PRODUCCIÓN DE DISBACTERIOSIS EN RATONES

Para analizar los efectos generados por la microbiota residente en el intestino de ratones sobre la producción de IL-25 en respuestas de resistencia frente

a infecciones con *E. caproni*, estos animales fueron sometidos a disbacteriosis mediante la administración de un cóctel de antibióticos en agua de bebida. Los ratones recibieron agua potable en régimen *ad libitum* que contenía ampicilina (1,0 g / l), metronidazol (1,0 g /L), neomicina (1,0 g / l) y vancomicina (0,5 g / l) (todos de Sigma excepto metronidazol que fue de Guinama) durante dos semanas previamente a la inducción de la infección secundaria por *E. caproni*. El agua era renovada cada 4 días para evitar que se produjera la precipitación de los antibióticos disueltos. Finalmente, los animales fueron necropsiados a las 2 semanas de la inducción de la infección secundaria para evaluar la expresión de IL-25 en un medio desprovisto de microbiota propia, en ratones sometidos a una segunda exposición del mismo parásito.

2.6.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN HECES

Para determinar la carga bacteriana total presente en muestras fecales de animales sometidos a disbacteriosis previa a la inducción de una infección secundaria con *E. caproni* y compararla con animales en presencia de infección secundaria convencional, se realizó PCRrt del gen ARNr 16S. Para ello, se empleó el kit *KAPA SYBR FAST qPCR*. Para cada muestra, se preparó un volumen final de reacción PCR de 20 µl por duplicado, que contenía 2 µl del ADN de la muestra, 10 µl de la solución proporcionada en kit y 0,4 µl de cebadores forward y reverse (27F-PCRrtAGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 338R-PCRrtTGCTGCCTCCCGTAGG AGT) a una concentración final de 0,2 mM. El volumen de reacción se completó con la adición de 7,2 µl de agua destilada.

Previamente a establecer las condiciones óptimas de la PCRrt, se empleó un producto de PCR del gen de ARNr 16S de la cepa C68 de *Enterococcus faecium* para obtener una curva estándar. Esta PCR de ARNr 16S de *E. faecium* se realizó

como sigue. Brevemente, se preparó una reacción de 25 µl que contenía 1 µl de 1 colonia bacteriana resuspendida en PBS, 2,5 µl de tampón de reacción estándar Taq 10x (New England BioLabs), 0,25 mM de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP), 2,5 U de Taq ADN polimerasa (New England BioLabs) y 0,2 mM de cebadores. El volumen se completó con agua. Las condiciones de amplificación fueron, un ciclo inicial de 5 minutos a 94°C y 35 ciclos de desnaturalización 30 segundos a 94°C, hibridación 30 segundos a 56°C y elongación 30 segundos a 68°C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 68°C. La amplificación se confirmó por electroforesis mediante la carga de 4µl del producto de reacción de la PCR en gel de agarosa al 1.6%. El volumen restante fue purificado en las placas ExcelaPure™ 96-Well PCR Purification Plates (Edge Bio).

Se utilizó el programa ENDMEMO para determinar el número de moléculas de ADNr 16S en el producto de PCR de *E. faecium* CD68 basándose en la secuencia del gen de ARNr 16S y la concentración del producto de PCR. Se obtuvo una curva estándar haciendo diluciones de 5 veces del producto de PCR. Las condiciones de ciclo de la PCRrt fueron 94°C durante 5 minutos y 45 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y un ciclo de elongación final a 68°C durante 5 minutos. Por extrapolación de los resultados con los obtenidos con la curva estándar, se determinó el número de genes de ARNr 16S para cada muestra. El número final de genes de ARNr 16S por gramo de muestra fecal se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de moléculas de ADNr 16S / 1g de heces} = E * N / 2 * F$$

donde E representa el volumen del tampón usado para la dilución del ADN tras la extracción, N representa el número de moléculas de ADNr 16S obtenidas por PCRrt, 2 representa el volumen de ADN usado para la reacción de PCRrt y F representa el peso (en gramos) del sedimento fecal del que se extrajo el ADN.

2.7. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN INFECCIONES POR *ECHINOSTOMA CAPRONI*

2.7.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN ADN_r 16S DE BACTERIAS INTESTINALES

El ADN total se aisló a partir de heces de ratón mediante el kit *QIAamp Fast DNA Stool mini* kit (Qiagen) y su concentración se midió utilizando un fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technology, CA, EE. UU.) como se ha descrito previamente (véase en apartado 2.6.3.1). La concentración de ADN de las muestras se normalizó a 10 ng/μL. La región V3-V4 del gen de ADN_r 16S se amplificó mediante PCR utilizando el protocolo de *Illumina* para la preparación de Librerías de Secuenciación Metagenómica (Cod. 15044223 Rev. A) con los primers propuestos por Klindworth *et al.*, (2013) para detección de bacterias (forwards: S-D-Bact-0564-a-S-15; reverse: S-D-Bact-0785-b-A-18; cobertura total: 89%) El paso de *multiplexing* se realizó utilizando el kit *Nextera XT Index* (FC-131-2001) (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Se empleó el chip *Bioanalyzer DNA 1000* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) para analizar la calidad del ADN de la librería de PCR obtenida, y las librerías se secuenciaron usando 2×300 pb paired-end run (MiSeq Reagent kit v3) en la plataforma *MiSeq-Illumina* (servicio de secuenciación FISABIO, Valencia, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina). Como control de calidad, se secuenciaron los reactivos empleados para la extracción de ADN y la amplificación por PCR. La evaluación de la calidad de las secuencias se realizó mediante el programa PRINSEQ-lite (Schmieder & Edwards, 2011) que permite establecer un control de calidad y preprocesamiento del conjunto de datos genómicos de manera rápida y sencilla a

partir de secuencias crudas en formato FAST o FASTQ. Para ello, se establecieron una serie de filtros que definieron la longitud mínima de secuencia (`min_length`: 50); calidad del corte de secuencia (`trim_qual_right`: 20); tipo de calidad del corte de secuencia (`trim_qual_type`: `mean`); ventana de calidad del corte de secuencia (`trim_qual_window`: 20). Las lecturas R1 y R2 de la secuenciación se unieron mediante `fastq-join` del paquete `ea-tools` (Aronesty, 2011). El filtrado de calidad, la unión de secuencias y la eliminación de quimeras se obtuvieron utilizando una fuente ad-hoc escrita en un entorno RStatistics y el procesamiento de los datos se llevó a cabo mediante la plataforma bioinformática QIIME (versión 1.9.0) (Caporaso *et al.*, 2010). QIIME es un software de acceso abierto que emplea el conjunto de herramientas PyCogent toolkit (Hopkin, 2006), para abordar la problemática de generar datos de secuenciación a partir de secuencias crudas para posteriormente realizar su interpretación y deposición en bases de datos. Este software se encuentra disponible en <http://qiime.org/> (Caporaso *et al.*, 2010). También se aplicaron filtros adicionales: taxa con menos de 3 lecturas en al menos el 20% de las muestras y, taxa con menos del 0.01% del total de lecturas en todas las muestras fueron eliminaron. Además, se utilizó el paquete de `decontam` (Davis *et al.*, 2018) en el entorno R (Rizzo, 2019; RStudio Team, 2020) para hallar posibles secuencias relacionadas con contaminantes. Asimismo, muestras con menos de 1000 lecturas también se eliminaron del análisis final. Las secuencias agrupadas se emplearon para construir tablas OTU (Unidades Taxonómicas Operativas, por sus siglas en inglés) con el 97% de identidad que fueron clasificadas a nivel taxonómico de filo, familia y género de acuerdo con los datos encontrados en la base de datos RDP Release 11. Las secuencias que no se lograron clasificar taxonómicamente o aquellas que correspondían a cianobacterias y cloroplastos (procedentes de material vegetal ingerido por los animales) fueron eliminadas de los análisis. Todas aquellas secuencias que no se pudieron clasificar para un nivel taxonómico determinado, aparecen descritas a nivel taxonómico con el sufijo “No clasificados” (NC). A partir de estos datos, se generaron tablas de abundancia relativa de taxones a los distintos

niveles (filo, familia y género) además de realizar otros análisis propios para el estudio de las poblaciones microbianas.

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

A partir de los datos obtenidos en los diferentes estudios, se realizaron numerosos test estadísticos que permitieron dar un significado biológico a los resultados mediante la aplicación de diversas herramientas estadísticas.

Para la comparación de medias se utilizaron pruebas paramétricas cuando el conjunto de datos analizado mostraba una distribución normal. El test de Shapiro-Wilk fue empleado para contrastar la normalidad en cada conjunto de datos y, en caso de que estos datos no cumplieran la hipótesis nula de normalidad (p -valor $<0,05$), se realizó su transformación logarítmica para poder aceptarla. Además, los test aplicados para la comparación de los datos deben cumplir una distribución homogénea entre las varianzas de los conjuntos de datos enfrentados. Para ello, se realizó el test de Levene, que permite confirmar la igualdad de varianzas entre dos o más grupos respecto a una variable determinada. A continuación, se describe los tests empleados para los diferentes tipos de comparaciones que se muestran a lo largo de la presente Tesis Doctoral, indicando en cada momento, cuando fueron utilizados cada uno de ellos. Todos los cálculos estadísticos se realizaron empleando los software SPSS Statistics (IBM) y RStudio.

2.8.1. TEST T DE STUDENT

El test t de student es un test paramétrico empleado para comparar las medias de una variable numérica (variable dependiente) con respecto a una variable nominal (variable independiente) que puede estar únicamente representada por dos valores. Cuando se acepta la hipótesis nula, se asume que no hay diferencias significativas entre las medias de los dos grupos o categorías comparadas. Como test paramétrico, asume la distribución normal de los datos de cada grupo y varianzas iguales en ambos grupos.

El test t de Student para muestras independientes, no relacionadas, se utilizó para valorar la significancia estadística del recuento de células mucossecretoras en la mucosa del íleon de ratones infectados por *E. caproni* en presencia de rIL-4 o rIL-13, recuento de marcadores celulares de células *tuft* e ILC2s GATA3+ en secciones de íleon de ratones infectados, tratados con pzo y reinfectados por *E. caproni* y la expresión génica relativa de las citoquinas implicadas en las respuestas frente a los diferentes escenarios de infección de ratones con *E. caproni* expuestos en este trabajo con respecto a los animales controles. En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el test t de Student arrojaba un p -valor $< 0,05$.

2.8.2. ANOVA DE UN FACTOR

La prueba ANOVA de una vía, ANOVA de un factor o modelo factorial de un solo factor es el tipo de análisis que se emplea cuando los datos no están pareados y se quiere estudiar si existen diferencias significativas entre las medias de una variable aleatoria cuantitativa (variable dependiente) en los diferentes niveles de

otra variable cualitativa o factor (variable independiente). Es una extensión de los t-test independientes para más de dos grupos. Como todos los análisis de la varianza, el ANOVA de un factor asume que las observaciones en cada categoría se distribuyen de forma normal y tienen varianzas iguales. La hipótesis nula asume que: las medias observadas en los grupos sobre el factor son iguales; al menos un par de medias son significativamente distintas la una de la otra.

La prueba ANOVA de un factor se empleó para analizar las diferencias estadísticas en la expresión relativa de citoquinas y otras enzimas en las diferentes condiciones experimentales planteadas en la presente Tesis Doctoral. Asimismo, se utilizó esta prueba para determinar la significancia estadística de las variaciones encontradas en la expresión de proteínas de íleon en ratones infectados con *E. caproni*, tratados con rIL-25 e infectados, tratados con rIL-25 y control. Por otro lado, también se empleó la prueba ANOVA de un factor para el estudio de la actividad de los distintos suptipos de catepsinas presentes en los ESPs de *E. caproni* implicadas en la degradación de anticuerpos de ratones unidos a la superficie del parásito. En todos los casos, el valor de significatividad se fijó en p -valor < 0,05.

2.8.3. TEST KRUSKAL-WALLIS

La prueba Kruskal-Wallis, es la alternativa no paramétrica al test ANOVA de una vía para datos no pareados. Se trata de un test que emplea rangos para contrastar la hipótesis de que k muestras han sido obtenidas de una misma población.

A diferencia del ANOVA en el que se comparan medias, el test de Kruskal-Wallis contrasta si las diferentes muestras están equidistribuidas y que por lo tanto

pertencen a una misma población. Bajo ciertas simplificaciones puede considerarse que el test de Kruskal-Wallis compara las medianas donde la hipótesis nula asume que todas las muestras provienen de la misma población (distribución) mientras que la hipótesis alternativa enuncia que al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

El test de Kruskal-Wallis es adecuado cuando los datos tienen un orden natural, es decir, cuando para darles sentido tienen que estar ordenados o bien cuando no se satisfacen las condiciones para poder aplicar un ANOVA. Además, no es necesario que las muestras que se comparan presenten una distribución normal pero es requisito necesario que todos los grupos tengan la misma varianza (homocedasticidad) y que la distribución de los grupos debe ser igual en todos.

Esta prueba no paramétrica fue aplicada para analizar las diferencias observadas en la cuantificación del %AC de los adultos de *E. caproni* por anticuerpos de ratones en diferentes condiciones de cultivo *in vitro* con inhibidores de proteasas.

2.8.4. ANÁLISIS POST-HOC

Cuando el test ANOVA de un factor mostró la presencia de diferencias significativas entre los grupos comparados se realizó un análisis post-hoc mediante el test de Bonferroni, para identificar los grupos que presentaban diferencias estadísticamente significativas. Este test ajusta el valor de significancia en función del número de pares de medias comparados. En el caso de las distribuciones no paramétricas en las que se aplicaron la prueba Kruskal-Wallis se empleó como análisis post-hoc el test de Dunn para medir las diferencias significativas entre

grupos. En todos los casos, las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando $p\text{-valor} < 0,05$.

2.8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 2D-DIGE

El análisis estadístico de la expresión diferencial de proteínas, en el hígado de ratones control, infectados con *E. caproni*, inoculados con rIL-25 e inoculados con rIL-25 e infectados, se realizó mediante el módulo Progenesis Stats del software Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics).

Progenesis Stats es una herramienta de análisis estadístico avanzada y fácil de aplicar para realizar un análisis más profundo de los datos proteómicos. El enfoque de Progenesis SameSpots produce resultados sin valores perdidos, por lo que se puede aplicar en técnicas estadísticas univariadas y multivariadas para una exploración completa de los datos de expresión de proteínas. Esta herramienta detecta la consistencia de las diferencias entre todos los geles y aplica pruebas estadísticas para asignar un intervalo de confianza a cada diferencia. En nuestro caso, se calculó la relación media de la expresión entre los grupos estudiados dos a dos: i) controles frente a inoculados con rIL-25; ii) infectados frente a inoculados con rIL-25 e infectados; iii) inoculados con rIL-25 e infectados frente a inoculados con rIL-25. Después, se aplicó el test t de Student (véase apartado 2.8.1) para detectar las diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Los test estadísticos se aplican al logaritmo de la abundancia, que se obtiene de la normalización del volumen del spot, estandarizado frente al estándar de gel correspondiente. Asimismo, se aplicó el test FDR (False Discovery Rate), un test estadístico control que permite corregir el valor de significatividad cuando se realizan comparaciones múltiples, con la finalidad de reducir la introducción de falsos positivos.

Para un determinado conjunto de datos, el test FDR utiliza las características de la distribución de los valores de p para asignar un valor de significatividad q a cada comparación. Se consideró que la comparación había superado el test FDR cuando $q < 0,05$. Por otra parte, se pueden aplicar diferentes tipos de análisis multivariantes tales como: i) el análisis de componentes principales (PCA), que genera una primera impresión sobre cuánto de diferentes entre sí son los distintos grupos, permitiendo identificar, en su caso, fuentes subyacentes de variación en el experimento y ii) análisis de correlación por patrones jerárquicos, capaz de encontrar patrones de expresión, sin ninguna información previa de las variables, agrupando tanto las proteínas como los individuos con un patrón de expresión similar. Estos análisis se describen, con más detalle, en los apartados siguientes.

2.8.5.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El PCA es una prueba estadística no supervisada (es decir, no utiliza ningún conocimiento de las agrupaciones de los datos) que proporciona una representación gráfica simplificada de los datos multidimensionales. Es útil para determinar si las muestras tienen las agrupaciones esperadas o si hay valores atípicos en los datos. Examinar el gráfico de PCA es una verificación de control de calidad útil antes de realizar un análisis adicional. El objetivo de este análisis es la simplificación y reducción de la dimensionalidad en el análisis de datos multivariantes, de tal modo que los datos transformados no pierdan las características básicas de los datos iniciales, asumiendo una pérdida de información muy pequeña. Dicho de otra forma, se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De este modo se genera una imagen del conjunto de datos mucho más sencilla sin perder información útil lo cual facilita su interpretación. Los nuevos componentes principales son una combinación lineal de las variables originales y son independientes entre sí (Silva *et al.*, 2014).

El primer paso en un PCA es realizar la matriz de correlaciones. Un PCA tiene sentido cuando existen altas correlaciones entre las variables, que a su vez indica que hay información redundante y que, por tanto, pocos son los factores responsables de gran parte de la variabilidad total. Para llevar a cabo el PCA se parte de una matriz de datos con N filas (observaciones) y K columnas (variables). Esta matriz se representa en un espacio con tantas dimensiones como variables (K dimensiones), donde cada variable representa un eje de coordenadas y cada observación se representa como un punto, generando un espacio multidimensional.

Para seleccionar los componentes principales, sobre el espacio multidimensional obtenido a partir de los datos originales, el PCA define nuevas variables que acaparan la mayor parte de la información (identificada con la varianza) contenida en las variables de partida. Es decir, el PCA buscará los ejes que proyecten una mayor cantidad de varianza. Estos nuevos ejes, conocidos como componentes principales, son una combinación lineal de las variables originales y deben ser independientes entre sí. Como primer componente principal (PC) se elige la variable que recoja la mayor proporción de variabilidad original. Por tanto, el primer componente principal 1 (PC1) se define como la combinación lineal de las variables originales que tiene máxima varianza y el segundo factor es el que recoge la máxima variabilidad posible no recogida en el primero y así sucesivamente. Del total de factores o componentes se seleccionan aquellos que recogen el porcentaje de variabilidad que se considera suficiente. El valor de la proyección de cada observación en el nuevo eje de coordenadas, definido por los componentes principales, se conoce como puntuación y la representación de las proyecciones de las observaciones en los nuevos ejes de coordenadas recibe el nombre de gráfico de puntuación. Pero el PCA no solo aporta información sobre las observaciones, sino también sobre las variables.

Los valores de contribución se representan en el gráfico de contribución y nos indican las variables que presentan correlación entre sí, cuáles son las más

influyentes y cuáles son responsables de los patrones detectados en las observaciones. De este modo, cuando la correlación es directa, las variables se agrupan en la misma región del gráfico de contribución y cuando están inversamente correlacionadas se sitúan en cuadrantes opuestos. La distancia del punto representado en el gráfico al origen también influye, presentando un mayor impacto sobre el modelo cuanto más alejado se encuentre del origen. Además, es de tener en cuenta que este análisis es muy sensible a la presencia de valores extremos o *outliers*, que son observaciones que no encajan en el modelo arrojado y pueden provocar alteraciones en el análisis. No obstante, estos valores son fáciles de detectar.

Para el PCA, el módulo Progenesis Stats de Progenesis Samespots permite tomar como variables las muestras y como observaciones los *spots* o a la inversa. En el presente trabajo los resultados se presentan tomando los *spots* como variables. De este modo, lo que se pretende es disminuir la complejidad de los datos para lograr una visión e interpretación clara, a partir de los gráficos de puntuación obtenidos. En este análisis, las muestras que corresponden al mismo grupo experimental y, en primera instancia, con perfiles de expresión similares, deben encontrarse próximas en el gráfico de puntuación. Por ello, este análisis es realmente útil para identificar otros parámetros responsables de variación en el experimento y encontrar valores extremos o *outliers* en las muestras que deban ser excluidos del estudio.

2.8.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO

El análisis de correlación por agrupamiento jerárquico permite agrupar a las proteínas o péptidos por sus patrones de expresión. Este análisis multivariante no supervisado proporciona una instantánea real de la actividad de las proteínas

presentes en el experimento e identifica características en los mismos procesos biológicos y vías de participación. Los resultados se muestran en un árbol dendrograma interactivo donde se agrupan perfiles de expresión similares. Este tipo de análisis, al igual que el PCA, se realiza con todos los *spots* obtenidos, en todas las muestras y geles de la aproximación experimental, sin contar con el conocimiento ni las razones biológicas por las que las variables se han agrupado. Asimismo, se conoce como agrupamiento jerárquico porque crea una jerarquía entre las clases que se construyen a partir de las observaciones. De esta forma, se genera un árbol jerárquico a partir de un conjunto de datos inicial en el que cada elemento corresponde a una clase y agrupa en cada etapa las dos clases que se sitúan a la misma distancia. Por tanto, además de simplificar las dimensiones de los datos representados, permite separar en grupos un conjunto de observaciones de acuerdo con la similitud presente entre ellas. Es decir, ordena los objetos (observaciones y variables) de modo que los perfiles de expresión de los objetos que corresponden a un grupo sean muy próximos entre sí y diferentes a los perfiles de expresión de los objetos de otros grupos (Meunier *et al.*, 2007). Este análisis se realizó con el módulo Progenesis Stats del software Progenesis SameSpots que utiliza las distancias euclídeas para estimar la similitud entre *spots*. Este diagrama representa un sistema de coordenadas en el que los *spots* están graficados en base a su distancia entre ellos.

2.8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MICROBIOTA INTESTINAL

Los análisis estadísticos aplicados a los datos obtenidos en el estudio de la microbiota intestinal de heces de ratones control, sometidos a infección primaria con *E. caproni*, tratados con pzz y sometidos a infección secundaria en diferentes momentos de la infección, se realizó con el programa estadístico R v.3.2.2. Este programa, es un programa de acceso libre basado en un lenguaje de programación

sencillo en el que sus propios usuarios pueden publicar paquetes para ampliar su configuración básica. Además, permite ejecutar una gran diversidad de análisis estadísticos tales como modelos lineales, no lineales, tests estadísticos, análisis de series temporales, algoritmos de clasificación y agrupamiento etc y obtener gráficas de alta calidad. Asimismo, R puede integrarse con diferentes bases de datos y existen bibliotecas que facilitan su utilización desde lenguajes de programación interpretados como Perl y Python.

Previamente a proceder al análisis de datos en R, todas las tablas originales fueron normalizadas por el método Total Sum Scaling (TSS). Esta normalización de los datos divide los *counts* obtenidos a partir de las secuencias de los diferentes niveles taxonómicos a normalizar entre el total de *counts*, hallando de este modo, su abundancia relativa (Badri *et al.*, 2018). Así, se elimina el sesgo producido por la distinta profundidad del tratamiento de las secuencias en las diferentes librerías, obteniendo una distribución homogénea de la varianza de las variables, optimizando de este modo, los datos empleados para los posteriores análisis multivariantes (Ramette, 2007). Una vez homogenizados los datos, se realizaron numerosos análisis en R que serán explicados a continuación.

2.8.6.1. ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD- α Y RIQUEZA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

Para analizar la diversidad y riqueza de la microbiota presente en las heces de los animales correspondientes a las diferentes condiciones experimentales planteadas en la presente Tesis Doctoral, se aplicaron diversos índices estadísticos capaces de resumir las principales características de diversidad y riqueza biológica de las poblaciones microbianas.

Se empleó el paquete R Vegan para calcular los siguientes índices: (i) Shannon-Weaver o diversidad- α , mide la probabilidad de que dos individuos al azar de una comunidad ambos sean de la misma especie. Cuanto más alta sea esta probabilidad más diversa es la comunidad y sus valores suelen estar comprendidos entre 1 y 4.5 siendo valores superiores a 3 interpretados como poblaciones diversas; (ii) Chao1, mide la riqueza de la población entendida como el número de secuencias diferentes presentes en una muestra para un nivel taxonómico concreto. Las diferencias encontradas en la riqueza y en el índice de Shannon entre grupos se llevaron a cabo con la función `wilcox.test` de R, que emplea la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (Woolson, 2007) . El test de Wilcoxon es una prueba no paramétrica ampliamente aplicada en estudios de ecología debido a la gran variabilidad existente entre las muestras y además, permite realizar un análisis pareado, necesario para comparar las muestras que están relacionadas entre sí (Wilcoxon, 1992; Anderson, 2001). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p\text{-valor} < 0,05$.

2.8.6.2. ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD- β DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

Para estudiar la diversidad- β de las poblaciones microbianas encontradas en las muestras empleadas se aplicó el índice de disimilitud de Bray-Curtis. En concreto, la distancia Bray-Curtis se refiere a la diferencia total en la abundancia de especies entre dos muestras, teniendo en cuenta la abundancia total en cada muestra. Este índice genera una matriz de disimilitud de la composición microbiana de las muestras al nivel taxonómico deseado utilizando el paquete R Vegan. Las diferencias encontradas en la microbiota a nivel global, entre los diferentes grupos de estudio, se visualizaron mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) que permite hacer una representación de los datos en un gráfico de 2 dimensiones,

descrito por una matriz cuadrada (Gower, 1966). Se empleó el test Adonis para analizar las diferencias a partir de las matrices de distancias donde una $p < 0,05$ indicaba la presencia de diferencias significativas entre grupos.

2.8.6.3. ANÁLISIS DE REDUNDANCIA DISCRIMINANTE (RDA)

Se aplicó el análisis de redundancia discriminante (RDA) para la detección directa de gradientes de variación de la composición microbiana entre muestras en función del grupo al que pertenecen y la abundancia relativa de las diferentes poblaciones microbianas que las conforman. Esta prueba crea un conjunto de dimensiones latentes denominadas factores constreñidos por variables externas donde los ejes de ordenación representan gradientes. El análisis RDA es un método desarrollado por (Van Den Wollenberg, 1977) para extraer y resumir la variación en un conjunto de variables respuesta que pueden explicarse mediante un conjunto de variables explicativas. Más exactamente, RDA es una técnica de análisis de gradiente directo que resume las relaciones lineales entre los componentes de las variables respuesta que son "redundantes" (es decir, "explicadas") con un conjunto de variables explicativas. Para hacer esto, RDA extiende la regresión lineal múltiple (MLR) al permitir la regresión de múltiples variables de respuesta en múltiples variables explicativas. Seguidamente, una matriz de los valores ajustados de todas las variables respuesta generadas a través de MLR es sometida a PCA. Por tanto, el RDA también puede considerarse una versión restringida del PCA, en la que los ejes canónicos, contruidos a partir de combinaciones lineales de variables respuesta, también deben ser combinaciones lineales de las variables explicativas (es decir, ajustadas por MLR). Este análisis genera una ordenación en el espacio definido por la matriz de variables respuesta y otra por la matriz de variables explicativas. Es decir, produce una ordenación que resume los principales patrones de variación en la matriz respuesta que se puede explicar mediante una matriz de

variables explicativas. Se consideraron diferencias significativas cuando p -valor < 0,05.

2.8.6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL EFECTO TAMAÑO (LEfSe)

Para examinar los biomarcadores bacterianos más relevantes en los grupos de animales que conforman el experimento se realizó el análisis discriminante lineal efecto tamaño (LEfSe). Esta prueba fue aplicada desde la plataforma de acceso libre en línea Galaxy (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) (Segata *et al.*, 2011), con el fin de detectar las diferencias en la composición bacteriana que caracterizan a los grupos de animales infectados, tratados con pzq y re infectados con *E. caproni*.

La prueba LEfSe determina las características (organismos, clados, unidades taxonómicas operativas (OTUs), genes o funciones) que probablemente expliquen las diferencias entre condiciones experimentales (por ejemplo, ratones infectados con *E. caproni* frente a ratones re infectados) mediante la combinación de pruebas estándar de significación estadística con pruebas adicionales que codifican la coherencia biológica y la relevancia del efecto. En concreto, utiliza la prueba de rango de suma de Kruskal-Wallis factorial no paramétrica para detectar las características de abundancia que presentan diferencias significativas con respecto a la clase de interés. La importancia biológica se investiga posteriormente mediante un conjunto de pruebas por pares entre subclases mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Como último paso, LEfSe utiliza el análisis discriminante lineal (LDA) para estimar el efecto del tamaño de cada característica. Como resultado, LEfSe sugiere biomarcadores que explican la mayoría de las diferencias entre los grupos analizados. Por lo tanto, esta prueba se utilizó para identificar los grupos bacterianos con mayor dominancia en los ratones sometidos a infección primaria, tratados con pzq e infectados secundariamente con *E. caproni*.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CATEPSINAS DE ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN LA EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

Las catepsinas son un grupo de cisteín-proteasas de tipo papaína expresadas en todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Estas enzimas también están presentes en helmintos parásitos y tienen un papel fundamental en las interacciones parásito-hospedador. Se ha observado que las catepsinas intervienen en los procesos de invasión y establecimiento de los parásitos, así como en la alimentación de los vermes o la supresión de las funciones de ciertas células efectoras del sistema inmunitario (Sajid & McKerrow, 2002; Robinson *et al.*, 2008). Recientemente, se ha descrito un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollado por trematodos parásitos en el que proteasas secretadas en los ESPs del parásito, limitan la actividad de los anticuerpos unidos a su superficie (Cortés *et al.*, 2017b).

A continuación, se analiza el papel desempeñado por las catepsinas secretadas por adultos de *E. caproni* en la limitación de la respuesta desarrollada por el hospedador frente a la infección.

3.1.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Existen numerosos estudios previos sobre la caracterización de catepsinas de trematodos que desarrollan migración tisular, al menos de manera parcial, en el hospedador definitivo (Stack *et al.*, 2011). En cambio, el papel de estas peptidasas en trematodos que se establecen directamente en el intestino ha sido escasamente analizado. Los echinostomátidos son trematodos que no presentan fases de

migración intraorgánica. Probablemente, esto sea una de las principales razones por las que no se han realizado estudios en relación a las catepsinas de estos parásitos. Sin embargo, el papel de estas enzimas no se encuentra únicamente sujeto a la invasión de los tejidos, sino que también tienen especial relevancia en otros procesos de interacción parásito-hospedador. De acuerdo con esto, estudios previos han revelado que las cisteín-proteasas producidas por algunos parásitos intestinales presentan la capacidad de cortar los extremos no glicosilados de las mucinas que componen el moco intestinal, interrumpiendo de esta manera, la estructura macromolecular del mismo lo que facilita la invasión por parte del parásito (Moncada *et al.*, 2003; Lidell *et al.*, 2006). Además, Berasain *et al.*, (2000, 2003) observaron que las proteasas secretadas por los trematodos poseían la capacidad de degradar diferentes isotipos de inmunoglobulinas generando de este modo, un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador frente a la infección.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento del papel ocupado por las catepsinas expresadas por los adultos de *E. caproni* y su interacción con la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador, se examinó la actividad de diversos subtipos de cisteín-proteasas presentes en los ESPs. Asimismo, se analizó la localización tisular de estas enzimas en los tejidos de los parásitos adultos a partir de secciones histológicas.

3.1.2. ACTIVIDAD CISTEÍN-PEPTIDASA DE LOS ESPS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Se analizaron los ESPs de adultos de *E. caproni* con el fin de determinar la actividad de las catepsinas en ellos. En concreto, se examinaron las cisteín-peptidasas pertenecientes a la subclase C1 (catepsina B y catepsina L). Para ello, se

utilizaron antígenos de ES aislados de parásitos adultos de *E. caproni* que fueron previamente recuperados de ratones a las 2 semanas tras inducir la infección. La caracterización de la actividad desarrollada por las catepsinas fue llevada a cabo mediante el empleo del sustrato FR a un rango de pH de 4,0-6,0 e inhibidores específicos de catepsina B y L para confirmar la especificidad de la actividad peptidasa y diferenciar entre la actividad ejercida por cada subclase de catepsina. En la **Figura 3.1.** se observa los resultados obtenidos de los análisis de la actividad de las endopeptidasas de los antígenos ES de *E. caproni* en presencia y ausencia de inhibidores específicos en el rango de pH anteriormente citado con un incremento lineal de 0,5 unidades durante el tiempo de reacción. Los valores obtenidos se expresan en unidades de fluorescencia/minuto y representan la cantidad de fluoróforo AMC liberado por minuto tras producirse la hidrólisis del sustrato FR. Para todo el rango de pH examinado se obtuvo una actividad superior en catepsina L que en catepsina B. Del mismo modo, la actividad endopeptidasa se vio más inhibida cuando al medio de reacción se añadió el inhibidor frente a catepsina L, iCL que cuando se utilizó el inhibidor de catepsina B, CA-074. En el caso de la catepsina L, se obtuvo una inhibición superior al 98% en todo el rango de pH analizado. En cambio, en la catepsina B se observó una inhibición superior al 91% y ésta fue disminuyendo a medida que se incrementaba el pH. Además, se observó que el pH en el que la catepsina L presentaba una mayor actividad era 5,5, siendo por contraparte, el punto en el que se obtuvo un menor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática. Concretamente, a pH 5,5 la actividad desarrollada por la catepsina L fue más de 6 veces superior a la actividad de la catepsina B (**Figura 3.1.A**).

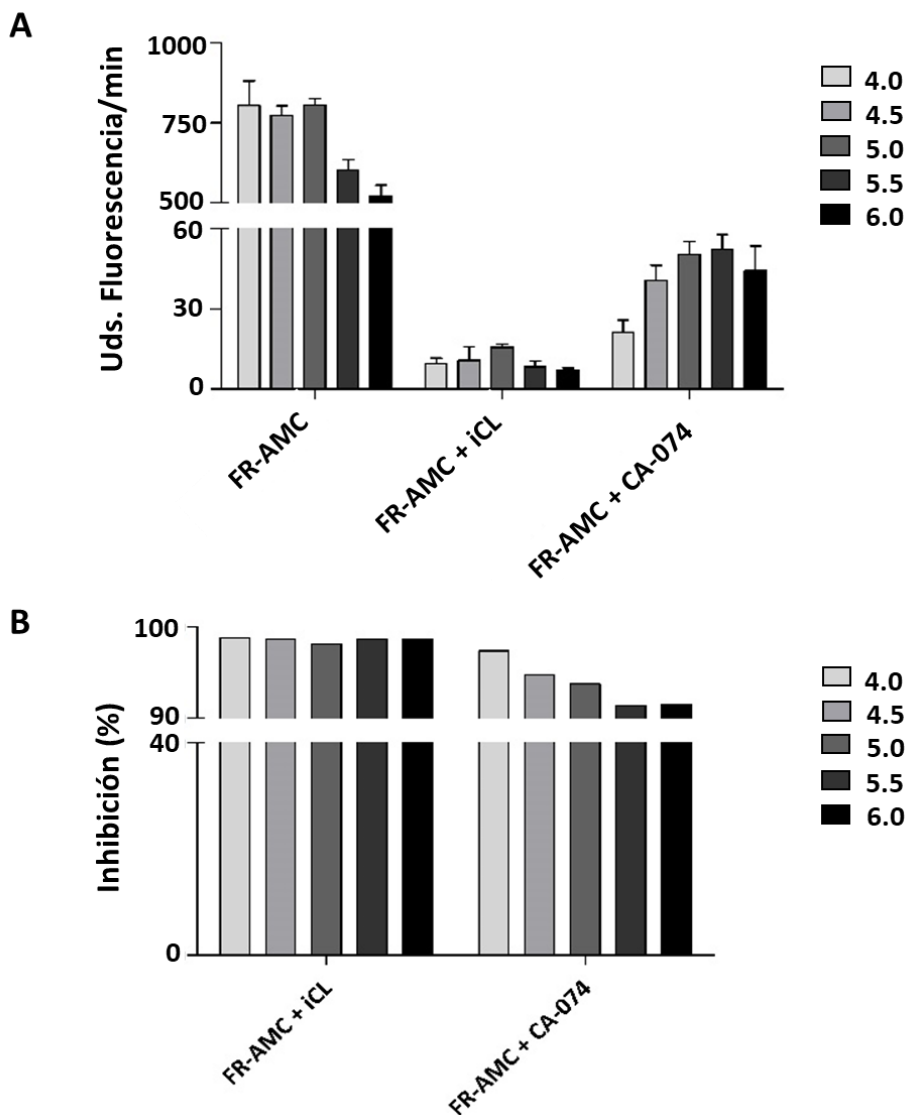


Figura 3.1.- Actividad cisteín-peptidasa de las catepsinas de adultos de *E. caproni*. (A) Ensayo fluorométrico de la actividad cisteín-peptidasa en los productos de excreción/secreción (ESPs) de *Echinostoma caproni* en relación al pH (rango de 4.0 a 6.0) expresado en unidades (Uds.) de fluorescencia detectadas por minuto. (B) Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de las catepsinas en presencia de inhibidores específicos (iCL: inhibidor irreversible de catepsina L; CA-074: inhibidor irreversible de catepsina B). FR-AMC: benzoiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilumarina (sustrato peptídico).

3.1.3. UNIÓN DE DCG-04 AL SITIO ACTIVO DE CATEPSINA L EN LOS ESPs DE ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Para detectar las catepsinas en los ESPs de adultos de *E. caproni*, se empleó el inhibidor irreversible biotinilado DCG-04 (**Figura 3.2.**), que tiene la capacidad de unirse de manera covalente al sitio activo de estas cisteín-peptidasas (Greenbaum *et al.*, 2000). Tras realizar la electroforesis monodimensional de los ESPs y su transferencia con DCG-04 se obtuvo una única banda proteica de unos 28 kDa, PM esperado para estas enzimas. El control negativo, previamente incubado con E-64 (inhibidor específico de peptidasas) no mostró ninguna reacción confirmando la especificidad de unión del inhibidor biotinilado (**Figura 3.2A**). Con la finalidad de confirmar la presencia de catepsina L en los ESPs de *E. caproni* se realizaron ensayos de *Western blot* con el anticuerpo heterólogo frente a catepsina L de *Fasciola hepatica*. Los resultados obtenidos mostraron que este anticuerpo de *F. hepatica* fue capaz de reconocer específicamente la proteína de *E. caproni*, dando lugar a una banda específica a la altura de 28 kDa (**Figura 3.2B**) coincidiendo con el PM observado previamente en el blotting con DCG-04.

3.1.4. INMUNOLocalIZACIÓN DE CATEPSINA L EN ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Tras confirmar la actividad de la catepsina L en los ESPs de los adultos de *E. caproni* y su presencia a partir de suero anti-catepsina L de *F. hepatica* que reconoce de manera homóloga la catepsina L de *E. caproni*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la localización tisular de la expresión de catepsina L en adultos de *E. caproni*. Estos ensayos se llevaron a cabo a partir de cortes

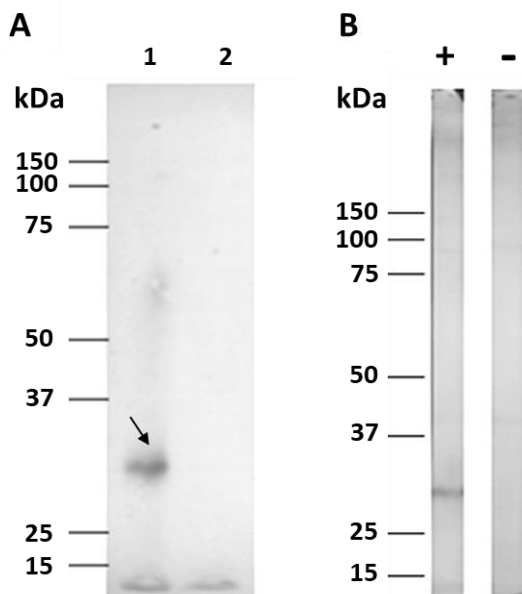


Figura 3.2.- Detección de catepsinas de tipo L en los productos de excreción/secreción (ESPs) de *Echinostoma caproni* por unión de DCG-04 mediante Western blot. (A) Confirmación de la presencia de catepsinas en los ESPs de *E. caproni* mediante incubación con la sonda para cisteín- peptidasas DCG-04 biotinilada (1). Control de especificidad de unión del DCG-04 por incubación de los ESPs con el inhibidor de peptidasas E-64 previa a la incubación con DCG-04 (2). **(B)** Detección de catepsinas de tipo L por el anticuerpo anti-*Fasciola hepatica* catepsina L (+) y suero de oveja control (-). La flecha indica la banda de 28 KDa correspondiente a la detección de catepsina L.

histológicos de parásitos adultos recuperados de ratones a las 2 semanas tras haber sido infectados. Se observó marcaje específico de catepsina L en la superficie corporal y en la pared intestinal en todas las secciones de adultos analizados (**Figura 3.3.**). En concreto, se encontraron mayores niveles de marcaje de fluorescencia de catepsina L en la parte más externa del tegumento que corresponde exactamente con la zona de interacción parásito-hospedador (**Figura 3.3C**). Cabe mencionar, que además del marcaje específico obtenido tanto en el tegumento como en la pared intestinal (**Figura 3.3B y C**), se apreció un marcaje inespecífico en la pared del útero y huevos del parásito, ya que se mostró marcaje tanto en las secciones incubadas con suero anti-catepsina L como en suero control (**Figura 3.3D y E**).

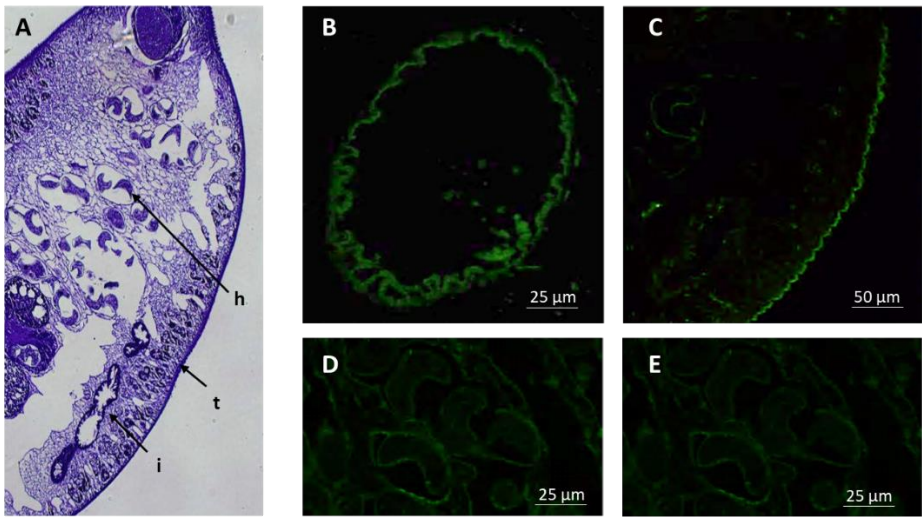


Figura 3.3.- Inmunolocalización de catepsina L en adultos de *Echinostoma caproni*. (A) Sección de un adulto de *E. caproni* teñido con azul de toluidina indicando las estructuras del parásito que presentan marcaje fluorescente al ser incubadas con suero anti-catepsina L de *Fasciola hepatica* y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo FITC: i) intestino; t) tegumento y h) útero con huevos. (B-E) Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia en las que se observa el marcaje específico de la pared intestinal (B) y tegumento (C) de los ejemplares adultos y el marcaje inespecífico del útero y los huevos, observado tanto al utilizar suero anti-catepsina L (D) como suero control (E).

3.1.5. ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA CATEPSINA L DE LOS ESPs DE *ECHINOSTOMA CAPRONI* SOBRE LAS INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN

Para determinar *in vitro* la capacidad de las catepsinas presentes en los ESPs de adultos de *E. caproni* en la degradación de los anticuerpos del hospedador, se incubaron inmunoglobulinas purificadas de ratón con ESPs en diferentes condiciones experimentales.

Para analizar la actividad ejercida por las catepsinas de tipo B y L presentes en los ESPs de los parásitos adultos en la degradación *in vitro* de inmunoglobulinas, se incubaron inmunoglobulinas de ratón con ESPs en presencia de inhibidores de

proteasas específicos o de amplio espectro durante 3 horas previamente a realizar el análisis por *Western blot* siguiendo el protocolo explicado previamente (véase apartado 2.3.6) (**Figura 3.4.**). Los resultados obtenidos por *Western blot* mostraron que los ESPs de *E. caproni* presentan la capacidad de degradar tanto las IgG como las IgA de ratones infectados con metacercarias de *E. caproni* (**Figura 3.4.**).

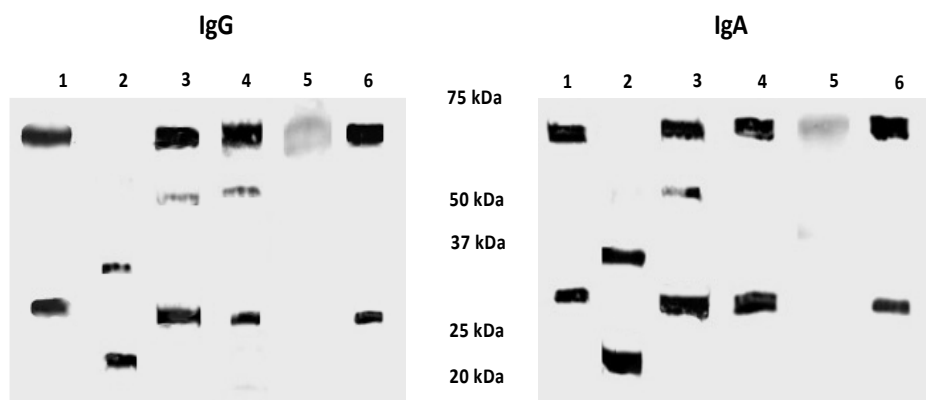


Figura 3.4.- Determinación por *Western blot* de la actividad *in vitro* de los productos de excreción/secreción (ESP) de *Echinostoma caproni* e inhibidores específicos de catepsinas sobre la degradación de Inmunoglobulinas (Ig)G e IgA de ratón pre-incubación (carril 1) y post-incubación con ESPs durante 3 horas (carril 2) y ESPs en presencia de inhibidores de proteasa: cóctel inhibidor de peptidasa (PIC; cOmplete-Mini, libre de EDTA) (carril 3); inhibidor de cisteín-peptidasa de amplio espectro irreversible (E-64) (carril 4); inhibidor específico de catepsina B (CA-074) (carril 5); e inhibidor específico de catepsina L (iCL) (carril 6).

De los inhibidores empleados, sólo se observó una degradación significativa en presencia del inhibidor de catepsina B (CA-074) mientras que las inmunoglobulinas incubadas con el inhibidor de catepsinas de tipo L no presentaron una degradación aparente lo que sugiere que las inmunoglobulinas de ratón fueron degradadas principalmente por peptidasas de tipo catepsina L.

3.1.6. DEGRADACIÓN *IN VIVO* DE LOS ANTICUERPOS UNIDOS A LA SUPERFICIE DE *ECHINOSTOMA CAPRONI* POR LA CATEPSINA L DE LOS ESPs

Con el fin de analizar el papel que juegan las cisteín-peptidasas presentes en los ESPs en la degradación de los anticuerpos unidos a la superficie de parásitos adultos de *E. caproni*, se incubaron vermes adultos en medio de cultivo suplementado con un inhibidor de peptidasas (PIC, cOMplete-Mini sin EDTA) o inhibidor de cisteín-peptidasas de amplio espectro, E-64 (**Figura 3.5.**).

La adicción de los inhibidores al medio de incubación no afectó al mantenimiento de los parásitos con vida ni provocó alteraciones en sus movimientos. Tras 3 h de incubación en ausencia de inhibidores de peptidasas, se observa que los anticuerpos unidos *in vivo* a la superficie de los parásitos presentes en el momento inicial de la incubación (0 h) habían quedado atrapados bajo una capa de ESPs que cubría el tegumento de los vermes adultos (**Figura 3.5.**). En cambio, cuando se añade al medio de cultivo el inhibidor de peptidasas PIC o el inhibidor de cisteín-peptidasas E-64, los anticuerpos atrapados en la superficie del parásito, se degradaron en menor proporción que en la condición 3 h de incubación en ausencia de inhibidores, siendo esto más notorio cuando se adiciona E-64 al medio. Asimismo, cuando se estudia el %AC por IgG en la superficie de los vermes adultos, observamos que tanto en los adultos incubados con PIC como con E-64, el porcentaje de IgG observado en superficie alcanza niveles similares a los observado a las 0 h de incubación en ausencia de inhibidores (**Figura 3.6.**). De este modo, se puede confirmar que los anticuerpos atrapados debajo de la capa de ESPs son degradados por peptidasas presentes en estos ESPs liberados por el parásito, siendo incluso más relevante el papel de las cisteín-peptidasas (**Figura 3.5. y Figura 3.6.**).

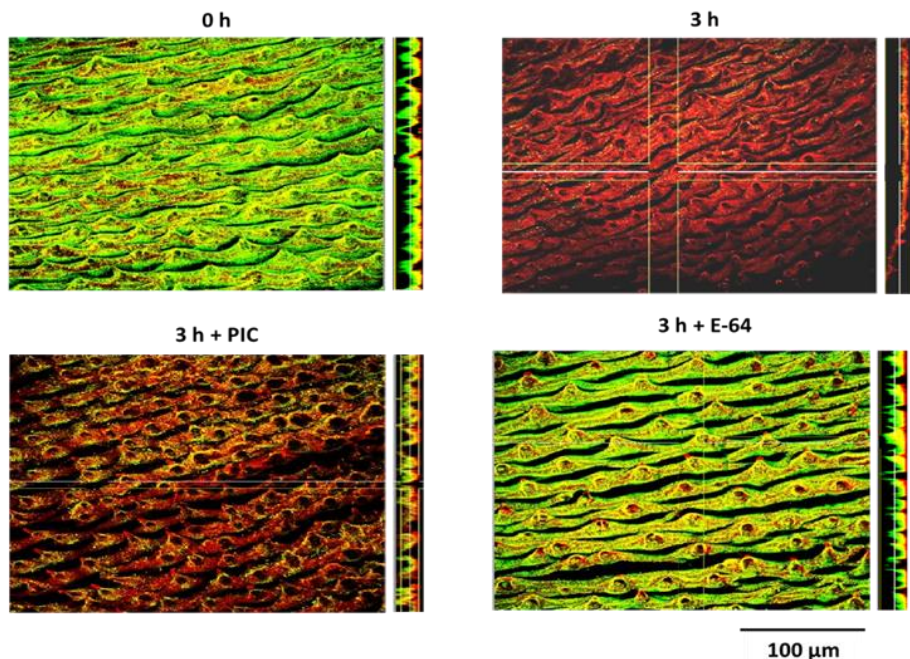


Figura 3.5.- Marcaje de inmunofluorescencia de adultos de *Echinostoma caproni* para localización de IgG de ratón y productos de excreción/secreción (ESPs) pre- (0 h) y post-incubación (3 h) *in vitro* en presencia de inhibidores de peptidasas. PIC: cóctel inhibidor peptidasas (cOmplete-Mini, sin EDTA); E-64: inhibidor de cisteín-peptidasas de amplio espectro. Imágenes 2D de microscopía confocal láser teñidas con IgG anti-ratón (verde) y anti-ESPs de *E. caproni* (rojo) (la combinación de ambos marcajes se muestra en amarillo). Para cada condición experimental, se muestran imágenes representativas de los ejes XY (izquierda) e YZ (derecha).

Para analizar la actividad desarrollada por las catepsinas de tipo B y L en la degradación de IgG atrapadas bajo los ESPs producidos por el parásito, se cultivaron adultos de *E. caproni* en presencia de inhibidores específicos de cisteín-peptidasas o de amplio espectro. Al igual que lo observado en la primera aproximación experimental, se obtuvo una disminución significativa en el marcaje anti-IgG sobre el tegumento de los vermes cultivados durante 3 h en ausencia de inhibidores de peptidasas pero no en adultos que fueron incubados en presencia de los inhibidores de amplio espectro PIC o E-64 (**Figura 3.7.**).

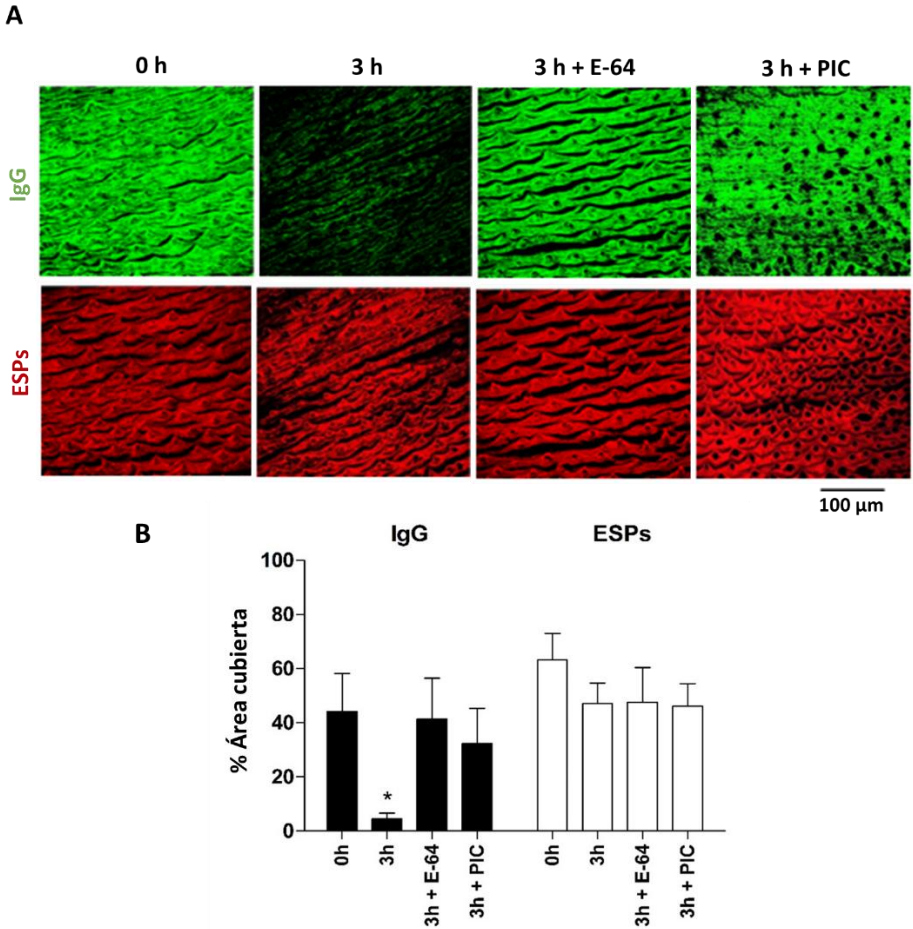


Figura 3.6.- Actividad de los inhibidores de peptidasas de amplio espectro sobre la degradación de anticuerpos atrapados bajo la capa de productos de excreción/secreción (ESPs). Inmunofluorescencia de adultos de *Echinostoma caproni* para marcaje de IgG de ratón (verde) y ESPs del parásito (rojo) antes (0 h) y después (3 h) de incubación *in vitro* en presencia de inhibidores de peptidasas. E-64: inhibidor de cisteín-peptidasas de amplio espectro; PIC: cóctel inhibidor de peptidasas (cOplete-Mini, sin EDTA). **(A)** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de escaneo láser de la superficie del parásito. **(B)** Porcentaje de área cubierta de la superficie del parásito por tinción con anti-IgG de ratón y anti-ESPs. Las barras verticales muestran la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas en relación con los adultos a tiempo 0 horas (no incubados) con $p < 0,05$ (ANOVA de un factor y análisis post-hoc Bonferroni).

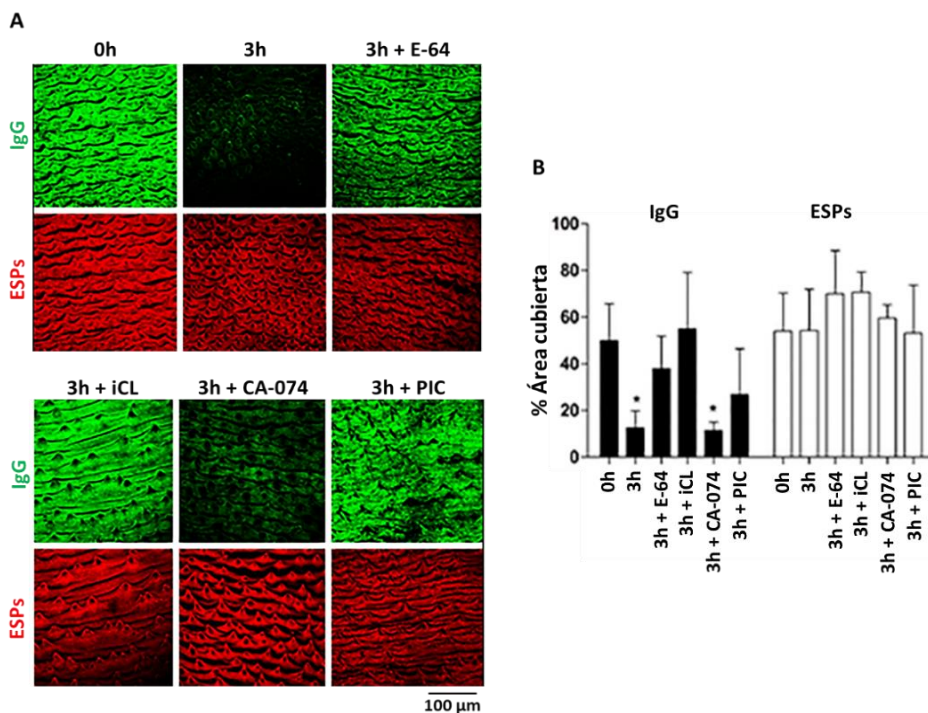


Figura 3.7.- Resultado del efecto de la adición de inhibidores de catepsinas específicos sobre la degradación de Inmunoglobulinas (Ig)G atrapadas bajo los productos de excreción/secreción de *Echinostoma caproni*. (A) Micrografías confocales de escaneo láser para detección del marcaje de IgG de ratón (verde) presentes sobre la superficie de los vermes adultos y marcaje de los ESPs (rojo) antes (0 h) y después (3 h) de la incubación *in vitro* en presencia de inhibidores de peptidasas [inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas de amplio espectro (E-64); inhibidor selectivo de catepsina L (iCL); inhibidor selectivo de catepsina B (CA-074); cóctel inhibidor de la peptidasa (PIC; cOmplete-Mini, sin EDTA)]. (B) Cuantificación del porcentaje de área cubierta a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal del marcaje anti-IgG de ratón y anti-ESPs del parásito. Las barras verticales muestran la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (análisis estadístico Kruskal-Wallis y prueba post-hoc Dunn) frente a las imágenes obtenidas a tiempo 0 h (vermes no incubados) con $p < 0,05$.

Asimismo, cuando se añade el inhibidor específico frente a catepsina L (iCL) al medio de cultivo, se observa que el marcaje anti-IgG obtenido alcanzó los mismos niveles que los obtenidos a las 0 h de incubación por lo que la presencia de iCL impidió la degradación de los anticuerpos IgG unidos a la superficie del parásito. Sin embargo, el marcaje obtenido de IgG unidas a la superficie de los

vermes adultos que fueron incubados con el inhibidor de catepsina B (CA-074) y el %AC por el anticuerpo anti-IgG tras 3 h de cultivo con este inhibidor, disminuyó significativamente con respecto a iCL y los otros inhibidores de peptidasas de amplio espectro alcanzando niveles similares a los observados en adultos incubados 3h en ausencia de inhibidores de peptidasas. Esto sugiere que el papel de la catepsina de tipo B en la degradación de IgG de ratón es muy limitado (**Figura 3.7.**). De igual modo, se llevó a cabo el mismo planteamiento experimental empleando anti-IgA de ratón para examinar la actividad ejercida por las peptidasas y concretamente, por las catepsinas L y B de los ESPs de *E. caproni* en la degradación de anticuerpos en este caso, de isotipo IgA. Los resultados obtenidos, mostraron la misma dinámica de degradación de anticuerpos IgA a la observada con IgG confirmando nuevamente que la iCL es la catepsina que presenta una mayor actividad en la degradación de anticuerpos de ratón atrapados bajo los ESPs liberados por los adultos de *E. caproni* hacia la superficie tegumentaria (**Figura 3.8.**).

3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN EL ÍLEON DE RATONES INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN PRESENCIA DE rIL-25

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación empleando como modelo experimental *E. caproni*-ratón han mostrado que en este hospedador de alta compatibilidad se genera una respuesta inmunitaria diferente en infección primaria y secundaria. Se ha observado que en infecciones primarias causadas por *E. caproni* se genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1 dando lugar al desarrollo crónico de la infección. En cambio, cuando estos animales son expuestos secundariamente a metacercarias de *E. caproni*, presentan la capacidad de eliminar

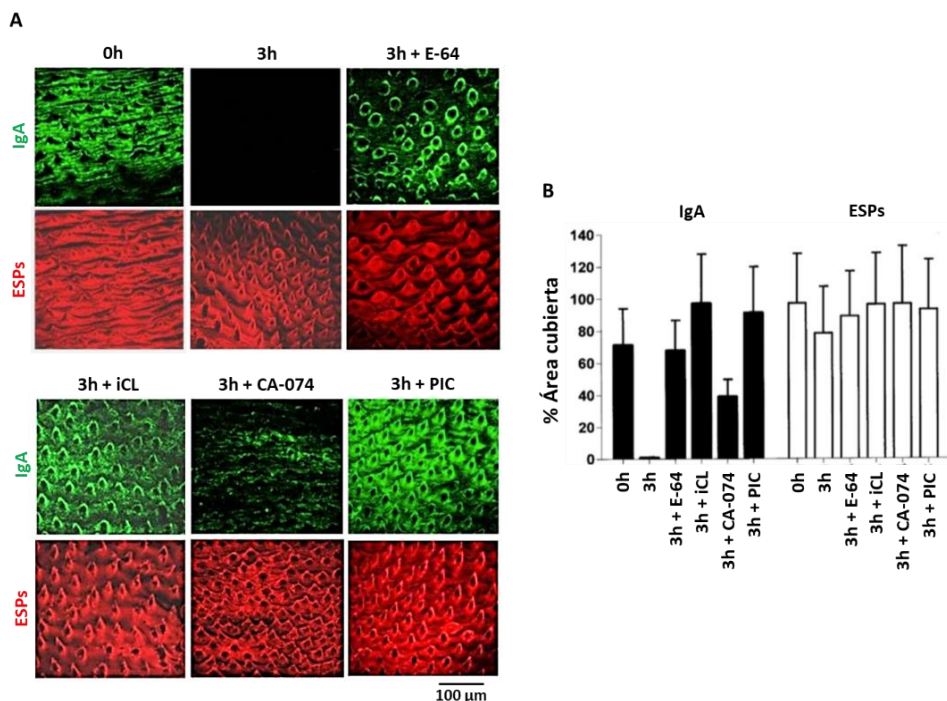


Figura 3.8.- Resultado del efecto de la adición de inhibidores de catepsinas específicos sobre la degradación de Inmunoglobulinas (Ig)A atrapadas bajo los productos de excreción/secretión de *Echinostoma caproni*. (A) Micrografías confocales de escaneo láser para detección del marcaje de IgA de ratón (verde) presentes sobre la superficie de los vermes adultos y marcaje de los ESPs (rojo) antes (0 h) y después (3 h) de la incubación *in vitro* en presencia de inhibidores de peptidasas [E-64: inhibidor de cisteín-peptidasas de amplio espectro; inhibidor selectivo de catepsina L (iCL); inhibidor selectivo de catepsina B (CA-074); cóctel inhibidor de peptidasas (PIC; cOmplete-Mini, sin EDTA)]. (B) Cuantificación del porcentaje de área cubierta a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal del marcaje anti-IgA de ratón y anti-ESPs del parásito. Las barras verticales muestran la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (ANOVA de un factor y prueba post-hoc de Bonferroni) frente a vermes no incubados a tiempo 0 h con $p < 0,05$.

la infección a las pocas semanas post infección. Asimismo, estudios previos han asociado esta resistencia con la presencia de IL-25 en el momento de la inducción de la infección secundaria, por encontrarse involucrada en la activación de una respuesta inmunitaria Th2 y en mecanismos asociados a la reparación tisular.

Sin embargo, los cambios producidos a nivel proteómico en infección primaria y secundaria por *E. caproni* han sido escasamente examinados. En el presente apartado, se profundizará en el análisis de las alteraciones proteómicas inducidas en infección por *E. caproni* en presencia y ausencia de rIL-25 para, de este modo, obtener nuevos conocimientos acerca del papel ejercido por la IL-25 en el desarrollo de resistencia a infecciones secundarias producidas por *E. caproni* en ratón. Estos datos pueden dar lugar a resultados de gran interés que nos permitan comprender con más detalle, los factores implicados tanto en el desarrollo de resistencia a infecciones secundarias en los hospedadores de alta compatibilidad como las alteraciones proteómicas producidas en infecciones primarias que puedan facilitar el establecimiento crónico de este parásito en ratón.

Para estudiar las alteraciones proteómicas y su posible influencia sobre la evolución de la infección intestinal de *E. caproni* en ratones en presencia y ausencia de rIL-25, se realizaron análisis de la expresión diferencial de proteínas para identificar aquellas en las que la expresión se veía modificada como consecuencia de la presencia de rIL-25 en el momento de la inducción de la infección.

3.2.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Se comparó mediante 2D-DIGE la expresión diferencial encontrada en el proteoma del íleon de ratones sometidos a diferentes condiciones experimentales para estudiar los cambios cuantitativos a partir de extractos proteicos. Se establecieron 4 condiciones experimentales (infectados con *E. caproni*; tratados con rIL-25; tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni*; y, control) y se realizaron 3 comparaciones entre grupos: i) tratados con rIL-25 e infectados frente a infectados con *E. caproni*; ii) tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni* frente a tratados con rIL-25; y iii) tratados con rIL-25 frente a control. Para llevar a cabo esta

aproximación se emplearon un total de 4 réplicas biológicas por condición experimental (infectados con *E. caproni*, tratados con rIL-25, tratados con rIL-25 e infectados y control). Las diferencias estadísticas significativas obtenidas y la repercusión biológica de las mismas fueron evaluadas a partir de pruebas estadísticas univariadas y multivariadas como se ha descrito previamente en el Capítulo II, apartado 2.8.5 Análisis estadísticos para la interpretación de resultados 2D DIGE. Del mismo modo, tras aplicar diversos parámetros, se seleccionaron los *spots* de proteínas que presentaban una expresión diferencial representativa entre los grupos comparados que fueron finalmente extraídos de los geles 2D-DIGE para ser posteriormente identificados por LC-MS/MS.

3.2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR 2D-DIGE

Previamente a analizar el perfil de expresión de proteínas de las 3 comparaciones entre grupos descritas anteriormente, se observó que en el momento de la disección todos los animales tratados con rIL-25 y expuestos a metacercarias de *E. caproni* resultaron negativos a la infección. En cambio, aquellos animales que fueron infectados sin ningún tratamiento adicional, resultaron positivos a la infección y el porcentaje de adultos recuperados tras el sacrificio osciló entre un 40-100% (media $69,36 \pm DS 16,29\%$).

Las 3 comparaciones realizadas del perfil proteómico del íleon, generaron un total de 172 *spots* definidos con un 85% de presencia, encontrados en al menos 7 de los 8 geles del experimento. Seguidamente, se calculó la abundancia promedio de cada *spot* entre las 24 imágenes obtenidas y se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,01$, tanto en ANOVA de un factor como en el análisis post-hoc.

El análisis estadístico de los resultados, utilizando ANOVA de un factor y aplicando el test FDR, reveló un total de 59 *spots* diferencialmente expresados ($p < 0,01$ y $q < 0,05$). Este valor se genera de forma automática sin previa validación manual a partir del software de procesamiento y análisis de imágenes DeCyder™. Asimismo, para identificar los *spots* de proteínas en los que su expresión presenta mayores diferencias entre los grupos experimentales comparados, se aplicó un segundo filtro para seleccionar únicamente aquellos *spots* que mostraron un $AVR \geq 1,5$, en valor absoluto. Este filtro de selección generó un total de 41 *spots* de los cuales un total de 11 *spots* fueron sobre-expresados en las comparaciones realizadas y se encontraron repartidos del siguiente modo: 4 *spots* en tratados con rIL-25 e infectados frente a infectados, 5 *spots* en ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones tratados con rIL-25, y, 2 *spots* en tratados con rIL-25 frente a control. Asimismo, se obtuvieron un total de 30 *spots* infra-expresados en las comparaciones anteriormente citadas distribuidos de la siguiente manera: 1 *spots* en tratados con rIL-25 e infectados frente a infectados; 24 *spots* en ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones tratados con rIL-25; y, 5 *spots* en tratados con rIL-25 frente a control. Finalmente, 40 de los 41 *spots* seleccionados se pudieron extraer de los geles y se identificaron exitosamente por LC-MS/MS. La **Figura 3.9.** detalla esquemáticamente los resultados obtenidos en el 2D- DIGE y los criterios aplicados para la selección de los *spots* que fueron sometidos posteriormente a LC-MS/MS para la identificación de las proteínas correspondientes.

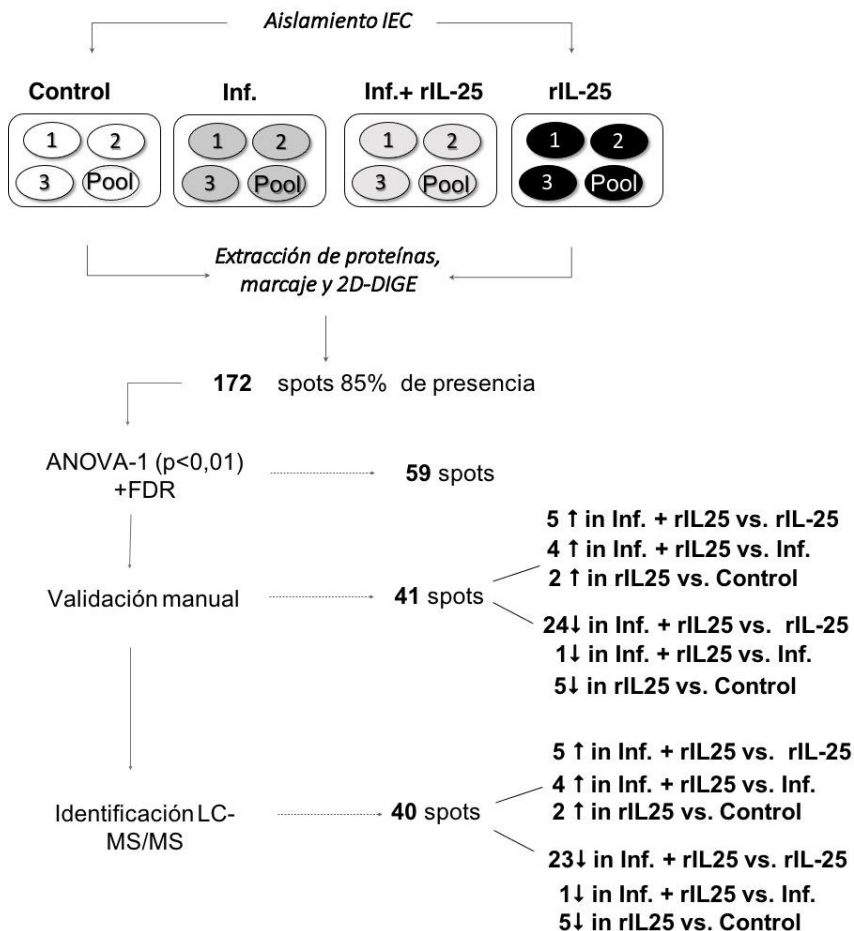


Figura 3.9.- Esquema de los criterios de selección aplicados en 2D-DIGE para la identificación de los *spots* diferencialmente expresados en el íleon de ratones infectados con *Echinostoma caproni* (INF), tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados con *E. caproni* (rIL-25 + INF), tratados con rIL-25 y control. Representación esquemática y filtros aplicados para seleccionar los *spots* de proteínas que presentan una expresión diferencial significativa entre los grupos experimentales comparados. La identificación se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MC/MS). IEC: células del epitelio intestinal; FDR: False Discovery Rate; (↑): *Spots* sobre-expresados en un grupo respecto a otro; (↓): *Spots* infra-expresados en un grupo respecto a otro.

a) Resultados de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Agrupamiento Jerárquico

Una vez obtenido el análisis diferencial de expresión de proteínas en las 3 comparaciones realizadas, se llevaron a cabo análisis estadísticos multivariantes para agrupar las muestras analizadas según su perfil de expresión global de proteínas sin tener en cuenta los datos de identificación de las mismas. Este tipo de estudios permite clasificar las muestras sin presentar ningún conocimiento previo de las razones biológicas para la existencia de tales grupos dando lugar de este modo a una interpretación biológica de los resultados (Meunier *et al.*, 2007). Las herramientas estadísticas multivariantes aplicadas para analizar este tipo de conjunto de datos fueron el análisis PCA y el análisis de agrupamiento jerárquico. Por un lado, el PCA es un análisis estadístico que nos permite agrupar y reducir la información ofrecida por el conjunto de datos inicial con la finalidad de facilitar la interpretación de los datos. En cambio, el análisis de agrupamiento jerárquico nos ofrece la posibilidad de agrupar los diferentes *spots* que conforman el perfil de expresión de proteínas de cada grupo experimental según su similitud en los niveles de expresión.

Tras aplicar los filtros de selección mencionados previamente, se llevaron a cabo PCA y análisis de agrupamiento jerárquico con el conjunto de los 172 *spots* obtenidos con un 85% de presencia y los 41 *spots* validados manualmente que mostraron diferencias significativas entre grupos, con $p < 0,01$ en el test t de Student. En todos los casos, tanto el PCA como el análisis de agrupamiento jerárquico se llevaron a cabo para realizar comparaciones entre grupos experimentales dos a dos: (i) ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones infectados con *E. caproni* (**Figura 3.10.**); (ii) ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones tratados con rIL-25 (**Figura 3.11.**); y (iii) ratones tratados con rIL-25 frente a ratones control (**Figura 3.12.**).

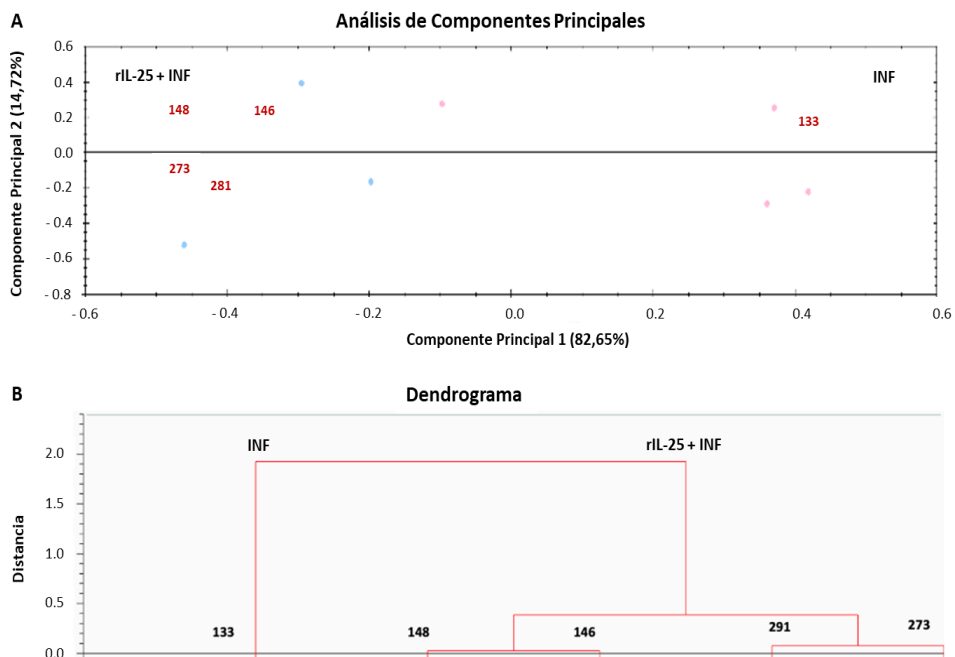


Figura 3.10.- Análisis estadísticos multivariantes aplicado al conjunto de 41 spots expresados diferencialmente validados de manera manual (85% de presencia; $p < 0,01$; $q < 0,05$) en el experimento 2D-DIGE que compara ratones tratados con recombinante (r)IL - 25 e infectados frente a ratones infectados con *Echinostoma caproni*. (A) Gráfico del análisis de componentes principales entre grupos comparados separados en dos áreas según su sobre-expresión en un grupo con respecto al otro. (B) Dendrograma del análisis de agrupamiento jerárquico basado en distancias euclídeas.

Como se observa en las gráficas de PCA realizadas con estas condiciones, los spots diferencialmente expresados aparecieron separados en dos grupos en base al primer componente principal, en todas las comparaciones realizadas. Las **Figura 3.10.A, 3.11.A, 3.12.A** resaltan los spots con mayor presencia en cada grupo experimental. Asimismo, el análisis de agrupamiento jerárquico ordenó los spots en dos grupos principales diferentes, coincidiendo con la similitud del perfil de expresión proteica observada en las condiciones experimentales enfrentadas. En las **Figuras 3.10.B, 3.11.B, 3.12.B** se representa los dendrogramas resultantes.

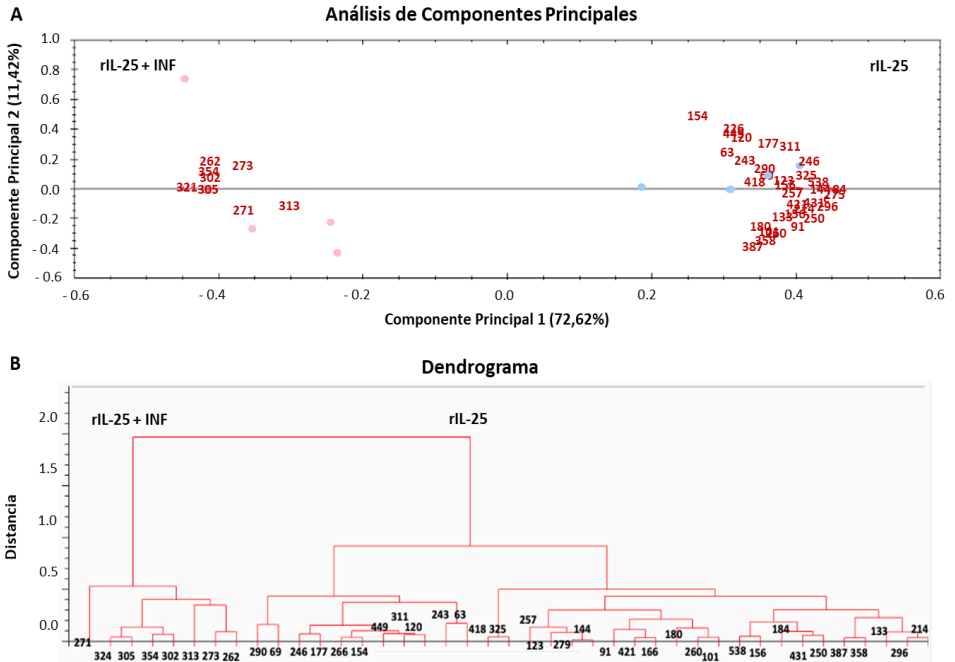


Figura 3.11. - Análisis estadísticos multivariantes aplicado al conjunto de 41 *spots* expresados diferencialmente validados de manera manual (85% de presencia; $p < 0,01$; $q < 0,05$) en el experimento 2D-DIGE que compara animales tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados con *Echinostoma caproni* frente a ratones tratados con rIL - 25. (A) Gráfico del análisis de componentes principales entre grupos comparados separados en dos áreas según su sobre-expresión en un grupo con respecto al otro. (B) Dendrograma del análisis de agrupamiento jerárquico basado en distancias euclídeas.

Por ello, estos resultados sugieren que el patrón de expresión de proteínas dado por el conjunto de los 41 *spots* que presentan $p < 0,01$ y $q < 0,05$ es lo suficientemente contundente para explicar las diferencias detectadas en las distintas condiciones experimentales consideradas. Además, estos análisis permitieron clasificar las muestras y los *spots* de proteínas que presentaron un perfil de expresión parecido en cada condición experimental.

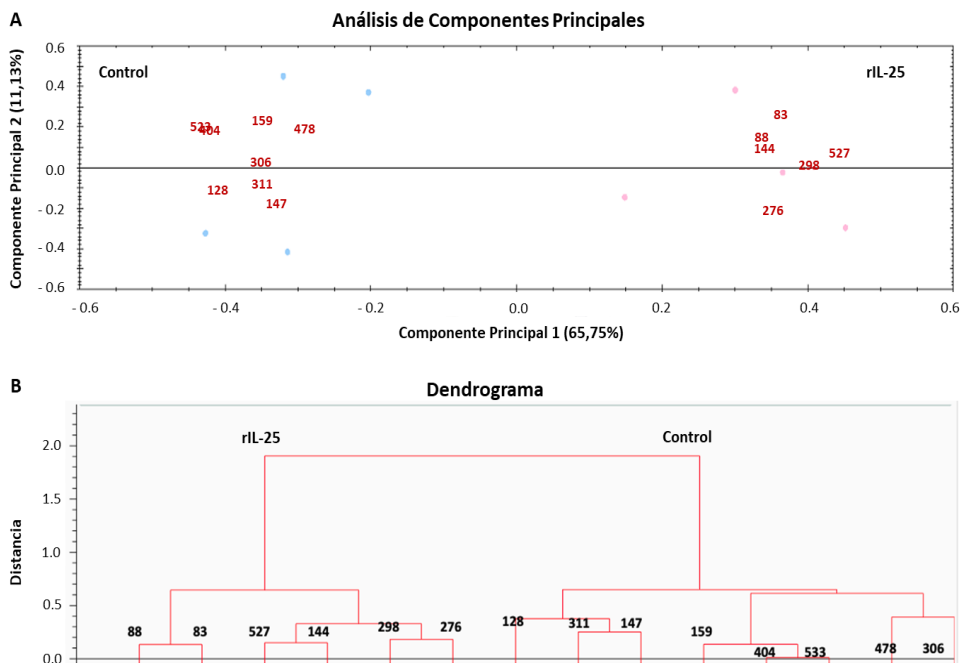


Figura 3.12.- Análisis estadísticos multivariantes aplicado al conjunto de 41 *spots* expresados diferencialmente validados de manera manual (85% de presencia; $p < 0,01$; $q < 0,05$) en el experimento 2D - DIGE que compara animales control frente a ratones tratados con recombinante (r)IL - 25. (A) Gráfico del análisis de componentes principales entre grupos comparados separados en dos áreas según su sobre-expresión en un grupo con respecto al otro. (B) Dendrograma del análisis de agrupamiento jerárquico basado en distancias euclídeas.

b) Identificación por espectrometría de masas de las proteínas diferencialmente expresadas

Se identificaron con precisión por MS y búsqueda en bases de datos los *spots* con mayores diferencias de expresión ($AVR \geq 1,5$, en valor absoluto) y mayor significancia estadística ($p < 0,01$ para el test *t* de Student y $q < 0,05$ en el test FDR). De los 41 *spots* iniciales, un total de 40 *spots* pasaron todos los filtros aplicados y pudieron ser identificados con éxito. De los 40 *spots* validados: 4 *spots* se mostraron regulados al alza y 1 *spot* regulado a la baja en ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones infectados; 5 *spots* se mostraron regulados al alza y 23

spots regulados a la baja en ratones tratados con rIL-25 e infectados frente a ratones tratados con rIL-25; 2 *spots* se mostraron regulados al alza y 5 *spots* regulados a la baja en ratones tratados con rIL-25 frente a ratones control (**Figura 3.9.**).

La identificación de estos *spots* arrojó un resultado de un total de 24 proteínas diferentes, ya que 6 de estas proteínas fueron identificadas en más de 1 *spot*. Esta redundancia parece estar relacionada con diversas modificaciones postraduccionales, distintas isoformas (diferenciadas en función del peso molecular y/o punto isoeléctrico) o con modificaciones en las proteínas producidas durante la preparación de las muestras. En las **Figuras 3.13., 3.14. y 3.15.** se muestra las imágenes representativas de los geles de referencia sobre los que se destacan la localización de los *spots* seleccionados y su infra-expresión o sobre-expresión entre los grupos comparados.

Las proteínas identificadas fueron clasificadas en 5 grupos según su función indicando para cada *spot* si se encontró sobre-expresada o infra-expresada en relación con el tratamiento con rIL-25 en presencia y/o ausencia de infección por *E. caproni* en ratones (**Tabla 3.1., 3.2. y 3.3.**). Los 5 grupos funcionales en los que se clasificaron las proteínas diferencialmente expresadas fueron: enzimas metabólicas; proteínas estructurales; enzimas antioxidantes y detoxificantes; proteínas de unión a calcio; y, proteínas de regulación celular. Cabe destacar que el grupo de proteínas que presentó mayores diferencias de expresión fue el de las enzimas metabólicas, con un total de 27 *spots* correspondientes a 15 proteínas diferentes. Estas enzimas se vieron mayoritariamente infra-expresadas en el intestino de los ratones tratados con rIL-25 e infectados en comparación con los animales que solo fueron tratados con rIL-25. Por tanto, de manera cuantitativa, las proteínas involucradas en los procesos metabólicos fueron las más alteradas en cualquiera de los grupos

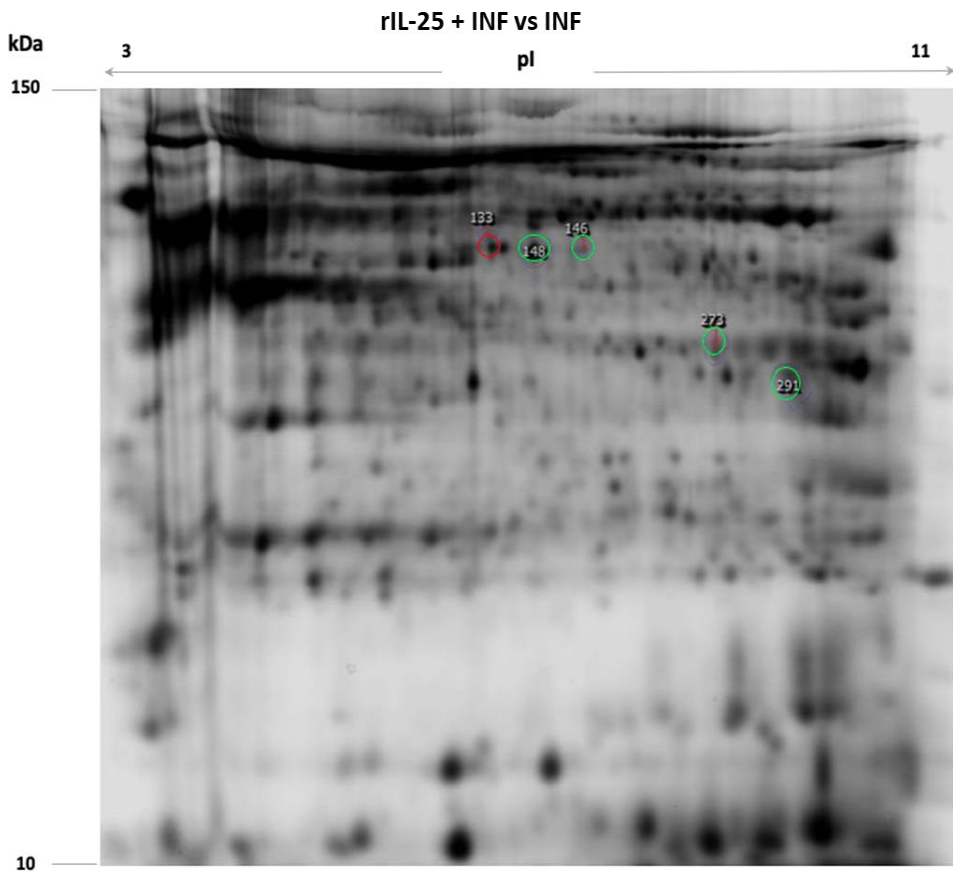


Figura 3.13.- Imagen representativa de gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del íleon de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados frente a ratones infectados con *Echinostoma caproni*. Imagen representativa obtenida a partir del módulo BVA del software DeCyder™ en la que se señalan los *spots* infra-expresados (rojo) y sobre-expresados (verde) en el íleon de ratones tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni* frente a ratones infectados, seleccionados para la identificación por espectrometría de masas. La identificación de los *spots* de proteínas correspondientes a este gel se presenta de manera más detallada en la **Tabla 3.1**.

analizados. Además, se observaron alteraciones en la expresión de varias proteínas implicadas en el ciclo de Krebs tales como la fumarato hidratasa y malato deshidrogenasa y en la vía de las pentosas fosfato (transaldolasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa). Asimismo, se obtuvo una infra-expresión en enzimas glucolíticas entre las que se incluyen varias isoformas de enolasa 1B, gliceraldehído 3-fosfato

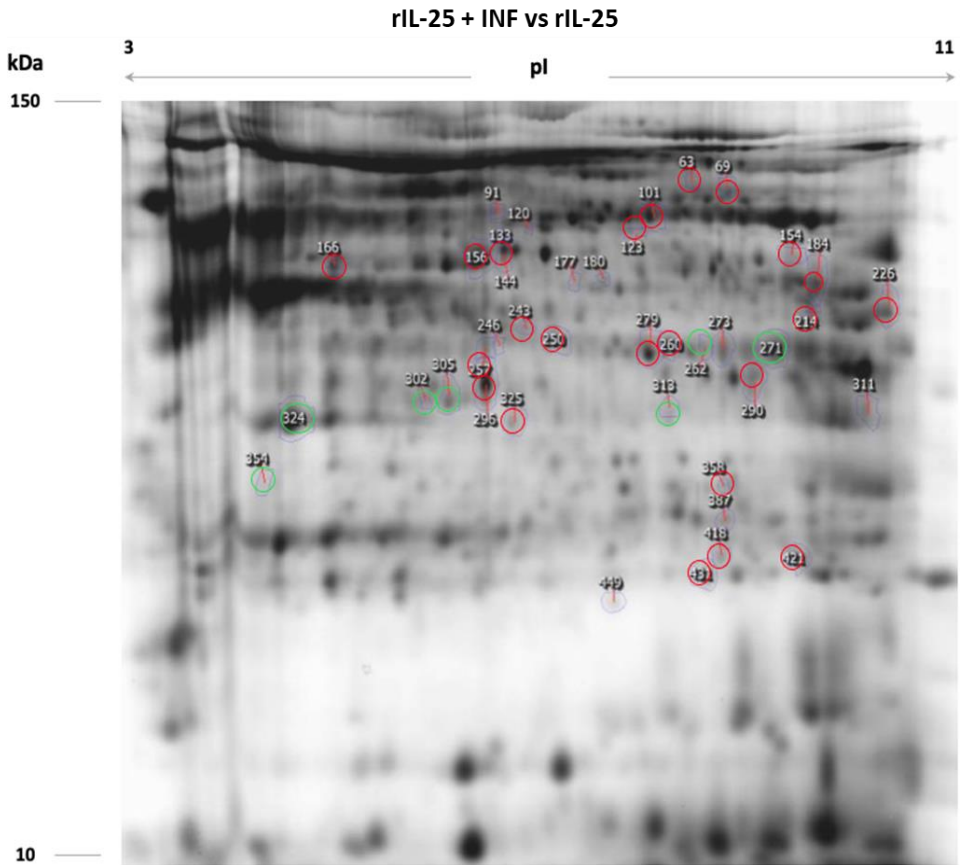


Figura 3.14.- Imagen representativa de gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del fíleon de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados con *Echinostoma caproni* frente a ratones tratados con rIL-25. Imagen representativa obtenida a partir del módulo BVA del software DeCyder™ en la que se señalan los *spots* infra-expresados (rojo) y sobre-expresados (verde) en el fíleon de ratones tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni* frente a ratones tratados con rIL-25, seleccionados para la identificación por espectrometría de masas. La identificación de los *spots* de proteínas correspondientes a este gel se presenta de manera más detallada en la **Tabla 3.2**.

deshidrogenasa, piruvato quinasa PKM, fosfoglicerato quinasa 1 y triosafosfato isomerasa. Esto puede ser indicativo de la presencia de disfunción mitocondrial al mismo tiempo que se reduce el metabolismo aeróbico tras la inducción de la infección por *E. caproni*. Sin embargo, en los animales tratados con rIL-25 e

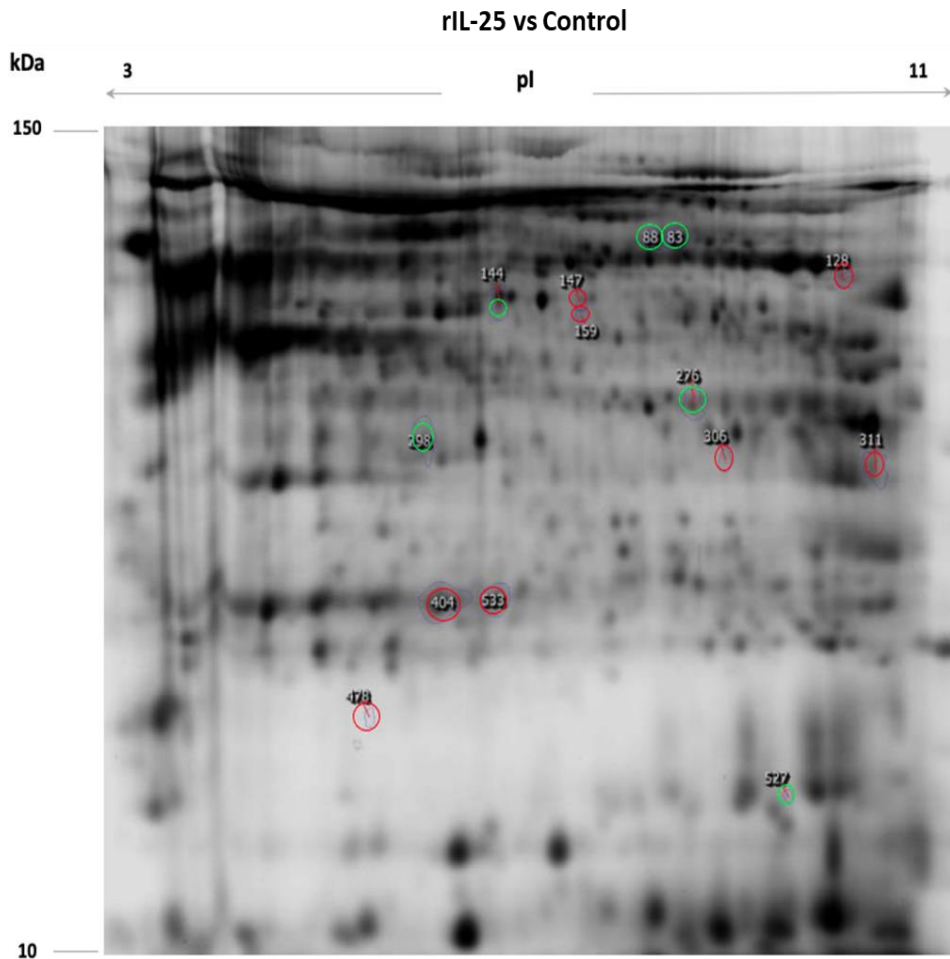


Figura 3.15.- Imagen representativa de gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del hígado de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 frente a ratones control. Imagen representativa obtenida a partir del módulo BVA del software DeCyder™ en la que se señalan los *spots* infra-expresados (rojo) y sobre-expresados (verde) en el hígado de ratones tratados con rIL-25 frente a ratones control, seleccionados para la identificación por espectrometría de masas. La identificación de los *spots* de proteínas correspondientes a este gel se presenta de manera más detallada en la **Tabla 3.3**.

infectados se observó un incremento en la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa con respecto a los animales infectados lo cual puede ser indicativo de un aumento en el uso anaeróbico de la glucosa para cubrir la alta demanda

energética causada por la disfunción mitocondrial en presencia de la infección parasitaria. El grupo de animales tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni* mostró cambios en la expresión de una proteína de tipo estructural denominada placoglobina o β -catenina. Esta proteína pertenece a la familia de las cateninas y forma parte de los componentes de los desmosomas participando en los mecanismos de adhesión celular y es esencial para mantener y regular la homeostasis del epitelio intestinal.

El hecho de que los animales tratados con rIL-25 e infectados presenten una regulación negativa de tres isoformas de placoglobina con respecto a los ratones tratados con rIL-25 muestra que el establecimiento de los parásitos adultos de *E. caproni* en el intestino promueven alteraciones en la estructura y homeostasis del epitelio intestinal. Además, otras dos proteínas implicadas en la diferenciación celular y la homeostasis tisular también presentaron alteraciones en presencia de rIL-25. Se observó que la proteína 2G4 asociada a proliferación (PA2G4) y el receptor de proteína C quinasa 1 activada (RACK1) estaban regulados a la baja en ratones tratados con rIL-25 con respecto a ratones control.

La proteína PA2G4 se encuentra implicada en la regulación del crecimiento celular mediante su papel en la transducción de señales inhibitoras del crecimiento celular. Por otro lado, RACK1 es una proteína de anclaje que juega un papel relevante en el transporte de proteínas fijando proteínas en ciertos lugares y participa en el mantenimiento de la homeostasis intestinal protegiendo la integridad de la barrera epitelial promoviendo la diferenciación y la apoptosis generada frente a respuestas de estrés. Por tanto, la regulación a la baja de PA2G4 y RACK1 en ratones tratados con rIL-25 puede contribuir a prevenir la hiperplasia en el tejido intestinal, la cual está asociada con una mayor susceptibilidad a las infecciones por *E. caproni*.

Otra característica destacable relacionada con alteraciones en el epitelio intestinal y resistencia a infecciones por *E. caproni* es la sobre-expresión de las

anexinas 2 y 4 en ratones tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni*. Estas proteínas juegan un papel en el control de la muerte celular y también en la alteración de varias propiedades de la membrana, como la permeabilidad o el anclaje de los componentes citoesqueléticos. Estas proteínas también participan en la migración de las células epiteliales, paso crítico para la reparación del daño en la mucosa intestinal. La regulación al alza de estas proteínas fue relacionada con la disminución de la tasa de muerte celular que se produce a pesar de la presencia de disfunción mitocondrial, un estrés oxidativo elevado y senescencia celular. De manera específica, la anexina 4 parece desempeñar un papel clave en los mecanismos de reparación de la membrana plasmática a través de procesos de endocitosis o exocitosis que han sido previamente observados en heridas mecánicas o exposición a agentes formadores de poros en membrana. Por tanto, la sobreexpresión de anexina 4 en ratones tratados con rIL-25 e infectados, puede favorecer la limitación del establecimiento de la infección parasitaria gracias a su actividad desarrollada en la remodelación del tejido intestinal y factor antiinflamatorio. Por otro lado, la anexina 2 presenta un papel relevante en el tráfico de proteínas entre membranas y genera estabilidad en los complejos de proteínas de membrana que se encuentran asociados con el citoesqueleto de actina. Asimismo, esta proteína se encuentra involucrada en la migración de las células epiteliales e induce la agrupación de fosfolípidos específicos de membrana para la formación del dominio lipídico. Es por ello que, el aumento de anexina 2 podría estar relacionada con los procesos de motilidad intestinal que favorecen la expulsión de los parásitos adultos del intestino. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que la regulación al alza de las anexinas 2 y 4 en ratones tratados con rIL-25 e infectados con *E. caproni*

Tabla 3.1.- Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el feon de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados frente a ratones infectados con *Echinostoma caproni*.

<i>Spot</i> ^a	Identificación	Especie	Expresión	PM (Da) obs. ^b	PI obs. ^c	Papel celular	Loc. ^d	Puntuación MASCOT	Cobertura (%)
Enzimas metabólicas									
133	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	-1.4	116	6.37	Glicolisis Activación plasminógeno Metabolismo ornitina	Cit MP Mit	45.44	66.59
146	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	+1.9	112	7.17	Glicolisis Activación plasminógeno Metabolismo ornitina	Cit MP Mit	38.54	45.16
148	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	+2.0	111	6.67	Glicolisis Activación plasminógeno Metabolismo ornitina	Cit MP Mit	108.86	87.33
273	Gliceraldehído 3P deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	+2.4	93	8.44	Glicolisis	Cit	32.38	62.76
291	Lactato deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	+1.5	88.8	9.26	Fermentación piruvato a lactato	Cit	16.31	45.48

^a El número de *spot* está referido a la **Figura 3.13**; ^b Peso Molecular observado (Da); ^c Punto isoeléctrico observado; ^d Localización

Tabla 3.1.- Identificación por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos, de las proteínas que mostraron una expresión diferencial en el intestino de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados respecto a ratones infectados con *Echinostoma caproni*. (+): sobre-expresión; (-): infra-expresión en tratados con rIL-25 e infectados frente a infectados. Cit.: citoplasma; MP: membrana plasmática; Mit.: mitocondria.

Tabla 3.2.- Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el fleon de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados con *Echinostoma caproni* respecto a ratones tratados con rIL-25.

<i>Spot</i> ^a	Identificación	Especie	Expresión	PM (Da) obs. ^b	PI obs. ^c	Papel celular	Loc. ^d	Puntuación MASCOT	Cobertura (%)
Enzimas metabólicas									
63	Piruvato quinasa PKM	<i>Mus musculus</i>	-1.9	132	8.2	Glicolisis	Cit Nuc	51.34	52.54
69	Piruvato quinasa PKM	<i>Mus musculus</i>	-1.7	132	8.48	Glicolisis	Cit Nuc	46.03	42.94
101	Glutamato deshidrogenasa 1	<i>Mus musculus</i>	-1.6	126	8.05	Anaplerosis glutamina	Mit	70.19	62.54
123	6-Fosfogluconato deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	-1.7	122	7.62	Vía pentosas fosfato	Cit	14	18.84
144	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	-1.8	118	8.46	Glicolisis	Cit MP Mit	89.91	79.95
154	Fumarata hidratasa	<i>Mus musculus</i>	-1.6	118	9.12	Ciclo de Krebs	Mit	39.41	35.5
156	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	-1.8	118	6.37	Glicolisis	Cit MP Mit	46.26	51.15

166	Creatina quinasa tipo B	<i>Mus musculus</i>	-2.0	116	5.34	Actividad creatina quinasa	Cit	12.4	29.92
184	Fosfoglicerato quinasa I	<i>Mus musculus</i>	-2.3	114	9.5	Glicolisis	Cit	46.01	63.55
214	Gliceraldehído 3P deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	-1.9	108	9.43	Glicolisis	Cit	15.03	42.94
226	Aspartato aminotransferasa	<i>Mus musculus</i>	-2.2	108	9.92	Metabolismo aminoácidos	Mit	48.42	50
250	Transaldolasa	<i>Mus musculus</i>	-1.8	102	7.04	Vía pentosas fosfato	Cit	20.35	35.34
257	Malato deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	-1.8	96	6.16	Ciclo de Krebs	Cit	28.05	41.62
262	Gliceraldehído 3P Deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	+1.8	100	8.44	Glicolisis	Cit	13.22	39.64
279	Ornitina carbamoiltransferasa	<i>Mus musculus</i>	-2.0	100	8.3	Metabolismo ornitina	Mit	35.79	45.87
290	Proteína palmitoil tioesterasa	<i>Mus musculus</i>	-2.6	94	8.85	Metabolismo palmitoil	Cit	10,04	21.5
296	Malato deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	-1.8	94	6.28	Ciclo de Krebs Transporte de malato	Cit	61.69	74.55

302	Malato deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	+2.2	90	5.58	Ciclo de Krebs Transporte de malato	Cit	17.01	36.53
305	Malata deshidrogenasa	<i>Mus musculus</i>	+1.7	90	5.98	Ciclo de Krebs Transporte de malato	Cit	42.04	53.59
387	Triosafosfato isomerasa	<i>Mus musculus</i>	-1.8	60	8.66	Glicolisis Gluconeogénesis	Cit	3.9	16.03
Proteínas estructurales									
243	Placoglobina	<i>Mus musculus</i>	-2.3	104	6.43	Adhesión celular	Cit	39.85	46.98
260	Placoglobina	<i>Mus musculus</i>	-1.5	102	8.18	Adhesión celular	Cit	29.38	29.4
325	Placoglobina	<i>Mus musculus</i>	-1.6	86	6.34	Adhesión celular	Cit	12.5	17.85
Enzimas detoxificantes y antioxidantes									
358	Dihidropteridina reductasa	<i>Mus musculus</i>	-2.5	74	8.4	Actividad oxidoreductasa	Mit	11.8	31.92
418	Glutation S transferasa P1	<i>Mus musculus</i>	-1.6	60	8.33	Conjugación glutatión y detoxificación	Cit Mit Nuc	18.06	57.14

421	Glutation S transferasa P1	<i>Mus musculus</i>	-1.7	59	9.21	Conjugación glutatión y detoxificación	Cit Mit Nuc	31.38	78.1
431	Peroxiredoxina 1	<i>Mus musculus</i>	-2.0	57	8.26	Regulación redox	Cit	10.18	33.67
Proteínas de unión a calcio									
271	Anexina A2	<i>Mus musculus</i>	+1.6	101	8.84	Transporte de membrana Homeostasis fibrina	MP	39.75	71.98
324	Anexina A4	<i>Mus musculus</i>	+2.5	86	5.02	Transporte de membrana	MP	23.72	41.69

^a El número de *spot* está referido a la **Figura 3.14**; ^b Peso Molecular observado (Da); ^c Punto isoelectrico observado; ^d Localización

Tabla 3.2.- Identificación por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos, de las proteínas que mostraron una expresión diferencial en el intestino de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 e infectados con *Echinostoma caproni* respecto a ratones tratados con rIL-25. (+): sobre-expresión; (-): infra-expresión en tratados con rIL-25 e infectados frente a tratados con rIL-25. Cit.: citoplasma; Nuc.: núcleo; Mit.: mitocondria; MP: membrana plasmática.

Tabla 3.3.- Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el fleón de ratones tratados con rIL-25 respecto a ratones control.

Spot ^a	Identificación	Especie	Expresión	PM (Da) obs. ^b	PI obs. ^c	Papel Celular	Loc. ^d	Puntuación MASCOT	Cobertura (%)
Enzimas metabólicas									
144	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	+1.2	110	6.37	Glicolisis Activación plasminógeno Metabolismo ornitina	Cit MP Mit	89.91	75.81
47	Enolasa 1B	<i>Mus musculus</i>	-1.5	110	6.75	Glicolisis Activación plasminógeno Metabolismo ornitina	Cit MP Mit	37.45	48.62
533	Triosafosfato isomerasa	<i>Mus musculus</i>	-1.9	60	6.28	Glicolisis Gluconeogénesis	Cit	25	45.48
Proteínas estructurales									
527	Placoglobina	<i>Mus musculus</i>	+1.7	27	8.7	Adhesión celular	Cit	3.33	3.44
Enzimas antioxidantes y detoxificantes									
404	Peroxiredosina 4	<i>Mus musculus</i>	-1.9	60	5.9	Regulación Redox	Cit	10.61	42.34

Proteínas regulación celular									
159	Proliferación asociada a 2G4	<i>Mus musculus</i>	-1.8	108	6.83	Procesos apoptóticos Diferenciación celular	Cit Nuc	29.09	41.62
306	Receptor de protein C quinasa 1 activada	<i>Mus musculus</i>	-1.8	83	8.31	Procesos apoptóticos Ritmos biológicos Regulación translación	MP Nuc	13.62	27.76

^aEl número de *spot* está referido a la **Figura 3.15.**; ^b Peso Molecular observado (Da); ^c Punto isoelectrico observado; ^d Localización.

Tabla 3.3.- Identificación por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos, de las proteínas que mostraron una expresión diferencial en el intestino de ratones tratados con recombinante (r)IL-25 respecto a ratones control. (+): sobre-expresión; (-): infra-expresión en tratados con rIL-25 frente a control. Cit.: citoplasma; Nuc.: núcleo; Mit.: mitocondria; MP: membrana plasmática.

podría ser crucial para el mantenimiento de la barrera del epitelio intestinal durante infecciones causadas por helmintos intestinales.

En cuanto a enzimas de tipo antioxidantes y detoxificante, se encuentra una regulación a la baja de la expresión de peroxirredoxina 1 y 4, glutatión S-transferasa y la dihidropteridina reductasa en presencia de rIL-25 y/o infección. La peroxirredoxina 4 juega un papel importante en la reducción del estrés oxidativo mediante la reducción del peróxido de hidrógeno a agua en un ciclo catalítico dependiente de tior y también se ha relacionado con la regulación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción proinflamatorio clave. La marcada regulación a la baja de peroxirredoxina 4 podría apoyar que la presencia de infección promueve la alteración de los procesos relacionados con el estrés oxidativo y muerte celular de manera independiente a la inoculación de IL-25. Por tanto, la IL-25 no parece ejercer ninguna función relacionada con la regulación de los procesos de estrés oxidativo y apoptosis necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En cambio, los animales tratados con rIL-25 e infectados presentaron una infra-expresión de la peroxirredoxina 1 con respecto a los ratones tratados con rIL-25. Esta proteína es clave en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes y en las respuestas inflamatorias. Esta regulación a la baja de la peroxirredoxina 1 se observó en aquellos animales que resultaron refractarios a la infección por *E. caproni*. Por tanto, la producción reducida de esta enzima después de la infección en presencia de rIL-25 puede estar relacionada con la activación de los procesos de proliferación celular e inducción de estrés oxidativo y muerte celular programada mediada por ROS para contrarrestar las alteraciones homeostáticas generadas por la infección.

La infección de ratones previamente tratados con rIL-25 también indujo una reducción en la producción de la proteína palmitoil tioesterasa (PTT). Las proteínas tioesterasas proporcionan un control dinámico sobre la localización o función de las proteínas. Asimismo, la regulación a la baja de PTT se encuentra

implicada en la interrupción de la vía lisosoma-endosomal, endocitosis, tráfico vesicular y metabolismo de lípidos, entre otros procesos. Además, parece estar involucrada en la muerte celular, defectos en las actividades de las enzimas mitocondriales y metabolismo energético adaptativo. Por esta razón, la infraexpresión de PPT tras la infección de ratones con *E. caproni* en presencia de rIL-25 puede estar relacionada con la función de esta proteína en la regulación de la muerte celular y el metabolismo energético asociados con el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Esto se encuentra apoyado por la regulación a la baja de la creatina quinasa de tipo B (CKB) de manera concomitante. La CKB presenta un papel clave en la transducción de energía en los tejidos con incrementos en de la demanda energética. La CKB participa en una vía energética regulada por señales hipóxicas que pueden mejorar el metabolismo de la creatina (Cr) en ausencia de oxígeno facilitando la remodelación de los tejidos y mantenimiento de la homeostasis. Por tanto, la alteración del transporte de Cr / PCr (fosfocreatinina) puede ser otro factor más que contribuye a la desregulación de la energía mitocondrial y al incremento de la permeabilidad en los tejidos inflamados y, por último, al establecimiento de la infección por *E. caproni*.

3.3. ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS TH2 E IL-25 EN RESISTENCIA FRENTE A INFECCIONES CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN

La IL-25 es una citoquina de tipo alarmina derivada de células epiteliales intestinales que participa en la iniciación y amplificación de la inmunidad protectora de tipo Th2 frente a infecciones causadas por numerosas especies de helmintos intestinales. En cambio, los mecanismos activados por estas respuestas inmunitarias son poco conocidos a día de hoy (Cortés *et al.*, 2017a; Smith *et al.*, 2018).

Estudios recientes han mostrado que la IL-25 ejerce un papel clave en el desarrollo de respuestas Th2 e interviene en funciones antiinflamatorias mediante la regulación a la baja de las respuestas Th1 y Th17 (Owyang *et al.*, 2006; Kleinschek *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016). Asimismo, la presencia de niveles elevados de IL-25 en el medio intestinal en el momento de la exposición a infecciones por helmintos intestinales se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la infección a través de la activación de los mecanismos efectores mediados por las respuestas Th2. Entre estos mecanismos efectores involucrados en la expulsión de los parásitos intestinales se incluye hiperplasia de células mucosectoras, hipercontractilidad del músculo liso, expresión de la molécula RELM- β y mastocitosis intestinal, entre otros (Cortés *et al.*, 2017a). A pesar de los estudios realizados recientemente acerca del origen y mecanismos de acción de la IL-25, existe cierta incertidumbre en torno al papel desempeñado por la IL-25 en la generación de respuestas protectoras Th2 frente a las infecciones causadas por helmintos intestinales ya que no se conoce claramente si la participación de IL-25 se restringe a la activación y amplificación de las respuestas Th2 o si presenta funciones directamente involucradas en la activación de los mecanismos efectores de resistencia (Angkasekwinai *et al.*, 2007; Mearns *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2018). Además, la participación de IL-25 en las vías de diferenciación celular de las células Th en células de memoria y la implicación de la misma en el desarrollo del estado de inmunidad frente a las infecciones causadas por helmintos intestinales está todavía por esclarecer (Mearns *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2018).

3.3.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Estudios previos desarrollados con el modelo experimental *E. caproni*-ratón mostraron que la ausencia de IL-25 en infecciones primarias se caracterizaban por el desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo Th1 dando lugar a infecciones

de carácter crónico. En cambio, la cura farmacológica de estas infecciones induce de manera inespecífica la expresión de IL-25 que protege a los ratones frente a una infección secundaria la cual se encuentra asociada al desarrollo de una respuesta Th2 y la activación de los mecanismos efectores mediados por la misma (Cortés *et al.*, 2017a). En relación con estudios previos realizados por el presente grupo de investigación, se realizó este trabajo con la finalidad de analizar el papel ejercido por la IL-25 en la generación de resistencia en infecciones producidas por *E. caproni* en ratón. Este estudio se ha centrado en analizar los factores involucrados en la modulación de la expresión de IL-25 en infecciones por *E. caproni*, el papel de la IL-25 en la regulación de la respuesta inmunitaria y los mecanismos efectores inducidos por la IL-25 responsables del desarrollo de resistencia.

Para llevar a cabo este trabajo, se emplearon un total de 134 ratones machos de la cepa ICR todos ellos de 5 semanas de edad en el momento de la estabulación en nuestras instalaciones. La dosis empleada para la infección experimental de los animales fue de 50 metacercarias administradas por vía oral. Para la consecución de los resultados, a partir de estos animales se analizó la tasa de infección en diferentes condiciones experimentales, la expresión de citoquinas y marcadores celulares (RELM- β y marcadores de macrófagos) por RT-PCRrt, el recuento de células mucosecretoras, el recuento de células *tuft* e ILC2s y la carga bacteriana total a partir de heces por PCRrt.

3.3.2. INFECCIÓN CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN PRESENCIA DE CITOQUINAS TH2

Se infectaron un total de 15 ratones con 50 metacercarias de *E. caproni* de los cuales 5 fueron tratados con rIL-4, otros 5 con rIL-13 y los 5 restantes se emplearon como controles de una infección primaria convencional (véase protocolo

experimental en Apartado 2.6.1.-b) Administración intraperitoneal de rIL-4 y rIL-13). Asimismo, se emplearon otros 10 ratones como controles del tratamiento de estas recombinantes en ausencia de infección: 5 tratados con rIL-4 y otros 5 tratados con rIL-13. Otros 5 últimos ratones, no infectados y no tratados con ninguna recombinante, se consideraron como ratones control negativos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la inoculación de las citoquinas propias de respuestas Th2 no generan resistencia frente a la infección primaria por *E. caproni* en ratón. La tasa de recuperación de adultos en los ratones a los que se suministraron rIL-4 [51-65% ($61,2 \pm 11,2\%$)] o rIL-13 [62-85% ($76,1 \pm 16,5\%$)] fue muy similar a la observada en los animales control de a una infección primaria convencional [54-68% ($62,1 \pm 10,6\%$)] (**Figura 3.16A**).

El análisis de la expresión de citoquinas realizado mediante RT-PCR_{rt} mostró que en animales infectados y tratados con rIL-13 se producía una disminución significativa en los niveles de expresión de las citoquinas IL-13 e IL-4 con respecto a los animales tratados con rIL-4 (**Figura 3.16B**). Además, el tratamiento de los animales infectados con rIL-4 y rIL-13 produjo una marcada regulación a la baja de citoquinas propias de respuestas Th1, tales como IL-12p35, IL-12-p40 o IFN- γ . Sin embargo, los ratones infectados y tratados con rIL-4, mostraron incrementos significativos en la expresión de IL-13 (**Figura 3.16B**). No se observaron diferencias significativas entre grupos ni con respecto a los animales control de infección primaria en la expresión de IL-25 ni en la expresión de marcadores de macrófagos (no representado).

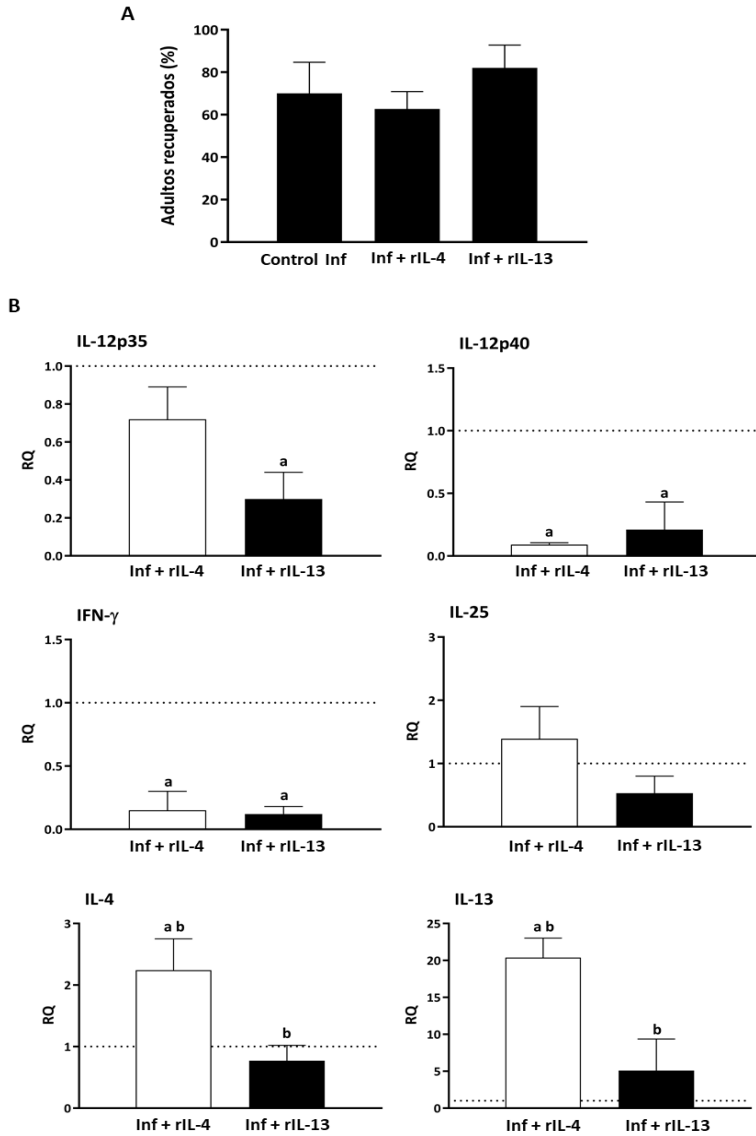


Figura 3.16.- Tratamiento con recombinante de (r)IL-4 o rIL-13 tras la inducción de la infección con *Echinostoma caproni* en ratón. (A) Porcentaje de recuperación de adultos de *E. caproni* en animales control de infección, infectados (Inf) y tratados con rIL-4 e infectados y tratados con rIL-13 a las dos semanas de la inducción de la infección; (B) Expresión de ARNm de citoquinas en el tejido intestinal de ratones infectados y tratados con rIL-4 o rIL-13 tras dos semanas de infección con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) de citoquinas se muestran tras la normalización con el gen β -actina y la estandarización con respecto a la expresión relativa en ratones controles de infección primaria (línea discontinua). Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

En cuanto al recuento de células mucosecretoras, los ratones control de infección primaria presentaron entre 6,1 y 9,4 células por unidad de cripta ($8,1 \pm 1,2$ células por cripta). Sin embargo, los animales a los que se suministró rIL-13 mostraron una hiperplasia de células mucosecretoras significativa ($13,1 \pm 2,5$ células por cripta) y ésta fue incluso más elevada en aquellos animales tratados con rIL-13 que fueron previamente infectados por *E. caproni* ($19,3 \pm 4,3$ células por cripta). Por el contrario, de los animales tratados con rIL-4 la hiperplasia de las células mucosecretoras solo se produjo en aquellos que fueron previamente infectados con metacercarias de *E. caproni* ($15,3 \pm 2,9$ células por cripta) (**Figura 3.17A**). Asimismo, los niveles de expresión de RELM- β fueron regulados negativamente en animales infectados y tratados con rIL-4 con respecto a los animales control y tratados con rIL13. Sin embargo, estos valores se vieron incrementados en los animales tratados con rIL-13 siendo más elevados en aquellos animales que fueron posteriormente sometidos a la infección experimental (**Figura 3.17B**).

3.3.3. BLOQUEO DE IL-25 EN INFECCIÓN SECUNDARIA CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN

Para estudiar el papel ocupado por la IL-25 en el desarrollo de resistencia frente a las infecciones por *E. caproni*, se infectaron experimentalmente un total de 10 ratones que fueron posteriormente tratados con pzq a las 4 spip. A un total de 5 de estos ratones, a las 2 semanas de la cura de una infección primaria (2 sptto) y antes de la infección secundaria con *E. caproni*, se les administró por vía intraperitoneal un anticuerpo α -IL-25 para neutralizar la IL-25 producida de manera inespecífica. Los 5 ratones restantes recibieron una infección secundaria al mismo tiempo, pero sin ser inoculados con α -IL-25. Todos los ratones fueron

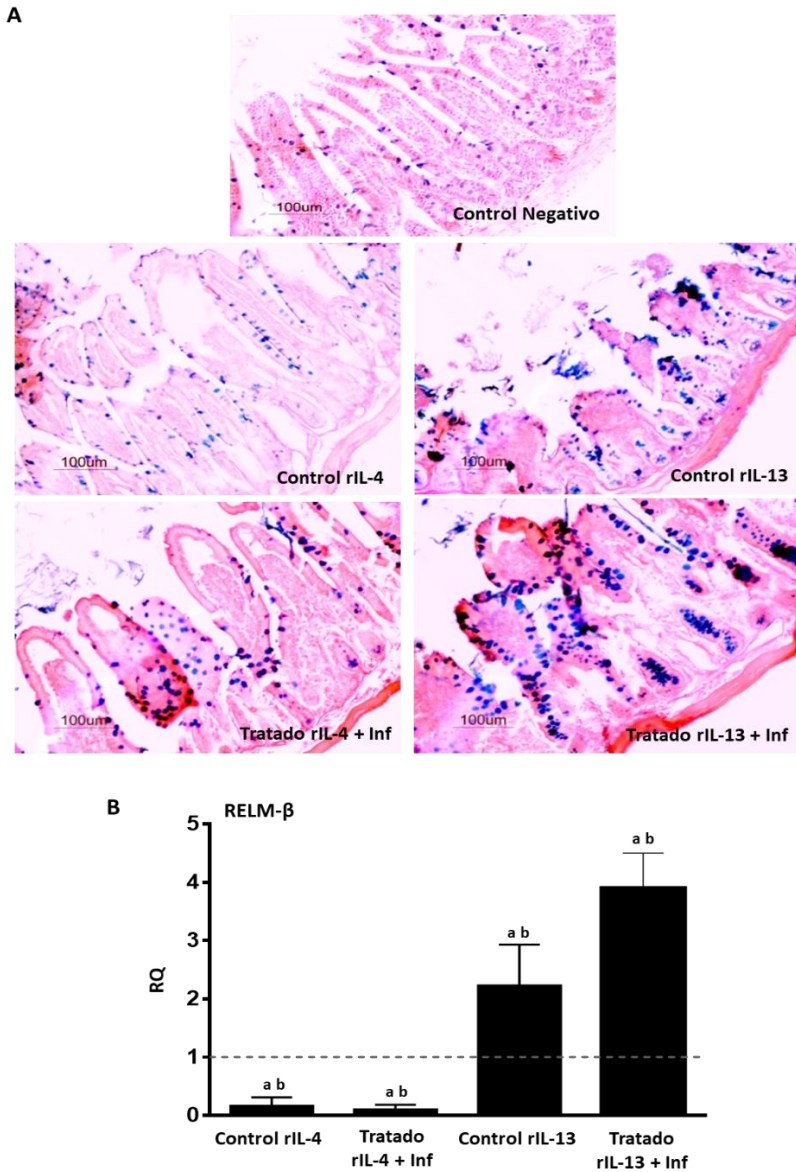


Figura 3.17.- Imágenes de la expresión de células mucosecretoras y la molécula RELM- β en el intestino de ratones tratados con recombinante (r)IL-4 o rIL-13 previamente a la inducción de la infección por *Echinostoma caproni*. Tinción con azul alcian de las células mucosecretoras de tejido intestinal (A) y expresión de ARNm de RELM- β en el tejido intestinal (B) de ratones control negativo, ratones tratados con rIL-4 en presencia o ausencia de infección (Inf) y ratones tratados con rIL-13 en presencia o ausencia de infección a las 2 semanas tras la inducción de la infección con *E. caproni*. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los controles negativos; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

sacrificados a las 2 semanas post infección secundaria (2 spis). Adicionalmente, se sacrificaron 3 ratones en el mismo momento experimental y fueron empleados como control negativo del experimento.

Los resultados obtenidos muestran que el bloqueo de la IL-25 revierte la resistencia parcial a la infección secundaria y el número de adultos recuperados en el momento del sacrificio fue significativamente mayor en los animales inoculados con α -IL-25 que en los ratones no inoculados (**Figura 3.18A**). Así, el porcentaje de infección en el grupo de animales inoculados con α -IL-25 se encontraba en un 78-89% ($84,00 \pm 3,9$), en cambio, los ratones sometidos a infección secundaria sin el anticuerpo bloqueante de IL-25 presentaron una tasa de infección del 9-32% ($23,12 \pm 8,2$).

La expresión de citoquinas en infección secundaria en presencia y ausencia de niveles elevados de IL-25 a las 2 spis fue estudiada por RT-PCRrt. Las alteraciones más destacadas fueron observadas en la expresión de las citoquinas IL-4, IL-13 e IL-25. En el grupo de animales inoculados con α -IL-25 se observa un incremento significativo de la expresión de IL-4 e IL-13 y una regulación a la baja de la expresión de IL-25 endógena (**Figura 3.18B**). Asimismo, en los animales a los que no se suministró α -IL-25 se produjo una respuesta inmunitaria de tipo Th2 con una regulación positiva de la expresión génica de IL-4 e IL-13 junto con incrementos en la expresión de IL-25 tras la inducción de la infección secundaria. Por otro lado, la expresión de citoquinas de tipo Th1 fue regulada negativamente en ambos grupos experimentales. El hecho más destacable observado fue la reducción de los niveles de expresión génica de IL-25 en los ratones inoculados con α -IL-25 que fueron similares a los obtenidos en una infección primaria (**Figura 3.18B**).

Para analizar los posibles cambios generados en las vías de activación de macrófagos inducidas en presencia o ausencia de niveles elevados de IL-25, analizamos los marcadores de activación de macrófagos por la vía clásica o M1 (Arg

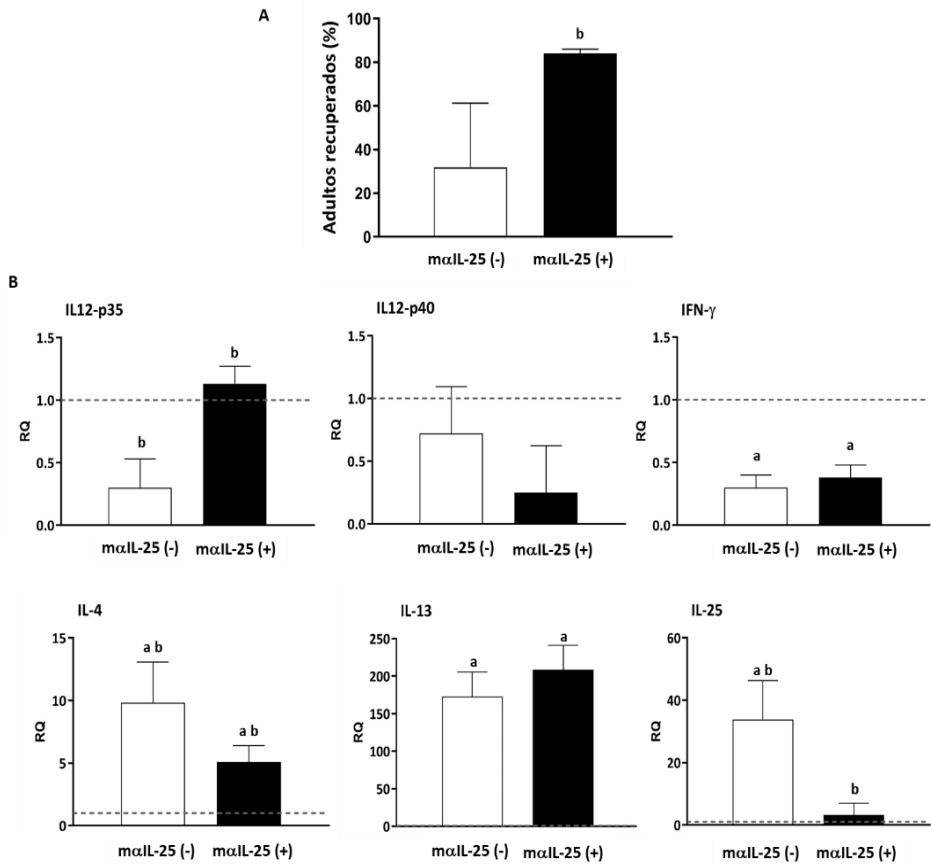


Figura 3.18.- Tasa de infección y perfil de expresión de citoquinas en infección secundaria con *Echinostoma caproni* en ratón en presencia o ausencia de niveles elevados de IL-25 en el momento de la inducción de la infección. (A) Porcentaje de adultos de *E. caproni* recuperados tras el sacrificio de ratones inoculados y no inoculados con mα-IL-25 previamente a la inducción de la infección secundaria; **(B)** expresión del ARNm de citoquina en el tejido intestinal de ratones tratados y no tratados con mα-IL-25 tras la infección secundaria con *E. caproni*. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran tras de la normalización con β-actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones controles negativos. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativo; b: diferencias significativas entre grupos (p<0,05).

II e iNOS) y alternativa o M2 (Ym-1 y Arg I). Los datos obtenidos mostraron que el bloqueo de la IL-25 endógena por el anticuerpo mα-IL-25 mantiene el predominio de la activación de macrófagos por la vía M2 al igual que lo observado en infecciones secundarias con *E. caproni*. En cambio, se observó una reducción

significativa en la expresión de los marcadores Arg I, Arg II e iNOS con respecto al grupo de ratones no tratados con el anticuerpo de bloqueo de la IL-25 endógena (**Figura 3.19.**). En cuanto al recuento de células mucoscretoras, no se observaron

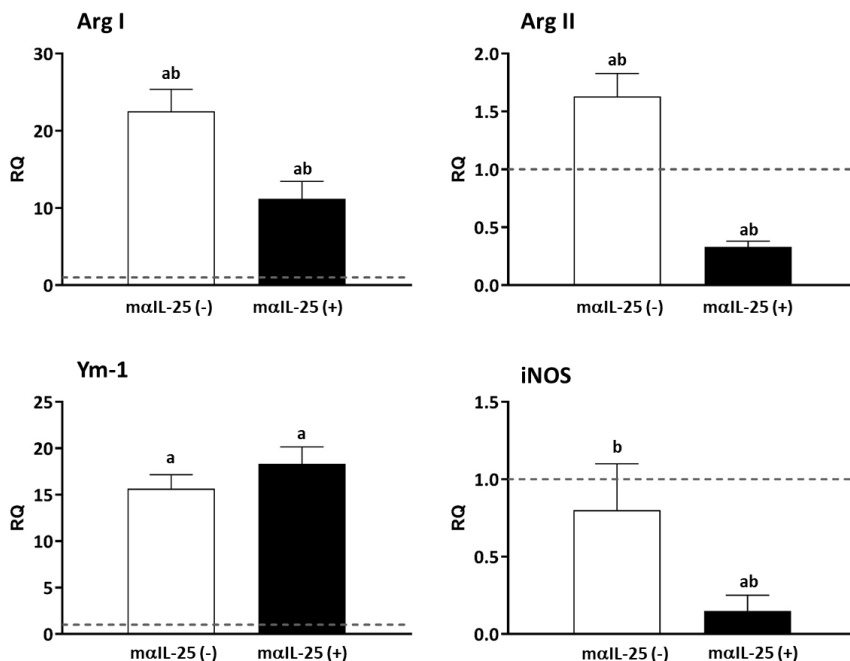


Figura 3.19.- Estudio del patrón de activación de los macrófagos en ratones en presencia y ausencia de niveles elevados de IL-25 en infección secundaria con *Echinostoma caproni*. Análisis de la expresión de ARNm de los marcadores de activación de macrófagos por la vía clásica (Arg II e iNOS) y vía alternativa (Arg I e Ym-1) en el tejido intestinal de ratones inoculados y no inoculados con mα-IL25 tras la inducción de la infección secundaria con *E. caproni*. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran después de la normalización con el gen β-actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones controles negativos. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativo; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

diferencias significativas en el intestino de ratones mαIL-25(-) y los controles negativos, con recuentos de $63,4 \pm 11,2$ y $64,6 \pm 2,5$ células por campo 400x, respectivamente. Sin embargo, en los ratones en presencia de infección secundaria y mα-IL-25(+), el recuento celular alcanzó unos valores significativos de $144,0 \pm$

5.9 células mucosecretoras por campo ($p < 0,05$). Asimismo, el bloqueo de la IL-25 endógena no provocó cambios significativos en la expresión del gen RELM- β entre grupos siendo estos niveles significativamente superiores a los observados en animales control negativo ($p < 0,05$) (**Figura. 3.20.**).

3.3.4. INFECCIÓN SECUNDARIA CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN PRESENCIA DE NIVELES BASALES DE IL-25

Para estudiar de manera más exhaustiva el papel llevado a cabo por la IL-25 producida de manera innata tras la cura de una infección primaria de *E. caproni* en el desarrollo de respuestas de resistencia frente a infecciones secundarias inducidas en ratón, se retrasó la exposición secundaria a las metacercarias de *E. caproni* hasta que los niveles de expresión del gen IL-25 volvieron a valores basales. Estos datos fueron comparados con los obtenidos en un grupo de animales de la misma edad sometidos a infección primaria por este parásito.

Así, para monitorizar los niveles de expresión de IL-25 tras la cura de la infección primaria se emplearon un total de 15 ratones que fueron previamente infectados con 50 metacercarias de *E. caproni*. A las 4 spip todos los animales se trataron con pzq y se confirmó la desparasitación mediante Kato-Katz. Cada 2 semanas desde el tratamiento con pzq (6, 8, 10, 12 y 14 spip), 3 animales fueron sacrificados para analizar la expresión de IL-25 mediante RT-PCRrt. Además, un total de 3 ratones no infectados fueron utilizados como control negativo. De este modo, se observó que a las 14 spip (10 sptto) los niveles de IL-25 en el intestino de los ratones infectados con *E. caproni* y tratados con pzq volvían a niveles basales, arrojando valores estadísticos muy similares a los obtenidos en los animales controles negativos (**Figura 3.21A**).

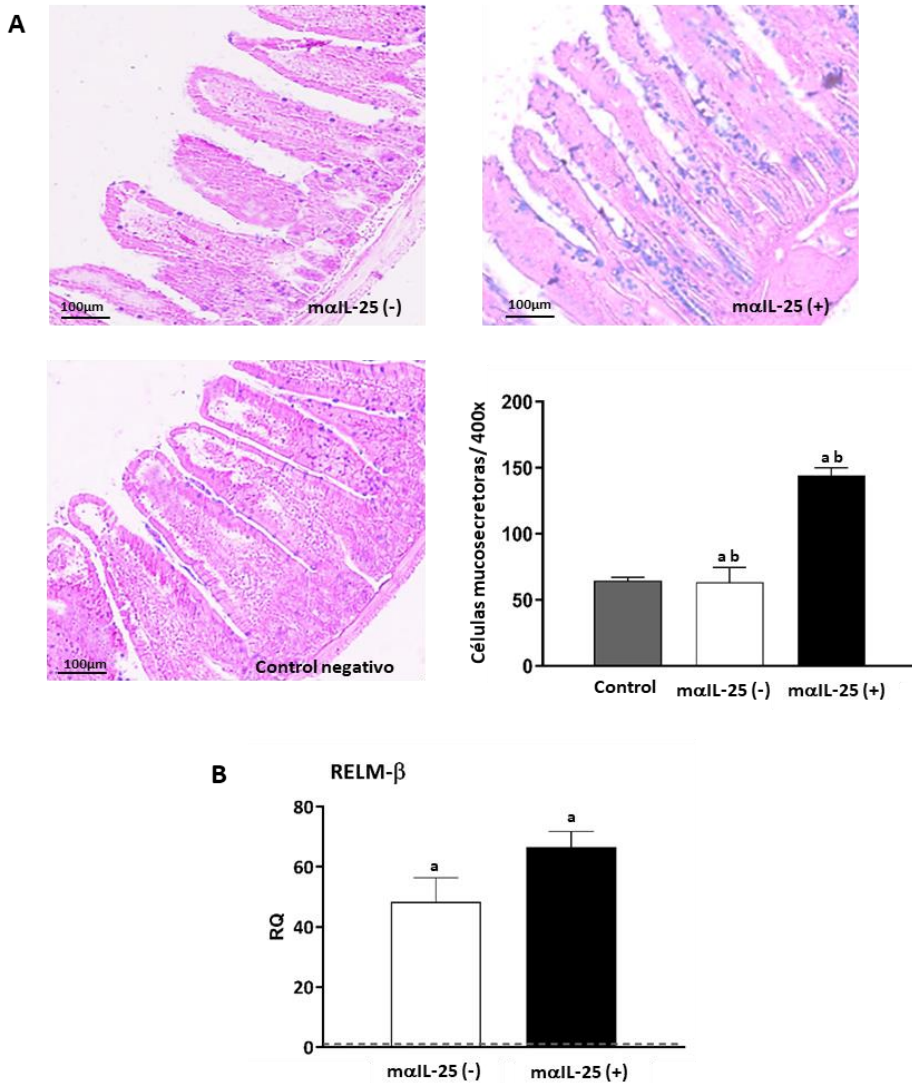


Figura 3.20. Recuento de células mucoscretoras y análisis de la expresión de la molécula RELM- β en presencia y ausencia de niveles elevados de IL-25 en el intestino delgado de ratones sometidos a infección secundaria con *Echinostoma caproni*. (A) Recuento de células mucoscretoras en secciones intestinales de ratón a partir de muestras teñidas con azul alcian a 400 aumentos con microscopio óptico en ratones inoculados y no inoculados con m α IL-25 previamente a la inducción de la infección secundaria con *E. caproni*. (B) Análisis de la expresión de ARNm del gen RELM- β en los diferentes grupos experimentales. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran después de la normalización con el gen β -actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones controles negativos. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativo; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

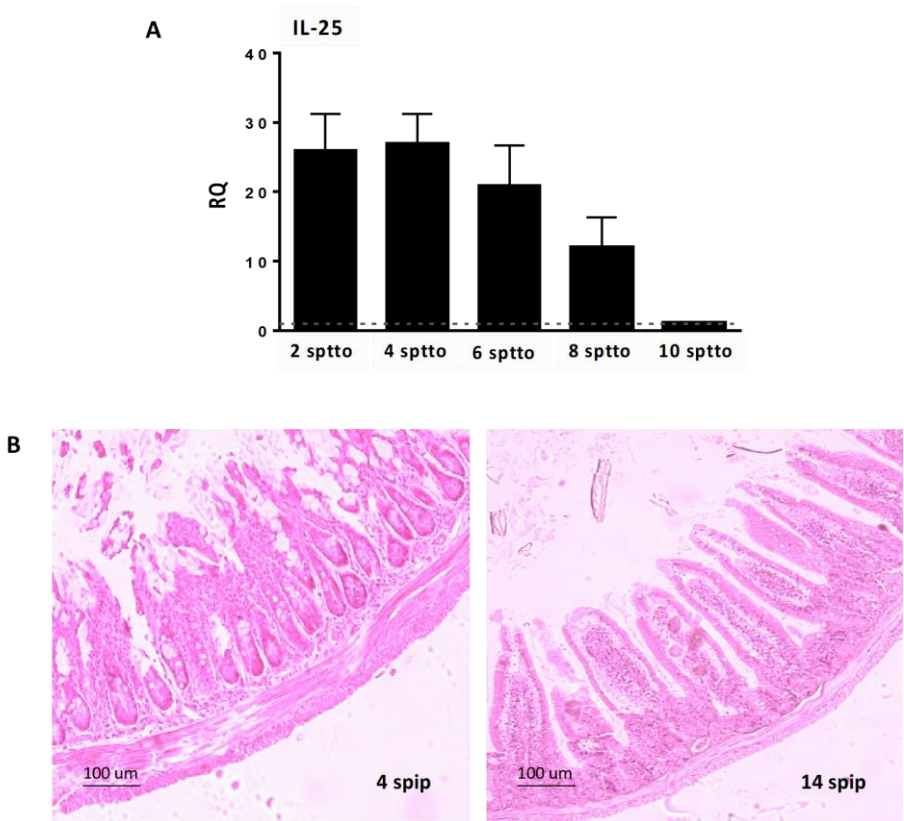


Figura 3.21 Análisis de la expresión relativa del gen IL-25 a diferentes tiempos tras la cura farmacológica de una infección primaria con *Echinostoma caproni* en ratón e imágenes representativas de las vellosidades intestinales de ratones tras infección primaria y tratamiento con praziquantel (pzq) (a distintos tiempos post tratamiento). (A) Expresión del ARNm de IL-25 en el tejido intestinal de ratones expuestos a una infección primaria con *E. carponi* y tratados con praziquantel a diferentes tiempos post tratamiento (ptto). Las cantidades relativas (RQ) del gen de IL-25 se muestran después de la normalización con β -actina y la estandarización de la cantidad relativa frente al control negativo. Las barras verticales representan la desviación estándar. (B) Imagen representativa de las vellosidades intestinales teñidas con hematoxilina-eosina de ratones infectados y tratados con pzq a las 4 semanas post-infección primaria (spip) y a las 14 spip.

Asimismo, se comprobó que el tejido intestinal se había regenerado completamente transcurrido este tiempo (**Figura 3.21B**). En base a estos datos se seleccionó las 10 sptto como momento para llevar a cabo la infección secundaria en presencia de niveles basales de IL-25.

Un total de 3 ratones fueron infectados, tratados con pzq a las 4 spip y sometidos a infección secundaria a las 10 sptto (14 spip). Tanto la infección primaria como la infección secundaria se realizaron empleando una dosis de 50 metacercarias de *E. caproni* y todos los animales se sacrificaron a las 2 spis (16 spip).

Además, para contemplar los posibles efectos de la edad del animal en los resultados de una infección, un total de 6 ratones se mantuvieron estabulados sin infectar durante 14 semanas. En ese momento, 3 de estos ratones fueron infectados con 50 metacercarias de *E. caproni* y se sacrificaron a las 2 spip. Los 3 ratones restantes (no infectados) se sacrificaron al mismo tiempo que los anteriores y fueron utilizados como control negativo.

La tasa de recuperación de adultos obtenida en los animales infectados secundariamente en presencia de niveles basales de IL-25 y animales con infección primaria de la misma edad, mostró que tras la disminución de los niveles de expresión de IL-25, los animales eran nuevamente susceptibles a la infección por *E. caproni*. La recuperación de adultos en infecciones secundarias en ausencia de IL-25 [46-59% ($54,2 \pm 11,1$)] fue similar a la observada en los animales de la misma edad sometidos a infección primaria [49-61% ($58,6 \pm 13,6$)] (**Figura 3.22A**).

El estudio del perfil de expresión de citoquinas mostró que la infección secundaria por *E. caproni* inducida a las 10 sptto promueve el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo Th2, a pesar de la presencia de niveles basales de IL-25 en el momento de la exposición a la infección secundaria (**Figura. 3.22B**). En este ambiente de infección, se obtuvo un perfil de citoquinas caracterizado por la expresión significativa al alza de las citoquinas IL-4 e IL-13 y regulación negativa o alterada de citoquinas Th1 tales como IL-12p35, IL-12p40 o IFN- γ con respecto a los animales control negativo de infección. Sin embargo, en los animales sometidos a infección primaria a la misma semana de edad, se observó un perfil de

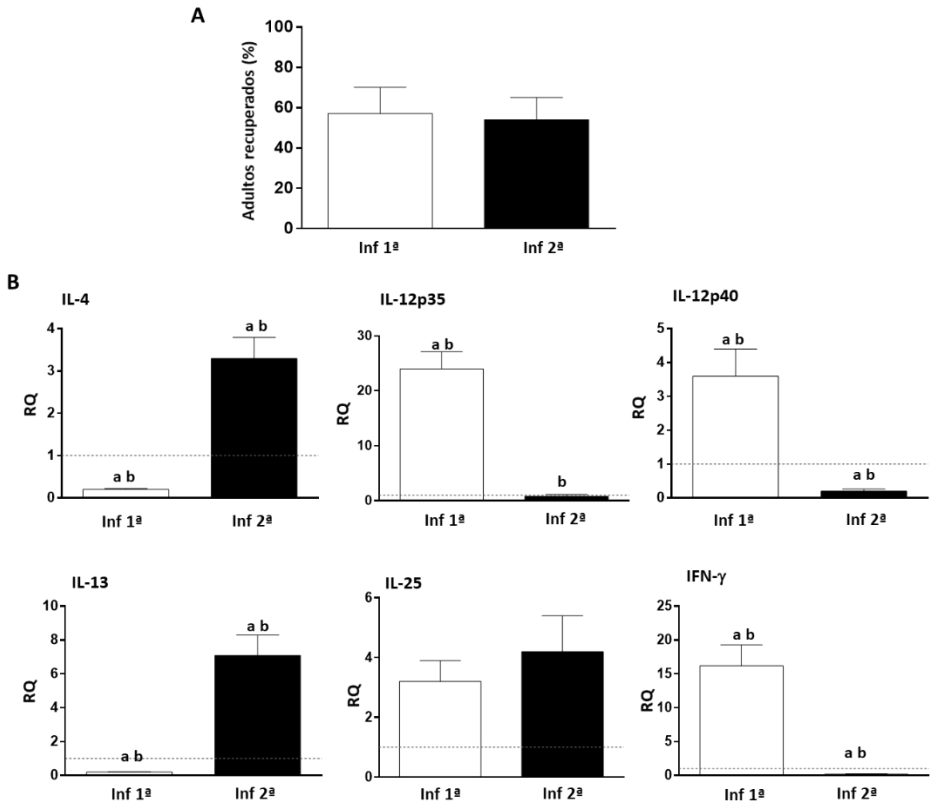


Figura 3.22.- Estudio del porcentaje de adultos recuperados y expresión relativa de las principales citoquinas involucradas en respuesta a la infección primaria y secundaria frente a *Echinostoma caproni* en ratón tras la recuperación de la expresión basal de ARNm de IL-25. (A) Porcentaje de adultos recuperados en ratones sometidos a infección primaria y ratones infectados secundariamente tras la cura de la infección primaria tras recuperar niveles basales de IL-25; **(B)** Expresión de ARNm en tejido intestinal de las principales citoquinas involucradas en la respuesta inmunitaria generada en ratones en presencia de niveles basales de IL-25 a las 2 semanas tras la inducción de la infección primaria y secundaria por *E. caproni*, respectivamente. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran tras la normalización con β -actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones controles a día 0. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativos; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

expresión de citoquinas de tipo Th1. Asimismo, no se mostraron diferencias significativas entre grupos en relación con la expresión endógena de IL-25 (**Figura 3.22B**).

3.3.5. EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS TUFT E ILC2S GATA3+ EN RESPUESTAS TH2 FRENTE A INFECCIONES CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Con la finalidad de analizar las poblaciones celulares involucradas en la producción de IL-25, se realizó el recuento de células *tuft* e ILC2s GATA3+ en un total de 15 ratones. Los 15 ratones fueron infectados con una dosis de 50 metacercarias de *E. caproni* de los cuales, 5 fueron sacrificados a las 4 spip y los 10 restantes se trataron con pzz en el mismo momento experimental. Seguidamente, 5 de estos 10 animales fueron sacrificados a las 2 sptto (6 spip) y los otros 5 se sometieron a una infección secundaria y fueron finalmente sacrificados a las 2 spis (8 spip). Además, se emplearon 3 ratones adicionales como control del experimento.

En los animales infectados no se observó hiperplasia de las células *tuft* con respecto a los controles negativos, pero se mostró un ligero incremento en las poblaciones de ILC2s GATA3+ (8.91 ± 2.67). Tras el tratamiento de la infección primaria con pzz no se mostró ningún aumento en ninguna de estas poblaciones celulares estudiadas. En cambio, se observó un marcado incremento en el recuento de células *tuft* e ILC2s GATA3+ (22.65 ± 2.19 y 22.09 ± 1.19 , respectivamente) como consecuencia de la infección secundaria (**Figura 3.23 y 3.24.**).

3.3.6. MECANISMOS EFECTORES MEDIADOS POR CITOQUINAS TH2 VÍA ACTIVACIÓN DE STAT6 EN RESISTENCIA FRENTE A *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Para evaluar el papel de las citoquinas Th2 en la activación de los mecanismos efectores vía STAT6 que intervienen en la resistencia mediada por

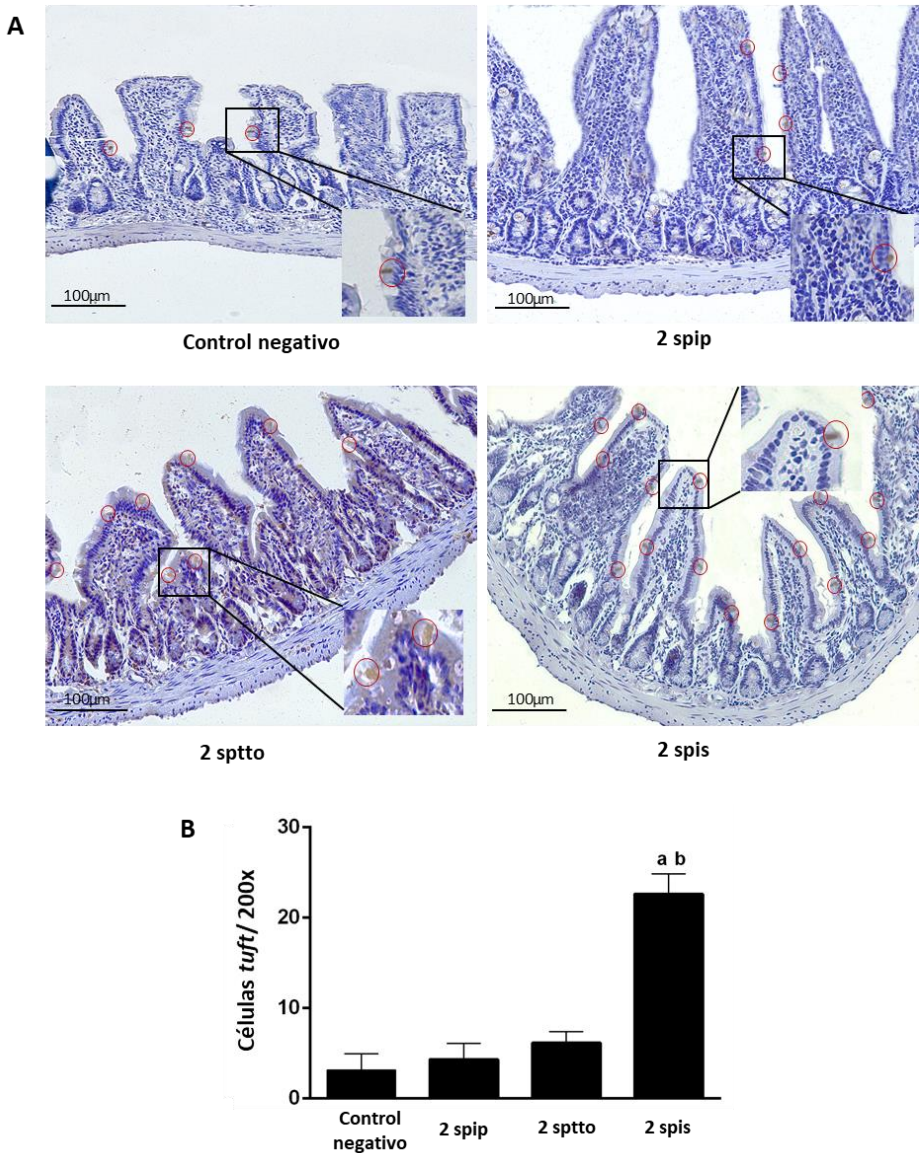


Figura 3.23.- Estudio de la cinética de las poblaciones de células tuft en secciones de intestino delgado obtenidas de ratones tras la inducción de infección primaria (2 spip), tratamiento con praziquantel (2 sptto) e infección secundaria con *Echinostoma caproni* (2 spis). (A) Imágenes de inmunohistoquímicas teñidas con hematoxilina modificada de Mayer's que muestran los cambios en las poblaciones de células tuft y (B) recuento de células tuft realizado a 200 aumentos bajo microscopio óptico en las diferentes condiciones experimentales. a: diferencias significativas con respecto a los ratones control negativo; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Spip: semanas post infección primaria; sptto: semanas post tratamiento con pzo; spis: semanas post infección secundaria.

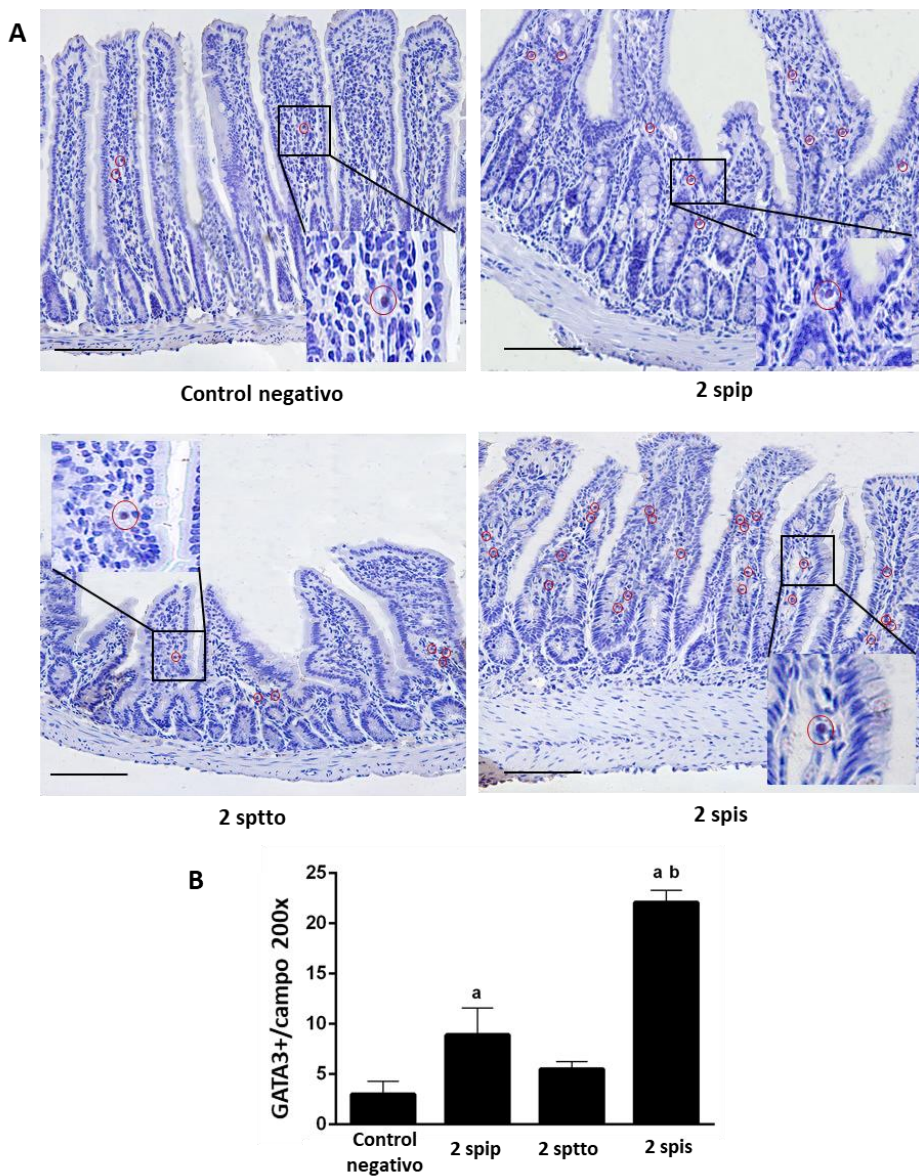


Figura 3.24.- Estudio de la cinética de las poblaciones de células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) en secciones de intestino delgado obtenidas a partir de ratones tras la inducción de infección primaria (2 spip), tratamiento con praziquantel (pzq) (2sptto) e infección secundaria por *Echinostoma caproni* (2 spis). (A) Imágenes de inmunohistoquímica teñidas con hematoxilina modificada de Mayer's que muestran cambios en las poblaciones de ILC2 mediante el marcador GATA3+ y (B) recuento de ILC2 a 200 aumentos bajo microscopio óptico en las diferentes condiciones experimentales. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Spip: semanas post infección primaria; sptto: semanas post tratamiento con pzq; spis: semanas post infección secundaria.

IL-25, se empleó un total de 15 ratones. Por un lado, 5 ratones fueron inoculados con rIL-25 y con anticuerpos α IL-4R α y IL-13R α s₂ (bloqueantes de los receptores Th2) de manera intraperitoneal. Por otro lado, 10 ratones fueron inoculados vía intraperitoneal con los anticuerpos α IL-4R α y IL-13R α s₂ (bloqueantes de los receptores Th2). De estos 10 animales, 5 fueron sometidos a infección primaria por *E. caproni* con una dosis de 50 metacercarias. Asimismo, los 5 animales restantes fueron inoculados con rIL-25 de manera intraperitoneal y expuestos a una infección primaria convencional. Además, se emplearon 3 ratones como control del experimento. Todos los animales fueron sacrificados a las 2 spip.

Los resultados ponen de manifiesto que los animales sometidos al tratamiento previo con rIL-25, resultaron refractarios a la infección por *E. caproni*. En el grupo de animales inoculados con los anticuerpos de bloqueo de los receptores de las citoquinas Th2, IL-4R α y rIL-13R α s₂, se observó una reducción significativa en la fosforilación y translocación de STAT6 con respecto a los animales infectados en presencia de rIL-25 a las 2 spip. En el grupo de animales inoculados con rIL-25 y los dos anticuerpos de bloqueo en ausencia de infección, la señal de fluorescencia obtenida fue similar a la observada en animales controles que no habían sufrido ningún tratamiento previo (**Figura 3.25.**).

En cuanto al perfil de citoquinas, cabe destacar que la respuesta generada tras la exposición a la infección con *E. caproni* fue diferente en cada grupo de ratones (**Figura 3.26.**). En los animales que recibieron el tratamiento de los anticuerpos bloqueantes de los mecanismos efectoros Th2, se desarrolló una respuesta inmunitaria de tipo Th1 con niveles elevados en la expresión de IFN- γ y sin cambios significativos en los niveles de expresión de IL-4 e IL-13 con respecto a los controles negativos. Asimismo, no se mostraron cambios significativos en la expresión de IL-25 ni en el resto de citoquinas estudiadas en comparación con

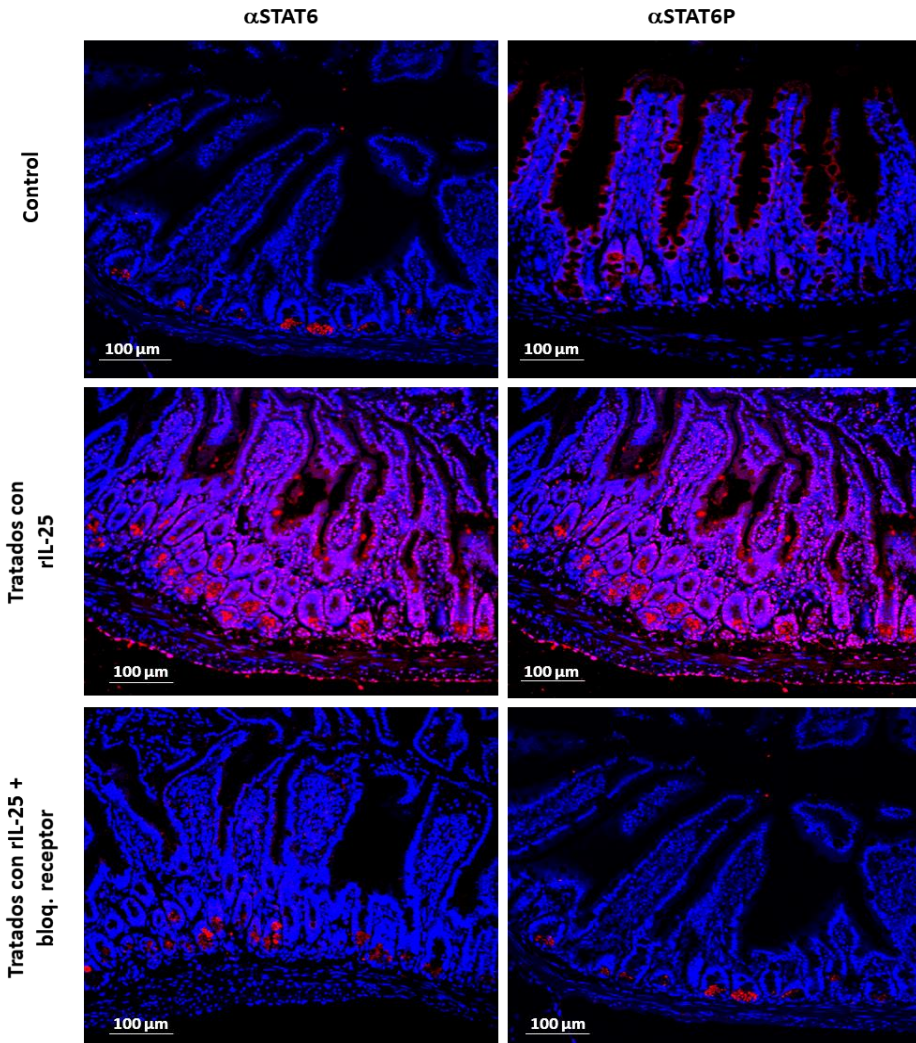


Figura 3.25. Inmunofluorescencia indirecta en tejido intestinal de ratón para la localización del factor de transcripción STAT6 de los receptores Th2. Inmunofluorescencia indirecta para localización de α STAT6 citosólico (rojo) y α STAT6P nuclear (rojo) en secciones intestinales de ratones sometidos a infección primaria de *Echinostoma caproni* previamente inoculados con recombinante (r)IL-25 o tcon rIL-25 y anticuerpos m- α IL-4R α y rIL-13R α s2 bloqueantes de la activación de los mecanismos efectores Th2. Todos los animales fueron sacrificados a las 2 semanas tras la inducción de la infección primaria. Barra de escala: 100 μ m.

comparación con los ratones control. En cambio, los animales tratados con rIL-25 e infectados, mostraron una regulación al alza de IL-4, IL-13 e IL-25 con respecto a

los animales tratados con los anticuerpos de bloqueo y los ratones control (**Figura 3.26**). En cuanto al resto de citoquinas, se observan incrementos en la expresión de iNOS y RELM- β en los animales tratados con los anticuerpos bloqueantes al mismo

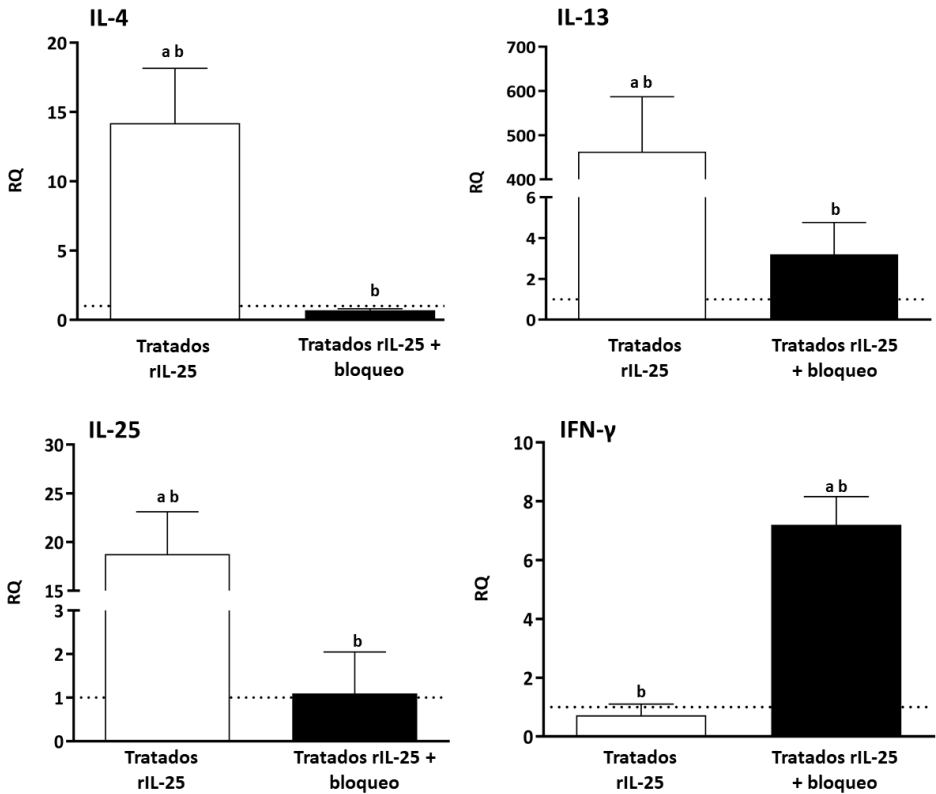


Figura 3.26. Análisis de la expresión relativa de citoquinas en ratones tratados con recombinante de (r)IL-25 y ratones tratados con rIL-25 y anticuerpos de bloqueo de los receptores Th2 en presencia de infección por *Echinostoma caproni*. Expresión de ARNm en tejido intestinal de las principales citoquinas involucradas en la respuesta inmunitaria generada en ratones tratados con rIL-25 y ratones tratados con rIL-25 y anticuerpos de bloqueo de receptores Th2 a las 2 semanas tras la inducción de la infección por *E. caproni*. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran tras la normalización con β -actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones controles a día 0. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativos; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

tiempo que se disminuye la expresión de Arg II con respecto a animales infectados en presencia de rIL-25 y animales control (**Figura 3.27.**). En cambio, en los animales infectados en presencia de rIL-25 y ausencia de anticuerpos de bloqueo se observa una regulación positiva significativa de los niveles de expresión de Arg I y disminución significativa en los niveles de iNOS (**Figura 3.27.**).

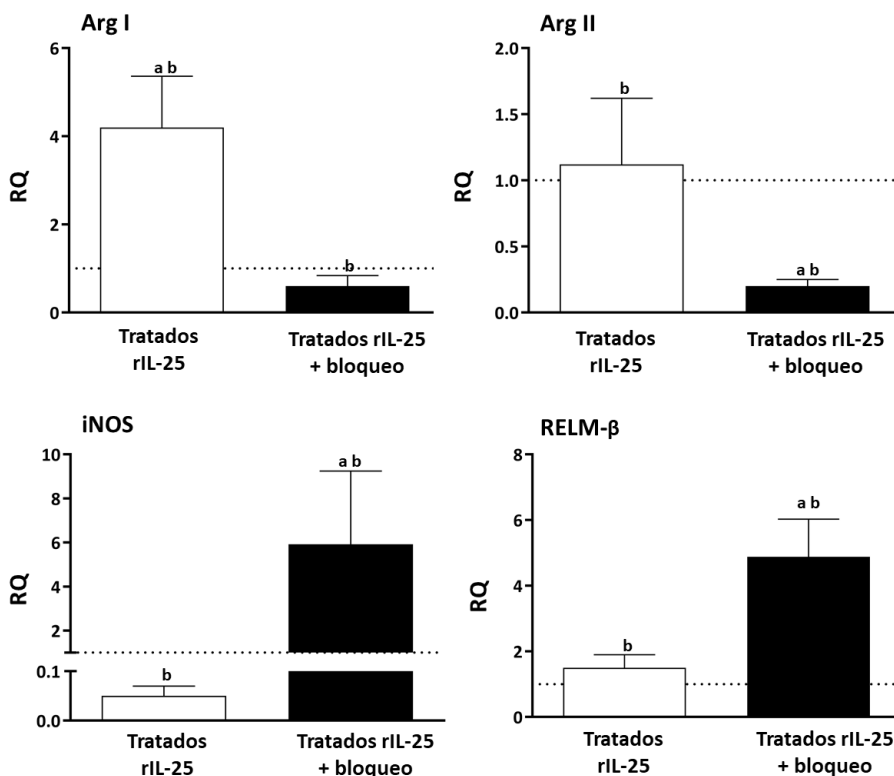


Figura 3.27. Análisis de la expresión relativa de los marcadores de activación de macrófagos y de la molécula RELM-β en ratones inoculados con recombinante (r)IL-25 y con rIL-25 y anticuerpos de bloqueo de los receptores Th2, en presencia de infección por *Echinostoma caproni*. Patrón de activación de macrófagos analizado por la expresión de ARNm de marcadores de activación de macrófagos por la vía clásica (Arg II e iNOS) como alternativa (Arg I) en el tejido intestinal de ratones inoculados con rIL-25 y ratones inoculados con rIL-25 y anticuerpos de bloqueo de receptores Th2 a las 2 semanas tras la inducción de la infección por *E. caproni*. Las cantidades relativas (RQ) de los genes de citoquinas se muestran tras la normalización con β-actina y la estandarización de la cantidad relativa frente a ratones control. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto a los ratones controles negativos; b: diferencias significativas entre grupos (p<0,05).

3.3.7. PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN DE IL-25 EN INFECCIONES RESISTENTES FRENTE A *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Para analizar la influencia de la microbiota intestinal residente en la regulación positiva de la producción de IL-25 se emplearon un total de 15 ratones para estudiar mediante PCRrt las alteraciones provocadas en la carga bacteriana total. Los ratones se distribuyeron en tres grupos experimentales: 5 ratones en presencia de infección primaria con *E. caproni*, 5 ratones infectados secundariamente con *E. caproni* y 5 ratones control negativo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la infección primaria con *E. caproni* induce una reducción cuantitativamente significativa de la carga bacteriana total con respecto a los ratones infectados secundariamente y controles negativos. Asimismo, los ratones infectados secundariamente mostraron unos niveles de la carga bacteriana total similares a los observados en los ratones control negativo (**Figura 3.28A.**).

Para profundizar en el conocimiento del papel ocupado por la microbiota intestinal en la regulación de la expresión de IL-25 tras la cura de una infección primaria con *E. caproni*, un total de 5 ratones infectados y tratados con pzq a las 4 spip fueron tratados durante 2 semanas con un cóctel de antibióticos de amplio espectro en agua de bebida para mantener la disbacteriosis producida en infección primaria. A las 6 spip, estos animales fueron sometidos a una infección secundaria. Los resultados obtenidos se compararon con un grupo de 5 ratones que fueron infectados, tratados con pzq a las 4 spip e infectados secundariamente a las 6 spip sin añadir antibióticos en agua de bebida. Todos los ratones se sacrificaron a las 8 spip. Asimismo, 3 ratones se emplearon como control negativo del experimento.

El análisis por PCRrt mostró que los ratones tratados con antibióticos no producían IL-25 en respuesta a una infección secundaria con *E. caproni* como

consecuencia de la inducción de la disbacteriosis. Por el contrario, los ratones no tratados con antibióticos respondieron con niveles elevados de expresión del gen IL-25 a la infección secundaria (**Figura 3.28B.**).

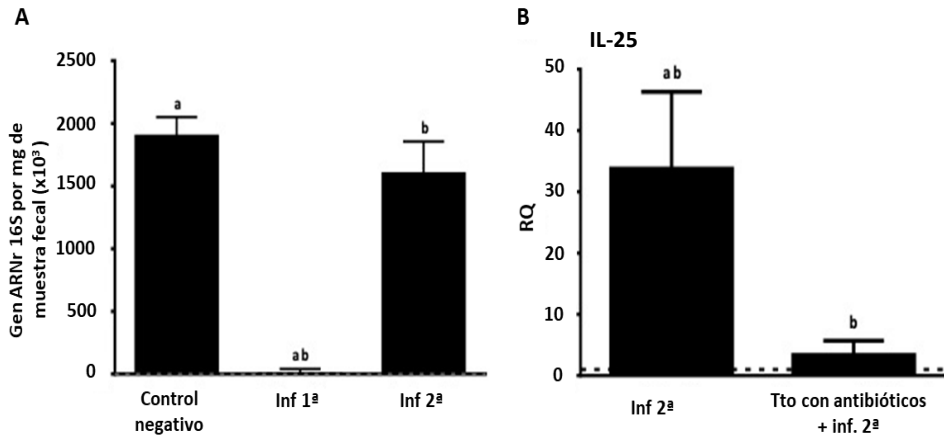


Figura 3.28. Cambios cuantitativos en la composición de la microbiota residente en el intestino de ratones sometidos a infección primaria y secundaria con *Echinostoma caproni* y niveles de expresión de IL-25 en presencia o ausencia de disbiosis. (A) Evaluación cuantitativa de la microbiota residente en el intestino de ratones en presencia de infección primaria (Inf 1^a) y secundaria (Inf 2^a) con *Echinostoma caproni* analizada por PCR cuantitativa del gen de ARNr 16S de la cepa DH5a de *Escherichia coli* expresada como genes 16S de ARNr por mg de muestra fecal (x10³). (B) Expresión relativa de ARNm de IL-25 en el tejido intestinal de ratones infectados de forma secundaria (Inf 2^a) con o sin tratamiento previo con antibióticos promotores de disbiosis intestinal. Las cantidades relativas (RQ) de genes de citoquinas se muestran tras la normalización con β -actina y la estandarización de la cantidad relativa frente al control negativo. Las barras verticales representan la desviación estándar. a: diferencias significativas con respecto al control negativo; b: diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

3.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN INFECCIONES CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN

En los últimos años, se ha observado numerosas evidencias de la relación entre la microbiota intestinal y la regulación de la respuesta inmunitaria frente a infecciones causadas por helmintos intestinales. Asimismo, se ha mostrado que el establecimiento de los helmintos en el intestino, generan alteraciones en las poblaciones que constituyen la microbiota intestinal afectando de manera directa a los procesos que participan en la regulación de la respuesta inmunitaria (Peachey *et al.*, 2017; Brosschot & Reynolds, 2018; Cortés *et al.*, 2018). Sin embargo, a día de hoy se sigue desconociendo los mecanismos a través de los cuales se altera esta respuesta inmunitaria.

En algunos estudios, se ha demostrado que la respuesta Th2 desarrollada en infecciones causadas por helmintos intestinales afecta a la composición de la microbiota intestinal (Fricke *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018). En cambio, en otros estudios se sugiere que esta respuesta no afecta tanto a la microbiota, ya que los cambios observados son idénticos a los que se dan en ratones que carecen de la capacidad de diferenciación a respuestas Th2 (McFarlane *et al.*, 2017; White *et al.*, 2018). Asimismo, hay autores que sugieren que la microbiota intestinal puede ser responsable de facilitar o, por el contrario, dificultar el establecimiento de los parásitos en el intestino mediante mecanismos dependientes de la respuesta inmunitaria.

A pesar de estas contradicciones, durante los últimos años se ha puesto de manifiesto que las poblaciones bacterianas que componen la microbiota intestinal presentan la capacidad de interactuar con células del sistema inmunitario

regulando de este modo, las respuestas inmunitarias desarrolladas frente a infecciones por parásitos intestinales.

3.4.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Estudios previos, sugieren que la producción de IL-25 observada en infecciones resistentes frente a helmintos intestinales está regulada por la microbiota intestinal (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). En infecciones por *E. caproni* producidas en ratón, la expresión de esta citoquina solo ocurre como consecuencia de los procesos de regeneración del epitelio intestinal que se inician tras la cura farmacológica de la infección primaria y resulta fundamental para explicar la resistencia frente a infecciones secundarias.

En este sentido, las poblaciones microbianas que componen la microbiota intestinal en el momento de la inducción de una infección secundaria por *E. caproni* en ratón, podrían jugar un papel clave en la activación de la producción de la IL-25 endógena y los mecanismos efectores responsables de resistencia. Es por ello, que en el presente estudio se analiza las comunidades microbianas que conforman la microbiota intestinal de ratones sometidos a infección primaria, tratados con pzq y sometidos a infección secundaria con *E. caproni* a diferentes tiempos experimentales a partir de muestras de heces.

Para llevar a cabo este trabajo, se emplearon un total de 65 ratones machos de la cepa ICR todos ellos de 5 semanas de edad distribuidos en cuatro grupos y nueve jaulas diferentes: tres jaulas de animales control, dos jaulas de animales sometidos a infección primaria, dos jaulas de animales tratados con pzq y dos jaulas de animales infectados secundariamente (**Figura 3.29.**).

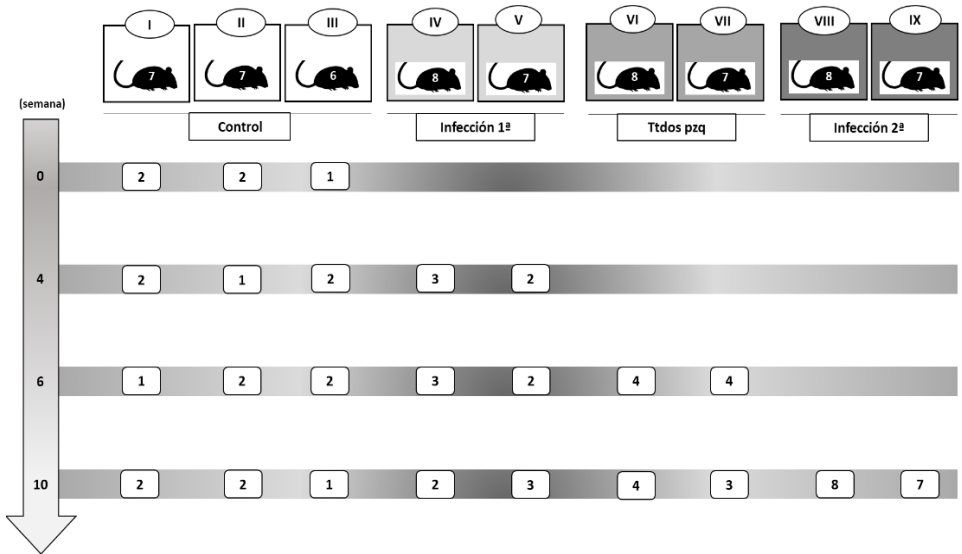


Figura 3.29.- Cronograma para la necropsia de los ratones pertenecientes al estudio de microbiota intestinal a partir de muestras de heces en animales control, sometidos a infección primaria, tratados con praziquantel e infectados secundariamente por *Echinostoma caproni*. Los números romanos hacen referencia al número de jaula. Dentro de cada jaula se detalla el número de animales que se encuentra en cada una de ellas. El número de semanas hace referencia al momento en el que se realiza la necropsia de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales y el número que aparece dentro de la caja blanca, hace referencia a la cantidad de animales que se toman de cada jaula.

En total se emplearon 20 ratones como control del experimento que fueron sacrificados en grupos de 5 animales seleccionados aleatoriamente de tres jaulas diferentes, a tiempo 0, 4, 6 y 10 semanas desde el comienzo del experimento. Los 45 animales restantes, fueron sometidos a una infección primaria con una dosis de 50 metacercarias administradas por vía oral. De estos, 5 fueron sacrificados a las 4 spip, otros 5 a las 6 spip y 5 a las 10 spip siempre escogidos de dos jaulas distintas, para neutralizar los posibles cambios inducidos en la microbiota intestinal por influencia de los ratones que conviven en la misma jaula.

A las 6 spip los 30 ratones restantes, fueron tratados con pzz, sacrificando 8 ratones-tratados de dos jaulas diferentes en ese momento y, posteriormente a las 10 spip, otros 7 ratones tratados, de dos jaulas diferentes. Los 15 ratones remanentes,

de dos jaulas distintas, fueron re infectados a las 8 spip con la misma dosis de metacercarias que en infección primaria y se sacrificaron a las 10 spip. A partir de todos estos ratones se analizó la tasa de infección en las diferentes condiciones y tiempos experimentales, la expresión de citoquinas y poblaciones microbianas mediante el empleo de RT-PCRrt, secuenciación masiva y análisis estadístico para la interpretación de estos datos.

3.4.2. RESULTADOS DE INFECCIÓN CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN A DIFERENTES TIEMPOS EXPERIMENTALES

Los ratones de los grupos infectados, tratados con pzq e infectados secundariamente resultaron positivos a la infección tras la exposición primaria a metacercarias de *E. caproni* siendo esto confirmado mediante Kato-Katz con la detección de huevos en heces. Sin embargo, la tasa de recuperación de adultos varió de manera significativa en los ratones sometidos a infección primaria, en los diferentes tiempos experimentales con respecto a los animales expuesto a infección secundaria con *E. caproni* ($p < 0,001$) (**Figura 3.30.**). En ratones sometidos a infección secundaria la positividad fue significativamente inferior a la observada en ratones sometidos a una infección primaria encontrando solamente resultado positivo de infección en la mitad de los animales que habían sido expuestos de manera secundaria a las metacercarias de *E. caproni*.

De manera similar, la tasa de recuperación de adultos fue inferior en infección secundaria que, en infección primaria, en cualquiera de los tiempos experimentales estudiados ($p < 0,001$). En infección primaria, la tasa de recuperación de adultos a las 4, 6 y 10 spip osciló entre un 47%-60 % ($53,3 \pm 10,9$), mientras que en los ratones infectados secundariamente esta tasa se redujo a valores del 4,3% - 11,9% ($8,1 \pm 3,8$) a las 4 spis (10 spip).

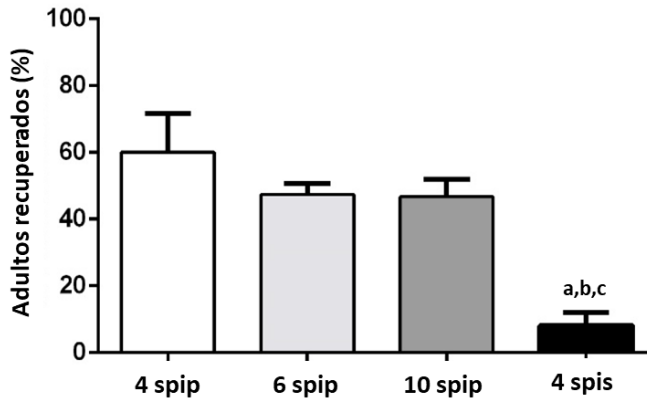


Figura 3.30.- Porcentaje de adultos recuperados en ratones sometidos experimentalmente a infección primaria y secundaria con *Echinostoma caproni*. Spip: semanas post infección primaria; spis: semanas post infección secundaria. a: diferencias significativas entre infectados a 4 spip y re infectados a 4 spis con $p < 0,001$; b: diferencias significativas entre infectados a 6 spip y re infectados a 4 spis con $p < 0,001$; diferencias significativas infectados a 10 spip y re infectados a 4 spis con $p < 0,001$.

3.4.3. IMPACTO DE LA INFECCIÓN PRIMARIA CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATONES A DIFERENTES TIEMPOS EXPERIMENTALES

En este estudio se analizó la composición microbiana de un total de 65 muestras de heces tomadas a partir de los ratones empleados anteriormente (Apartado 3.4.1.- Fundamento experimental). La composición de la microbiota intestinal analizada a partir de las heces obtenida de ratones infectados en los diferentes tiempos experimentales mostró diferencias estadísticamente significativas a nivel de phylum y familia (**Figura 3.31A y B**).

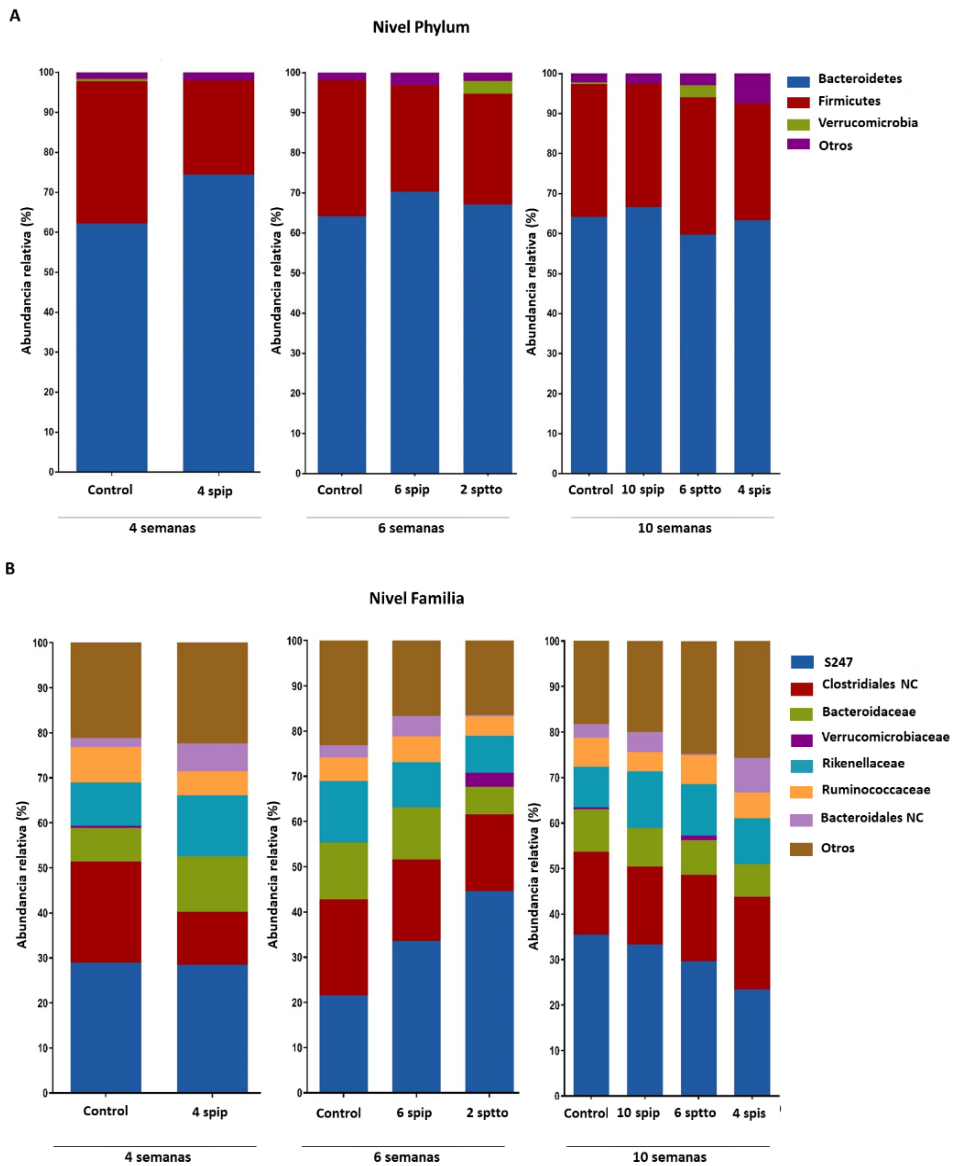


Figura 3.31.- Análisis de la abundancia relativa de los principales phyla y familias detectados en muestras de heces de ratones sometidos a diferentes condiciones experimentales a las 4, 6 y 10 semanas del experimento. (A-B) Abundancia relativa a nivel de phylum y familia (expresada en porcentaje a las 4, 6 y 10 semanas desde el comienzo del experimento) detectado en ratones control, ratones sometidos a infección primaria con *Echinostoma caproni* (4, 6 y 10 semanas post infección primaria (spip)), ratones tratados con praziquantel (pzq) (2 y 6 semanas post tratamiento (sptto)) y ratones sometidos a infección secundaria (4 semanas post infección secundaria (spis)).

En cuanto a la composición de la microbiota de los ratones infectados a nivel de phylum, se observaron niveles elevados de la abundancia relativa del phylum Bacteroidetes (71,72%) junto con una reducción del phylum Firmicutes (22,62%) a las 4 spip con respecto a los ratones control (61,6% y 35,2%, respectivamente) ($p < 0,05$) (**Figura 3.31A**). Adicionalmente, a nivel de familia se mostró una reducción de la abundancia relativa de Clostridiales NC (11,75%) al mismo tiempo que se incrementó la abundancia relativa de Bacteroidales NC (6,17%) a las 4 spip, con respecto a los ratones control (22,37% y 1,94%, respectivamente) ($p < 0,05$) (**Figura 3.31B**). Por otro lado, a las 6 spip se observó un aumento de la familia S247 (33,64%) frente a lo observado en ratones control (21,51%) ($p < 0,05$). El tiempo experimental no tuvo efecto diferenciador significativo sobre la composición de la microbiota en muestras de heces de ratones infectados, ni a nivel de phylum ni de familia.

3.4.4. MODIFICACIONES EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DE HECES DE RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA POR *ECHINOSTOMA CAPRONI* FRENTE A RATONES TRATADOS CON PRAZIQUATEL E INFECCIÓN SECUNDARIA

Como se ha comentado anteriormente, la abundancia relativa a nivel de phylum y familia en todas las condiciones experimentales se representa en la **Figura 3.31**. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los perfiles microbianos obtenidos a partir de las heces de los ratones sometidos a infección primaria, tratados con pzz y en los infectados secundariamente a cada tiempo experimental. Los phyla bacterianos más abundantes en todos los grupos experimentales fueron Bacteroidetes y Firmicutes. El phylum Verrucomicrobia (3,06%) solamente estuvo presente en los ratones tratados con pzz tanto a las 6 como a las 10 semanas desde

el comienzo del experimento ($p < 0,001$). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el resto de phylum entre grupos de ratones ni tiempo experimental.

Las 7 familias bacterianas más abundantes de la microbiota de todos los grupos experimentales analizados se encuentran representadas en la **Figura 3.31B**. La diversidad detectada en la microbiota a nivel de familia fue evidente en las muestras recolectadas de todas las condiciones experimentales. En todas ellas, las familias bacterianas más abundantes fueron S247, Clostridiales NC y Bacteroidaceae aportando en su conjunto en torno al 51-67% de la microbiota global (**Figura 3.31B**). Además, se detectó un incremento significativo en la abundancia relativa de la familia S247 (44,6%) y reducción de Bacteroidales NC (0,26%) en los ratones tratados a las 6 semanas frente a los ratones en infección primaria a este tiempo experimental (33,64% y 4,52%, respectivamente) ($p < 0,05$). Por otro lado, la familia Bacteroidales NC mostró diferencias significativas en la abundancia relativa entre los 3 grupos experimentales comparados a las 10 semanas presentando la menor abundancia relativa en tratados (0,27%) seguido de infección primaria (4,43%) y siendo más representativa en los ratones en infección secundaria (7,56%) ($p < 0,05$). Cabe destacar que la familia Verrucomicrobiaceae solamente fue detectada en ratones tratados con pzz tanto a las 6 como a las 10 semanas desde el comienzo del experimento ($p < 0,001$).

Se calculó el índice de Shannon con la finalidad de analizar las posibles diferencias dadas en la diversidad- α de los cuatro grupos experimentales. Los ratones en infección primaria mostraron una diversidad moderadamente baja a las 4 spip con respecto a los ratones control a la misma semana experimental ($p < 0,05$) (**Figura. 3.32A**). Los ratones control, en infección primaria, tratados con pzz y en infección secundaria presentaron valores similares de diversidad- α tanto a las 6 como a las 10 semanas desde el comienzo del experimento.

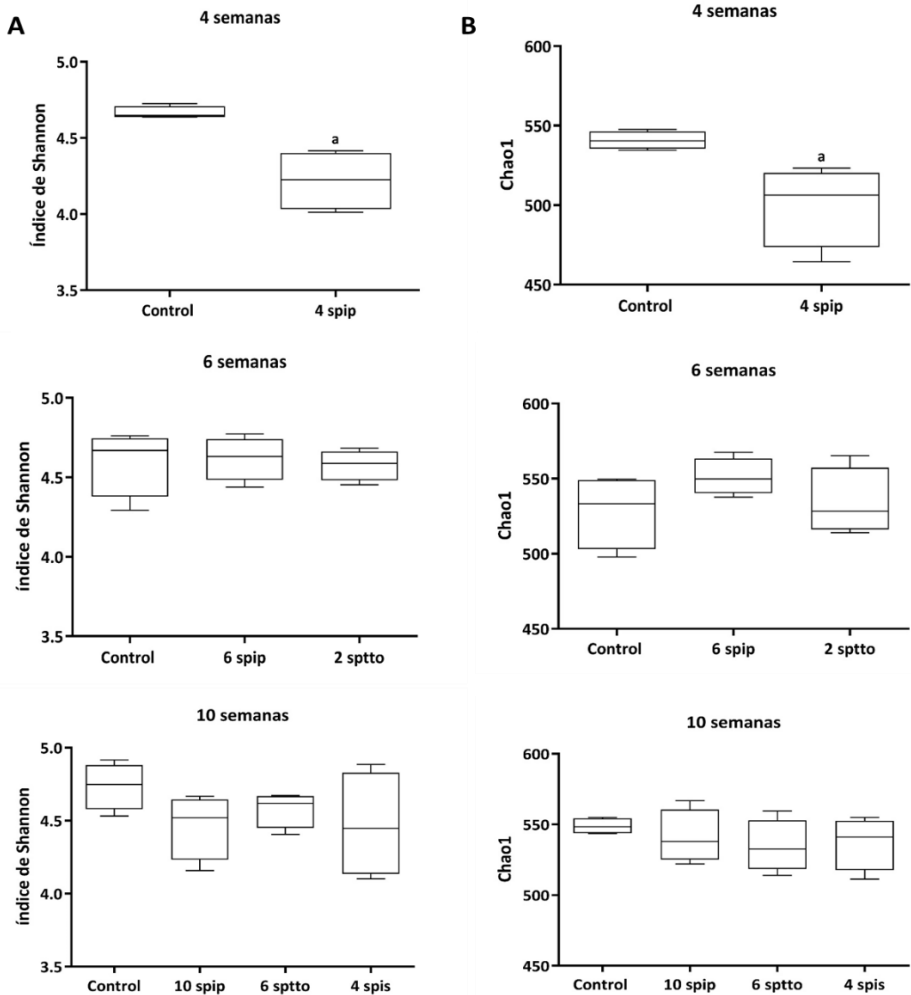


Figura 3.32.- Análisis de la diversidad- α y riqueza microbiana en muestras de heces de ratones en presencia y/o ausencia de infección con *Echinostoma caproni* a diferentes tiempos experimentales. La diversidad- α fue medida a partir de la microbiota detectada en muestras de heces mediante el índice de Shannon (A) y la riqueza por el índice de Chao 1 (B) a las 4, 6 y 10 semanas desde el comienzo del experimento: ratones control, sometidos a infección primaria, tratados con praziquantel y sometidos a infección secundaria. Spip: semanas post infección primaria; sptto: semanas post tratamiento; spis: semanas post infección secundaria. a: diferencias significativas entre ratones control e infectados con $p < 0,05$.

Sin embargo, en ratones sometidos a infección secundaria se observó una mayor variación en la diversidad entre muestras dentro del grupo. No se observaron

diferencias significativas en la diversidad- α con respecto al tiempo experimental. Por otro lado, la riqueza de la microbiota de ratones en presencia de infección primaria a las 4 spip evaluada por el índice de Chao 1 (**Figura 3.32B**), fue bastante baja con respecto a los animales control a ese mismo tiempo experimental ($p < 0,05$). En cambio, no se observaron diferencias significativas entre grupos ni dentro del mismo grupo a las diferentes semanas de estudio.

En el análisis discriminante lineal (LDA) efecto tamaño (LefSE), la alta abundancia de la familia Rikenellaceae (LDA 3.85, $p < 0,05$) y el género *Prevotella* (LDA 3.65, $p < 0,05$) fueron características de los ratones en infección primaria, mientras que las familias S247 y Lachnospiraceae (LDA 4.8 y 3.9, respectivamente, $p < 0,05$) y el género *Akkermansia* (LDA 4.2, $p < 0,05$) fueron característicos de los ratones tratados con pzq (**Figura 3.33**). La familia Bacteroidales NC (LDA 4.3, $p < 0,05$) y los géneros *Lactobacillus* y *Odoribacter* (LDA 4.2 y 3.5, respectivamente, $p < 0,05$) se encontraron enriquecidas de manera significativa en ratones infectados secundariamente en comparación con el resto de los grupos experimentales.

Todos los grupos experimentales compartieron una microbiota central de 12 géneros bacterianos diferentes. El núcleo estaba compuesto por los géneros S247 NC, Clostridiales NC, *Bacteroides*, Rikenellaceae NC, *Prevotella*, Bacteroidales NC, Lachnospiraceae NC, *Lactobacillus*, *Oscillospira*, Ruminococaceae NC, *Odoribacter* y *Ruminococcus* (**Figura 3.34**).

Curiosamente, los géneros S247 NC y Clostridiales NC fueron los más prevalentes en todas las muestras y en todos los grupos experimentales analizados formando hasta un 40-60% de la abundancia relativa total.

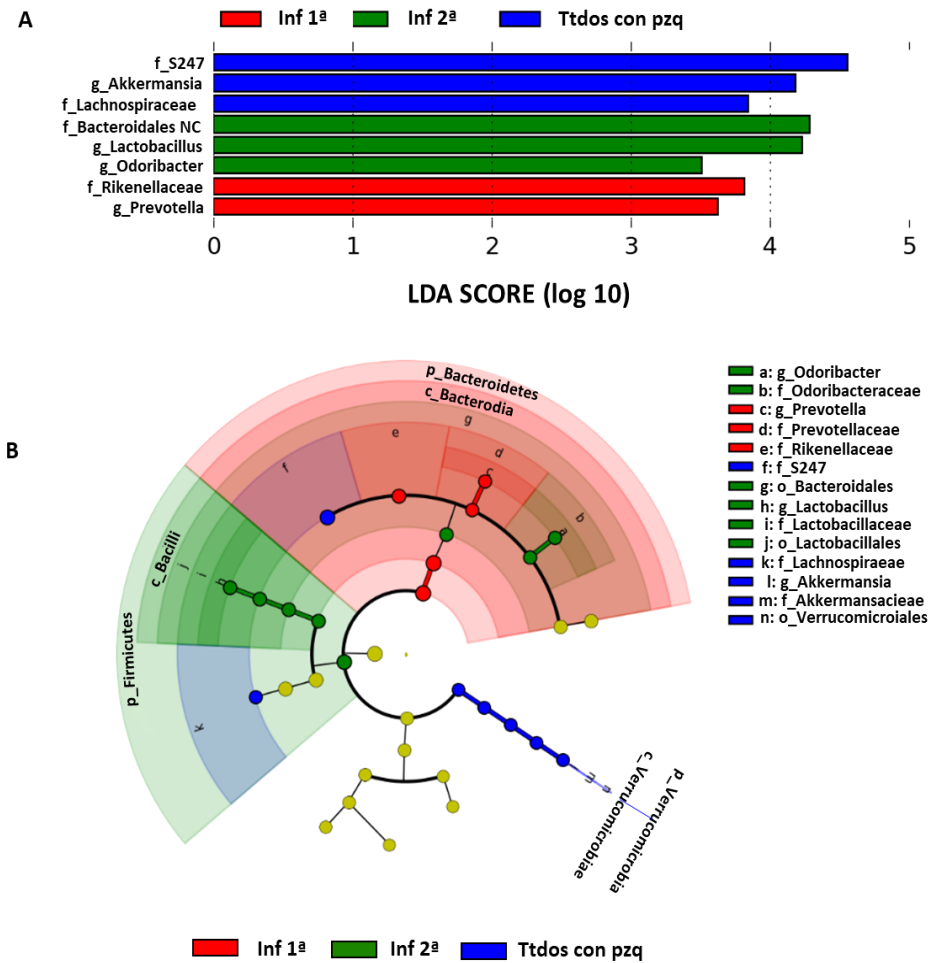


Figura 3.33.- Análisis de los taxones bacterianos que muestran diferencias significativas en la abundancia relativa de los perfiles microbianos obtenidos a partir de muestras de heces de ratones sometidos a infección primaria con *Echinostoma caproni*, tratados con praziquantel y ratones infectados secundariamente, según el análisis discriminante lineal (LDA) efecto tamaño (LEfSe). **(A)** Diferencias significativas obtenidas en la abundancia relativa de los principales taxones microbianos detectados en heces de ratones en infección primaria con *E. caproni* (rojo), tratados con praziquantel (pzq) (azul) y en infección secundaria (verde) con una puntuación LDA superior a 2. **(B)** Representación por cladograma de las diferencias significativas obtenidas a partir del análisis de LEfSe en la abundancia relativa microbiana detectada en las heces de ratones en presencia de infección primaria (rojo), tratados con pzq (azul) y en infección secundaria (verde).

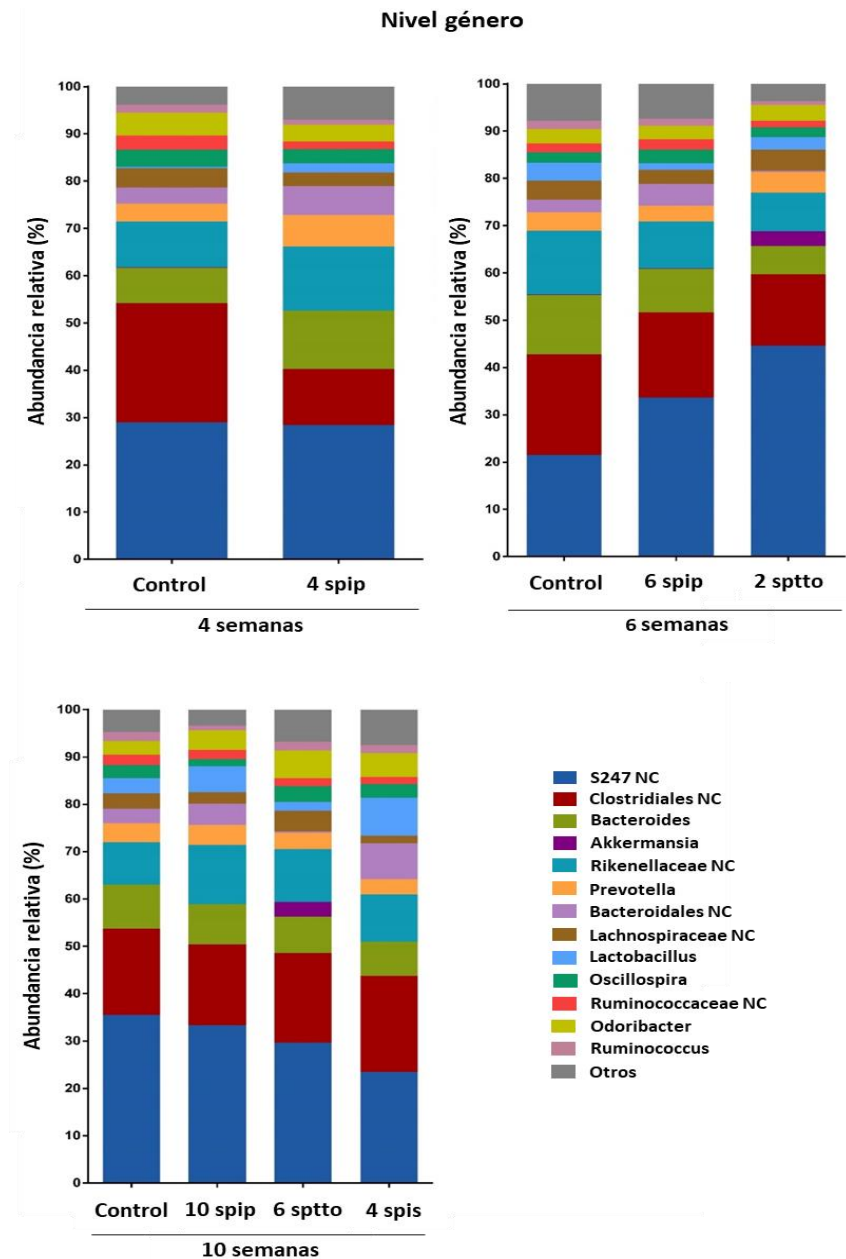


Figura 3.34.- Análisis de la abundancia relativa de los principales géneros detectados en muestras de heces de ratones sometidos a diferentes condiciones experimentales a las 4, 6 y 10 semanas del experimento. Abundancia relativa a nivel de género expresada en porcentaje detectado en ratones control y ratones sometidos a infección primaria con *Echinostoma caproni* (4 spip, 6 spip y 10 spip), ratones tratados con praziquantel (pzq) (2 sptto y 6sptto) y ratones sometidos a infección secundaria (4 spis).

3.4.4.1. COMPARACIÓN DEL PERFIL MICROBIANO A NIVEL DE GÉNERO Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* FRENTE A TRATADOS CON PRAZIQUANTEL

La composición de la microbiota intestinal de los ratones tratados con pzq manifestó diferencias a nivel de género con respecto a las poblaciones observadas en ratones infectados. Un total de 3 géneros bacterianos (*Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Turicibacter*) fueron exclusivos de los ratones tratados con pzq (no representado).

Se observó un incremento en la abundancia relativa de los géneros *Akkermansia* y Lachnospiraceae NC en ratones tratados con pzq con respecto a los ratones infectados a la vez que se produjo una regulación positiva en la expresión de los genes de las citoquinas propias de respuestas Th2 (IL-4 e IL-13) e IL-25 ($p < 0,05$) (**Figura 3.35**). Asimismo, la ausencia de regulación positiva de la respuesta Th2 e IL-25 en ratones en infección primaria coincidió con una abundancia relativa superior del género Bacteroidales NC frente a lo observado en los ratones pertenecientes al grupo tratados con pzq ($p < 0,05$). En cuanto al análisis de coordenadas principales PCoA, las muestras correspondientes a los ratones tratados con pzq se encontraron claramente separadas y mostraron una mayor variabilidad que la observada en los ratones en infección primaria (**Figura 3.36A**). En el análisis de redundancia discriminante RDA no se observó ninguna interacción significativa entre la microbiota de los ratones en infección primaria y tratados con pzq (**Figura 3.36B**).

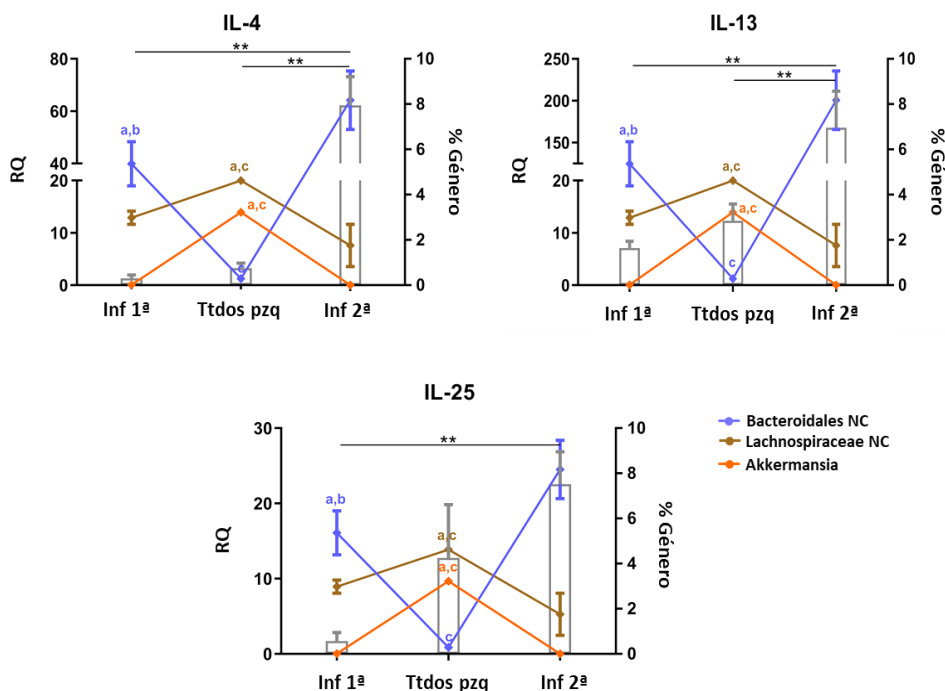


Figura 3.35.- Comparación del perfil de expresión de citoquinas Th2 e IL-25 respecto al porcentaje de abundancia relativa (AR) de la microbiota a nivel de género deetctada en heces de ratones sometidos a infección primaria con *Echinostoma caproni* (Inf 1ª), tratados con praziquantel (Ttdos pzq) y ratones en infección secundaria (Inf 2ª). a: diferencias significativas en la AR de la microbiota de Inf 1ª y Ttdos pzq con $p < 0,05$; b: diferencias significativas en la AR de la microbiota de Inf 1ª e Inf 2ª con $p < 0,05$; c: diferencias significativas en la AR de la microbiota de Ttdos pzq e Inf 2ª con $p < 0,05$. Los asteriscos representan diferencias significativas en la expresión de citoquinas entre grupos; * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$. Las barras verticales representan la desviación estándar dentro del grupo.

3.4.4.2. COMPARACIÓN DEL PERFIL MICROBIANO A NIVEL DE GÉNERO Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RATONES EN INFECCIÓN PRIMARIA CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* FRENTE A INFECTADOS SECUNDARIAMENTE

Las poblaciones microbianas a nivel de género detectadas en el conjunto de ratones que componen la presente aproximación experimental mostraron de manera

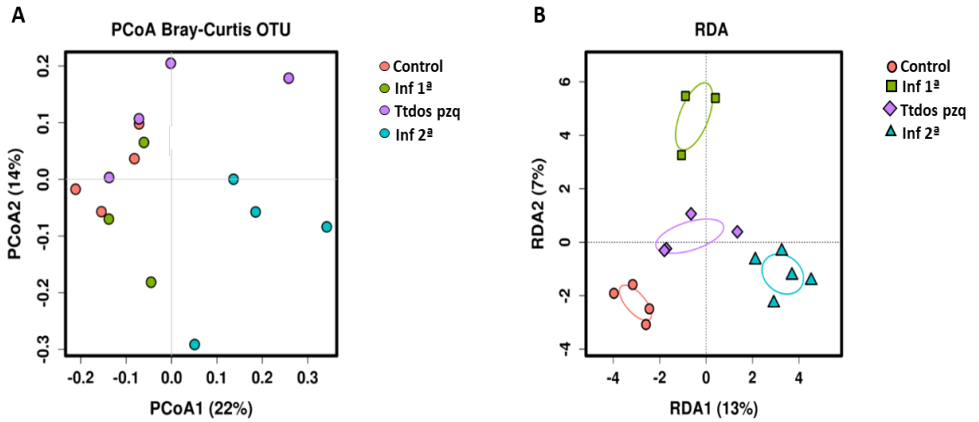


Figura 3.36.- Análisis de coordenadas principales (PCoA) Bray-Curtis (A) y análisis de redundancias discriminante (RDA) (B). Perfil microbiano obtenido a partir de muestras de heces procedentes de animales control, sometidos a infección primaria (Inf 1ª) con *Echinostoma caproni*, tratados con praziquantel (Ttdos pzo) e infectados secundariamente (Inf 2ª).

interesante, que 32 de los 33 géneros localizados en ratones en infección primaria también estaban presentes en ratones en infección secundaria. Sin embargo, se observaron diferencias significativas de la expresión de los niveles de citoquinas, con respecto a la abundancia relativa de microbiota a nivel de género, entre dichos grupos.

Los ratones sometidos a infección secundaria presentaron un porcentaje de abundancia relativa significativamente superior del género Bacteroidales NC (8.17%) en comparación con los ratones en infección primaria (5.36%) ($p < 0,05$). El aumento de este género en la microbiota intestinal de ratones en infección secundaria coincide con un incremento significativo en los niveles de citoquinas Th2 e IL-25 en estos ratones con respecto a los ratones en infección primaria (**Figura 3.35**). En cuanto al perfil microbiano, se obtuvieron diferencias significativas entre la composición global de la microbiota de ratones sometidos a infección primaria respecto a ratones en presencia de infección secundaria ($p < 0,05$). Asimismo, la composición microbiana detectada en los ratones que conformaron el grupo infección secundaria se agrupó por separado del resto de los grupos

experimentales como se observa tanto por el análisis PCoA como RDA (**Figura 3.36A y B**).

CHAPTER IV

DISCUSSION

The main objective of this Doctoral Thesis is the analysis of the immunoregulatory processes in intestinal helminth infections and their consequences in the course of the infection. To this purpose, we have employed several approaches using the digenetic trematode *Echinostoma caproni* as experimental model.

E. caproni is an intestinal trematode, broadly employed as an experimental model for the study of the biology of this group of parasitic helminths, with emphasis on the host-parasite interactions. One of the key features that makes this trematode a suitable model for studying host-parasite relationships is its different compatibility among laboratory rodents (Toledo, 2009a). Low-compatible hosts, i.e. rats or jirds, are able to rapidly expel the parasites. Conversely, hosts of high compatibility, such as mice or hamsters, develop chronic infections lasting more than 25 weeks (Toledo *et al.*, 2004a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Toledo, 2009a). In highly compatible hosts, such as mice, strong, Th1-type inflammatory responses are developed at the site of infection, together with elevated levels of oxidative stress and mucosal antibodies (Sotillo *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). This response, however, is not effective in the clearance of the infection and does not affect worm establishment nor development (Toledo *et al.*, 2004a; Sotillo *et al.*, 2007; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Toledo, 2009a; Trelis *et al.*, 2011). Worm recovery rates in mice are high, and adults are larger and more fecund than those recovered from hosts of low compatibility are weeks (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007). Altogether, these facts suggest that the parasite is well adapted to this environment and it is capable of avoiding, or minimizing somehow, the deleterious effects mediated by the immune response, including antibodies, developed in mice.

In this context, we have analysed several aspects of the immune response against *E. caproni* in mice that are related to the course of the infection, with the aim to elucidate the factors that determine resistance to infection.

4.1. IN RELATION TO THE ANTIBODY RESPONSE

Previous studies of our group have shown that *E. caproni* infection in a susceptible host, such as mice, are characterized by elevated antibody responses (both at systemic level and in mucosa) and a marked Th1 response with elevated levels of IFN- γ (Sotillo *et al.*, 2007; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Toledo, 2009a; Toledo *et al.*, 2009a). Thus, we initially analyse the mechanisms through which parasites are able to withstand the immune response and ensure their survival inside the host and, subsequently, the regulation of immune responses against intestinal helminths and the factors governing the resistance against these parasites will be studied and discussed. Furthermore, we study the changes in the secretome of *E. caproni* in adults collected after primary and secondary infections in mice to investigate the ability of *E. caproni* to adapt to Th1 or Th2 environments determining whether resistance or chronic infections are developed.

Parasites are able to actively evade or manipulate the host immune system for their own benefit, either increasing their transmission or reducing clearance. That is crucial in the evolution of host-parasite interactions, pathology and virulence. Evasion strategies, such as antigenic variation, antigen masking, molecular mimicry or protease secretion are common among both protozoa and helminth parasites (Schmid-Hempel, 2008). Ultimately, these mechanisms let the parasites disrupt or manipulate the host immune responses, both innate and adaptive, and/or prevent the formation of a memory response (Schmid-Hempel, 2008). It is well known that antibodies can affect the development of helminth parasites by hindering processes such as attachment, feeding or motility, among others (Harris, 2011). Several studies show that antibodies are able to target parasites, such as *E. caproni* or *N. brasiliensis*, for other immune effector mechanisms such as granulocyte and macrophage binding, or complement system activation (Simonsen & Andersen, 1986; Giacomini *et al.*, 2008; Allen &

Sutherland, 2014; Cortés *et al.*, 2017b). Nevertheless, though antibody responses are commonly needed for controlling helminth infections, generally these are not sufficient to prevent nor overcome the infection (Harris, 2011).

The tegument of trematodes is a highly active structure with a key role in host-parasite interactions and the maintenance of tegument integrity is crucial for worm survival (Skelly & Wilson, 2006; Cortés & Fried, 2019). For these reasons, a number of tegumental proteins have been proposed as promising vaccine candidates against these helminthiases. However, though different levels of protection have been observed, antibody responses *per se* normally have limited effect and complete protection against infection has not been reached so far (Bethony *et al.*, 2011; Toet *et al.*, 2014; Leow *et al.*, 2015; Cortés *et al.*, 2017b). This suggests the existence of intrinsic mechanisms that limit the susceptibility of the tegument to the immune attack. Herein, we describe a potential novel mechanism for parasite immune evasion, which consists in the entrapment of surface-bound antibodies to limit the effects mediated by the humoral response.

High levels of mucosal antibodies are characteristic of *E. caproni* infections in mice (Sotillo *et al.*, 2007). With the aim to confirm the *in vivo* binding of luminal antibodies over the parasite surface, double indirect immunofluorescence was performed on *E. caproni* adults. Specific mouse IgA and IgG were detected on worms at 0 min, indicating that they are susceptible of being affected by antibody-mediated responses. At this time point, an intense staining with the different tags used (i.e. anti-*E. caproni*-actin, anti-*E. caproni*-enolase and anti-mouse IgA/G), indicating that the host immune response effectively targets *E. caproni* adults for antibody-mediated attack. Actin and enolase are immunogenic proteins, commonly found in ESPs of *E. caproni* and other trematodes, so that antibodies against both molecules were used as general markers to tag the parasite surface and the deposit of ESPs. Considering that distal tegument consists of a syncytial cytoplasm, externally limited by a plasma membrane, and that no detergents were employed for

immunofluorescence, the ESP molecules detected on the parasite surface are outside the tegument itself. These results are in agreement with those from Simonsen and co-authors, indicating that mouse antibodies bind to secreted antigens and form an external layer of immune complexes that covers the parasite (Bethony *et al.*, 2011; Toet *et al.*, 2014; Leow *et al.*, 2015; Cortés *et al.*, 2017b). Moreover, Sotillo *et al.* (2008) found that both molecules (actin and enolase) were among the most antigenic proteins in the ESPs of *E. caproni*.

Loss of surface-bound antibodies during *in vitro* culture has been previously described in *E. caproni* and other trematodes (Simonsen & Andersen, 1986; Schmid-Hempel, 2008). It was suggested that the shedding of surface antigens and, consequently, the antigen-bound antibodies, might be an adaptation of this group of parasites to withstand the host immune attack. However, the approach we have followed herein, based on monitoring *in vitro* the dynamics of bound antibodies by double immunofluorescence, reveals a different mechanism of immune evasion. This new mechanism consists in entrapping the surface-bound antibodies within newly secreted products. As the time culture increases, an external layer of ESPs appears over the *in vivo*-bound antibodies. This new layer is almost continuous after 30 min of incubation in RPMI. Andresen *et al.*, (1989) found that antigen-antibody complexes were released from the parasite surface into the culture medium during no longer than 20-25 min, suggesting that surface turnover was completed by this time. Our results, however, yield a novel interpretation of this finding. It seems that the loss of surface-bound antibodies *in vitro* is not due to the turnover of surface antigens, but instead to the trapping of the antibodies underneath a layer of excreted/secreted molecules.

A 3D reconstruction of antibody trapping and degradation process was created at two time points of *in vitro* culture using Imaris software. After 1 h incubation, it can be appreciated how the layer of *in vivo*-bound antibodies is beneath a continuous and relatively thick layer of secreted material, tagged either

with anti-actin or anti-enolase antibody. This indicates that antibodies are not lost from the surface of the parasite, as previously suggested (Simonsen & Andersen, 1986; Andresen *et al.*, 1989; Cortés *et al.*, 2017b) but, in contrast, they become hidden beneath a layer of ESPs. After 2 h in RPMI, *in vivo*-bound antibodies are scarcely detected on the parasite surface, suggesting that trapped antigen-antibody complexes were removed or degraded somehow.

The *in vitro* study has let us elucidate the dynamics of bound-antibodies through the incubation of worms in an antibody-free medium. However, antibody trapping is expected to function also within the host (Andresen *et al.*, 1989; Cortés *et al.*, 2017b). In that case, both antibody binding and trapping must occur simultaneously, and the continuous entrapment of surface-bound antibodies may serve to disable their harmful impact over the parasite. To confirm our hypothesis that this is a dynamic process and to examine the role that secreted proteases may have in the context of this mechanism of immune evasion, two different experiments were carried out.

Firstly, adult worms were incubated for 3 h in culture media in the presence and absence of a cocktail of protease inhibitors. As it was expected, only a slight reduction in the anti-IgA staining was observed after 3 h when protease inhibitors were added to the culture media. This result indicates that antibody trapping not only hampers the accessibility of other immune molecules and cells to the bound antibodies, but also facilitates antibody degradation by parasite-derived proteases. Furthermore, this proves that the loss of green staining (*in vivo*-bound mouse antibodies) *in vitro* is not an artifactual result. The fact that *in vivo*-bound antibodies are still detected over the surface after culture in the presence of protease inhibitors demonstrates that the reduction in anti-mouse antibody staining during incubation in not-supplemented medium is not consequence of a passive release of antibodies due to low-affinity bindings. A variety of proteases have been previously detected in the ESPs of *E. caproni* (Fujino & Fried, 1993; Garg *et al.*, 2013; Cortés *et al.*,

2019) and, using protease inhibitors, herein we have also shown that ESPs of *E. caproni* have protease activity. Future studies will show which proteases are involved in the degradation of entrapped antibodies on the parasite surface.

Secondarily, to verify that the ESPs deposited over the surface of the parasite can be recognized by new antibodies, adult specimens were incubated for 1 h with the serum of *E. caproni*-infected mice and a HRP-conjugated anti-mouse IgG as a secondary antibody. Previously, these worms had been kept for more than 2 h in RPMI to ensure the elimination of *in vivo*-bound antibodies. Immune mouse sera effectively tagged the surface of worms, whereas unspecific antibody binding was not observed over those incubated with pre-immune serum, indicating that ESPs accumulated on the surface can be the target for new antibodies. Furthermore, this confirms that antibody binding to parasite antigens is specific and that nonspecific unions, e.g. through Fc, do not occur. Altogether, these findings suggest a constant and reciprocal interplay between parasite- and host-released molecules at the site of infection. Antibody responses have been shown to have little effect on worm survival and development in *E. caproni* primary infections, with the highest rates of establishment and longevity being associated with high levels of mucosal antibodies (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007). The evasion mechanism described herein may serve to explain the lack of effectiveness of these responses.

To examine if the proposed mechanism is compatible with the tegument dynamics and ultrastructure, the surface of *E. caproni* was studied by transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM, respectively). Moreover, immunogold labelling using anti-actin and anti-ESPs polyclonal antibodies was performed. Secretory vesicles of different morphology are highly abundant in the tegumental syncytium, indicating a very active secreting surface. Elongate and circular vesicles were accumulate manly at the apex, where they fuse with the external plasma membrane and empty their content to the outside (Andresen *et al.*, 1989). Immunogold labelling with anti-*E. caproni* ESPs showed a widespread

staining of both the tegumental syncytium and the parasite surroundings, i.e. external surface, secretions and extracellular vesicles. Gold particles inside membrane-bound vesicles, either elongated or circular, are seen profusely through the syncytium. Similar results were observed with anti-*E. caproni* actin, though specific staining was much less extensive as could be expected when detecting a discrete molecule. This demonstrates that secreted proteins are incorporated in tegumentary vesicles that fuse with the plasma membrane in the apex and discharge their content to the extracellular milieu. According to these results, antibody trapping by newly secreted products is mechanistically feasible and it may occur *in vivo*. This was further confirmed by double immunogold for ESPs and mouse antibodies, showing antibody trapping by ESPs both on the parasite surface and within the extracellular secretions in the tegument vicinity. High-resolution SEM reveals that a layer of extracellular material is deposited on the parasite surface, both on the ventral and dorsal sides. Highly likely, this layer consists of a mixture of parasite secreted proteins and host-derived molecules (i.e., trapped antibodies) and corresponds to what is detected by double indirect immunofluorescence.

Although we cannot discard that antibody shedding effectively operates to evade the host immune response, our results indicate that it is less relevant than the mechanism proposed herein. Antibody shedding was suggested as a mechanism of immune evasion based on the facts that adult worms lost surface-bound antibodies during *in vitro* culture and they rapidly released antigen-antibody complexes into the culture medium (Andresen *et al.*, 1989). Hence, it was hypothesized that bound antibodies were removed from the surface due to antigen turnover. Our results of confocal microscopy show that, in culture, most of antibodies are not shed, as suggested by Andresen *et al.*, (1989), but they remain bound to the surface beneath a layer of ESPs. Loss of antibodies from the parasite surface is mainly related to an initial trapping by ESPs, which masks surface-bound antibodies, and the subsequent degradation of trapped antibodies by parasite-derived proteases. The fact that surface-bound antibodies became entrapped within a layer of ESPs may explain the

interpretation of Andresen and co-workers (1989), since this layer prevents antigen-antibody shedding, thus antibodies were non-detectable by the modified ELISA method used by those authors. *In vivo*, antibody binding and trapping by ESPs is a continuous process in which antibodies and ESPs are overlapping. In this context, parasite-derived proteases may play a critical role by degrading the layers of molecules that are continuously formed on the parasite surface. Despite the complexity of this process, our experimental design has allowed to determine how it occurs and its potential consequences on parasite survival within a hostile environment.

Our results lead to a new interpretation of classic studies on tegument dynamics in parasitic trematodes. As with other common evasion mechanisms (i.e. antigen shedding or protease cleavage), antibody trapping and degradation is expected to function in other helminth parasites in addition to *E. caproni*, alleviating the deleterious effects of antibodies and promoting parasite survival. Our current results suggest that antibody trapping may occur through the covering of surface-bound antibodies with secreted antigens.

Cysteine cathepsins are papain-like peptidases used by helminth parasites in crucial interactions with the host, and are essential for parasite viability and growth (Robinson *et al.*, 2008), which makes them key targets for developing new anthelmintic drugs, vaccines and diagnostic tools (reviewed by Sajid & McKerrow, (2002)). Available knowledge of trematode cathepsins comes from studies on species displaying (at least partial) tissue migration in the definitive host, such as blood flukes (*Schistosoma* spp.), liver flukes (*Clonorchis* spp., *Opisthorchis* spp. and *Fasciola* spp.), and lung flukes of the genus *Paragonimus* (Stack *et al.*, 2011). Conversely, these peptidases in intestinal trematodes have been generally overlooked. In this Doctoral Thesis we have carried out several studies to determine if *E. caproni* cathepsins play a role in the evasion of host immunity via the degradation of trapped antibodies.

As described above, the intestinal trematode *E. caproni* is well adapted to establish and grow in an environment with high levels of locally produced IgG and IgA (Toledo *et al.*, 2005; Sotillo *et al.*, 2007) by a novel mechanism of parasite immune evasion, which may serve to minimize the deleterious effects of the antibody-mediated attack by a continuous entrapment of surface-bound antibodies by the constantly released ESPs, thus enabling antibody degradation by parasite-derived peptidases.

Pathogen-derived peptidases are well-known virulence factors that play key roles in the colonization of host niches and the pathogenesis of infections (reviewed by Robinson *et al.*, (2008)). In particular, cysteine peptidases are highly represented in the transcriptome of trematode parasites, such as *F. hepatica* (McVeigh *et al.*, 2012), *F. magna* (Cantacessi *et al.*, 2012), *Clonorchis sinensis* (Yoo *et al.*, 2011) or *Paragonimus westermani* (Kim, Tae-Suk *et al.*, 2006). In *E. caproni*, the peptidase protein domain C1A was found among the 10 most represented domains in the putative proteins annotated in a transcriptomic analysis of the adult stage (Garg *et al.*, 2013). Clan CA, family C1 of the papain superfamily (CA1 peptidases) includes cathepsins B, C, F and L, which have great relevance in the relationships between trematode parasites and their hosts (Stack *et al.*, 2011). In addition to the evidence at mRNA level (Garg *et al.*, 2013), the presence of cysteine cathepsin-like peptidases has been previously reported in the ESPs of *E. caproni* (Cortés *et al.*, 2016b). Herein, however, we show for the first time that both cathepsins L and B are active in these ESPs, and provide evidence of a functional role for cathepsin L-like on worm surface.

E. caproni ESPs were tested for their activity against Z-FR-AMC, a peptide substrate commonly used to detect cathepsins L and B. A substantial reduction in peptidase activity was observed upon addition of either iCL or CA-074 inhibitors to the reaction medium, although iCL displayed greater inhibitory efficacy at every pH assayed. This result indicates that cathepsin L-like peptidase(s) in the ESPs of adult

E. caproni work over a broader range of pH than cathepsin(s) B-like. However, it should be taken into consideration that, even though CA-074 is described as a selective inhibitor of cathepsin B, it has been reported to reduce the activity of cathepsins L under reducing conditions (Steverding, 2011; Steverding *et al.*, 2012; Jedličková *et al.*, 2018). Therefore, we cannot rule out the possibility that the inhibitory effect observed for CA-074 on the peptidase activity of ESPs was due to the inactivation of cathepsin L. Indeed, blotting with DCG-04 only distinguished a single band in the ESPs, which was specifically recognized by an anti-cathepsin L antibody, thus supporting the notion that cathepsins of L-type are likely the most abundant cysteine endopeptidases in this parasite material.

Localization of cathepsin L-like peptidase in the gut wall and the syncytial tegument of *E. caproni* adults is consistent with previous observations in other trematode species (Collins *et al.*, 2004; Na *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2010). In particular, the presence of cathepsin L-like peptidase(s) in the tegument and ESPs of *E. caproni* suggests that they can be secreted trans-tegmentally to accomplish functions at the host-parasite interface (Na *et al.*, 2006), such as participating in the degradation of ESPs-trapped antibodies on the worm surface.

Degradation of host immunoglobulins by pathogen-derived cysteine peptidases had been previously reported (Sajid & McKerrow, 2002). Notably, *F. hepatica* secretes cathepsin L-like peptidases, which are able to degrade IgG *in vitro* (Berasain *et al.*, 2000) and prevent antibody-mediated attachment of eosinophils to newly excysted juveniles (Carmona *et al.*, 1993). However, in contrast to previous studies using either ESPs mixtures or purified enzymes (Sajid & McKerrow, 2002), our results demonstrate that this cathepsin-mediated evasion mechanism is highly probable to occur *in vivo*. Although the parasites were maintained in culture, degradation of host antibodies was carried out by peptidases released by live worms, on their own surface. In particular, we show that *E. caproni* secreted cathepsin L-like peptidases were involved in the degradation of mouse IgG and IgA bound to

the parasite surface in our experiments. The role of cathepsin B-like peptidases in this process is, however, difficult to ascertain according to our current results. In contrast to E-64 and iCL, addition of cathepsin B selective inhibitor CA-074 to the culture medium failed to prevent from degradation of surface-bound antibodies. It is possible that, as discussed above, cathepsin B-like peptidases are scant, or not even present, in the ESPs of *E. caproni*. Notwithstanding, it is also plausible that the features of the culture medium influenced this result.

In order to assess the role of secreted cysteine peptidases in the degradation of trapped antibodies, freshly collected parasites were incubated in RPMI at physiological pH. Whilst trematode cysteine peptidases are generally active through a pH range between 4 and 10 (Kašný *et al.*, 2009), it has been observed that their optimum pH may shift to acid *in vitro* (Dvořák *et al.*, 2005; Kašný *et al.*, 2007; Barrett *et al.*, 2012). Herein, fluorometric assay of the cysteine peptidase activity in ESPs showed that CA-074 largely inhibited the enzymatic activity at pH 4.0, but its inhibitory effect decreased progressively as the pH of the medium was increased; this suggests that, if present, cathepsin B-like peptidases are more efficient at acid pH, and may explain the results observed with cultured worms.

The exact pH at which antibody degradation occurs *in vivo*, in the mouse intestine, is difficult estimate. A study showed that the pH of the ileal content of mice is about 5 (McConnell *et al.*, 2008). However, it is known that the mucus layer that covers the gastrointestinal epithelium creates a pH gradient from the lumen to the vicinity of the epithelium, where the pH gets close to 7 (Schade *et al.*, 1994; Phillipson *et al.*, 2002). *E. caproni* adults inhabit the lumen of the ileum, but are in close contact with the mucosa, where they attach by the ventral sucker (Toledo *et al.*, 2009a); therefore, a pH ranging between 5 and 7 can be expected at the host-parasite interface. Overall, the results presented herein showed that secreted cathepsin L-like peptidases are active through this pH range, thus proving that these enzymes can catalyze the degradation of surface-trapped antibodies *in vivo*.

Furthermore, this evidence shows that shedding of surface-bound antibodies is not a major mechanism of immune evasion in this parasite, as previously thought Andresen *et al.*, (1989), but, in contrast, bound antibodies are mostly proteolytically degraded on parasite's surface (Cortés *et al.*, 2017b). Future studies addressing whether cathepsins are responsible for either partial antibody cleavage (i.e. to Fc and Fab fragments, which is a general capability of papain) or complete digestion will aid to defining the roles of these peptidases in the evasion of antibody-mediated immunity.

Besides local antibodies, other molecules of the host can be a substrate of trematode-derived cathepsins (Dalton *et al.*, 1997; Na *et al.*, 2006; Kašný *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2008; Jedličková *et al.*, 2018). In a comparative proteomic study of the secretome of *E. caproni*. Cortés *et al.* (2016a) found that a cathepsin L-like peptidase was significantly over-represented in the ESPs of worms collected from rats, the low-compatible hosts that are able to rapidly expel the parasites a few weeks post-infection, and produce low levels of local specific antibodies (Sotillo *et al.*, 2007). Over-secretion of this cathepsin L by worms grown in an environment with low levels of antibodies suggests that it may perform additional proteolytic functions at the host-parasite interface (Cortés *et al.*, 2016b). For instance, *Entamoeba histolytica* secretes cysteine peptidases that cleave intestinal mucins, thus disrupting the mucus structure and enabling the invasion of the epithelium by the parasite (Moncada *et al.*, 2003; Lidell *et al.*, 2006). *E. caproni* adults are well adapted to subsist in the mouse intestine in the presence of high amounts of mucus, a well-known effector mechanism for the clearance of intestinal worms (Cortés *et al.*, 2015a). Further studies will clarify if cathepsins secreted by *E. caproni* may be also involved in parasite resistance against this defense mechanism of the host.

Herein, we have proven that secreted cathepsins of L-type are functionally active on the surface of *E. caproni*, where they can participate in immune evasion by degrading host local antibodies. Even though this mechanism has been broadly

recognized for tissue-dwelling flukes, to our knowledge, this is the first evidence of it operating on the surface of living parasites and, in particular, of an intestinal species. These results point towards a crucial role of cysteine peptidases in adaptation and niche colonization also by intestine-dwelling trematodes.

Previous studies of our group have shown that susceptibility to primary infections is related to the inability of mice to express IL-25, despite expansion of tuft cells lineage. Under these conditions, a Th1 environment is developed, leading to chronic infections. In contrast, tuft cell hyperplasia induced by inoculation exogenous IL-25 or due to epithelial restoration after cure of a primary infection enhanced tuft cell expansion and endogenous IL-25 production facilitating the development of protective Th2 responses with elevated levels of IL-13. Although the effector mechanisms responsible for the resistance need to be studied further, changes in goblet cell populations and increased expression of terminal fucose (Fuc) residues in intestinal mucus appear to be involved in resistance against *E. caproni* (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a).

4.2. IN RELATION TO THE REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE

Resistance to intestinal helminths is based on the generation of Th2 responses in a complex process that involves the interaction between innate and adaptative mechanisms (Grencis, 2015; Cortés *et al.*, 2017a; Harris, 2017). Protective Th2 immunity against intestinal helminths is initiated and amplified by the epithelial-derived alarmin cytokines including IL-25, IL-33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP), though the immune mechanisms behind the development of these responses are poorly understood (Cortés *et al.*, 2017a; Smith *et al.*, 2018). In recent years, IL-25, a member of the IL-17 family of cytokines also called IL-17E,

has been considered a key cytokine. IL-25 promotes Th2 immunity and exerts anti-inflammatory functions via the downregulation of Th17 and Th1 responses (Owyang *et al.*, 2006; Kleinschek *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016). IL-25 expression is generally associated with resistance to gastrointestinal helminth infections through the activation of Th2 responses that mediate effector mechanisms for parasite expulsion (which include goblet cell hyperplasia, smooth muscle hypercontractility, expression of RELM- β , and intestinal mastocytosis, amongst others) (Cortés *et al.*, 2017a). Recent work has uncovered the origin and the mechanisms of action of IL-25 (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). Intestinal tuft cells are the main source of IL-25. Upon helminth establishment, tuft cells release IL-25. In response to alarmins, group 2 innate lymphoid cells (ILC2) produce large amounts of IL-13 that activates dendritic cells in the lamina propria and license their migration to mesenteric lymph nodes to polarize naïve CD4⁺ T cells into Th2. ILC2 and basophils can also perform antigen presentation to CD4⁺ T cells and induce Th2 polarization, which is aided by IL-4 in the case of basophils. Th2-polarized cells release an array of cytokines that drive effector mechanisms and expand themselves through positive feedback loops, amplifying the response (Cortés *et al.*, 2017a). Despite these facts, there are several doubts in relation to the role of IL-25 in the generation of protective Th2 responses to intestinal helminth infections (Artis *et al.*, 2004; Mearns *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2018; Álvarez-Izquierdo *et al.*, 2020). For example, it is not well defined if the participation of IL-25 is limited to its ability to promote Th2 responses or if it is directly involved in the activation of effector mechanisms responsible for resistance. Likewise, its role in the differentiation of Th cells to memory subset cells and their implications in the generation of immunity against intestinal helminths is unknown. Several recent studies have questioned the role of IL-25 on the generation of adaptive type 2 responses or the differentiation of Th2 cells or their development to effector or memory Th2-cell subsets (Mearns *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2018).

Primary infection of mice with *E. caproni* does not elicit IL-25 upregulation. However, pharmacological curation of the primary infection induced a marked overexpression of IL-25. Due to these elevated levels of IL-25, mice became resistant to a challenge infection at 2 wppt (weeks post praziquantel treatment), concomitantly with the development of a robust Th2 response (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016b). Extending our previous studies, the present work was designed to analyze the role of IL-25 in the generation resistance to *E. caproni* infections in mice. The study has been focused on the factors determining IL-25 upregulation, the immune regulatory role of IL-25 and the effector mechanisms induced by IL-25 that determine resistance.

Although it is generally accepted that IL-25 is critical for resistance against intestinal helminths, there is not consensus in relation to the mechanisms by which this cytokine enhances resistance. Traditionally, the role of IL-25 in resistance has been exclusively attributed to its immune regulatory activity. IL-25 promotes Th2 immunity with production of IL-4 and/or IL-13 which, in turn, induce STAT6-mediated intestinal alterations determining parasite rejection (Fallon *et al.*, 2006; Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Angkasekwinai *et al.*, 2013, 2017). Upon helminth establishment, intestinal tuft cell populations expand and not specifically release IL-25 that activate a variety of immune cells to initiate type 2 responses and promote Th2-cell-mediated immunity. In response to IL-25 and other alarmins, ILC2 produce large amounts of IL-13 that polarize naïve CD4+ T cells into Th2. Antigen-presenting cells, such as basophils and dendritic cells, are also activated and induce Th2 polarization through different mechanisms (Gerbe *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016; Cortés *et al.*, 2017a). This is consistent with our results, since we observed that in resistant secondary infections against *E. caproni* there were an expansion of the populations of tuft cells and GATA3+ cells. The effector mechanisms activated in the resistance response against *E. caproni* seem to be dependent on the expansion of the tuft cells, thereby promoting the overexpression of IL-25 and activation of ILC2 or Th2 cells. In an environment of helminth

infection, IL-25 acts as a mediator of the activation of ILC2s promoting the polarization of the immune response towards a Th2 phenotype (Burrows *et al.*, 2019).

A number of laboratories have reported that IL-25 upregulation is induced by the infection with intestinal helminths such as *N. brasiliensis*, *T. spiralis*, *Trichuris muris* or *H. polygyrus* leading to activation of type 2 responses and resistance to infection (Fallon *et al.*, 2006; Owyang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Angkasekwinai *et al.*, 2013; Pei *et al.*, 2016). Despite these studies, recent works have suggested that the regulatory role of IL-25 may be secondary and this cytokine operates autonomously from Th2 response in the generation of resistance against intestinal helminths (Mearns *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2018). Smith *et al.*, (2018) showed that IL-25 plays a more important role than simply the promotion of protective Th2 responses. In fact, these authors demonstrated that adaptive Th2 response to *H. polygyrus* in mice developed normally even in the absence of IL-25R activation, but effector mechanisms became impaired. Similarly, Mearns *et al.*, (2014) challenged the role of IL-25 in the promotion of Th2 responses in intestinal helminth infections. Using crossed IL-25^{-/-} C57BL/6 mice and 64 IL-4 C57BL/6 reporter mice, these authors demonstrated no physiological role for IL-25 for either the differentiation of Th2 cells or their development to effector or memory Th2-cell subsets. For instance, IL-25 deficient mice mounted normal Th2 responses following *N. brasiliensis* infections. Our results, indicate that involvement of IL-25 in intestinal helminth infections may be more complex than previously expected. IL-25 is required for resistance against *E. caproni* infection in mice, but this resistance is independent of IL-4 and/or IL-13 activity and STAT6 activation. Furthermore, IL-25 may have a role in promoting Th2 responses though its contribution is different in primary and memory secondary responses. IL-25 is required for the development of a Th2 phenotype in response to primary infections but, in contrast, memory response is characterized by the upregulation of type 2

cytokines despite the lack of IL-25, suggesting that IL-25 enhances the expansion memory cells.

The inability of mice to produce IL-25 in response to primary infection and, consequently IL-13, results in susceptibility to infection. However, treatment of mice with rIL-25 induced resistance to infection, concomitantly with elevated levels of IL-13 (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). Our results confirm that the development of a Th2 response relies on the presence of IL-13 and STAT6 activation. Despite the lack of IL-25, treatment of mice with rIL-4 or rIL-13 elicited a Th2 phenotype in response to *E. caproni* primary infection and the activation of several IL-13-mediated mechanisms such as goblet cell hyperplasia or RELM- β activation. Our results also support that STAT6 activation is required for the production of type 2 cytokines in response to *E. caproni* primary infection. Blocking of IL-4R in mice treated with rIL-25 induced a decline in STAT6 phosphorylation and a Th1 response to infection.

IL-4 and IL-13 share a common receptor, the IL-4R chain, but IL-13 also uses IL-13R α 1 for signaling via JAK1 and JAK2. IL-13 binds 13R α 1 which complexes with IL-4R α to form the type 1 receptor signaling, but IL-13 also binds the cell surface and soluble forms of the monomeric type 2 receptor (IL-13R α 2 chain). However, IL-13R α 2 has a decoy effect, lacking signal transduction machinery and limiting the activity of IL-13 since binds the cytokine making it unavailable for activating type 1 receptor (Andrews *et al.*, 2006; McCormick & Heller, 2015; Giuffrida *et al.*, 2019; Bieber, 2020). Herein, we have shown that rIL-13R α 2 chain limits the ability of mice to respond to *E. caproni* primary infection, even in the presence of rIL-25. Treatment of mice with both rIL-25 and rIL-13R α 2 abrogated the response to *E. caproni* infection and no changes in cytokine levels were observed as a consequence of the infection. IL-13R α 2 may act as negative regulator of both IL-13 inhibiting signal transduction and STAT6 activation by the preferential binding of IL-13 to IL-13R α 2 (Rahaman *et al.*, 2002). However, IL-

IL-13R α 2 also inhibits IL-4 induced STAT6 activation and interact with IL-4R α , even in the absence of IL-13. IL-13R α 2 probably blocks the activation of STAT6 by the physical interaction between the short domain and the cytoplasmic domain of the IL-4R chain that harbors the STAT6 docking sites (Rahaman *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2006; Giuffrida *et al.*, 2019). In fact, we have observed that IL-13R α 2 expression is importantly upregulated coinciding with the resistance to secondary infection at 2 wppt.

In contrast to which occurs in primary infections, IL-25 does not appear to be required for the development of Th2 responses in secondary *E. caproni* infections. Herein, we have shown that mice also are unable to produce IL-25 in a secondary challenge infection. Despite this fact, secondary *E. caproni* infection at 2 wppt induced a Th2 response. This was attributed to the presence of elevated levels of IL-25 produced after the cure of the primary infection (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a). However, blocking of the IL-25 innately produced after healing of the primary infection gave rise to a type 2 response as a consequence of the secondary infection showing that IL-25 was not related to the biasing of the immune response. This is in contrast with the results obtained with other intestinal helminths. In *H. polygyrus* infections, both primary and secondary infections included IL-25, but both responses were different. IL-25 response in secondary infections was higher, concomitantly with a more potent Th2 response and enhanced resistance to infection. In contrast, the lower levels of IL-25 overexpression to primary infections, was reflected in a weak response of Th2 cytokines and chronic infections (Pei *et al.*, 2016). Although IL-25 does not appear to determine the polarization of Th2 cells in secondary *E. caproni* infections, it may be critical for the development to memory Th2 cell subsets. Mearns *et al.*, (2014) reported that there was not requirement for IL-25 in the development of Th2 cells during *H. polygyrus* infections. To analyze the role of IL-25 in the generation of memory responses against resistance to *E. caproni*, we delayed the challenge infection until the levels of innate IL-25 upregulation declined to baseline, which occurred at 10 wppt. Mice

were susceptible to the challenge infection despite the development of a Th2 phenotype with elevated levels of IL-4 and IL-13 but low levels of endogenous expression of IL-25. This suggest that innately produced IL-25 after healing of a primary infection is involved in the differentiation of memory cells.

Resistance to *E. caproni* primary infection was associated with IL-4-independent mechanisms and based on IL-13 activity and STAT6 activation (Sotillo *et al.*, 2011; Trelis *et al.*, 2011). However, recent studies have suggested that mechanisms of resistance to intestinal helminth infections mediated by IL-25 are not dependent on IL-4 and/or IL-13 activity (Smith *et al.*, 2018). Our results support the notion that IL-25 operates autonomously from type 2 cytokines and the generation of resistance is exclusively mediated by IL-25. Treatment of mice with rIL-4 or rIL-13 did not provide of resistance to a primary *E. caproni* infection in relation to the lack of IL-25, despite the development of a Th2 response.

Blocking of the IL-13 receptors induced a significant reduction of STAT6 phosphorylation concomitantly with a reduction of goblet cell hyperplasia and downregulation of RELM- β . However, both control animals and those with the blocked IL-13 receptors were refractory to primary infection due to the presence of exogenous IL-25. These facts indicate that resistance is exclusively mediated by IL-25 independently of the presence of IL-13 and STAT6 activation, probably in relation to M2 activation. Blocking of the IL-13 receptors took the values of iNOS expression to almost zero, together with overexpression of Arg1 indicating an increased M2 activation. It is well known that IL-25 induces alternative activation of macrophages and this an important mechanism for parasite rejection (Smith *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Independently of the presence of IL-13, M2 has been shown to be crucial for immunity against several intestinal helminths, such as *H. polygyrus* (Anthony *et al.*, 2006). An interesting feature is the upregulation of IL-13 after blocking of its receptors. Smith *et al.*, (2018) obtained similar results in rIL-25-treated mice in *H. polygyrus* infections, reporting that M2 may represent a major

source of IL-13. Smith *et al.*, (2018) demonstrated that IL-4 in addition with IL-4R α signaling is required for M2 activation and parasite elimination. Expression of IL-25R in M2 could be required for the parasite expulsion in the presence of IL-4R α signaling (Smith *et al.*, 2018). Our results support that M2 activation and the subsequent IL-13 overexpression do not depend on type I receptor signaling. Although the IL-4 expression was not very high, this cytokine may well act via type I receptor signaling enhancing the resistance to *E. caproni*. Strikingly, treatment of mice with rIL-4 did not yield neither resistance nor M2 activation, probably in relation to the lack of IL-25 production. This suggest that IL-4, but not IL-13, might be necessary for resistance along with IL-25.

A striking feature of *E. caproni* infections in mice is that tuft cell hyperplasia and the subsequent IL-25 overexpression exclusively occurs as a consequence of the healing of the infection. Howitt *et al.*, (2016) suggested that IL-25 upregulation in intestinal helminth infection is initiated during colonization by the recognition of parasite compounds by tuft cells via taste chemosensory pathways. To this purpose, tuft cells possess multiple taste-chemosensory G protein coupled receptors and many of them require the G protein subunit gustducin and the transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRMP5) to transduce the signals (Huang *et al.*, 2015). Howitt *et al.*, (2016) reported that disruption of chemosensory signaling by the loss of TRMP5 abrogated the tuft cell expansion and IL-25 upregulation on mice infected with *N. brasiliensis*, *T. spiralis*, or *H. polygyrus*. Although other mechanisms of immune suppression cannot be discarded (Valanparambil *et al.*, 2017), the lack of IL-25 expression in both *E. caproni* primary and challenge infections suggests that parasite components do not activate taste chemosensory pathways in tuft cells of mice which explain the susceptibility to both type of infections. The fact that expansion of GATA3⁺ cells exclusively occur after a secondary infection in presence of IL-25, may indicate that only the simultaneous combination of signals provided by the parasite and IL-25 are able to induce the polarization to Th2.

Strikingly, the mucosal regeneration and healing processes initiated after deworming appears to be implicated in the signaling leading to tuft cell hyperplasia and IL-25 upregulation. *E. caproni* induces severe epithelial damage in mice and several mechanisms for wound healing are activated early after primary and secondary infection (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Cortés *et al.*, 2015a, c, 2016b). In the murine gut, wound environment induces rapid changes in resident microbiota such as changes in microbial alpha or beta diversity (Peachey *et al.*, 2017). Several intestinal nematodes such as *N. brasiliensis*, *T. trichiura* or *Ascaris lumbricoides* induce significant alterations in diversity and composition of the intestinal microbiota (Cooper *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Giacomini *et al.*, 2016; Jenkins *et al.*, 2017). Moreover, changes in microbial composition associated with parasite infections elicit upregulation of cytokines altering the regulation of the immune response (Rausch *et al.*, 2013; Holm *et al.*, 2015; Cattadori *et al.*, 2016). Administration of probiotics promoted successful establishment of *H. polygyrus* in mice, via reduction of Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 and an increase in regulatory TCD4⁺ cells (Reynolds *et al.*, 2014). In contrast, resistance to *T. spiralis* was enhanced by promoting Th2 responses after oral administration of *Lactobacillus casei* (El Temsahy *et al.*, 2015). In the case of IL-25, several studies support that its intestinal production is regulated by resident microbiota showing that, in general, dysbacteriosis upregulates IL-25 expression (Cortés *et al.*, 2018). Moreover, IL-25-mediated intestinal immune regulation is impaired in mice in absence of microbiota (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). Expression of ileal IL-25 is reduced in germ-free mice compared to wild-type mice, but exposure to environmental microbes induced IL-25 overexpression (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). Furthermore, antibiotic treatment of mice significantly decreased the expression of gut IL-25 expression (Zaph *et al.*, 2008). Our results support that expression of IL-25 could be dependent on microbial-derived signals. Changes in resident microbiota as a consequence of the infection and subsequent healing participate in IL-25 production protecting from secondary infection. Treatment of mice with a cocktail of antibiotics

abrogated the IL-25 after the curation of the primary *E. caproni* infection concomitantly with a decrease in bacterial abundance in feces and susceptibility to challenge infection at 2 wppt. Changes in resident microbiota may play a pivotal role in the expression of IL-25 and, consequently, in the resistance to challenge infections.

In summary, we have analyzed the role of IL-25 in the resistance against *E. caproni* in both primary and secondary memory responses in ICR mice. Susceptibility of mice relies in the inability of mice to produce IL-25 in response to infection, which is probably related to alterations in the resident microbiota induced by the infection. In contrast to primary infection, secondary infection elicits a type 2 response, even in the absence of IL-25 expression. Despite the development of a type 2 response, mice are susceptible to secondary infection in relation to the lack of IL-25. Resistance to infection is due to IL-25, which acts autonomously from Th2 response in the parasite clearance.

4.3. IN RELATION TO THE ROLE OF MICROBIOTA IN THE IMMUNE RESPONSE

Due to its ability to modulate intestinal barrier function and homeostasis and the immune response against intestinal helminths, gut microbiota is receiving increased attention. In fact, microbiota appears to have a critical role in the course of intestinal helminth infections. Resistance or susceptibility to intestinal helminths have been often associated with changes in intestinal microbiota (Peachey *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018a). In this sense, IL-25 is one of the cytokines that seems to be most influenced by the composition of the intestinal microbiota. Several studies have showed that intestinal production of IL-25 is regulated by resident microbiota. Likewise, other studies have seen that using germ-free or antibiotic-

treated mice induced downregulation of IL-25 (Zaph *et al.*, 2008; Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017).

In the case of IL-25, several studies support that its intestinal production is regulated by resident microbiota showing that, in general, dysbacteriosis upregulates IL-25 expression (Cortés *et al.*, 2018a). Moreover, IL-25-mediated intestinal immune regulation is impaired in mice in absence of microbiota (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2017). Expression of ileal IL-25 is reduced in germ-free mice compared to wild-type mice, but exposure to environmental microbes induced IL-25 overexpression (Sawa *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2015). Furthermore, antibiotic treatment of mice significantly decreased the expression of gut IL-25 expression (Zaph *et al.*, 2008). Our results support that expression of IL-25 could be dependent on microbial-derived signals. Changes in resident microbiota as a consequence of the infection and subsequent healing participate in IL-25 production protecting from secondary infection. Treatment of mice with a cocktail of antibiotics abrogated the IL-25 after the curation of the primary *E. caproni* infection concomitantly with a decrease in bacterial abundance in feces and susceptibility to challenge infection at 2 wppt. Changes in resident microbiota may play a pivotal role in the expression of IL-25 and, consequently, in the resistance to challenge infections.

Despite to what occurs with most intestinal helminths, *E. caproni* primary infections in ICR mice induce a local Th1 response with increased expression of IFN- γ (Trelis *et al.*, 2011). This response is associated with the development of chronic infections with elevated inflammation and tissue damage (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007). However, mice become resistant to homologous secondary infections after drug cure of a primary infection (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b; Cortés *et al.*, 2016b). Recent studies of our group showed that partial resistance against *E. caproni* secondary infections is developed after chemotherapeutic cure of a primary infection and innately produced IL-25 is crucial to determine the resistance.

Susceptibility to primary infections was associated with low levels of intestinal IL-25 expression, whilst deworming via administration of pzq was accompanied by a steady increase in IL-25 expression and, in turn, by the onset of a Th2-type response that prevented the establishment of secondary infections (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b). Based on these observations, IL-25 represent the key mediator in the determination of resistance or susceptibility to *E. caproni* infections. However, the question that arises is how the production of IL-25 is activated. To analyze further this issue, we have studied the changes in the gut resident microbiota of mice induced by *E. caproni* primary infection, pharmacological curation of the primary infection and a secondary infection and the potential relationship with the immune response generated and the different course of the infection.

Although it is difficult to establish a relationship between changes in the microbiota with the abrupt production of Th2 type cytokines (IL-4, IL-13) and IL-25 and resistance, the elevation of IL-25 levels occurred concomitantly with an increase of the Verrucomicrobia belonging to the genus *Akkermansia* and a dramatic decline in the Unclassified Bacteroidales. Interestingly, increase in the members of the genus *Akkermansia* has been associated with increased expression of toll-like receptors and inflammatory genes (Ray *et al.*, 2020). This suggests that the elevated levels of *Akkermansia* in our work is related with the inflammatory events induced by *E. caproni* primary infection. In contrast, reduced abundance of members of Bacteroidetes phylum has been associated with a decay in the inflammatory cytokines (Han *et al.*, 2020). Therefore, the reduction of Unclassified Bacteroidales after pharmacological curation of the *E. caproni* primary infection could contribute to the rising of Th2 cytokines mediated by alarmins such as IL-25.

The overall gut microbiota profiles in the four experimental groups (naïve controls, primarily infected animals, pzq-treated mice and secondarily infected animals) showed marked quantitative and qualitative differences between them. This reveals that primary infection with *E. caproni*, and both pharmacological

curation and challenge infection, significantly affect the resident microbiota which may be of importance to analyze the immunological and pathological responses to infection in each condition.

α -Diversity is commonly used as a measurement to determine the health status of the microbiota. High values of α -diversity are associated with mature, homogeneous, stable and healthy intestinal microbial environment (Mosca *et al.*, 2016; Menni *et al.*, 2017). Consequently, it has been proposed that the direct or immune-mediated ability of gastrointestinal helminths to restore intestinal homeostasis by promoting increases in microbial richness and uniformity may represent a mechanism by which parasites exert therapeutic properties in individuals with chronic inflammatory disorders (Giacomin *et al.*, 2015, 2016; Zaiss *et al.*, 2015; Jenkins *et al.*, 2017). In this sense, we have observed a significant reduction of α -diversity after primary infection, which is consistent with the fact that *E. caproni* primary infection induces chronic infections with elevated levels of inflammation and tissue damage (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007)

This reduction was confirmed by the Chao1 index. The richness of the intestinal microbiota of mice in the presence of primary infection at 4 weeks post primary infection (wppi) evaluated by the Chao 1 index was lower than that observed in control animals at the same time point. Likewise, this index was increased in all experimental groups both at 6 and 10 wppi and no significant differences were observed between groups or within the same group at different study weeks. This fact suggests that the individual microbiota of mice in primary and secondary infection at 6 and 10 wpi differentially responded to the alteration of intestinal homeostasis observed in the early phases of primary infection. Previous studies have detected a significant increase in microbial richness in the gut microbiota of laboratory rodents experimentally infected with *T. suis* and *H. diminuta* (Kreisinger *et al.*, 2015; Holm *et al.*, 2015), as well as in fecal samples from humans infected with various intestinal helminth species (Jenkins *et al.*, 2017).

These data suggest that a higher richness could represent a common characteristic given in the intestinal microbiota of mammals parasitized by helminths, regardless of the species of parasites and the location in the gastrointestinal tract. However, in addition to the state of infection (acute or chronic), together with the characteristics of the parasite species in general, it is likely that the parasite load also affects the changes induced by intestinal helminths in the intestinal microbial richness (Jenkins *et al.*, 2018a).

Moreover, analysis of α -diversity supports the relevant role of helminth infection in the composition of resident microbiota. The taxonomic profile of microbial communities using PCoA and RDA revealed strong associations between intestinal composition and infection stage (primary or secondary infection), thus providing further evidence of the modulating function of the microbiota (directly or immune-mediated) in infections caused by intestinal helminths (Jenkins *et al.*, 2018a). Moreover, LefSE analysis showed that all of the experimental procedures markedly affected the richness of microbial communities with the major changes in the populations of Lachnospiraceae, Rikenellaceae, Unclassified.Clostridiales, Unclassified.Bacteroidales, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Prevotella* and *Odoribacter*.

The overall observation of the microbiota profile in each of the four experimental groups shows that Bacteroidetes and Firmicutes were the most represented phyla in all the groups. However, each experimental procedure elicited significant changes that may be essential to explain the susceptibility or resistance to *E. caproni* infection.

Primary infection with *E. caproni* induced a significant increase in the relative abundance of Bacteroidetes to the detriment of the Firmicutes, affecting the Bacteroidetes/Firmicutes ratio. Growth of Bacteroidetes is mainly related to an increase of Unclassified Bacteroidales. This is in contrast with other models in

which infection with intestinal helminths results in a decrease in the abundance of the genera belonging to Bacteroidetes.

Although, quantitative and qualitative changes in the gut microbiota are common features in infections with intestinal helminths (Peachey *et al.*, 2017), it is not known if those changes are due to the immune response elicited by the helminth infection or through the effects of the worms themselves (Su *et al.*, 2018). Peachey *et al.*, (2017) formulated three hypotheses to explain the helminth-associated changes in gut microbiota: (i) changes are induced by the host to create a hostile environment for the parasite; (ii) interactions with the helminth excretory/secretory products are the responsible of the alterations; and (iii) changes are due to the host immune response to helminth infection.

There are some evidences suggesting an active role of the host in the induction of modifications of the gut microbiota. Expulsion of *T. muris* has been associated with an increase of the antimicrobial protein angiotensin 4 that induce changes in the commensal flora (D'Elia *et al.*, 2009). Regarding the second hypothesis, it should be noted that excretory/secretory products of helminths have several antimicrobial proteins that can affect the microbiota (Hewitson *et al.*, 2011). Probably, the third hypothesis is the more reliable according to the current knowledge. Increased expression of several cytokines has been associated with relevant changes in the composition of the microbiota (Cattadori *et al.*, 2016). Moreover, changes in microbial composition were attenuated in STAT6^{-/-} and IL-13^{-/-} mice infected with *N. brasiliensis* (Fricke *et al.*, 2015). Recently, Su *et al.*, (2020) showed that changes in microbiota composition are dependent on IL-4/IL-13-STAT6 signaling pathway. Infection with *H. polygyrus* of STAT6^{-/-} mice did not induce significant changes in the resident microbiota and, moreover, treatment of mice with IL-25 altered the bacterial flora, even in absence of helminth infection, in relation to the Th2 phenotype developed.

Our results support the notion that changes in gut microbiota after an intestinal helminth infection are mainly due to the host immune response. Most of the intestinal helminths induces the development of a Th2 milieu which is associated with a reduction of the relative abundance of the members of Bacteroidetes and an increase of those belonging to Firmicutes (Walk *et al.*, 2010; Holm *et al.*, 2015; Kreisinger *et al.*, 2015; Peachey *et al.*, 2017). In contrast, the development of a Th1 response to *E. caproni* primary infection resulted in a markedly different pattern of microbial changes. Unlike to which occurs in other intestinal helminth infections, *E. caproni* primary infection elicited a significant increase of the abundance of the members of Bacteroidetes, mainly due to a rise in the presence of unclassified Bacteroidales. In contrast, members of Firmicutes significantly decreased in relation to a decline of unclassified Clostridiales. This is confirmed by the fact that upregulation and the development of a Th2 phenotype associate to pharmacological curation of the parasite infection resulted in a decrease of Bacteroidaceae and unclassified Bacteroidales. This suggests that Th1/Th2 balance in intestinal helminth infections has a relevant role in the composition of the gut bacterial populations.

Changes in microbiota composition may have a relevant role in the intestinal metabolism and pathology induced by helminths. Members of Bacteroidetes are involved in the degradation of carbohydrates and proteins, suggesting that *E. caproni* primary infection induces an increase of the metabolism of this type of molecules as previously described for other helminths. Increase of Bacteroidetes/Firmicutes ratio has been commonly associated with the growth of beneficial bacteria enhancing anti-inflammatory responses and may induce several metabolic changes in the intestine (Myhill *et al.*, 2018). The increase of Bacteroidetes induced by *E. caproni* primary infections is consistent with the metabolic changes previously observed. Primary infection of mice with *E. caproni* affects the carnitine biosynthetic pathway, which induces an increase of β -oxydation of fatty acids as an alternative source of energy. Bacteroidetes has the ability to use

a large range of substrates to degrade carbohydrates as a source of energy (Thomas *et al.*, 2011). In this context, the release of fatty acids as a consequence of the anaerobic degradation of carbohydrates by members of Bacteroidetes may facilitate the procurement of additional energy to the host.

Moreover, the decrease of Firmicutes may contribute to the accumulation of short chain fatty acids and the inflammation observed in *E. caproni* primary infections. Several studies have demonstrated that the members of Firmicutes are able to degrade pro-inflammatory factors, reduce cellular infiltration and ROS levels, ameliorating the intestinal inflammation (Mannick & Udall Jr, 1996; von Schillde *et al.*, 2012; Hörmannspenger *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2018). Thus, reduction of Firmicutes may favour the pathology induced by *E. caproni* primary infections due to an increase of inflammatory responses, oxidative stress and accumulation of short chain fatty acids which are relevant factors causing pathology in this infection (Cortés *et al.*, 2015b).

Pharmacological curation of *E. caproni* primary infection rapidly activates mechanisms for wound healing, including the development of a Th2 phenotype with elevated levels of IL-25 and alternative activation of macrophages and the transition from an inflammatory to an anti-inflammatory milieu (Cortés *et al.*, 2015a,c; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a,b). Strikingly, this process is associated with a marked increase of beneficial microbes such those of the Verrucomicrobia phylum (Verrucomicrobiaceae) together with a depletion of native microbial including Bacteroidaceae or Unclassified Bacteroidales. Increased abundance of Verrucomicrobia has been associated with the development of Th2 phenotype in response to *T. spiralis* infections (Liu *et al.*, 2019). It has been shown that Verrucomicrobia has a helpful effect since cause a decrease in inflammation and enhanced glucose metabolism of the host (Fujio-Vejar *et al.*, 2017; Plovier & Cani, 2017; Liu, *et al.*, 2019; Fujisaka *et al.*, 2020; Ray *et al.*, 2020). This is of interest since, apart from the anti-inflammatory effects, shift from the Th1 to Th2 responses

in *E. caproni* infections is characterized for an increased aerobic use of glucose (Cortés *et al.*, 2015a, c; Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b). In addition, it has been shown that *A. muciniphila* adheres to the intestinal epithelium and strengthens the integrity of enterocytes in in vitro assays (Justus *et al.*, 2015). Therefore, it is plausible that high levels of *A. muciniphila* may play a potential protective role against the alteration of the barrier function of the epithelium after infection (Jenkins *et al.*, 2018a).

Interestingly, bacteria belonging to the genus *Turicibacteres* were exclusively found in mice treated with pzq. Unfortunately, there is little information about the relationships between this group of bacteria and gastrointestinal helminth infections. However, in immunocompromised mice, a link between *Turicibacter* and host immune dysfunction has been described (Presley *et al.*, 2010; Dimitriu *et al.*, 2013). For example, *Turicibacter* spp. are abundant in the gut microbiota of wild-type mice, but are completely absent in the gut of mice with defective immune responses (CD45-) and mice lacking an adaptive immune system (RAG-) (Dimitriu *et al.*, 2013). Consequently, we suggest that the absence of *Turicibacter* observed in mice infected with *E. caproni* could be due to alterations in the immune functions of the mucosa during infection. However, it is not clear whether the absence of bacteria belonging to the genus *Turicibacter* could have an impact on the outcome of *E. caproni* infection.

Secondary *E. caproni* infection completely depleted the phylum Verrucomicrobia for the benefit of a marked increase of Unclassified Bacteroidales that may reflect the effects of the new infection. This is of interest since secondary responses elicited a Th2 response. However, this response may due to the elevated levels of IL-25 present in the milieu at the time of the challenge infection.

Increased populations of members of the genus *Lactobacillus* were observed in secondarily infected mice. A relationship between lactobacilli and parasitic helminths has been observed in the basis of data from experimental

infections of murine models infected with intestinal nematodes (Walk *et al.*, 2010; Rausch *et al.*, 2013; Reynolds *et al.*, 2014; Fricke *et al.*, 2015; Kreisinger *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2018). Reynolds *et al.* (2014) reported a marked increase in the populations of bacteria belonging to the Lactobacillaceae family after infection of C57BL/6 mice with the intestinal nematode *H. polygyrus*. In turn, the administration of *Lactobacillus* species prior to infection with the parasite resulted in a significant increase of parasite load, which led the authors to hypothesize the existence of a mutualistic relationship mediated by the immune system between selected bacteria and helminths (Reynolds *et al.*, 2014). Strickingly, the relative expansion of *Lactobacillus* populations only was observed in secondary infection, which suggests that lactobacilli are affected by the initiation of inflammatory responses caused after the establishment of helminths. Therefore, elevated levels of *Lactobacillus* in mice secondarily infected by *E. caproni* could represent a modulation of the microbiota.

Several bacterial taxa, such as the family Lachnospiraceae, commonly associated with events of intestinal inflammation were significantly increased in the intestinal microbiota of mice treated with pzq respected to that observed in primarily infected mice. Expanded populations of Lachnospiraceae have been reported in patients with irritable bowel syndrome (Rajilić–Stojanović *et al.*, 2011), as well as during intestinal inflammation (Reikvam *et al.*, 2015). In particular, significantly enlarged populations of Clostridia were detected in the fecal microbiota of mice during primary infection with *E. caproni* compared to subjects treated with pzq or subjected to secondary infection. In fact, several strains of Clostridia have been identified as main actors in the maintenance of intestinal homeostasis, due to their role in the protection of the intestine against the colonization of pathogens, as a mediator of the development of the host's immune system and as a modulator of the immunological tolerance (Lopetuso *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2018b).

The Bacteroidales S24-7 family is gaining recognition due to both its prevalence, particularly in murine-based data sets, and its fluctuating abundance in cross-sectional and intervention-type studies. Abundance has been described in mice fed a low-fat diet and, in association with greater exercise (Evans *et al.*, 2014), in diabetes-sensitive mice fed a high-fat diet (Serino *et al.*, 2012) and after remission of colitis in a mouse model (Rooks *et al.*, 2014). S24-7 is also the dominant family during hibernation of Arctic ground squirrels (Stevenson *et al.*, 2014; Ormerod *et al.*, 2016).

The phylum Actinobacteria is one of the most abundant phyla in the intestinal commensal flora of mammals (Hugon *et al.*, 2015), and is enriched in the upper intestine compared to other intestinal sites (Frank *et al.*, 2007). This phylum includes pathogens, such as the genus *Mycobacterium*, responsible for a diverse range of diseases in humans and animals, and gastrointestinal commensals, such as bacteria of the Bifidobacteriaceae family, which are characterized by well-known probiotic properties due to their ability to ferment oligosaccharides (Ventura *et al.*, 2007), as well as modulating the immune system of its human hosts (De Palma *et al.*, 2010). Increased concentrations of *Bifidobacteria* have been reported in the duodenum of children with inactive celiac disease compared with children with active celiac disease and healthy controls. Such observations led to the hypothesis that bacterial populations can be partially restored after the introduction of effective treatment. However, in another study, the differences in the concentration of duodenal Actinobacteria between celiac disease patients with and without persistent symptoms were statistically insignificant (Wacklin *et al.*, 2014). Lactobacilli appeared to be less prevalent in active celiac disease controls compared to other trial subjects with diet-controlled celiac disease. This group of bacteria is of particular interest in celiac disease research, as it includes known probiotics that have been shown to have a positive impact on a variety of gastrointestinal inflammatory conditions, such as those caused by inflammatory bowel diseases and rotavirus infections (Servin, 2004; Distrutti *et al.*, 2016). Lactobacilli are decreased in the

duodenal and fecal microbiota of children with active disease compared to children with inactive disease who receive a diet, as well as healthy controls (Collado *et al.*, 2008; Di Cagno *et al.*, 2011). This supports the hypothesis that adherence to a strict diet contributes to the restoration of a "healthy" intestinal flora (Collado *et al.*, 2008).

Giacomin *et al.*, (2015) characterized the qualitative and quantitative fluctuations in the composition of the microbiota associated with the mucosa of the test subjects experimentally infected with hookworms and exposed to increasing doses of gluten in the diet. Compared with samples collected from test subjects before experimental infections, those collected after hookworm infection, and micro-exposure to gluten showed a higher relative abundance of the orders Bacteroidales and Flavobacteriales, (phylum Bacteroides). Bacteroides also increased in the fecal microbiota of macaques with chronic idiopathic diarrhea (DCI) after an experimental infection with *Trichuris* sp., compared to uninfected controls showing clinical signs of the disease (Broadhurst *et al.*, 2012). However, the assessment of the abundance of Bacteroidetes analyzed by PCRrt showed a reduction in the populations of these bacteria in the feces of macaques after exposure to infection with *Trichuris* sp., which led the authors to hypothesize that the apparent increase observed could have reflected an expansion of the phylum Bacteroidetes in diseased subjects (Broadhurst *et al.*, 2012). More recent studies in murine models and in human populations have supported the role of *Trichuris* sp. in regulating the balance of Bacteroidetes within the intestine, at the same time that they promote colonization by Clostridiales (Ramanan *et al.*, 2016). However, in the study by Giacomin *et al.* (2015), a greater relative abundance of Bacteroidetes was detected in the test subjects both at the start of the experiment and after the introduction of an inflammatory stimulus. Based on these observations, as well as on the knowledge that these bacteria are more abundant in subjects with celiac disease who do not show symptoms of disease compared to symptomatic controls (Di Cagno *et al.*, 2011; Wacklin *et al.*, 2014), it is suggested that the relative expansion of

Bacteroidetes populations may be associated with helminth infections (Giacomin *et al.*, 2015).

Among the functions performed in parallel by the intestinal microbiota and intestinal helminths, we can find the damping or evasion of the immune response developed by the host to allow its survival, although bacteria and helminths need to suppress effector mechanisms dominated by Th1/17 and Th2 very different, respectively. Common strategies include the induction of suppressor regulatory T cells (Tregs) by a variety of bacteria, including *Bacteroides fragilis* (Round & Mazmanian, 2010), *Bifidobacterium infantis* (O'Mahony *et al.*, 2008), *Clostridium* spp. (Atarashi *et al.*, 2011, 2013; Narushima *et al.*, 2014) and *Lactobacillus* spp. (Smits *et al.*, 2005; Karimi *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2012), as well as intestinal nematode parasites, such as *H. polygyrus* (Grainger *et al.*, 2010) and *Strongyloides ratti* (Blankenhaus *et al.*, 2011). Interestingly, the activation of Tregs appears to be a generalized feature of both microbiota colonization (Faith *et al.*, 2011; Geuking *et al.*, 2011) and infection by helminth parasites (Maizels & Smith, 2011).

Changes in the microbiota after helminth infection are commonly correlated with the burden of adult worms (Hand *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2012). However, helminth clearance results in a returning of a previous status of the microbiota, suggesting that continued the presence of the parasites is required for the maintaining of sustained changes in the bacterial microbiota (Tremaroli & Bäckhed, 2012). In wild mice, about half of the animals simultaneously infected with a combination of *H. polygyrus* helminths, *Syphacia* spp. and *Hymenolepis* spp. (Littman & Pamer, 2011) showed a greater diversity of bacterial microbiota, and the presence of each helminth was associated with specific changes in the composition or abundance of microbiota species (Littman & Pamer, 2011; Reynolds *et al.*, 2014).

Moreover, the microbiota richness in primarily infected mice at 4wppi evaluated by the Chao1 index was lower than that of observed in in control animals

at the same time point. This index increased in all the experimental groups at 6 and 10 wppi with no significant differences neither inter- nor intra-groups. This suggest that differential alteration of mucosal structure in primary and secondary infection is different. Previous studies have shown that increases of intestinal microbial richness are a common feature in various helminth infections (Kreisinger *et al.*, 2015; Holm *et al.*, 2015; Jenkins *et al.*, 2017). This suggest that increases of microbial richness may be induced by helminth infections regardless of parasite species and location in the gastrointestinal tract. However, in addition to the state of infection (acute or chronic) as well as the characteristics of the parasitic species, it is likely that the parasite load also affects the changes induced by intestinal helminths in the intestinal microbial richness (Jenkins *et al.*, 2018a).

4.4. IN RELATION TO THE CHANGES IN *ECHINOSTOMA CAPRONI* INFECTIONS INDUCED BY IL-25

In view that IL-25 is crucial for resistance against *E. caproni* infections, we analyze the changes in the production of proteins induced by IL-25 in the ileum of mice that may be involved in the generation of resistance against intestinal helminths. Resistance against *E. caproni* infection has been associated with the preservation of the intestinal homeostasis despite the possible damage induced by the parasite. In resistant hosts, *E. caproni* infection elicits a rapid renewal of the intestinal that allows to maintain the epithelium homeostasis and impairing the proper worm establishment. In contrast, in susceptible hosts, such as mice, the development of chronic infections are related to the disruption of the intestinal homeostasis causing tissue hyperplasia (Muñoz-Antoli *et al.*, 2014; Cortés *et al.*, 2015b, c). Although mice are a susceptible host, treatment with rIL-25 prior to infection induces complete resistance to the infection (Muñoz-Antoli *et al.*, 2014). Our results support that IL-25 may contribute to resistance by the enhancement of

intestinal homeostasis via activation of the canonical wingless-related integrator site (Wnt)/ β -Catenin signaling pathway. Treatment of naïve mice with rIL-25 only elicited changes in the production of a total of 5 proteins, including the structural protein junction plakoglobin or β -catenin. This protein is a member of the catenin family, paralog to β -catenin, and is a component of desmosomes. It is involved in the mechanisms of cell adhesion and is essential to maintain and regulate intestinal epithelial homeostasis (Fevr *et al.*, 2007; Aktary *et al.*, 2016). Plakoglobin participates in the canonical pathway of Wnt/ β -Catenin signaling since elevated levels of plakoglobin promote the stabilization and nuclear localization of β -catenin enhancing the activation of Wnt/ β -Catenin signaling (Morgan *et al.*, 2013). Activation of this pathway is essential for the maintenance of the intestinal homeostasis since it plays an essential role in regulating cell proliferation, survival, and differentiation facilitating epithelial healing after disruption (Qian *et al.*, 2020). The central mediator of Wnt signaling is β -catenin. Wnt signaling activation is dependent on the nuclear translocation of β -catenin. When a canonical Wnt binds to the frizzled receptor and its co-receptor lipoprotein receptor-related protein 5/6, disheveled is recruited and the destruction complex is inhibited, thus promoting the accumulation of non-phosphorylated β -catenin in the cytosol. As non-phosphorylated β -catenin accumulates intracellularly, it is translocated to the nucleus where it activates the T-cell factor/lymphocyte enhancer factor transcription factor families to regulate gene transcription (Ackers & Malgor, 2018). Plakoglobin participates in the canonical pathway of Wnt/ β -Catenin signaling since this protein inhibits the glycogen synthase kinase (GSK3 β)-mediated nuclear localization of β -catenin. GSK-3 β is one important member that regulates the Wnt/ β -catenin target gene expression by controlling the level of cytoplasmic β -catenin and its nuclear shuttle (Jacobs *et al.*, 2012). Elevated levels of plakoglin promote the stabilization and nuclear localization of β -catenin (Morgan *et al.*, 2013) and may enhance intestinal homeostasis despite the damage caused by the infection. Oudhoff *et al.*, (2016) reported that Wnt/ β -Catenin signaling is an important component of resistance to the intestinal nematode *T. muris* in mice. These authors showed that

Wnt expression programs are induced upon infection with *T. muris* eggs and wild type mice were able to expel the infection. In contrast, mice deficient in SETD7 (a member of the Suppressor of variegation 3-9-Enhancer of zeste-Trithorax domain-containing family of lysine methyltransferases) were not able to reject the infection. SETD7 controls IEC turn over by modulating developmental signaling pathway Wnt/ β -Catenin. Lack of SETD7 resulted in downregulation of Wnt/ β -catenin, deficient and susceptibility to infection (Oudhoff *et al.*, 2016). The fact exposure of rIL-25-treated mice to *E. caproni* metacercariae induced a significant downregulation of three isoforms of plakoglobin with respect to rIL-25-treated mice supports that plakoglobin plays an important role in *E. caproni* infections and its potential role in the development of resistance to infection.

Strikingly, two other proteins involved in cell differentiation and tissue homeostasis also became altered by the treatment with rIL-25. Proliferation-associated 2G4 (PA2G4) and receptor of activated protein C kinase 1 (RACK1) were found to be downregulated in rIL-25-treated mice with respect to naïve mice. PA2G4, also known as EBP1 (ErbB3-binding protein 1), is a RNA-binding protein that is involved in growth regulation. This protein is present in pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes and may be involved in ribosome assembly and the regulation of intermediate and late steps of rRNA processing. This protein can interact with the cytoplasmic domain of the ErbB3 receptor and may contribute to transducing growth regulatory signals. This protein is also a transcriptional corepressor of androgen receptor (AR)-regulated genes and other cell cycle regulatory genes through its interactions with histone deacetylases. This protein has been implicated in growth inhibition (Zhang *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2016). The EBP1-binding in promoters regulated by E2F can result in an enhanced ability of EBP1 to suppress genes transcription regulated by the cell cycle and inhibit cell growth (Zhang & Hamburger, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Furthermore, the expression of EBP1 generates the negative expression of the AR and several of its target genes, thereby inhibiting AR-regulated cell growth (Lyne *et al.*, 1997; Zhang

et al., 2008; Karlsson *et al.*, 2016). RACK1 is a member of the tryptophan-aspartate repeat (WD-repeat) family of proteins and shares significant homology to the β subunit of G-proteins ($G\beta$). RACK1 adopts a seven-bladed β -propeller structure which facilitates protein binding. RACK1 has a significant role to play in shuttling proteins around the cell, anchoring proteins at particular locations and in stabilizing protein activity. It interacts with the ribosomal machinery, with several cell surface receptors and with proteins in the nucleus. As a result, RACK1 is a key mediator of various pathways and contributes to numerous aspects of cellular function. RACK1 is a scaffolding protein that takes part in the maintenance of intestinal homeostasis protecting the integrity of the epithelial barrier by suppressing the regeneration and proliferation of crypt cells, promotes differentiation and apoptosis and is generated against stress responses (Mamidipudi & Cartwright, 2009; Adams *et al.*, 2011; Duff & Long, 2017; Cheng & Cartwright, 2018). Downregulation of both EBPI and RACK1 may contribute to prevent the hyperplasia in the intestinal tissue that is associated to susceptibility to *E. caproni* infections.

Another striking feature that may be related with alterations in the intestinal epithelium and resistance to infections is the upregulation of annexins 2 and 4 in rIL-25-treated mice exposed to *E. caproni* metacercariae. Annexin is a common name for a family of structurally related proteins that mostly found in eukaryotic organisms both in extra and intracellular environment and bind phospholipids and carbohydrates in the presence of Ca^{2+} (Monastyrskaya *et al.*, 2009; Muñoz-Antoli *et al.*, 2014). Annexins play a role in the control of cell death and affect membrane properties such as permeability or anchoring of cytoskeletal elements (Gerke & Moss, 2002; Gerke *et al.*, 2005). These proteins also are related to epithelial cell migration that is a critical event in gastrointestinal mucosal wound healing (Babbin *et al.*, 2007). Furthermore, evidences of annexins as modulators of inflammation have been widely provided (Wallner *et al.*, 1986). In the small intestine, the expression of annexins appears to be restricted to M cells, where it plays a role in endocytic transport and membrane scaffolding (Verbrugge *et al.*, 2006). Annexins

can function as a natural ligand for phosphatidylserine, a prominent phospholipid that is exposed during cell death. It has been suggested that annexins blocks phosphatidylserine-dependent phagocytosis of dying cells, forcing its internalization and delivering phosphatidylserine back to the inner leaflet of the cell membrane (Kenis *et al.*, 2006). Annexins have been implicated in the repair mechanisms on both tissue and intracellular levels (Gerke & Moss, 2002). Upregulation of annexins has been reported in association with resistance to *E. caproni* secondary infections in mice (Cortés *et al.*, 2016a). This was attributed to the reduced rate of cell death that happens despite induction of mitochondrial dysfunction, cellular senescence and high levels of oxidative stress (Cortés *et al.*, 2016a).

Specifically, annexin 4 appears to play a specific role in membrane repair. Plasma membrane repair mechanisms involve internalization via endocytosis, or exocytosis as observed from mechanical wounding or exposure to plasma membrane poreforming agents (Steinhardt *et al.*, 1994; Idone *et al.*, 2008; Corrotte *et al.*, 2013; Boye *et al.*, 2017). Therefore, overexpression of annexin 4 due to the exposure to metacercariae of rIL-25-treated mice may contribute to the defense of this parasite infection participating in the healing of the intestinal tissue and acting as an anti-inflammatory factor. Annexin 2 is a protein that is part of the lipid rafts in the intestinal brush border and is associated with actin filaments mediating in membrane-membrane and membrane-cytoskeletal interactions influencing actin cytoskeletal remodeling through targeting signaling molecules to membrane domains. Consequently, it plays an important role in membrane trafficking and stabilization of membrane-associated protein complexes with the actin cytoskeleton and has been implicated in the migration of various cell types including epithelial cells and cell matrix interaction (Merrifield *et al.*, 2001; Babbín *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2016). Moreover, annexin 2 has been shown to induce clustering of specific plasma membrane phospholipids and play a role in lipid domain formation (Desrosiers *et al.*, 2000; Grill *et al.*, 2018). The absence of annexin 2 would therefore influence RhoA-mediated F-actin reorganization, which

in turn affects motility of annexin 2 deficient cells (Babbin *et al.*, 2007). In this sense, our results suggest that the up-regulation of both annexins (annexin 2 and 4) could help maintain the epithelial barrier structure during helminth infections.

Quantitatively, the proteins involved in metabolic processes were the most altered in any of the groups studied. A generalized reduction of ileal cell metabolism has been observed at 2 weeks after *E. caproni* infection in presence of rIL-25. A total of twenty of the identified *spots* (corresponding to 15 different proteins) are metabolic enzymes and a great part of them were significantly downregulate in infected in presence of rIL-25 mice with respect to control inoculated with rIL-25. Alterations in several proteins involved in the Krebs cycle (fumarate hydratase and malate dehydrogenase) and in the pentose phosphate pathway (transaldolase and 6-phosphogluconate dehydrogenase). We also detected a reduced expression of several glycolytic enzymes including several isoforms of enolase 1B, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase PKM, phosphoglycerate kinase 1 and triosephosphate isomerase. This may indicate mitochondrial dysfunction and a subsequent decrease in aerobic metabolism as a consequence of the exposure to *E. caproni* metacercariae. A similar situation has been described in the ileum of *E. caproni* mice at 2 wppi (Cortés *et al.*, 2015b). The reduction of aerobic metabolism was associated with an increase in the anaerobic use of glucose, through the overexpression of lactate dehydrogenase. However, Cortés *et al.*, (2016a) detected a marked downregulation of the production of lactate dehydrogenase were in the ileum of resistant secondarily infected mice, suggesting that both aerobic and anaerobic metabolism become impaired as the infection progresses. In contrast, in our study, lactate dehydrogenase was upregulated in the ileum of rIL-25-treated mice exposed to the infection with respect to mice conventionally infected. This might indicate that infection requires an increase in the anaerobic use of glucose to supports the high energy demand caused by parasitic infection both presence/absence of rIL-25 to cover the metabolic demand generated by mitochondrial dysfunction. The impact that alterations in energy metabolism has

over the course of the infection is difficult to assess according to our current knowledge. However, it could be of relevance for a better understanding of the mechanisms developed in the intestinal environment in responses to helminth infections.

Several antioxidant and detoxifying enzymes such as peroxiredoxins 1 and 4, glutathione S-transferase and dihydropteridine reductase were also found to be altered. Treatment with rIL-25 induced a marked downregulation of peroxiredoxin 4. This enzyme is a ubiquitously expressed member of the peroxiredoxin family that is localized in the endoplasmic reticulum and extracellular space (Tavender *et al.*, 2010). Peroxiredoxin 4 diminishes oxidative stress by reducing hydrogen peroxide to water in a thiol-dependent catalytic cycle and has been linked to the regulation of the key pro-inflammatory transcription factor, nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Wood *et al.*, 2003; Tavender *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). This supports that the processes related to oxidative stress and cell death are altered in the presence of infection by *E. caproni* independently of the presence of rIL-25. IL-25 does not appear to take part in the regulation of the processes related to oxidative stress and apoptosis necessary to maintain intestinal homeostasis. Strikingly, exposure of rIL-25-treated mice to metacercariae caused a downregulation of peroxiredoxin 1 instead peroxiredoxin 4. Peroxiredoxin 1 plays a key role against ROS and antioxidants and in inflammatory responses (Yanagisawa *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016). The production of this enzyme is upregulated in active ulcerative colitis specimens, and it increases along with the inflammation level in ulcerative colitis regenerative mucosal crypt epithelial cells (Waage *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2016). Downregulation of peroxiredoxin 1 was observed as a consequence of the curation of an *E. caproni* infection (Cortés *et al.*, 2016b). The reduced production of this enzyme after infection in presence of rIL-25 may play a double role, promoting crypt-cell proliferation but, at the same time, inducing oxidative stress and ROS-mediated programmed cell death to counteract homeostatic dysregulation induced by the infection (Zhao, Y. *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2014; Cortés *et al.*, 2015b).

Infection of rIL-25-treated mice also induced reduction in the production of palmitoyl-protein thioesterase (PPT). Protein thioesterases, or depalmitoylases, mediate the depalmitoylation of modified proteins, thereby completing a cycle of this reversible post-translational modification (Mizushima, 2007; Mizushima & Komatsu, 2011; Koster & Yoshii, 2019). Palmitoylation can effectively act as a post-translational “switch” on some proteins and provide dynamic control over protein localization or function. Indeed, palmitoylation plays critical roles in protein trafficking and strongly influences the stability of proteins (Dunphy & Linder, 1998; Linder & Deschenes, 2007; Fukata & Fukata, 2010; Salaun *et al.*, 2010; Chamberlain *et al.*, 2013; Montersino & Thomas, 2015). PPT1 is a lysosomal substrate that enter in the lysosome via autophagy leading to signaling of several processes related with anabolic and catabolic metabolism in the cell (Perera & Zoncu, 2016; Koster & Yoshii, 2019). PTT deficiency has been implicated in the disruption of the lysosome-endosomal pathway and in other cellular processes, including endocytosis, vesicular trafficking, synaptic function, lipid metabolism, neural specification, and axon connectivity and seems to be involved in cell susceptibility to apoptotic cell death and defects in the mitochondrial enzyme activities and adaptive energy metabolism (Kang *et al.*, 2008). For this reason, downregulation of PPT after exposure to *E. caproni* metacercariae in presence of rIL-25 mice may be due to its role in processes regulation involved in cell death and energy metabolism in order to maintain intestinal homeostasis. This is supported by the concomitant downregulation of Creatine kinase B-type (CKB). This enzyme plays a critical role in energy transduction in tissues with increases in energy demands. The creatine kinase energy system is itself further regulated by hypoxic signaling and can enhance creatine (Cr) metabolism during oxygen deprivation to promote tissue healing and homeostasis (Mooseker, 1985). Impaired Cr/PCr shuttling may contribute to dysregulated mitochondrial energetics and an increased barrier permeability characteristic of inflamed mucosa and susceptibility to *E. caproni* infection (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Cortés *et al.*, 2015b).

Our proteomic analysis shows that IL-25-treatment and the exposure to *E. caproni* metacercariae in presence of IL-25 induce proteomic changes in the ileum of mice that may contribute to resistance to infection. The main groups of proteins that become altered were those involved in the preservation and healing of the epithelial architecture enhancing the maintenance of the epithelium. Considering altogether our results, the maintenance of the intestinal homeostasis seems to be essential for resistance to infection. Our study provides new insights into the proteins involved in the regulation of tissue homeostasis in the presence of rIL-25, a cytokine that is considered as a target factor for the development of resistance to intestinal helminths.

Considering that intestinal environment (Th1 vs Th2) markedly affects the course of *E. caproni* infection, we have studied the ability of *E. caproni* to adapt its proteome to different host milieus and its consequences in the parasite survival, we have analyzed the secretome of adult worms exposed either to primary and homologous secondary infections in ICR mice. The results may aid to the identification of the factors that govern parasite adaptation, as a suitable approach to develop new strategies for the control of helminthic infections. Moreover, the identification of proteins implicated in parasite resistance may help to recognize useful targets for drug and vaccine development. Our results indicate that Th1 responses in primary *E. caproni* infections induce upregulation of several proteins, which may facilitate the chronic establishment of the parasite.

According to previous studies (Muñoz-Antoli *et al.*, 2016a, b) worm recovery was significantly lower in secondary than in primary infections and collected worms were markedly underdeveloped at 2 wpsi (weeks post secondary infection). Cortés *et al.*, (2016a) showed that *E. caproni* is able to modulate its secretome depending on the local environment. Thus, in order to identify differentially produced and/or secreted proteins in the context of early primary and secondary infections, the ESPs of each type of worms were subjected to 2D-DIGE

and a total of 7 differential protein *spots* were accurately identified by mass spectrometry and database search. Among the identified proteins there were metabolic enzymes, such as UTP-glucose-1-phosphate uridyltransferase (UTPGT), acetyl-CoA C-acetyltransferase (ACAT) and triose phosphate isomerase (TPI); an antioxidant enzyme, belonging to the superfamily of aldo-keto reductases (AKRs), and the chaperonin GroEL. Moreover, the structural protein actin was identified in two *spots*.

Proteomic results are consistent with the environment generated in each type of infection. Th1 primary response induced upregulation of several proteins (ACAT, AKR, UTPGT and GroEL) related to the response against oxidative stress and the enhancement of parasite survival. This fact may contribute to the long survival of *E. caproni*, in spite of the hostile environmental conditions induced by that Th1 response against primary infections in ICR mice.

ACAT is a member of the thiolase superfamily, which includes a number of enzymes that share a common evolutionary origin and high degree of sequence similarity (Iguar *et al.*, 1992; Bun-Ya *et al.*, 1997). Eukaryotic thiolases have key roles in many biochemical pathways, such as β -oxidation of fatty acids, as well as in several biosynthetic routes. Moreover, thiolases have been shown to be upregulated under stress conditions, playing a crucial role in delaying aging of helminths and extending lifespan. Loss-of-function mutations in the ketoacyl thiolase gene (*kat-1*) of the model nematode *Caenorhabditis elegans* resulted in premature aging and a shortened lifespan. Under stress conditions, metabolism switches from the use of glucose to fatty acids oxidation by thiolases, providing further resistance and enhancing worm survival (Berdichevsky *et al.*, 2010). Furthermore, it has been shown that thiolases increase the survival of organisms by interfering with apoptosis. Cao *et al.*, (2008) showed that the thiolase Acetyl-CoA A-acetyltransferase attenuated the pro-apoptotic effect of BNIP3 in human cells. Genes encoding for enzymes involved in fatty acids metabolism are intact and

expressed in several trematode species, such as *Clonorchis sinensis*, while not in others as *Schistosoma japonicum* (Wang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015), though their roles in the course of the infection are not well known. Lin *et al.* (2015) studied in detail the role of Acetyl-CoA thiolase of *C. sinensis* and showed that environmental conditions modulate the production of this protein. Under stress conditions, this thiolase became upregulated, increasing parasite survival. This upregulation served to enhance the β -oxidation of fatty acids as energy source to survive longer. Our results support that *E. caproni* ACAT is modulated by the host immune response and its overregulation may serve to extend parasite survival in primary infections. Under the stress milieu generated by Th1 primary response, ACAT is upregulated concomitantly with the development of *E. caproni* chronic infections. In contrast, early expulsion and underdevelopment of adult worms in secondary infections is associated with significantly lower production of this enzyme.

AKRs comprise a group of structurally related proteins of a common ancestry that have been found in a wide range of phyla, including both prokaryotes and eukaryotes. AKRs catalyze redox transformation in a number of cellular processes that involve biosynthesis, intermediary metabolism and detoxification. Substrates of AKRs include glucose, steroids, glycosylation end-products, lipid peroxidation products and environmental pollutants (Barski *et al.*, 2008; Mindnich & Penning, 2009). AKRs have been previously reported in *E. caproni* and it seems to be secreted via exosomes (Guillou *et al.*, 2007; Marcilla *et al.*, 2012). Cortés *et al.*, (2016a) showed that the secretion of these enzymes can be modulated by environmental conditions. After a primary infection, production of *E. caproni* AKR was greater in rats than in mice, probably in relation to host-dependent factors. Herein, we have demonstrated that, using the same host species, this protein is overproduced as a consequence of Th1 response. There is increasing recognition of the role of AKRs in preventing toxicity, and several studies have demonstrated that

they are more active under stress conditions, particularly in oxidative defense, promoting cellular survival (Chang & Petrash, 2008; Farahyar *et al.*, 2013).

GroEL is a stress-related protein, belonging to the HSP60 family of chaperones. In eukaryotes, GroEL and li-like chaperonin GroES, are nearly identical, both structurally and functionally, to HSP60 (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991; Horwich *et al.*, 2007). GroEL assists in correct folding and assembly of proteins to avoid denaturation and also serves to prevent protein denaturation and reactivate partially denatured proteins under stress conditions. Several toxics and stressing conditions have been shown to increase transcription of GroEL. Oxidative stress is one of the most relevant features upregulating GroEL production, playing an important role for adaptation to adverse conditions (Dosanjh *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2016). Moreover, GroEL has been found secreted in membrane fractions under stress conditions, suggesting a role in the attachment process of intestinal pathogens (Hennequin *et al.*, 2001). Previous studies carried out by this research group analyzed whether *E. caproni* GroEL have been involved in mucosal adherence. Contrary to expectations, GroEL did not appeared accumulated in the tegument nor the external surface of adult worms, but it was localized in vitelline glands and eggs, suggesting that it may have a role in proper egg formation and maturation, to ensure parasite transmission. According to this result, higher secretion of GroEL after primary infection may be explained by the greater development of worms. Muñoz-Antoli *et al.*, (2016b) showed that adults from primary infections are more developed than those from secondary ones, with higher metric values for different variables, including ovary and testis. Differences in worm growth are confirmed herein and different amount of GroEL in ESPs may be indicative of greater gravidity of worms in primary infections.

Another protein associated with virulence and pathogen survival that have been found upregulated in *E. caproni* primary infections is UTPGT (alternatively named glucose pyrophosphorylase). UTPGT is involved in carbohydrate

metabolism, specifically in glycogenesis, synthesizing UDP-glucose from glucose-1-phosphate and uridine triphosphate (UTP). Several studies have implicated a number of genes, encoding proteins involved in carbohydrate metabolism, to be of importance for pathogen survival (Klein *et al.*, 2012). Among these genes, that encoding UTPGT (*galU*) appeared to play a major role (Klein *et al.*, 2012). Moreover, it has been shown that *galU* gene and its product are essential for the success of infections. (Priebe *et al.*, 2004) showed that blocking of the *galU* gene in *Pseudomonas aeruginosa* inhibited its ability to infect the cornea of mice and the systemic spread of the bacteria after lung infection. Similarly, *galU* gene has been also found to be critical for pathogenesis and survival of other bacteria ((Sandlin *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996; Rioux *et al.*, 1999; Nesper *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2002). In the protozoan *Leishmania major*, depletion of this gene resulted in altered expression of lipophosphoglycan and reduced growth and virulence of the parasite (Damerow *et al.*, 2015). In our study, we have observed that fewer production of UTPGT occurs concomitantly with early rejection of *E. caproni* adult worms in secondary infections in mice. Although further studies are required, our results suggest that this protein may be involved in *E. caproni* survival in its definitive host.

The potential role of upregulation of *E. caproni* TPI in primary infections in mice is difficult to ascertain. TPI has been previously reported in ESPs of *E. caproni* and it was found to be secreted via exosomes (Marcilla *et al.*, 2012). Moreover, this protein has been also reported in several trematodes, such as *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* or *Schistosoma* spp. (Saijuntha *et al.*, 2009; Zinsser *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). This protein is a key regulatory enzyme of glycolysis and glycogenesis, playing an essential role in the metabolism and development of most organisms (Robinson, 1991). TPI catalyzes the conversion of dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate. Then, D-glyceraldehyde 3-phosphate is further processed in the glycolytic pathway to pyruvate, permitting production of ATP and NADH. Without this reaction, there would not be production of ATP through the

glycolytic pathway. Furthermore, TPI participates in other biological functions related to the development of trematodes including energy and metabolites generation, reproduction and processing of metabolites and nutrient factors (Zhou *et al.*, 2015). In primary *E. caproni* infections in mice, higher expression of TPI may serve as an energy provider for adult worms, promoting the survival of the parasite in an adverse milieu. Zhou *et al.*, (2015) suggested that *C. sinensis* TPI is essential in the first steps of the infection, to invade the definitive host and to the transformation of juvenile into adult worms. However, the role of TPI should be studied further. It is known that oxidative stress induces redirection of carbohydrate flux, to the generation NADH at the expense of the pentose phosphate pathway (Godon *et al.*, 1998). This makes difficult to explain the upregulation of TPI in primary infections in mice, though it could be a mechanism to compensate repression of glycolysis induced by oxidative stress.

According to our results, *E. caproni* is able to modulate its secretome to adapt to the environment imposed by the host and enhance parasite survival. Adult worms exposed to a primary infection in mice upregulate a number of proteins involved in detoxification processes, response to stress and enhancement of parasite survival. This may serve to withstand the Th1 environment, with inflammatory response and oxidative stress, generated as a consequence of a primary infection, resulting in the development of chronic infections. In contrast, Th2 environment in secondary infection did not induce significant upregulation of any protein in the secretome of *E. caproni*, coinciding with the early rejection of worms. This confirms that *E. caproni* appears to be better adapted to grow in a Th1-type than in a Th2 environment, which may explain, at least in part, the course of *E. caproni* infection in each milieu.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

CHAPTER V: CONCLUSIONS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral en relación a los objetivos planteados que se pretenden responder y que procuran añadir nueva información a la ya existente, permiten extraer las siguientes conclusiones:

1.-

Los estudios realizados con el sistema *E.caproni*-ratón han permitido describir un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria por parte del parásito que puede servir para minimizar los efectos deletéreos del ataque mediado por anticuerpos. Este mecanismo, conocido como *antibody trapping*, consiste en la captura continuada de los anticuerpos unidos a la superficie del parásito por los ESPs que se liberan constantemente permitiendo la degradación de los mismos por las peptidasas de tipo catepsinas producidas por el parásito.

Our studies with the E.caproni-mouse system have made possible to description of a new mechanism of evasion of the immune response by the parasite that can serve to minimize the deleterious effects of antibody-mediated attack. This mechanism, known as antibody trapping, consists in the continuous capture of the antibodies bound to the surface of the parasite by the ESPs that are constantly released, allowing the degradation of the antibodies by the cathepsin-type peptidases produced by the parasite.

2.-

Los datos obtenidos indican que las catepsinas L presentes en los ESPs de las formas adultas de *E. caproni* son las principales involucradas en la degradación de anticuerpos de superficie. Estas catepsinas funcionan en un rango más amplio de pH que las catepsinas B, apoyando así la idea de que las catepsinas de tipo L son probablemente las cisteínas endopeptidasas más abundantes en este material del

parásito. Nuestros resultados demuestran que este mecanismo de evasión mediado por catepsinas es muy probable que ocurra *in vivo* ya que, aunque los parásitos se mantuvieron en cultivo, la degradación de los anticuerpos del hospedador se llevó a cabo mediante peptidasas liberadas por vermes vivos, en su propia superficie. En particular, mostramos que las catepsinas L secretadas por *E. caproni* estaban involucradas en la degradación de IgG e IgA de ratón unidas a la superficie del parásito.

Our data indicate that the cathepsins L present in the ESPs of the adult forms of E. caproni are the main proteins involved in the degradation of surface antibodies. These cathepsins function over a wider pH range than cathepsins B, thus supporting the idea that L-type cathepsins are probably the most abundant endopeptidase cysteines in this parasite material. Our results demonstrate that this cathepsin-mediated evasion mechanism is very likely to occur in vivo since, although the parasites were maintained in culture in our experiments, the degradation of host antibodies was carried out by peptidases released by live worms to the surface. In particular, we have shown that cathepsins L secreted by E. caproni were involved in the degradation of mouse IgG and IgA bound to the parasite surface.

3.-

La IL-25 es necesaria para el desarrollo de resistencia frente a la infección por *E. caproni*. De hecho, la susceptibilidad a la infección está relacionada con la incapacidad del ratón a responder con sobreexpresión de IL-25 en la infección primaria. Sin embargo, la infección secundaria en presencia de IL-25 genera un estado de resistencia parcial, junto con una respuesta Th2.

IL-25 is required for the development of resistance against E. caproni infection. In fact, susceptibility to infection is related to the inability of the mouse to respond with overexpression of IL-25 in the primary infection. However, secondary infection in the presence of IL-25 generates a state of partial resistance, along with a Th2 response.

4.-

El papel de la IL-25 en la resistencia frente a *E. caproni*, no se limita a actuar como alarmina, facilitando la generación de respuestas Th2. Los resultados obtenidos demuestran que la IL-25 tiene un papel efector en la resistencia independientemente de la generación de una respuesta Th2. De hecho, la respuesta Th2 en ausencia de IL-25 no induce resistencia frente al parásito. Asimismo, la IL-25 no parece ser determinante en la polarización de la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th2 en infecciones secundarias, pero sí que podría facilitar la diferenciación de subconjuntos de células inmunitaria a células de memoria Th2.

The role of IL-25 in resistance against E. caproni is not limited to acting as alarmin, facilitating the generation of Th2 responses. The results obtained demonstrate that IL-25 has an effector role in resistance independently of the generation of Th2 response. In fact, the Th2 response in the absence of IL-25 does not induce resistance against the parasite. Likewise, IL-25 does not appear to be a determining factor in the polarization of the immune response towards a Th2 phenotype in secondary infections, but it could facilitate the differentiation of subsets of immune cells to Th2 memory cells.

5.-

La infección por *E. caproni* en presencia de rIL-25 induce cambios proteómicos en las células epiteliales intestinales del íleon de los ratones que pueden contribuir a la generación de resistencia frente a la infección. Los principales grupos de proteínas que se encontraron alterados en ratones tratados con rIL-25 e infectados fueron aquellos involucrados en la renovación y el mantenimiento de la barrera epitelial mejorando de este modo, la preservación del epitelio. Para la preservación de la barrera epitelial parece esencial un control estricto de los procesos de proliferación y muerte celular programada protegiendo así, al hospedador de los efectos perjudiciales producidos a causa de la infección. De hecho, la susceptibilidad se encuentra asociada a hipertrofia celular mediada por una respuesta Th1 y ausencia de IL-25.

Resistance to infection is associated with the maintenance of tissue homeostasis. Infection by E. caproni in the presence of rIL-25 induces proteomic changes in the intestinal epithelial cells of the ileum of mice that may contribute to the generation of resistance against infection. The main groups of proteins that were found altered in mice treated with rIL-25 and infected were those involved in the renewal and maintenance of the epithelial barrier, thus improving the preservation of the epithelium. For the preservation of the epithelial barrier, a strict control of the proliferation processes and programmed cell death seems essential, thus protecting the host from the harmful effects produced by infection. In fact, the susceptibility is associated with cellular hypertrophy mediated by a Th1 response and absence of IL-25.

6.-

La resistencia frente a la infección está asociada al mantenimiento de la homeostasis tisular mediada por una respuesta Th2. Los procesos de regeneración y remodelación de la mucosa intestinal iniciados tras la cura de la infección primaria parecen estar implicados en la señalización que conduce a la hiperplasia de las células *tuft* y subsiguientemente, a la regulación positiva de IL-25. Además, los mecanismos efectores activados en la respuesta de resistencia frente a *E. caproni* parecen depender de la expansión de las células *tuft*, las cuales promueven la sobreexpresión de IL-25 y esta a su vez, la activación de las ILC2 que polarizan la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th2. Sin embargo, la función reguladora de la IL-25 parece ser secundaria por lo que esta citoquina puede que opere de manera independiente a la respuesta Th2 en la generación de resistencia frente a helmintos intestinales. Asimismo, la IL-25 induce la activación alternativa de los macrófagos en presencia de infección el cual constituye un mecanismo importante para la expulsión de los helmintos intestinales.

Resistance to infection is associated with the maintenance of tissue homeostasis mediated by a Th2 response. The processes of regeneration and remodeling of the intestinal mucosa initiated after the cure of the primary infection appear to be involved in the signaling that leads to hyperplasia of the tuft cells and subsequently to the up-regulation of IL-25. In addition, the effector mechanisms activated in the resistance response against E. caproni seem to depend on the expansion of tuft cells, which promote the overexpression of IL-25 and this, in turn, the activation of ILC2 cells that polarize the immune response towards a Th2 phenotype. However, the regulatory function of IL-25 seems to be secondary, so this cytokine may operate independently of the Th2 response in generating resistance against intestinal helminths. Likewise, IL-25 induces the alternative activation of macrophages in the presence of infection, which constitutes an important mechanism for the expulsion of intestinal helminths.

7.-

La microbiota parece tener un papel fundamental en el curso de las infecciones intestinales por helmintos. La resistencia o susceptibilidad frente a los helmintos intestinales se ha asociado con la presencia o ausencia de producción de IL-25 la cual, se sugiere que está regulada por la microbiota residente. Nuestros resultados apoyan que la expresión de IL-25 podría depender de señales derivadas de la microbiota. Los cambios en la microbiota residente como consecuencia de la infección y la posterior cura, participan en la producción de IL-25 protegiendo de una infección secundaria con *E. caproni*. La inducción de disbacteriosis en ratones mediante la administración de un cóctel de antibióticos en agua de bebida anuló la producción de IL-25 tras la cura de la infección primaria por *E. caproni* de forma concomitante con una disminución de la abundancia relativa de bacterias en heces y la susceptibilidad a la infección secundaria. Por tanto, los cambios en la microbiota residente pueden desempeñar un papel fundamental en la expresión de IL-25 y, en consecuencia, en la resistencia a las infecciones con *E. caproni*.

The microbiota appears to play a fundamental role in the course of intestinal helminth infections. Resistance or susceptibility to intestinal helminths has been associated with the presence or absence of IL-25 production, which is suggested to be regulated by the resident microbiota. Our results support that IL-25 expression could depend on derived signals. of the microbiota. Changes in the resident microbiota as a consequence of infection and subsequent cure participate in IL-25 production, protecting against secondary infection by E. caproni. Induction of dysbacteriosis in mice by administration of an antibiotic cocktail in drinking water abolished IL-25 production after cure of the primary infection by E. caproni concomitantly with a decrease in bacterial abundance in feces and susceptibility to secondary infection. Therefore, changes in the resident microbiota may play a key role in IL-25 expression and, consequently, in resistance to E. caproni infections.

8.-

Los perfiles generales de la microbiota intestinal en los ratones controles, infectados, tratados con pzq e infectados secundariamente muestran diferencias cuantitativas y cualitativas entre ellos. Esto revela que tanto la infección primaria con *E. caproni*, como la cura farmacológica de la misma y la infección secundaria, alteran de manera significativa la composición de la microbiota residente, lo que puede ser de importancia para analizar las respuestas inmunitarias y patológicas desarrolladas en cada condición. Asimismo, se ha observado que los cambios en la microbiota intestinal inducidos por una infección con *E. caproni* se deben principalmente a la respuesta inmunitaria del hospedador. A diferencia de lo que ocurre en otras infecciones intestinales por helmintos, la infección primaria por *E. caproni* asociada a una respuesta inmunitaria Th1, provocó un aumento significativo en la abundancia relativa del phylum Bacteroidetes. En cambio, la regulación positiva de la respuesta inmunitaria Th2 tras la cura farmacológica de la infección primaria con *E. caproni* se caracterizó por una disminución de la abundancia relativa del orden Bacteroidales y de la familia Bacteroidaceae. Esto sugiere, que el equilibrio Th1/Th2 en las infecciones por helmintos intestinales tiene un papel relevante en la composición de las poblaciones bacterianas intestinales.

The general profiles of the gut microbiota in naïve, infected, pzq-treated and secondary infected mice show quantitative and qualitative differences between them. This shows that both, primary infection with E. caproni, as well as pharmacological cure and challenge infection, significantly alter the composition of the resident microbiota, which may be important to analyze the immune and pathological response developed in every condition. Likewise, it has been observed that the changes in the intestinal microbiota induced by an infection with E. caproni are mainly due to the immune response of the host. Unlike what occurs in other intestinal helminth infections, the primary infection by E. caproni associated with a

Th1 immune response, caused a significant increase in the relative abundance of the phylum Bacteroidetes. In the opposite way, the positive regulation of the Th2 immune response after pharmacological cure of the primary infection with E. caproni was characterized by a decrease in the relative abundance of the order Bacteroidales and the family Bacteroidaceae. This suggests that Th1 / Th2 balance in intestinal helminth infections plays a relevant role in the composition of intestinal bacterial populations.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Ackers, I. & Malgor, R.** (2018). Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 15(1), 3-13.
- Adams, D. R., Ron, D. & Kiely, P. A.** (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 1-24.
- Agger, M. K., Simonsen, P. E. & Vennervald, B. J.** (1993). The antibody response in serum, intestinal wall and intestinal lumen of NMRI mice infected with *Echinostoma caproni*. *Journal of Helminthology*, 67(3), 169-178.
- Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y. & Collins, S. M.** (2002). Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(2), G226-G232.
- Aktary, Z., Bertrand, J. U. & Larue, L.** (2016). The WNT-less wonder: WNT-independent β -catenin signaling. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(5), 524-540.

- Alam, A., Leoni, G., Quiros, M., Wu, H., Desai, C., Nishio, H., Jones, R. M., Nusrat, A. & Neish, A. S.** (2016). The microenvironment of injured murine gut elicits a local pro-restitutive microbiota. *Nature Microbiology*, *1*(2), 1-8.
- Allen, J. E. & Maizels, R. M.** (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, *11*(6), 375-388.
- Allen, J. E. & Sutherland, T. E.** (2014). Host protective roles of type 2 immunity: parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. Paper presented at the *Seminars in Immunology*, *26*(4) 329-340.
- Alum, A., Rubino, J. R. & Ijaz, M. K.** (2010). The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(9), e732-e738.
- Álvarez-Izquierdo, M., Pérez-Crespo, M., Esteban, J. G., Muñoz-Antoli, C. & Toledo, R.** (2020). Interleukin-25-mediated resistance against intestinal trematodes does not depend on the generation of Th2 responses. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 1-13.
- Anderson, M. J.** (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, *26*(1), 32-46.

- Andresen, K., Simonsen, P. E., Andersen, B. J. & Birch-Andersen, A.** (1989). *Echinostoma caproni* in mice: shedding of antigens from the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology*, 19(1), 111-118.
- Andrews, A., Holloway, J. W., Holgate, S. T. & Davies, D. E.** (2006). IL-4 receptor α is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *The Journal of Immunology*, 176(12), 7456-7461.
- Angkasekwinai, P., Park, H., Wang, Y., Wang, Y., Chang, S. H., Corry, D. B., Liu, Y., Zhu, Z. & Dong, C.** (2007). Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1509-1517.
- Angkasekwinai, P., Sodthawon, W., Jeerawattanawart, S., Hansakon, A., Pattanapanyasat, K. & Wang, Y.** (2017). ILC2s activated by IL-25 promote antigen-specific Th2 and Th9 functions that contribute to the control of *Trichinella spiralis* infection. *PLoS One*, 12(9), e0184684.
- Angkasekwinai, P., Srimanote, P., Wang, Y., Pootong, A., Sakolvaree, Y., Pattanapanyasat, K., Chaicumpa, W., Chaiyaroj, S. & Dong, C.** (2013). Interleukin-25 (IL-25) promotes efficient protective immunity against *Trichinella spiralis* infection by enhancing the antigen-specific IL-9 response. *Infection and Immunity*, 81(10), 3731-3741.

- Anthony, R. M., Urban, J. F., Alem, F., Hamed, H. A., Rozo, C. T., Boucher, J., Van Rooijen, N. & Gause, W. C.** (2006). Memory TH 2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Medicine*, 12(8), 955-960.
- Aronesty Erik.** (2011). *Command-line tools for processing biological sequencing data.*
- Artis, D. & Spits, H.** (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517(7534), 293-301.
- Artis, D., Wang, M. L., Keilbaugh, S. A., He, W., Brenes, M., Swain, G. P., Knight, P. A., Donaldson, D. D., Lazar, M. A. & Miller, H. R.** (2004). RELM β /FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13596-13600.
- Ataev, G. L., Dobrovolskij, A. A., Fournier, A. & Jourdane, J.** (1997). Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). *The Journal of Parasitology*, 444-453.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S. & Hase, K. (2013). T reg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232-236.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T. & Ohba, Y. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 331(6015), 337-341.

Audousset, J. C., Rondelaud, D., Dreyfuss, G. & Vareille-Morel, C. (1989). Les émissions césariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin De La Société Française De Parasitologie*, 7(2), 217-224.

B

Babbin, B. A., Parkos, C. A., Mandell, K. J., Winfree, L. M., Laur, O., Ivanov, A. I. & Nusrat, A. (2007). Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *The American Journal of Pathology*, 170(3), 951-966.

- Badri, M., Kurtz, Z. D., Müller, C. L. & Bonneau, R.** (2018). Normalization methods for microbial abundance data strongly affect correlation estimates. *bioRxiv*, 406264.
- Balic, A., Smith, K. A., Harcus, Y. & Maizels, R. M.** (2009). Dynamics of CD11c dendritic cell subsets in lymph nodes draining the site of intestinal nematode infection. *Immunology Letters*, 127(1), 68-75.
- Barrett, A. J., Woessner, J. F. & Rawlings, N. D.** (2012). *Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 1*. Elsevier.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M. & Bhatnagar, A.** (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553-624.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J. J. & Goñi, F.** (2003). Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(1), 23-29.

- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P. & Goñi, F.** (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology*, 94(2), 99-110.
- Berdichevsky, A., Nedelcu, S., Boulias, K., Bishop, N. A., Guarente, L. & Horvitz, H. R.** (2010). 3-Ketoacyl thiolase delays aging of *Caenorhabditis elegans* and is required for lifespan extension mediated by sir-2.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18927-18932.
- Bethony, J. M., Cole, R. N., Guo, X., Kamhawi, S., Lightowers, M. W., Loukas, A., Petri, W., Reed, S., Valenzuela, J. G. & Hotez, P. J.** (2011). Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunological Reviews*, 239(1), 237-270.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D. & Hotez, P. J.** (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*, 367(9521), 1521-1532.
- Bieber, T.** (2020). Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy*, 75(1), 54-62.

- Bindseil, E. & Christensen, N. Ø.** (1984). Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. *Parasitology*, 88(3), 431-438.
- Blankenhaus, B., Klemm, U., Eschbach, M., Sparwasser, T., Huehn, J., Kühl, A. A., Loddenkemper, C., Jacobs, T. & Breloer, M.** (2011). *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3 regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, 186(7), 4295-4305.
- Bouchery, T., Kyle, R., Camberis, M., Shepherd, A., Filbey, K., Smith, A., Harvie, M., Painter, G., Johnston, K. & Ferguson, P.** (2015). ILC2s and T cells cooperate to ensure maintenance of M2 macrophages for lung immunity against hookworms. *Nature Communications*, 6(1), 1-13.
- Bouix-Busson, D., Rondelaud, D. & Barthe, D.** (1985). L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L.-I—Étude des lésions de la glande digestive et du rein chez de jeunes mollusques. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparée*, 60(5), 571-585.

- Bowcutt, R., Bramhall, M., Logunova, L., Wilson, J., Booth, C., Carding, S. R., Grencis, R. & Cruickshank, S.** (2014). A role for the pattern recognition receptor Nod2 in promoting recruitment of CD103 dendritic cells to the colon in response to *Trichuris muris* infection. *Mucosal Immunology*, 7(5), 1094-1105.
- Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., Simonsen, A. C. & Nylandsted, J.** (2017). Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications*, 8(1), 1-11.
- Broadhurst, M. J., Ardeshir, A., Kanwar, B., Mirpuri, J., Gundra, U. M., Leung, J. M., Wiens, K. E., Vujkovic-Cvijin, I., Kim, C. C. & Yarovinsky, F.** (2012). Therapeutic helminth infection of macaques with idiopathic chronic diarrhea alters the inflammatory signature and mucosal microbiota of the colon. *PLoS Pathog*, 8(11), e1003000.
- Brosschot, T. P. & Reynolds, L. A.** (2018). The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity. *Mucosal Immunology*, 11(4), 1039-1046.
- Brygoo, E. R.** (1965). Cycle experimental d'*Echinostoma caproni* Richard, 1964. *Archives De L'Institut Pasteur De Madagascar*, 207-209.

- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M. & Harcus, Y.** (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5(1), 1-12.
- Bulek, K., Swaidani, S., Aronica, M. & Li, X.** (2010). Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunology and Cell Biology*, 88(3), 257-268.
- Bun-Ya, M., Maebuchi, M., Hashimoto, T., Yokota, S. & Kamiryo, T.** (1997). A second isoform of 3-ketoacyl-CoA thiolase found in *Caenorhabditis elegans*, which is similar to sterol carrier protein x but lacks the sequence of sterol carrier protein 2. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 252-259.
- Buonomo, E. L., Cowardin, C. A., Wilson, M. G., Saleh, M. M., Pramoonjago, P. & Petri Jr, W. A.** (2016). Microbiota-regulated IL-25 increases eosinophil number to provide protection during *Clostridium difficile* infection. *Cell Reports*, 16(2), 432-443.
- Burrows, K., Ngai, L., Wong, F., Won, D. & Mortha, A.** (2019). ILC2 activation by protozoan commensal microbes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4865.

C

- Cadman, E. T. & Lawrence, R. A.** (2010). Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunology*, 32(1), 1-19.
- Cantacessi, C., Mulvenna, J., Young, N. D., Kasny, M., Horak, P., Aziz, A., Hofmann, A., Loukas, A. & Gasser, R. B.** (2012). A deep exploration of the transcriptome and “excretory/secretory” proteome of adult *Fascioloides magna*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(11), 1340-1353.
- Cao, W., Liu, N., Tang, S., Bao, L., Shen, L., Yuan, H., Zhao, X. & Lu, H.** (2008). Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 attenuates the apoptotic effects of BNIP3 in two human cell lines. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(6), 873-880.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M. & Knight, R.** (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.

- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M. & Dalton, J. P.** (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 9-17.
- Cattadori, I. M., Sebastian, A., Hao, H., Katani, R., Albert, I., Eilertson, K. E., Kapur, V., Pathak, A. & Mitchell, S.** (2016). Impact of helminth infections and nutritional constraints on the small intestine microbiota. *PLoS One*, 11(7), e0159770.
- Cayrol, C. & Girard, J.** (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 9021-9026.
- Chai, J.** (2009). Echinostomes in humans. *The biology of echinostomes* (pp. 147-183). Springer.
- Chai, J., Cho, J., Chang, T., Jung, B. & Sohn, W.** (2020). Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-collar-spined *Echinostoma* spp.: a historical review. *The Korean Journal of Parasitology*, 58(4), 343.
- Chamberlain, L. H., Lemonidis, K., Sanchez-Perez, M., Werno, M. W., Gorleku, O. A. & Greaves, J.** (2013). Palmitoylation and the trafficking of peripheral membrane proteins. *Biochemical Society Transactions*, 41(1).

- Chang, H., Lee, J., Deng, W., Fu, T. & Peng, H.** (1996). Virulence and outer membrane properties of a gal-U mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbial Pathogenesis*, 20(5), 255-261.
- Chang, Q. & Petrash, J. M.** (2008). Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(2), 237-245.
- Cheng, Z. & Cartwright, C. A.** (2018). Rack1 maintains intestinal homeostasis by protecting the integrity of the epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(2), G263-G274.
- Cho, Y. K., Ryang, Y. S., Kim, I. S., Park, S. K., Im, J. A. & Lee, K. J.** (2007). Differential immune profiles following experimental *Echinostoma hortense* infection in BALB/c and C3H/HeN mice. *Parasitology Research*, 100(5), 1053-1061.
- Christensen, N. Ø, Simonsen, P. E., Odaibo, A. B. & Mahler, H.** (1990). Establishment, survival, and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and jirds. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 57(2), 104-107.

- Christensen, N. Ø, Knudsen, J. & Andreassen, J.** (1986). *Echinostoma revolutum*: resistance to secondary and superimposed infections in mice. *Experimental Parasitology*, 61(3), 311-318.
- Chu, D. K., Jimenez-Saiz, R., Verschoor, C. P., Walker, T. D., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Shen, P., Gordon, M. E., Barra, N. G. & Bassett, J. D.** (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1657-1672.
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y.** (2008). Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiology*, 8(1), 1-9.
- Collins, P. R., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Doyle, S., Ryan, T., Brennan, G. P., Mousley, A., Stewart, M., Maule, A. G. & Dalton, J. P.** (2004). Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17038-17046.
- Connor, L. M., Tang, S., Camberis, M., Le Gros, G. & Ronchese, F.** (2014). Helminth-conditioned dendritic cells prime CD4 T cells to IL-4 production in vivo. *The Journal of Immunology*, 193(6), 2709-2717.

- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C., Belkaid, Y. & Powrie, F.** (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103 DCs induces Foxp3 regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1757-1764.
- Cooper, P., Walker, A. W., Reyes, J., Chico, M., Salter, S. J., Vaca, M. & Parkhill, J.** (2013). Patent human infections with the whipworm, *Trichuris trichiura*, are not associated with alterations in the faecal microbiota. *PLoS One*, 8(10), e76573.
- Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., Cortez, M., Miller, H., Song, W. & Maugel, T. K.** (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife*, 2, e00926.
- Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Sotillo, J., Fried, B., Esteban, J. G., & Toledo, R.** (2015a). *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo mucin expression and glycosylation in high- and low-compatible hosts. *Parasite Immunology*, 37(1), 32-42.
- Cortés, A. & Fried, B.** (2019). Form and Function in the Digenea. *Digenetic Trematodes*, 3-20.

- Cortés, A., Mikeš, L., Muñoz-Antolí, C., Álvarez-Izquierdo, M., Esteban, J. G., Horák, P. & Toledo, R.** (2019). Secreted cathepsin L-like peptidases are involved in the degradation of trapped antibodies on the surface of *Echinostoma caproni*. *Parasitology Research*, 118(12), 3377-3386.
- Cortés, A., Muñoz-Antolí, C., Álvarez-Izquierdo, M., Sotillo, J., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2018b). Adaptation of the secretome of *Echinostoma caproni* may contribute to parasite survival in a Th1 milieu. *Parasitology Research*, 117(4), 947-957.
- Cortés, A., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2017a). Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. *Trends in Parasitology*, 33(9), 678-693.
- Cortés, A., Muñoz-Antolí, C., Martín-Grau, C., Esteban, J. G., Grencis, R. K. & Toledo, R.** (2015b). Differential alterations in the small intestine epithelial cell turnover during acute and chronic infection with *Echinostoma caproni* (Trematoda). *Parasites & Vectors*, 8(1), 334.
- Cortés, A., Sotillo, J., Muñoz-Antolí, C., Fried, B., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2015). Altered protein expression in the ileum of mice associated with the development of chronic infections with *Echinostoma caproni* (Trematoda). *PLoS Negl Trop Dis*, 9(9), e0004082.

- Cortés, A., Sotillo, J., Muñoz-Antolí, C., Martín-Grau, C., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2016). Resistance against *Echinostoma caproni* (Trematoda) secondary infections in mice is not dependent on the ileal protein production. *Journal of Proteomics*, 140, 37-47.
- Cortés, A., Sotillo, J., Muñoz-Antolí, C., Molina-Durán, J., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2017b). Antibody trapping: a novel mechanism of parasite immune evasion by the trematode *Echinostoma caproni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005773.
- Cortés, A., Sotillo, J., Muñoz-Antolí, C., Trelis, M., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2016a). Definitive host influences the proteomic profile of excretory/secretory products of the trematode *Echinostoma caproni*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 185.
- Cortés, A., Sotillo, J., Muñoz-Antolí, C., Trelis, M., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2016b). Definitive host influences the proteomic profile of excretory/secretory products of the trematode *Echinostoma caproni*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 185.
- Cortés, A., Toledo, R. & Cantacessi, C.** (2018). Classic models for new perspectives: delving into helminth–microbiota–immune system interactions. *Trends in Parasitology*, 34(8), 640-654.

D

- Dai, Y., Wang, X., Zhao, S., Tang, J., Zhang, L., Dai, J., Zeng, M., Lu, S., Zhu, Y. & Su, C.** (2014). Construction and evaluation of replication-defective recombinant optimized triosephosphate isomerase adenoviral vaccination in *Schistosoma japonicum* challenged mice. *Vaccine*, 32(7), 771-778.
- Dalton, J. P., Clough, K. A., Jones, M. K. & Brindley, P. J.** (1997). The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*, 114(2), 105-112.
- Damerow, S., Hoppe, C., Bandini, G., Zarnovican, P., Buettner, F. R., Lüder, C. G., Ferguson, M. A. & Routier, F. H.** (2015). Depletion of UDP-glucose and UDP-galactose using a degron system leads to growth cessation of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(11), e0004205.
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J.** (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*, 6(1), 226. 10.1186/s40168-018-0605-2
- De Palma, G., Cinova, J., Stepankova, R., Tuckova, L. & Sanz, Y.** (2010). Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(5), 765-778.

- D'Elia, R., Matthew, L. d., Zeef, L. A., Wright, S. H., Pemberton, A. D. & Else, K. J.** (2009). Expulsion of *Trichuris muris* is associated with increased expression of angiogenin 4 in the gut and increased acidity of mucins within the goblet cell. *BMC Genomics*, 10(1), 1-17.
- Desrosiers, R. R., Gauthier, F., Lanthier, J. & Béliveau, R.** (2000). Modulation of Rho and cytoskeletal protein attachment to membranes by a prenylcysteine analog. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 14949-14957.
- Detwiler, J. T., Bos, D. H. & Minchella, D. J.** (2010). Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 611-620.
- Detwiler, J. T., Zajac, A. M., Minchella, D. J. & Belden, L. K.** (2012). Revealing cryptic parasite diversity in a definitive host: echinostomes in muskrats. *The Journal of Parasitology*, 98(6), 1148-1155.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., De Pasquale, I., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Ricciuti, P., Gagliardi, F., Laghi, L., Crecchio, C. & Guerzoni, M. E.** (2011). Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiology*, 11(1), 1-21.

- Dimitriu, P. A., Boyce, G., Samarakoon, A., Hartmann, M., Johnson, P. & Mohn, W. W.** (2013). Temporal stability of the mouse gut microbiota in relation to innate and adaptive immunity. *Environmental Microbiology Reports*, 5(2), 200-210.
- Distrutti, E., Monaldi, L., Ricci, P. & Fiorucci, S.** (2016). Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22(7), 2219.
- Donaldson, D. S., Bradford, B. M., Artis, D. & Mabbott, N. A.** (2015). Reciprocal regulation of lymphoid tissue development in the large intestine by IL-25 and IL-23. *Mucosal Immunology*, 8(3), 582-595.
- Dosanjh, N. S., Rawat, M., Chung, J. & Av-Gay, Y.** (2005). Thiol specific oxidative stress response in Mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 87-94.
- Drake, L. J., Jukes, M., Sternberg, R. J. & Bundy, D.** (2000). Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): cognitive and developmental impacts. Paper presented at the *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 11(4) 245-251.

- Dudakov, J. A., Hanash, A. M. & van den Brink, Marcel RM.** (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual Review of Immunology*, 33, 747-785.
- Duff, D. & Long, A.** (2017). Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. *Cellular Signalling*, 35, 250-255.
- Dunphy, J. T. & Linder, M. E.** (1998). Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(1-2), 245-261.
- Dvořák, J., Delcroix, M., Rossi, A., Vopálenský, V., Pospíšek, M., Šedinová, M., Mikeš, L., Sajid, M., Sali, A. & McKerrow, J. H.** (2005). Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology*, 35(8), 895-910.

E

- El Tamsahy, M. M., Ibrahim, I. R., Mossallam, S. F., Mahrous, H., Bary, A. & Salam, S. A. A.** (2015). Evaluation of newly isolated probiotics in the protection against experimental intestinal trichinellosis. *Veterinary Parasitology*, 214(3-4), 303-314.

- Elliott D. E. & Weinstock J. V.** (2012). Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1247, 83-96.
- Esteban J. G. & Muñoz-Antolí C.** (2009). Echinostomes: Systematics and Life Cycles. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes*, Springer, pp. 1-34
- Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y. & Leone, V.** (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS One*, 9(3), e92193.
- Everts, B., Tussiwand, R., Dreesen, L., Fairfax, K. C., Huang, S. C., Smith, A. M., O'Neill, C. M., Lam, W. Y., Edelson, B. T. & Urban Jr, J. F.** (2016). Migratory CD103 dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 35-51.

F

- Faith, J. J., McNulty, N. P., Rey, F. E. & Gordon, J. I.** (2011). Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, 333(6038), 101-104.
- Fallon, P. G., Ballantyne, S. J., Mangan, N. E., Barlow, J. L., Dasvarma, A., Hewett, D. R., McIlgorm, A., Jolin, H. E. & McKenzie, A. N.** (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 1105-1116.
- Farahyar, S., Zaini, F., Kordbacheh, P., Rezaie, S., Safara, M., Raoofian, R. & Heidari, M.** (2013). Overexpression of aldo-keto-reductase in azole-resistant clinical isolates of *Candida glabrata* determined by cDNA-AFLP. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 1-7.
- Farid, A. S., Jimi, F., Inagaki-Ohara, K. & Horii, Y.** (2008). Increased intestinal endotoxin absorption during enteric nematode but not protozoal infections through a mast cell-mediated mechanism. *Shock*, 29(6), 709-716.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. & Huelsken, J.** (2007). Wnt/ β -catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7551-7559.

- Filbey, K. J., Grainger, J. R., Smith, K. A., Boon, L., Van Rooijen, N., Harcus, Y., Jenkins, S., Hewitson, J. P. & Maizels, R. M.** (2014). Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection. *Immunology and Cell Biology*, 92(5), 436-448.
- Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Morris, S. C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K. B., Schopf, L. & Urban Jr, J. F.** (2004). Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews*, 201(1), 139-155.
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B. & Lesley, R.** (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 15(6), 985-995.
- Franco, J., Huffman, J. E. & Fried, B.** (1986). Infectivity, growth, and development of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *The Journal of Parasitology*, 142-147.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. & Pace, N. R.** (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.

- Frazer, B. A., Fried, B., Fujino, T. & Sleckman, B. P.** (1999). Host-parasite relationships between *Echinostoma caproni* and RAG-2-deficient mice. *Parasitology Research*, 85(4), 337-342.
- Fricke, W. F., Song, Y., Wang, A., Smith, A., Grinchuk, V., Pei, C., Ma, B., Lu, N., Urban, J. F. & Shea-Donohue, T.** (2015). Type 2 immunity-dependent reduction of segmented filamentous bacteria in mice infected with the helminthic parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Microbiome*, 3(1), 1-12.
- Fried, B.** (1994). Metacercarial excystment of trematodes. *Advances in Parasitology*, 33, 91-144.
- Fried, B., Nanni, T. J., Reddy, A. & Fujino, T.** (1996). Maintenance of the life cycle of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in dexamethasone-treated ICR mice and laboratory-raised *Helisoma trivolvis* (Gastropoda). *Parasitology Research*, 83(1), 16-19.
- Fried, B. & Graczyk, T. K.** (2004). Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the “revolutum” group. *Adv Parasitol*, 58, 139-195.
- Fried, B., Schneck, J. L. & Ponder, E. L.** (2004). Effects of tonicity, digestive enzymes and bile salts, and nutrient media on the survival of excysted metacercariae of *Echinostoma caproni*. *Parasitology Research*, 93(1), 1-4.

- Fried, B. & Toledo, R.** (2004). Criteria for species determination in the 'revolutum' group of *Echinostoma*. *Journal of Parasitology*, 90(4), 917.
- Fu, Y., Jin, Y., Li, F. & Liu, G.** (2019). Characterization of the complete mitochondrial genome of the echinostome *Echinostoma miyagawai* and phylogenetic implications. *Parasitology Research*, 118(10), 3091-3097.
- Fujino, T., Ichikawa, H., Fried, B. & Fukuda, K.** (1997). The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal reactions in C3H/HeN mice treated with dexamethasone. *Journal of Helminthology*, 71(3), 257-259.
- Fujino, T., Ichikawa, H., Fukuda, K. & Fried, B.** (1998). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* caused by goblet cell hyperplasia in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite*, 5(3), 219-222.
- Fujino, T. & Fried, B.** (1993). Expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) Kanev, 1985 and retention of *E. caproni* Richard, 1964 (Trematoda: Echinostomatidae) in C3H mice: pathological, ultrastructural, and cytochemical effects on the host intestine. *Parasitology Research*, 79(4), 286-292.

- Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, J. A., Navarrete, P. & Gotteland, M.** (2017). The gut microbiota of healthy chilean subjects reveals a high abundance of the phylum verrucomicrobia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1221.
- Fujisaka, S., Usui, I., Nawaz, A., Igarashi, Y., Okabe, K., Furusawa, Y., Watanabe, S., Yamamoto, S., Sasahara, M. & Watanabe, Y.** (2020). Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Fukata, Y. & Fukata, M.** (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 161-175.
- Fürst, T., Keiser, J. & Utzinger, J.** (2012). Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3), 210-221.

G

- Gabrie, J. A., Rueda, M. M., Rodríguez, C. A., Canales, M. & Sanchez, A. L.** (2016). Immune profile of Honduran schoolchildren with intestinal parasites: the skewed response against geohelminths. *Journal of Parasitology Research*, 2016.
- Gao, Y., Nish, S. A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limón, P., Weinstein, J. S., Zhao, H. & Medzhitov, R.** (2013). Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity*, 39(4), 722-732.
- Garg, G., Bernal, D., Trelis, M., Forment, J., Ortiz, J., Valero, M. L., Pedrola, L., Martínez-Blanch, J., Esteban, J. G. & Ranganathan, S.** (2013). The transcriptome of *Echinostoma caproni* adults: further characterization of the secretome and identification of new potential drug targets. *Journal of Proteomics*, 89, 202-214.
- George, P. J., Anuradha, R., Kumar, N. P., Kumaraswami, V., Nutman, T. B. & Babu, S.** (2012). Evidence of microbial translocation associated with perturbations in T cell and antigen-presenting cell homeostasis in hookworm infections. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(10), e1830.

- Georgieva, S., Selbach, C., Faltýnková, A., Soldánová, M., Sures, B., Skírnisson, K. & Kostadinova, A.** (2013). New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors*, 6(1), 64.
- Gerbe, F. & Jay, P.** (2016). Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1353-1359.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M. & Brulin, B.** (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529(7585), 226-230.
- Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E.** (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), 449-461.
- Gerke, V. & Moss, S. E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews*, 82(2), 331-371.
- Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D. & Macpherson, A. J.** (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34(5), 794-806.

- Giacomin, P. R., Gordon, D. L., Botto, M., Daha, M. R., Sanderson, S. D., Taylor, S. M. & Dent, L. A.** (2008). The role of complement in innate, adaptive and eosinophil-dependent immunity to the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Molecular Immunology*, 45(2), 446-455.
- Giacomin, P. R., Siracusa, M. C., Walsh, K. P., Grecis, R. K., Kubo, M., Comeau, M. R. & Artis, D.** (2012). Thymic stromal lymphopietin-dependent basophils promote Th2 cytokine responses following intestinal helminth infection. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4371-4378.
- Giacomin, P., Croese, J., Krause, L., Loukas, A. & Cantacessi, C.** (2015a). Suppression of inflammation by helminths: a role for the gut microbiota? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1675), 20140296.
- Giacomin, P., Zakrzewski, M., Croese, J., Su, X., Sotillo, J., McCann, L., Navarro, S., Mitreva, M., Krause, L. & Loukas, A.** (2015b). Experimental hookworm infection and escalating gluten challenges are associated with increased microbial richness in celiac subjects. *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.

- Giacomin, P., Zakrzewski, M., Jenkins, T. P., Su, X., Al-Hallaf, R., Croese, J., De Vries, S., Grant, A., Mitreva, M. & Loukas, A.** (2016). Changes in duodenal tissue-associated microbiota following hookworm infection and consecutive gluten challenges in humans with coeliac disease. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Giuffrida, P., Caprioli, F., Facciotti, F. & Di Sabatino, A.** (2019). The role of interleukin-13 in chronic inflammatory intestinal disorders. *Autoimmunity Reviews*, 18(5), 549-555.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. & Labarre, J.** (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22480-22489.
- Gold, M. J., Antignano, F., Hughes, M. R., Zaph, C. & McNagny, K. M.** (2016). Dendritic-cell expression of Shp1 regulates Th2 immunity to helminth infection in mice. *European Journal of Immunology*, 46(1), 122-130.
- Gower, J. C.** (1966). A Q-technique for the calculation of canonical variates. *Biometrika*, 588-590.

Grainger, J. R., Bridgett, S., Blaxter, M. L., Ashton, P. D. & Ashford, D. A.

(2011). Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1573-1594.

Grainger, J. R., Smith, K. A., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Harcus, Y.,

Filbey, K. J., Finney, C. A., Greenwood, E. J., Knox, D. P. & Wilson, M. S. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2331-2341.

Greenbaum, D., Medzihradzsky, K. F., Burlingame, A. & Bogyo, M. (2000).

Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry & Biology*, 7(8), 569-581.

Grencis, R. K. (2015). Immunity to helminths: resistance, regulation, and

susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annual Review of Immunology*, 33, 201-225.

Grencis, R. K., Humphreys, N. E. & Bancroft, A. J. (2014). Immunity to

gastrointestinal nematodes: mechanisms and myths. *Immunological Reviews*, 260(1), 183-205.

Grill, D., Matos, A. L., de Vries, W. C., Kudruk, S., Heflik, M., Dörner, W., Mootz, H. D., Ravoo, B. J., Galla, H. & Gerke, V. (2018). Bridging of membrane surfaces by annexin A2. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.

Guillou, F., Roger, E., Moné, Y., Rognon, A., Grunau, C., Théron, A., Mitta, G., Coustau, C. & Gourbal, B. E. (2007). Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(1), 45-56.

H

Haas, W. (2000). The behavioral biology of echinostomes. *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research* (pp. 175-197). Springer.

Hammad, H. & Lambrecht, B. N. (2015). Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity*, 43(1), 29-40.

Hand, T. W., Dos Santos, L. M., Bouladoux, N., Molloy, M. J., Pagán, A. J., Pepper, M., Maynard, C. L., Elson, C. O. & Belkaid, Y. (2012). Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science*, 337(6101), 1553-1556.

- Hansen, K., Nielsen, J. W., Hindsbo, O. & Christensen, N. Ø.** (1991). *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. *Parasitology Research*, 77(8), 686-690.
- Hansson, J., Panchaud, A., Favre, L., Bosco, N., Mansourian, R., Benyacoub, J., Blum, S., Jensen, O. N. & Kussmann, M.** (2011). Time-resolved quantitative proteome analysis of in vivo intestinal development. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(3)
- Hardman, C. & Ogg, G.** (2016). Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 42, 16-24.
- Harris, N. L.** (2011). Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design? *Trends in Parasitology*, 27(7), 288-293.
- Harris, N. L.** (2017). Recent advances in type-2-cell-mediated immunity: insights from helminth infection. *Immunity*, 47(6), 1024-1036.
- Hasnain, S. Z., Evans, C. M., Roy, M., Gallagher, A. L., Kindrachuk, K. N., Barron, L., Dickey, B. F., Wilson, M. S., Wynn, T. A. & Grencis, R. K.** (2011). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(5), 893-900.

- Hasnain, S. Z., Gallagher, A. L., Grecis, R. K. & Thornton, D. J.** (2013). A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(2), 364-374.
- Helmby, H. & Grecis, R. K.** (2003). IFN- γ -independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3691-3696.
- Heneberg, P.** (2020). Taxonomic comments on the validity of *Echinostoma miyagawai* Ischii, 1932 (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology International*, 74, 101931.
- Hennequin, C., Collignon, A. & Karjalainen, T.** (2001). Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microbial Pathogenesis*, 31(5), 255-260.
- Hepworth, M. R., Danilowicz-Luebert, E., Rausch, S., Metz, M., Klotz, C., Maurer, M. & Hartmann, S.** (2012). Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6644-6649.

- Hepworth, M. R., Monticelli, L. A., Fung, T. C., Ziegler, C. G., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A. R., Ma, H., Crawford, A. & Angelosanto, J. M.** (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4 T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 498(7452), 113-117.
- Herbert, D. R., Yang, J., Hogan, S. P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q. & Brombacher, F.** (2009). Intestinal epithelial cell secretion of RELM- β protects against gastrointestinal worm infection. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2947-2957.
- Herbst, T., Esser, J., Prati, M., Kulagin, M., Stettler, R., Zaiss, M. M., Hewitson, J. P., Merky, P., Verbeek, J. S. & Bourquin, C.** (2012). Antibodies and IL-3 support helminth-induced basophil expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14954-14959.
- Hewitson, J. P., Filbey, K. J., Esser-von Bieren, J., Camberis, M., Schwartz, C., Murray, J., Reynolds, L. A., Blair, N., Robertson, E. & Harcus, Y.** (2015). Concerted activity of IgG1 antibodies and IL-4/IL-25-dependent effector cells trap helminth larvae in the tissues following vaccination with defined secreted antigens, providing sterile immunity to challenge infection. *PLoS Pathog*, 11(3), e1004676.

- Hewitson, J. P., Harcus, Y., Murray, J., van Agtmaal, M., Filbey, K. J., Grainger, J. R., Bridgett, S., Blaxter, M. L., Ashton, P. D. & Ashford, D. A.** (2011). Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1573-1594.
- Hewitson, J. P. & Maizels, R. M.** (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Review of Vaccines*, 13(4), 473-487.
- Holm, J. B., Sorobetea, D., Küllerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Estellé, J., Ma, T., Madsen, L., Kristiansen, K. & Svensson-Frej, M.** (2015). Chronic *Trichuris muris* infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of lactobacilli. *PloS One*, 10(5), e0125495.
- Hörmannsperger, G., von Schillde, M. & Haller, D.** (2013). Lactocepin as a protective microbial structure in the context of IBD. *Gut Microbes*, 4(2), 152-157.
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E. & Farr, G. W.** (2007). Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 23, 115-145.

- Hosier, D. W., Fried, B. & Szewczak, J. P.** (1988). Homologous and heterologous resistance of *Echinostoma revolutum* and *E. liei* in ICR mice. *The Journal of Parasitology*, 89-92.
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S. J., Brown, A. S., Buckle, G. & Budke, C. M.** (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2865.
- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J. & Jacobson, J.** (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311-1321.
- Hotez, P. J. & Kamath, A.** (2009). Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(8), e412.
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F. & Osborne, L. C.** (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351(6279), 1329-1333.

- Hu, W., Chen, S., Zhang, J., Lou, X. & Zhou, H.** (2014). Dihydroartemisinin induces autophagy by suppressing NF- κ B activation. *Cancer Letters*, 343(2), 239-248.
- Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P. R., Urban, J. F. & Paul, W. E.** (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1 hi cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 16(2), 161-169.
- Huffman, J. E. & Fried, B.** (1990). Echinostoma and echinostomiasis. *Advances in parasitology* (pp. 215-269). Elsevier.
- Hugon, P., Dufour, J., Colson, P., Fournier, P., Sallah, K. & Raoult, D.** (2015). A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(10), 1211-1219.
- Humphreys, N. E. & Grencis, R. K.** (2009). IL-1-dependent, IL-1R1-independent resistance to gastrointestinal nematodes. *European Journal of Immunology*, 39(4), 1036-1045.
- Humphreys, N. E., Xu, D., Hepworth, M. R., Liew, F. Y. & Grencis, R. K.** (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2443-2449.

Hung, L., Lewkowich, I. P., Dawson, L. A., Downey, J., Yang, Y., Smith, D. E.

& De'Broski, R. H. (2013). IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(1), 282-287.

Hussaarts, L., Yazdanbakhsh, M. & Guigas, B. (2014). Priming dendritic cells

for th2 polarization: lessons learned from helminths and implications for metabolic disorders. *Frontiers in Immunology*, *5*, 499.

I

Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M. & Andrews, N. W.

(2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, *180*(5), 905-914.

Igual, J. C., Gonzalez-Bosch, C., Dopazo, J. & Perez-Ortin, J. E. (1992).

Phylogenetic analysis of the thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *Journal of Molecular Evolution*, *35*(2), 147-155.

Ikeda, K., Nakajima, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Suto, A., Saito, Y.

& Iwamoto, I. (2003). Mast cells produce interleukin-25 upon FcεRI-mediated activation. *Blood, the Journal of the American Society of Hematology*, *101*(9), 3594-3596.

Inaba, T., Sato, H. & Kamiya, H. (2003). Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology*, 126(6), 591.

Ishikawa, N., Wakelin, D. & Mahida, Y. R. (1997). Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*, 113(2), 542-549.

Iskova, N. I. (1985). Trematoda. Vol. 4. Echinostomata. *Fauna Ukrainy*, 34.

J

Jacobs, K. M., Bhave, S. R., Ferraro, D. J., Jaboin, J. J., Hallahan, D. E. & Thotala, D. (2012). GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *International Journal of Cell Biology*, 2012

Jang, S., Kim, H., Kim, Y., Kang, M., Kwon, J., Seo, J., Kim, H. Y., Kim, B., Yu, J. & Hong, S. (2012). Asthma prevention by *Lactobacillus rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4 CD25 Foxp3 T cells. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 4(3), 150.

- Jedličková, L., Dvořáková, H., Dvořák, J., Kašný, M., Ulrychova, L., Vorel, J., Žárský, V. & Mikeš, L.** (2018). Cysteine peptidases of *Eudiplozoon nipponicum*: a broad repertoire of structurally assorted cathepsins L in contrast to the scarcity of cathepsins B in an invasive species of haematophagous monogenean of common carp. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-17.
- Jenkins, T. P., Formenti, F., Castro, C., Piubelli, C., Perandin, F., Buonfrate, D., Otranto, D., Griffin, J. L., Krause, L. & Bisoffi, Z.** (2018a). A comprehensive analysis of the faecal microbiome and metabolome of *Strongyloides stercoralis* infected volunteers from a non-endemic area. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Jenkins, T. P., Peachey, L. E., Ajami, N. J., MacDonald, A. S., Hsieh, M. H., Brindley, P. J., Cantacessi, C. & Rinaldi, G.** (2018b). *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Jenkins, T. P., Rathnayaka, Y., Perera, P. K., Peachey, L. E., Nolan, M. J., Krause, L., Rajakaruna, R. S. & Cantacessi, C.** (2017). Infections by human gastrointestinal helminths are associated with changes in faecal microbiota diversity and composition. *PLoS One*, 12(9), e0184719.

Justus, R., Veera, K., Laura, H., Noora, O., Clara, B., Heikki, H., de Vos Willem, M. & Satokari, R. (2015). *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3655-3662.

K

Kanev, I., Dimitrov, V., Radev, V. & Fried, B. (1995). Redescription of *Echinostoma jurini* (Skvortzov, 1924) with a discussion of its identity and characteristics (Trematoda: Echinostomatidae). *Annalen Des Naturhistorischen Museums in Wien Serie B Für Botanik Und Zoologie*, 37-53.

Kanev, I. (1994). Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Systematic Parasitology*, 28(2), 125-144.

Kang, J., Bahk, Y., Cho, P., Hong, S., Kim, T., Sohn, W. & Na, B. (2010). A family of cathepsin F cysteine proteases of *Clonorchis sinensis* is the major secreted proteins that are expressed in the intestine of the parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(1), 7-16.

- Kang, R., Wan, J., Arstikaitis, P., Takahashi, H., Huang, K., Bailey, A. O., Thompson, J. X., Roth, A. F., Drisdell, R. C. & Mastro, R.** (2008). Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature*, 456(7224), 904-909.
- Kang, Z., Swaidani, S., Yin, W., Wang, C., Barlow, J. L., Gulen, M. F., Bulek, K., Do, J., Aronica, M. & McKenzie, A. N.** (2012). Epithelial cell-specific Act1 adaptor mediates interleukin-25-dependent helminth expulsion through expansion of Lin⁻ c-Kit innate cell population. *Immunity*, 36(5), 821-833.
- Karimi, K., Inman, M. D., Bienenstock, J. & Forsythe, P.** (2009). *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), 186-193.
- Karlsson, T., Altankhuyag, A., Dobrovolska, O., Turcu, D. C. & Lewis, A. E.** (2016). A polybasic motif in ErbB3-binding protein 1 (EBP1) has key functions in nucleolar localization and polyphosphoinositide interaction. *Biochemical Journal*, 473(14), 2033-2047.
- Kašný, M., Mikeš, L., Dalton, J. P., Mountford, A. P. & Horák, P.** (2007). Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*,

- Kašný, M., Mikeš, L., Hampl, V., Dvořák, J., Caffrey, C. R., Dalton, J. P. & Horák, P.** (2009). Peptidases of trematodes. *Advances in Parasitology*, 69, 205-297.
- Kenis, H., van Genderen, H., Deckers, N. M., Lux, P. A., Hofstra, L., Narula, J. & Reutelingsperger, C. P.** (2006). Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Experimental Cell Research*, 312(6), 719-726.
- Khan, W. I., Blennerhasset, P., Ma, C., Matthaei, K. I. & Collins, S. M.** (2001). Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology*, 23(1), 39-42.
- Khan, W. I. & Collins, S. M.** (2004). Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunology*, 26(8-9), 319-326.
- Kim, M. R., Manoukian, R., Yeh, R., Silbiger, S. M., Danilenko, D. M., Scully, S., Sun, J., DeRose, M. L., Stolina, M. & Chang, D.** (2002). Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood, the Journal of the American Society of Hematology*, 100(7), 2330-2340.

Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M. & Kim, C. H. (2013).

Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*, 145(2), 396-406. e10.

Kim, S., Prout, M., Ramshaw, H., Lopez, A. F., LeGros, G. & Min, B. (2010).

Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1143-1147.

Kim, T., de Guzman, J. V., Kong, H. & Chung, D. (2006). Comparison of gene

representation between diploid and triploid *Paragonimus westermani* by expressed sequence tag analyses. *Journal of Parasitology*, 92(4), 803-816.

Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and

limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257-260. 10.1016/s1471-4914(02)02355-9

Klein, K. A., Fukuto, H. S., Pelletier, M., Romanov, G., Grabenstein, J. P.,

Palmer, L. E., Ernst, R. & Bliska, J. B. (2012). A transposon site hybridization screen identifies galU and wecBC as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 653-662.

- Kleinschek, M. A., Owyang, A. M., Joyce-Shaikh, B., Langrish, C. L., Chen, Y., Gorman, D. M., Blumenschein, W. M., McClanahan, T., Brombacher, F. & Hurst, S. D.** (2007). IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 161-170.
- Klementowicz, J. E., Travis, M. A. & Grecis, R. K.** (2012). *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. Paper presented at the *Seminars in Immunopathology*, 34(6) 815-828.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glöckner, F. O.** (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. 10.1093/nar/gks808
- Köhler, H., Rodrigues, S. P. & McCormick, B. A.** (2002). *Shigella flexneri* interactions with the basolateral membrane domain of polarized model intestinal epithelium: role of lipopolysaccharide in cell invasion and in activation of the mitogen-activated protein kinase ERK. *Infection and Immunity*, 70(3), 1150-1158.
- Kostadinova, A. & Gibson, D. I.** (2000). The systematics of the echinostomes. *Echinostomes as experimental models for biological research* (pp. 31-57). Springer.

- Kostadinova, A.** (1995). *Echinostoma echinatum* (Zeder 1803) sensu Kanev (Digenea: Echinostomatidae): a note of caution. *Systematic Parasitology*, 32(1), 23-26.
- Kostadinova, A.** (1999). Cercarial chaetotaxy of *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Digenea: Echinostomatidae), with a review of the sensory patterns in the 'revolutum' group. *Systematic Parasitology*, 44(3), 201-209.
- Kostadinova, A., Herniou, E. A., Barrett, J. & Littlewood, D. T. J.** (2003). Phylogenetic relationships of *Echinostoma Rudolphi*, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology*, 54(3), 159-176.
- Kostadinova, A., Jones, A., Jones, A., Bray, R. A. & Gibson, D. I.** (2005). Superfamily echinostomatoidea looss, 1899. In: R. A. Bray & D. I. Gibson (Eds.) *Keys to the Trematoda*, Vol. 2, CAB International Publishing and The Natural History Museum, London, pp. 5-8.
- Koster, K. P. & Yoshii, A.** (2019). Depalmitoylation by palmitoyl-protein thioesterase 1 in neuronal health and degeneration. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11, 25.

Kreisinger, J., Bastien, G., Hauffe, H. C., Marchesi, J. & Perkins, S. E. (2015).

Interactions between multiple helminths and the gut microbiota in wild rodents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1675), 20140295.

L

Laffont, S., Seillet, C. & Guéry, J. (2017). Estrogen receptor-dependent regulation

of dendritic cell development and function. *Frontiers in Immunology*, 8, 108.

Le, T. H., Pham, L. T. K., Doan, H. T. T., Le, X. T. K., Saijuntha, W.,

Rajapakse, R. & Lawton, S. P. (2020). Comparative mitogenomics of the zoonotic parasite *Echinostoma revolutum* resolves taxonomic relationships within the '*E. revolutum*' species group and the Echinostomata (Platyhelminthes: Digenea). *Parasitology*, 147(5), 566-576.

Lee, J., Kim, D., Pyo, K., Kim, M., Kim, H., Chai, J. & Shin, E. (2013). STAT6

expression and IL-13 production in association with goblet cell hyperplasia and worm expulsion of *Gymnophalloides seoi* from C57BL/6 mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(5), 589.

- Lee, K., Park, S. K., Im, J. A., Kim, S. K., Kim, G. H., Kim, G. Y., Yang, E. J. & Ryang, Y.** (2004). Susceptibility of several strains of mice to *Echinostoma hortense* infection. *The Korean Journal of Parasitology*, 42(2), 51.
- Lee, R. J., Xiong, G., Kofonow, J. M., Chen, B., Lysenko, A., Jiang, P., Abraham, V., Doghramji, L., Adappa, N. D. & Palmer, J. N.** (2012). T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4145-4159.
- Lee, S. C., San Tang, M., Lim, Y. A., Choy, S. H., Kurtz, Z. D., Cox, L. M., Gundra, U. M., Cho, I., Bonneau, R. & Blaser, M. J.** (2014). Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(5), e2880.
- León, B., Ballesteros-Tato, A., Browning, J. L., Dunn, R., Randall, T. D. & Lund, F. E.** (2012). Regulation of T H 2 development by CXCR5 dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nature Immunology*, 13(7), 681.
- Leow, C. Y., Willis, C., Hofmann, A. & Jones, M. K.** (2015). Structure–function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of schistosome parasites of humans: prospects for identification of novel targets for parasite control. *British Journal of Pharmacology*, 172(7), 1653-1663.

- Li, Y., Qiu, Y., Zeng, M., Diao, P., Chang, Q., Gao, Y., Zhang, Y. & Wang, C.** (2019). The complete mitochondrial genome of *Echinostoma miyagawai*: Comparisons with closely related species and phylogenetic implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 75, 103961.
- Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K. & Hansson, G. C.** (2006). Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9298-9303.
- Lin, J., Qu, H., Chen, G., He, L., Xu, Y., Xie, Z., Ren, M., Sun, J., Li, S. & Chen, W.** (2015). Clonorchis sinensis acetoacetyl-CoA thiolase: identification and characterization of its potential role in surviving in the bile duct. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-9.
- Linder, M. E. & Deschenes, R. J.** (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 74-84.
- Littman, D. R. & Pamer, E. G.** (2011). Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 311-323.

- Liu, C., Kuo, S., Hsu, L., Huang, S., Wang, C., Tsai, P., Chen, Y., Jou, T. & Ko, W.** (2016). Peroxiredoxin 1 induces inflammatory cytokine response and predicts outcome of cardiogenic shock patients necessitating extracorporeal membrane oxygenation: an observational cohort study and translational approach. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1-15.
- Liu, D., Cao, T., Wang, N., Liu, C., Ma, N., Tu, R. & Min, X.** (2016). IL-25 attenuates rheumatoid arthritis through suppression of Th17 immune responses in an IL-13-dependent manner. *Scientific Reports*, 6, 36002.
- Liu, T., Chen, X., Xu, Y., Wu, W., Tang, W., Chen, Z., Ji, G., Peng, J., Jiang, Q. & Xiao, J.** (2019). Gut microbiota partially mediates the effects of fine particulate matter on type 2 diabetes: evidence from a population-based epidemiological study. *Environment International*, 130, 104882.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V. & Gasbarrini, A.** (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*, 5(1), 1-8.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Lyne, J. C., Melhem, M. F., Finley, G. G., Wen, D., Liu, N., Deng, D. H. & Salup, R. (1997). Tissue expression of neu differentiation factor/heregin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *The Cancer Journal from Scientific American*, 3(1), 21-30.

M

Mahler, H., Christensen, N. Ø & Hindsbo, O. (1995). Studies on the reproductive capacity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in hamsters and jirds. *International Journal for Parasitology*, 25(6), 705-710.

Maizels, R. M., Bundy, D. A., Selkirk, M. E., Smith, D. F. & Anderson, R. M. (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, 365(6449), 797-805.

Maizels, R. M., Hewitson, J. P. & Smith, K. A. (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current Opinion in Immunology*, 24(4), 459-466.

- Maizels, R. M. & Smith, K. A.** (2011). Regulatory T cells in infection. *Advances in Immunology*, 112, 73-136.
- Makepeace, B., Martin, C., D Turner, J. & Specht, S.** (2012). Granulocytes in helminth infection-who is calling the shots? *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1567-1586.
- Mamidipudi, V. & Cartwright, C. A.** (2009). A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene*, 28(50), 4421-4433.
- Mannick, E. & Udall Jr, J. N.** (1996). Neonatal gastrointestinal mucosal immunity. *Clinics in Perinatology*, 23(2), 287-304.
- Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Mínguez, M. T., Valero, M. L., Del Pino, Manuel Mateo Sánchez, Muñoz-Antoli, C. & Toledo, R.** (2012). Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PloS One*, 7(9), e45974.
- Marillier, R. G., Michels, C., Smith, E. M., Fick, L. C., Leeto, M., Dewals, B., Horsnell, W. G. & Brombacher, F.** (2008). IL-4/IL-13 independent goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections. *BMC Immunology*, 9(1), 1-9.

- Marple, A., Wu, W., Shah, S., Zhao, Y., Du, P., Gause, W. C. & Yap, G. S.** (2017). Cutting edge: helminth coinfection blocks effector differentiation of CD8 T cells through alternate host Th2-and IL-10-mediated responses. *The Journal of Immunology*, 198(2), 634-639.
- Massacand, J. C., Stettler, R. C., Meier, R., Humphreys, N. E., Grecis, R. K., Marsland, B. J. & Harris, N. L.** (2009). Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13968-13973.
- McClemens, J., Kim, J. J., Wang, H., Mao, Y., Collins, M., Kunze, W., Bienenstock, J., Forsythe, P. & Khan, W. I.** (2013). *Lactobacillus rhamnosus* ingestion promotes innate host defense in an enteric parasitic infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(6), 818-826.
- McConnell, E. L., Basit, A. W. & Murdan, S.** (2008). Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(1), 63-70.
- McCormick, S. M. & Heller, N. M.** (2015). Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*, 75(1), 38-50.

- McCoy, K. D., Stoel, M., Stettler, R., Merky, P., Fink, K., Senn, B. M., Schaer, C., Massacand, J., Odermatt, B. & Oettgen, H. C.** (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host & Microbe*, 4(4), 362-373.
- McDermott, J. R., Bartram, R. E., Knight, P. A., Miller, H. R., Garrod, D. R. & Grecis, R. K.** (2003). Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7761-7766.
- McFarlane, A. J., McSorley, H. J., Davidson, D. J., Fitch, P. M., Errington, C., Mackenzie, K. J., Gollwitzer, E. S., Johnston, C. J., MacDonald, A. S. & Edwards, M. R.** (2017). Enteric helminth-induced type I interferon signaling protects against pulmonary virus infection through interaction with the microbiota. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 1068-1078. e6.
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P. & Florin, T. H.** (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265-278.
- McMaster, R. P., Huffman, J. E. & Fried, B.** (1995). The effect of dexamethasone on the course of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis* infections in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology Research*, 81(6), 518-521.

- McSorley, H. J. & Maizels, R. M.** (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 585-608.
- McVeigh, P., Maule, A. G., Dalton, J. P. & Robinson, M. W.** (2012). *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes and Infection*, 14(4), 301-310.
- Mearns, H., Forbes-Blom, E. E., Camberis, M., Tang, S., Kyle, R., Harvie, M., Kleinschek, M. A. & Gros, G. L.** (2014). IL-25 exhibits disparate roles during Th2-cell differentiation versus effector function. *European Journal of Immunology*, 44(7), 1976-1980.
- Menni, C., Jackson, M. A., Pallister, T., Steves, C. J., Spector, T. D. & Valdes, A. M.** (2017). Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International Journal of Obesity*, 41(7), 1099-1105.
- Merrifield, C. J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A. S. & Moss, S. E.** (2001). Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Current Biology*, 11(14), 1136-1141.
- Meunier, B., Dumas, E., Piec, I., Bechet, D., Hebraud, M. & Hocquette, J.** (2007). Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 358-366.

- Mike, L. & Man, P.** (2003). Purification and characterization of a saccharide-binding protein from penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum*- a bifunctional molecule with cysteine protease activity. *Parasitology*, 127(1), 69.
- Mindnich, R. D. & Penning, T. M.** (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Human Genomics*, 3(4), 1-9.
- Mirchandani, A. S., Besnard, A., Yip, E., Scott, C., Bain, C. C., Cerovic, V., Salmund, R. J. & Liew, F. Y.** (2014). Type 2 innate lymphoid cells drive CD4 Th2 cell responses. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2442-2448.
- Mizushima, N.** (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861-2873.
- Mizushima, N. & Komatsu, M.** (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741.
- Molofsky, A. B., Van Gool, F., Liang, H., Van Dyken, S. J., Nussbaum, J. C., Lee, J., Bluestone, J. A. & Locksley, R. M.** (2015). Interleukin-33 and interferon- γ counter-regulate group 2 innate lymphoid cell activation during immune perturbation. *Immunity*, 43(1), 161-174.

- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B. & Draeger, A.** (2009). The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(16), 2623-2642.
- Moncada, D., Keller, K. & Chadee, K.** (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and Immunity*, 71(2), 838-844.
- Montersino, A. & Thomas, G. M.** (2015). Slippery signaling: palmitoylation-dependent control of neuronal kinase localization and activity. *Molecular Membrane Biology*, 32(5-8), 179-188.
- Mooseker, M. S.** (1985). Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annual Review of Cell Biology*, 1(1), 209-241.
- Morgan, R. G., Pearn, L., Liddiard, K., Pumford, S. L., Burnett, A. K., Tonks, A. & Darley, R. L.** (2013). γ -Catenin is overexpressed in acute myeloid leukemia and promotes the stabilization and nuclear localization of β -catenin. *Leukemia*, 27(2), 336-343.

- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H. & Koyasu, S.** (2010). Innate production of TH 2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit Sca-1 lymphoid cells. *Nature*, 463(7280), 540-544.
- Mosca, A., Leclerc, M. & Hugot, J. P.** (2016). Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Frontiers in Microbiology*, 7, 455.
- Mullaly, S. C., Burrows, K., Antignano, F. & Zaph, C.** (2011). Assessing the role of CD103 in immunity to an intestinal helminth parasite. *PLoS One*, 6(5), e19580.
- Muñoz-Antolí C.** (1997). Contribución al conocimiento de la sistemática, biología y ecología de la Subfamilia Echinostomatidae Faust, 1929 (Trematoda: Echinostomatidae) en el Parque Natural de la Albufera de Valencia (España). Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 366 pp.
- Muñoz-Antolí, C., Carpena, I., Espert, A., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2004). The effect of host species on the development of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) adult worms. *Revista Ibérica De Parasitología*, 64, 81-87.

- Muñoz-Antoli, C., Cortés, A., Martín-Grau, C., Fried, B., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2016b). Partial resistance to homologous challenge infections of the digenean *Echinostoma caproni* in ICR mice. *Journal of Helminthology*, 90(4), 428.
- Muñoz-Antoli, C., Toledo, R. & Esteban, J. G.** (2013). The influence of adult worm age and definitive host on the transmission of *Echinostoma caproni*: egg hatchability and miracidial infectivity. *Journal of Helminthology*, 87(1), 42.
- Muñoz-Antoli, C., Cortés, A., Santano, R., Sotillo, J., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2016a). Interleukin-25 induces resistance against intestinal trematodes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Muñoz-Antoli, C., Cortés, A., Sotillo, J., Fried, B., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2014). Differential expression and glycosylation of proteins in the rat ileal epithelium in response to *Echinostoma caproni* infection. *Journal of Proteomics*, 101, 169-178.
- Muñoz-Antoli, C., Sotillo, J., Montegudo, C., Fried, B., Marcilla, A. & Toledo, R.** (2007). Development and pathology of *Echinostoma caproni* in experimentally infected mice. *Journal of Parasitology*, 93(4), 854-859.

Myhill, L. J., Stolzenbach, S., Hansen, T. V., Skovgaard, K., Stensvold, C. R., Andersen, L. O., Nejsum, P., Mejer, H., Thamsborg, S. M. & Williams, A. R. (2018). Mucosal barrier and Th2 immune responses are enhanced by dietary inulin in pigs infected with *Trichuris suis*. *Frontiers in Immunology*, 9, 2557.

N

Na, B., Kim, S., Lee, E., Kim, T., Bae, Y., Kang, I., Yu, J., Sohn, W., Cho, S. & Kong, Y. (2006). Critical roles for excretory–secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cellular Microbiology*, 8(6), 1034-1046.

Nair, M. G., Guild, K. J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M. & Artis, D. (2008). Goblet cell-derived resistin-like molecule β augments CD4 T cell production of IFN- γ and infection-induced intestinal inflammation. *The Journal of Immunology*, 181(7), 4709-4715.

Narushima, S., Sugiura, Y., Oshima, K., Atarashi, K., Hattori, M., Suematsu, M. & Honda, K. (2014). Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes*, 5(3), 333-339.

- Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G. & Pannell, R.** (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293), 1367-1370.
- Nesper, J., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Kapfhammer, D., Kraiß, A. & Reidl, J.** (2001). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El TorgalU and galE Mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 69(1), 435-445.
- Noikong, W., Wongsawad, C., Chai, J., Saenphet, S. & Trudgett, A.** (2014). Molecular analysis of echinostome metacercariae from their second intermediate host found in a localised geographic region reveals genetic heterogeneity and possible cryptic speciation. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(4), e2778.
- Nollen, P. M.** (1996). Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma paraensei* in concurrent infections in mice. *Journal of Helminthology*, 70(2), 133-136.
- Noor, Z., Watanabe, K., Abhyankar, M. M., Burgess, S. L., Buonomo, E. L., Cowardin, C. A. & Petri, W. A.** (2017). Role of eosinophils and tumor necrosis factor alpha in interleukin-25-mediated protection from amebic colitis. *MBio*, 8(1)

O

- Odaibo, A. B., Christensen, N. Ø & Ukoli, F. A.** (1988). Establishment, survival, and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in NMRI mice. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55(2), 265-269.
- Odaibo, A. B., Christensen, N. Ø. & Ukoli, F. A.** (1989). Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* infections in NMRI mice. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 56(2), 192-198.
- Oeser, K., Schwartz, C. & Voehringer, D.** (2015). Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunology*, 8(3), 672-682.
- Ohnmacht, C., Schwartz, C., Panzer, M., Schiedewitz, I., Naumann, R. & Voehringer, D.** (2010). Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity*, 33(3), 364-374.
- Oliphant, C. J., Hwang, Y. Y., Walker, J. A., Salimi, M., Wong, S. H., Brewer, J. M., Englezakis, A., Barlow, J. L., Hams, E. & Scanlon, S. T.** (2014). MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4 T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*, 41(2), 283-295.

- O'Mahony, C., Scully, P., O'Mahony, D., Murphy, S., O'Brien, F., Lyons, A., Sherlock, G., MacSharry, J., Kiely, B. & Shanahan, F. (2008).** Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF- κ B activation. *PLoS Pathog*, 4(8), e1000112.
- Ormerod, K. L., Wood, D. L., Lachner, N., Gellatly, S. L., Daly, J. N., Parsons, J. D., Dal'Molin, C. G., Palfreyman, R. W., Nielsen, L. K. & Cooper, M. A. (2016).** Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome*, 4(1), 1-17.
- Oudhoff, M. J., Antignano, F., Chenery, A. L., Burrows, K., Redpath, S. A., Braam, M. J., Perona-Wright, G. & Zaph, C. (2016).** Intestinal epithelial cell-intrinsic deletion of Setd7 identifies role for developmental pathways in immunity to helminth infection. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005876.
- Owyang, A. M., Zaph, C., Wilson, E. H., Guild, K. J., McClanahan, T., Miller, H. R., Cua, D. J., Goldschmidt, M., Hunter, C. A. & Kastelein, R. A. (2006).** Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 843-849.

P

- Park, J. & Eberl, G.** (2018). Type 3 regulatory T cells at the interface of symbiosis. *Journal of Microbiology*, 56(3), 163-171.
- Patel, N., Kreider, T., Urban Jr, J. F. & Gause, W. C.** (2009). Characterisation of effector mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 13-21.
- Peachey, L. E., Jenkins, T. P. & Cantacessi, C.** (2017). This gut ain't big enough for both of us. Or is it? Helminth–microbiota interactions in veterinary species. *Trends in Parasitology*, 33(8), 619-632.
- Pei, C., Zhao, C., Wang, A., Fan, A. X., Grinchuk, V., Smith, A., Sun, R., Xie, Y., Lu, N. & Urban, J. F.** (2016). Critical role for interleukin-25 in host protective Th2 memory response against *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. *Infection and Immunity*, 84(12), 3328-3337.
- Perera, R. M. & Zoncu, R.** (2016). The lysosome as a regulatory hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 223-253.

- Perez, G. M.** (2002). Aportaciones a la sistematica y biologia de un representante del género *Echinostoma Rudolphi*, 1809 (Trematoda: Echinostomatidae) del grupo "revolutum" en el Parque Natural de la Albufera de Valencia (España).
- Perrigoue, J. G., Saenz, S. A., Siracusa, M. C., Allenspach, E. J., Taylor, B. C., Giacomini, P. R., Nair, M. G., Du, Y., Zaph, C. & Van Rooijen, N.** (2009). MHC class II-dependent basophil-CD4 T cell interactions promote TH 2 cytokine-dependent immunity. *Nature Immunology*, 10(7), 697-705.
- Phillipson, M., Atuma, C., Henriksnas, J. & Holm, L.** (2002). The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(2), G211-G219.
- Phythian-Adams, A. T., Cook, P. C., Lundie, R. J., Jones, L. H., Smith, K. A., Barr, T. A., Hochweller, K., Anderton, S. M., Hämmerling, G. J. & Maizels, R. M.** (2010). CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2089-2096.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J. P. & Carmona, C.** (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and Immunity*, 67(4), 1954-1961.

- Pitt, J. J.** (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
- Platt, T. R., Graf, E., Kammrath, A. & Zelmer, D. A.** (2010). Diurnal migration of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) in ICR mice. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1072-1075.
- Plovier, H. & Cani, P. D.** (2017). Optimization and safety assessment of *Akkermansia muciniphila* for human administration. *Medecine Sciences: M/S*, 33(4), 373-375.
- Presley, L. L., Wei, B., Braun, J. & Borneman, J.** (2010). Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 936-941.
- Price, A. E., Liang, H., Sullivan, B. M., Reinhardt, R. L., Eisle, C. J., Erle, D. J. & Locksley, R. M.** (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11489-11494.

Priebe, G. P., Dean, C. R., Zaidi, T., Meluleni, G. J., Coleman, F. T., Coutinho, Y. S., Noto, M. J., Urban, T. A., Pier, G. B. & Goldberg, J. B. (2004). The galU gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung. *Infection and Immunity*, 72(7), 4224-4232.

Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R. & Brooker, S. J. (2014). Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-19.

Q

Qian, J., Huang, X., Zhang, Y., Ye, X. & Qian, W. (2020). γ -catenin overexpression in AML patients may promote tumor cell survival via activation of the Wnt/ β -catenin axis. *Oncotargets and Therapy*, 13, 1265.

R

Rahaman, S. O., Sharma, P., Harbor, P. C., Aman, M. J., Vogelbaum, M. A. & Haque, S. J. (2002). IL-13R α 2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Research*, 62(4), 1103-1109.

Rajamanickam, A., Munisankar, S., Menon, P. A., Dolla, C., Nutman, T. B. &

Babu, S. (2020). Helminth mediated attenuation of systemic inflammation and microbial translocation in helminth-diabetes comorbidity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 431.

Rajilić–Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H. G., Kajander, K., Kekkonen, R. A.,

Tims, S. & de Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792-1801.

Ramanan, D., Bowcutt, R., Lee, S. C., San Tang, M., Kurtz, Z. D., Ding, Y.,

Honda, K., Gause, W. C., Blaser, M. J. & Bonneau, R. A. (2016). Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. *Science*, 352(6285), 608-612.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS*

Microbiology Ecology, 62(2), 142-160.

Ran, R., Zhao, Q., Abuzeid, A. M., Huang, Y., Liu, Y., Sun, Y., He, L., Li, X.,

Liu, J. & Li, G. (2020). Mitochondrial genome sequence of *Echinostoma revolutum* from red-crowned crane (*Grus japonensis*). *The Korean Journal of Parasitology*, 58(1), 73.

- Raposo, G. & Stoorvogel, W.** (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Rausch, S., Held, J., Fischer, A., Heimesaat, M. M., Kühn, A. A., Bereswill, S. & Hartmann, S.** (2013). Small intestinal nematode infection of mice is associated with increased enterobacterial loads alongside the intestinal tract. *PloS One*, 8(9), e74026.
- Ray, P., Pandey, U. & Aich, P.** (2020). Comparative analysis of beneficial effects of Vancomycin treatment on Th1-and Th2-biased mice and role of gut microbiota. *bioRxiv*, 516898.
- Reikvam, H., Grønningsæter, I., Ahmed, A. B., Hatfield, K. & Bruserud, Ø.** (2015). Metabolic serum profiles for patients receiving allogeneic stem cell transplantation: the pretransplant profile differs for patients with and without posttransplant capillary leak syndrome. *Disease Markers*, 2015.
- Reyes, J. L., Fernando, M. R., Lopes, F., Leung, G., Mancini, N. L., Matisz, C. E., Wang, A. & McKay, D. M.** (2016). IL-22 restrains tapeworm-mediated protection against experimental colitis via regulation of IL-25 expression. *PLoS Pathogens*, 12(4), e1005481.

- Reynolds, L. A., Smith, K. A., Filbey, K. J., Harcus, Y., Hewitson, J. P., Redpath, S. A., Valdez, Y., Yebra, M. J., Finlay, B. B. & Maizels, R. M.** (2014). Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract: lactobacilli promote infection with, and are promoted by, helminth parasites. *Gut Microbes*, 5(4), 522-532.
- Richard J. & Brygoo E. R.** (1978). Life cycle of the trematode *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (Echinostomatoidea). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53, 265-275.
- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J. D. & Jacques, M.** (1999). Isolation and characterization of mini-Tn 10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(12), 1017-1026.
- Rizzo, A., Monteleone, I., Fina, D., Stolfi, C., Caruso, R., Fantini, M. C., Franzè, E., Schwendener, R., Pallone, F. & Monteleone, G.** (2012). Inhibition of colitis by IL-25 associates with induction of alternatively activated macrophages. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(3), 449-459.
- Rizzo, M. L.** (2019). *Statistical computing with R* (Second edition ed.). CRC Press (Taylor & Francis Group).

- Robinson, J. A.** (1991). Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 332(1263), 107-114.
- Robinson, M. W., Dalton, J. P. & Donnelly, S.** (2008). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(12), 601-608.
- Robinson, M. W., Tort, J. F., Lowther, J., Donnelly, S. M., Wong, E., Xu, W., Stack, C. M., Padula, M., Herbert, B. & Dalton, J. P.** (2008). Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(6), 1111-1123.
- Roeber, F., Jex, A. R. & Gasser, R. B.** (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6(1), 153.
- Rondelaud, D. & Barthe, D.** (1978). Arguments and proposals for a new developmental interpretation of *Fasciola hepatica* L. in *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller (author's transl). *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 53(2), 201-213.

- Rook, G. A., Lowry, C. A. & Raison, C. L.** (2013). Microbial ‘Old Friends’, immunoregulation and stress resilience. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2013(1), 46-64.
- Rooks, M. G., Veiga, P., Wardwell-Scott, L. H., Tickle, T., Segata, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Beal, C., van Hyckama-Vlieg, J. E. & Ballal, S. A.** (2014). Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *The ISME Journal*, 8(7), 1403-1417.
- Round, J. L. & Mazmanian, S. K.** (2010). Inducible Foxp3 regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12204-12209.
- RStudio Team.** (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA [computer software]. <http://www.rstudio.com/>
- Ryang, Y. S., Yang, E. J., Kim, J., Lee, K., Sung, H., Kim, J. & Kim, I. S.** (2007). Immune response and inhibitory effect of ketotifen on the BALB/c and C3H/HeN mice infected with *Echinostoma hortense*. *Parasitology Research*, 101(4), 1103.

Rzepecka, J., Rausch, S., Klotz, C., Schnöller, C., Kornprobst, T., Hagen, J., Ignatius, R., Lucius, R. & Hartmann, S. (2009). Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Molecular Immunology*, 46(6), 1109-1119.

S

Saenz, S. A., Siracusa, M. C., Monticelli, L. A., Ziegler, C. G., Kim, B. S., Brestoff, J. R., Peterson, L. W., Wherry, E. J., Goldrath, A. W. & Bhandoola, A. (2013). IL-25 simultaneously elicits distinct populations of innate lymphoid cells and multipotent progenitor type 2 (MPPtype2) cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(9), 1823-1837.

Saenz, S. A., Siracusa, M. C., Perrigoue, J. G., Spencer, S. P., Urban Jr, J. F., Tocker, J. E., Budelsky, A. L., Kleinschek, M. A., Kastelein, R. A. & Kambayashi, T. (2010). IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH 2 cytokine responses. *Nature*, 464(7293), 1362-1366.

- Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Chilton, N. B., Petney, T. N., Klinbunga, S., Satrawaha, R., Webster, J. P. & Andrews, R. H.** (2009). Impact of temporal changes and host factors on the genetic structure of a population of *Opisthorchis viverrini* sensu lato in Khon Kaen Province (Thailand). *Parasitology*, 136(9), 1057.
- Sajid, M. & McKerrow, J. H.** (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 1-21.
- Salaun, C., Greaves, J. & Chamberlain, L. H.** (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *Journal of Cell Biology*, 191(7), 1229-1238.
- Sandlin, R. C., Lampel, K. A., Keasler, S. P., Goldberg, M. B., Stolzer, A. L. & Maurelli, A. T.** (1995). Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infection and Immunity*, 63(1), 229-237.
- Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J. P. & Eberl, G.** (2011). ROR γ t innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunology*, 12(4), 320-326.

Sawant, D. V., Gravano, D. M., Vogel, P., Giacomini, P., Artis, D. & Vignali, D.

A. (2014). Regulatory T cells limit induction of protective immunity and promote immune pathology following intestinal helminth infection. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2904-2912.

Scafone, L. K., Nel, H. J., Gagliardo, L. F., Cameron, J. L., Al-Shokri, S.,

Leifer, C. A., Fallon, P. G. & Appleton, J. A. (2013). Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*, 81(4), 1354-1363.

Schade, C., Flemström, G. & Holm, L. (1994). Hydrogen ion concentration in the

mucus layer on top of acid-stimulated and-inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, 107(1), 180-188.

Schmid-Hempel, P. (2008). Parasite immune evasion: a momentous molecular

war. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(6), 318-326.

Schmidt, S., Hoving, J. C., Horsnell, W. G., Mearns, H., Cutler, A. J.,

Brombacher, T. M. & Brombacher, F. (2012). *Nippostrongylus*-induced intestinal hypercontractility requires IL-4 receptor alpha-responsiveness by T cells in mice. *PLoS One*, 7(12), e52211.

- Schmieder, R. & Edwards, R.** (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Computer Applications in the Biosciences*, 27(6), 863-864. 10.1093/bioinformatics/btr026
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P. J. & Cerf-Bensussan, N.** (2017). Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Current Opinion in Microbiology*, 35, 100-109.
- Schwartz, C., Turqueti-Neves, A., Hartmann, S., Yu, P., Nimmerjahn, F. & Voehringer, D.** (2014). Basophil-mediated protection against gastrointestinal helminths requires IgE-induced cytokine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48), E5169-E5177.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. & Huttenhower, C.** (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), 1-18.
- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Bergé, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J. & Klopp, C.** (2012). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*, 61(4), 543-553.

- Servin, A. L.** (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.
- Shah, M. M., Saio, M., Yamashita, H., Tanaka, H., Takami, T., Ezaki, T. & Inagaki, N.** (2012). *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells and suppresses allergic contact dermatitis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(4), 612-616.
- Sharma, A., Rustad, T., Mahajan, G., Kumar, A., Rao, K. V., Banerjee, S., Sherman, D. R. & Mande, S. C.** (2016). Towards understanding the biological function of the unusual chaperonin Cpn60. 1 (GroEL1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 97, 137-146.
- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., Hunter, C. L., Nuwaysir, L. M. & Schaeffer, D. A.** (2007). The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9), 1638-1655.
- Silva, T., Richard, N., P Dias, J. & M Rodrigues, P.** (2014). Data visualization and feature selection methods in gel-based proteomics. *Current Protein and Peptide Science*, 15(1), 4-22.

- Simonsen, P. E. & Andersen, B. J.** (1986). *Echinostoma revolutum* in mice; dynamics of the antibody attack to the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology*, 16(5), 475-482.
- Simonsen, P. E., Vennervald, B. J. & Birch-Andersen, A.** (1990). *Echinostoma caproni* in mice: ultrastructural studies on the formation of immune complexes on the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology*, 20(7), 935-941.
- Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Hill, D. A., Kim, B. S., Headley, M. B., Doering, T. A., Wherry, E. J., Jessup, H. K., Siegel, L. A. & Kambayashi, T.** (2011). TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*, 477(7363), 229-233.
- Sirag, S. B., Christensen, N. Ø, Frandsen, F., Monrad, J. & Nansen, P.** (1980). Homologous and heterologous resistance in *Echinostoma revolutum* infections in mice. *Parasitology*, 80(3), 479-486.
- Skelly, P. J. & Wilson, R. A.** (2006). Making sense of the schistosome surface. *Advances in Parasitology*, 63, 185-284.

- Smith, K. A., Hochweller, K., Hämmerling, G. J., Boon, L., Macdonald, A. S. & Maizels, R. M.** (2011). Chronic helminth infection mediates tolerance in vivo through dominance of CD11c^{lo} CD103⁺ DC population. *J Immunol*, *186*, 7098-7109.
- Smith, K. A., Filbey, K. J., Reynolds, L. A., Hewitson, J. P., Harcus, Y., Boon, L., Sparwasser, T., Hämmerling, G. & Maizels, R. M.** (2016). Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunology*, *9*(2), 428-443.
- Smith, K. A., Löser, S., Varyani, F., Harcus, Y., McSorley, H. J., McKenzie, A. N. & Maizels, R. M.** (2018). Concerted IL-25R and IL-4R α signaling drive innate type 2 effector immunity for optimal helminth expulsion. *Elife*, *7*, e38269.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N. & Garrett, W. S.** (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, *341*(6145), 569-573.

- Smits, H. H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E. C., Schipper, K., van Capel, T. M., Zaat, B. A., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E. A., & van Kooyk, Y.** (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6), 1260-1267.
- Sorensen, R. E., Curtis, J. & Minchella, D. J.** (1998). Intraspecific variation in the rDNA its loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implications for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *The Journal of Parasitology* , 992-997.
- Sotillo, J., Trelis, M., Cortes, A., Fried, B., Marcilla, A., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2011). Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Experimental Parasitology*, 129(3), 307-311.
- Sotillo, J., Valero, L., Sanchez Del Pino, M M, Fried, B., Esteban, J. G., Marcilla, A. & Toledo, R.** (2008). Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunology*, 30(5), 271-279.

- Sotillo, J., Muñoz-Antoli, C., Marcilla, A., Fried, B., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2007). *Echinostoma caproni*: Kinetics of IgM, IgA and IgG subclasses in the serum and intestine of experimentally infected rats and mice. *Experimental Parasitology*, 116(4), 390-398.
- Sotillo, J., Trudgett, A., Halferty, L., Marcilla, A., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2010). *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts. *Experimental Parasitology*, 125(3), 304-309.
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S. & Lauerma, A.** (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673-680.
- Specian, R. D. & Oliver, M. G.** (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260(2), C183-C193.
- Stack, C., Dalton, J. P. & Robinson, M. W.** (2011). The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Cysteine proteases of pathogenic organisms* (pp. 116-135). Springer.

- Steinhardt, R. A., Bi, G. & Alderton, J. M.** (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science*, 263(5145), 390-393.
- Stepek G., Buttle D. J., Duce I. R. & Behnke** (2007). Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *International Journal of Experimental Parasitology* 87, 325-341.
- Stevenson, T. J., Duddleston, K. N. & Buck, C. L.** (2014). Effects of season and host physiological state on the diversity, density, and activity of the arctic ground squirrel cecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5611-5622.
- Steverding, D.** (2011). The cathepsin B-selective inhibitors CA-074 and CA-074Me inactivate cathepsin L under reducing conditions. *Open Enzyme Inhibition Journal*, 4, 11-16.
- Steverding, D., Sexton, D. W., Wang, X., Gehrke, S. S., Wagner, G. K. & Caffrey, C. R.** (2012). *Trypanosoma brucei*: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. *International Journal for Parasitology*, 42(5), 481-488.

Su, C., Su, L., Li, Y., Long, S. R., Chang, J., Zhang, W., Walker, W. A., Xavier, R. J., Cherayil, B. J. & Shi, H. N. (2018). Helminth-induced alterations of the gut microbiota exacerbate bacterial colitis. *Mucosal Immunology*, *11*(1), 144-157.

Su, J., Chen, T., Ji, X., Liu, C., Yadav, P. K., Wu, R., Yang, P. & Liu, Z. (2013). IL-25 downregulates Th1/Th17 immune response in an IL-10–dependent manner in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(4), 720-728.

Sun, Y., Liu, G., Li, Z., Chen, Y., Liu, Y., Liu, B. & Su, Z. (2013). Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Immunology*, *138*(4), 370-381.

T

Tavender, T. J., Springate, J. J. & Bulleid, N. J. (2010). Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal*, *29*(24), 4185-4197.

- Taylor, B. C., Zaph, C., Troy, A. E., Du, Y., Guild, K. J., Comeau, M. R. & Artis, D.** (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 655-667.
- Thomas, F., Hehemann, J., Rebuffet, E., Czjzek, M. & Michel, G.** (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2, 93.
- Toet, H., Piedrafita, D. M. & Spithill, T. W.** (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*, 44(12), 915-927.
- Toledo, R., Espert, A., Muñoz-Antoli, C., Marcilla, A., Fried, B. & Esteban, J. G.** (2005). Kinetics of antibodies and antigens in serum of mice experimentally infected with *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*, 91(4), 978-980.
- Toledo, R. & Esteban, J. G.** (2016). An update on human echinostomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(1), 37-45.

- Toledo, R., Esteban, J. G. & Fried, B.** (2012). Current status of food-borne trematode infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(8), 1705-1718.
- Toledo, R.** (1992). Contribución al conocimiento de la morfología, biología y ecología de *Echinoparyphium* sp. aff. *recurvatum* (von Linstow, 1873) (Trematoda: Echinostomatidae) en el Parque Natural de la Albufera de Valencia, España. Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 297 pp.
- Toledo, R.** (2009a). Echinostomes in the definitive host: a model for the study of host-parasite relationships. *The biology of echinostomes* (pp. 89-109). Springer.
- Toledo, R.** (2009b). Immunology and pathology of echinostome infections in the definitive host. *The biology of echinostomes* (pp. 185-206). Springer.
- Toledo, R., Espert, A., Carpena, I., Muñoz-Antoli, C., Fried, B. & Esteban, J.** (2004). The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parasitology Research*, 93(6), 439-444.

- Toledo, R., Esteban, J. & Fried, B.** (2006b). Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Advances in Parasitology*, *63*, 285-365.
- Toledo, R., Esteban, J. & Fried, B.** (2009a). Recent advances in the biology of echinostomes. *Advances in Parasitology*, *69*, 147-204.
- Toledo, R. & Fried, B.** (2005). Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends in Parasitology*, *21*(6), 251-254.
- Toledo, R., Monteagudo, C., Espert, A., Fried, B., Esteban, J. G. & Marcilla, A.** (2006a). *Echinostoma caproni*: intestinal pathology in the golden hamster, a highly compatible host, and the Wistar rat, a less compatible host. *Experimental Parasitology*, *112*(3), 164-171.
- Toledo, R., Muñoz-Antoli, C. & Esteban, J. G.** (2000). The life-cycle of *Echinostoma friedi* n. sp.(Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the 'revolutum' group based on cercarial chaetotaxy. *Systematic Parasitology*, *45*(3), 199-217.
- Towatari, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K. & Katunuma, N.** (1991). Novel epoxysuccinyl peptides A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Letters*, *280*(2), 311-315.

- Townsend, M. J., Fallon, P. G., Matthews, D. J., Jolin, H. E. & McKenzie, A. N.** (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(6), 1069-1076.
- Trelis, M.** (2004). *Echinostoma Friedi* Toledo *et al.*, 2000 (Trematoda: Echinostomatidae): Estudio experimental del binomio miracidio-gasteropodo y caracterización molecular del adulto. Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 247 pp.
- Trelis, M., Galiano, A., Bolado, A., Toledo, R., Marcilla, A. & Bernal, D.** (2016). Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*, 46(12), 799-808.
- Trelis, M., Sotillo, J., Monteagudo, C., Fried, B., Marcilla, A., Esteban, J. G. & Toledo, R.** (2011). *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo cytokine responses in high and low compatible hosts. *Experimental Parasitology*, 127(2), 387-397.
- Tremaroli, V. & Bäckhed, F.** (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249.

Tsai, M., Grimaldeston, M. & Galli, S. J. (2011). Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. *Mast Cell Biology* (pp. 186-211). Springer.

Turner, J., Morrison, P. J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J., Panzer, U., Helmby, H. & Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 210(13), 2951-2965.

U

Urban, J. F., Schopf, L., Morris, S. C., Orekhova, T., Madden, K. B., Betts, C. J., Gamble, H. R., Byrd, C., Donaldson, D. & Else, K. (2000). Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell-and T cell-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 164(4), 2046-2052.

V

- Valanparambil, R. M., Tam, M., Jardim, A., Geary, T. G. & Stevenson, M. M.** (2017). Primary *Heligmosomoides polygyrus bakeri* infection induces myeloid-derived suppressor cells that suppress CD4 Th2 responses and promote chronic infection. *Mucosal Immunology*, 10(1), 238-249.
- Van Den Wollenberg, Arnold L.** (1977). Redundancy analysis an alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika*, 42(2), 207-219.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. & van Sinderen, D.** (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495-548.
- Verbrugghe, P., Waelput, W., Dieriks, B., Waeytens, A., Vandesompele, J. & Cuvelier, C. A.** (2006). Murine M cells express annexin V specifically. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 209(2), 240-249.
- Vercruyse, J., Knox, D. P., Schetters, T. P. & Willadsen, P.** (2004). Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends in Parasitology*, 20(10), 488-492.

Voehringer, D. (2011). Basophils in immune responses against helminths.

Microbes and Infection, 13(11), 881-887.

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221-225.

von Schilde, M., Hörmannspurger, G., Weiher, M., Alpert, C., Hahne, H., Bäuerl, C., van Huynegem, K., Steidler, L., Hrnčir, T. & Pérez-Martínez, G. (2012). Lactocepin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host & Microbe*, 11(4), 387-396.

W

Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. & Espevik, T. (1989).

The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(1), 333-338.

- Wacklin, P., Laurikka, P., Lindfors, K., Collin, P., Salmi, T., Lähdeaho, M., Saavalainen, P., Mäki, M., Mättö, J. & Kurppa, K.** (2014). Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. *American Journal of Gastroenterology*, 109(12), 1933-1941.
- Walford, H. H. & Doherty, T. A.** (2013). STAT6 and lung inflammation. *Jak-Stat*, 2(4), e25301.
- Walk, S. T., Blum, A. M., Ewing, S. A., Weinstock, J. V. & Young, V. B.** (2010). Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(11), 1841-1849.
- Wallner, B. P., Mattaliano, R. J., Hession, C., Cate, R. L., Tizard, R., Sinclair, L. K., Foeller, C., Chow, E. P., Browning, J. L. & Ramachandran, K. L.** (1986). Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A 2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*, 320(6057), 77-81.
- Wang, J.** (2018). Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 531-539.

- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T. & Conlon, M. A.** (2011). Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6718-6721.
- Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlamincx, J., Deforce, D., Jex, A. R., Gasser, R. B. & Geldhof, P.** (2013). Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(10), e2467.
- Watanabe, K., Gilchrist, C. A., Uddin, M. J., Burgess, S. L., Abhyankar, M. M., Moonah, S. N., Noor, Z., Donowitz, J. R., Schneider, B. N. & Arju, T.** (2017). Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. *PLoS Pathogens*, 13(8), e1006513.
- Weatherhead, J. E. & Hotez, P. J.** (2015). *Worm Infections in Children Educational Gaps*
- Weatherhead, J. E., Hotez, P. J. & Mejia, R.** (2017). The global state of helminth control and elimination in children. *Pediatric Clinics*, 64(4), 867-877.

- Webb, R. A., Hoque, T. & Dimas, S.** (2007). Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite Immunology*, 29(1), 11-21.
- Weinstein, M. S. & Fried, B.** (1991). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. *International Journal for Parasitology*, 21(2), 255-257.
- Wells, J. M.** (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. Paper presented at the *Microbial Cell Factories*, 10(1) 1-15.
- White, E. C., Houlden, A., Bancroft, A. J., Hayes, K. S., Goldrick, M., Grencis, R. K. & Roberts, I. S.** (2018). Manipulation of host and parasite microbiotas: Survival strategies during chronic nematode infection. *Science Advances*, 4(3), eaap7399.
- WHO** (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases.
- Wilcoxon, F.** (1992). *Individual comparisons by ranking methods*. Springer.

Wong, S. H., Walker, J. A., Jolin, H. E., Drynan, L. F., Hams, E., Camelo, A., Barlow, J. L., Neill, D. R., Panova, V. & Koch, U. (2012). Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nature Immunology*, 13(3), 229.

Wood, Z. A., Poole, L. B. & Karplus, P. A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300(5619), 650-653.

Woolson, R. F. (2007). Wilcoxon signed-rank test. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*, 1-3.

Worthington, J. J., Klementowicz, J. E., Rahman, S., Czajkowska, B. I., Smedley, C., Waldmann, H., Sparwasser, T., Grecis, R. K. & Travis, M. A. (2013). Loss of the TGF β -activating integrin $\alpha\beta 8$ on dendritic cells protects mice from chronic intestinal parasitic infection via control of type 2 immunity. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003675.

Y

Yanagisawa, R., Warabi, E., Inoue, K., Yanagawa, T., Koike, E., Ichinose, T., Takano, H. & Ishii, T. (2012). Peroxiredoxin I null mice exhibits reduced acute lung inflammation following ozone exposure. *The Journal of Biochemistry*, 152(6), 595-601.

- Yang, Z., Grinchuk, V., Urban Jr, J. F., Bohl, J., Sun, R., Notari, L., Yan, S., Ramalingam, T., Keegan, A. D. & Wynn, T. A.** (2013). Macrophages as IL-25/IL-33-responsive cells play an important role in the induction of type 2 immunity. *PLoS One*, 8(3), e59441.
- Yao, G., Huffman, J. E. & Fried, B.** (1991). The effects of crowding on adults of *Echinostoma caproni* in experimentally infected golden hamsters. *Journal of Helminthology*, 65(4), 248-254.
- Yin, D., Yin, X., Wang, X., Lei, Z., Wang, M., Guo, Y., Aggrey, S. E., Nie, W. & Yuan, J.** (2018). Supplementation of amylase combined with glucoamylase or protease changes intestinal microbiota diversity and benefits for broilers fed a diet of newly harvested corn. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 1-13.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J. & Lee, T. H.** (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *The Journal of Immunology*, 174(12), 8183-8190.

- Yoo, W. G., Kim, D., Ju, J., Cho, P. Y., Im Kim, T., Cho, S., Choi, S., Park, H., Kim, T. & Hong, S.** (2011). Developmental transcriptomic features of the carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(6), e1208.
- Yu, S., Mu, Y., Ao, J. & Chen, X.** (2010). Peroxiredoxin IV regulates pro-inflammatory responses in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and protects against bacterial challenge. *Journal of Proteome Research*, 9(3), 1424-1436.

Z

- Zaiss, M. M., Maslowski, K. M., Mosconi, I., Guenat, N., Marsland, B. J. & Harris, N. L.** (2013). IL-1 β suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003531.
- Zaiss, M. M., Rapin, A., Lebon, L., Dubey, L. K., Mosconi, I., Sarter, K., Piersigilli, A., Menin, L., Walker, A. W. & Rougemont, J.** (2015). The intestinal microbiota contributes to the ability of helminths to modulate allergic inflammation. *Immunity*, 43(5), 998-1010.

- Zaph, C., Du, Y., Saenz, S. A., Nair, M. G., Perrigoue, J. G., Taylor, B. C., Troy, A. E., Kobuley, D. E., Kastelein, R. A. & Cua, D. J.** (2008). Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23–IL-17 axis in the intestine. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2191-2198.
- Zaph, C., Troy, A. E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., Yost, E. A., Gruber, A. D., May, M. J. & Greten, F. R.** (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*, 446(7135), 552-556.
- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. & Georgopoulos, C.** (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annual Review of Microbiology*, 45(1), 301-325.
- Zhang, Y. & Hamburger, A. W.** (2004). Heregulin regulates the ability of the ErbB3-binding protein Ebp1 to bind E2F promoter elements and repress E2F-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26126-26133.
- Zhang, Y., Lu, Y., Zhou, H., Lee, M., Liu, Z., Hassel, B. A. & Hamburger, A. W.** (2008). Alterations in cell growth and signaling in ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) deficient mice. *BMC Cell Biology*, 9(1), 1-12.

- Zhao, A., McDermott, J., Urban, J. F., Gause, W., Madden, K. B., Yeung, K. A., Morris, S. C., Finkelman, F. D. & Shea-Donohue, T. (2003).** Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *The Journal of Immunology*, 171(2), 948-954.
- Zhao, A., Urban Jr, J. F., Anthony, R. M., Sun, R., Stiltz, J., Van Rooijen, N., Wynn, T. A., Gause, W. C. & Shea-Donohue, T. (2008).** Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology*, 135(1), 217-225. e1.
- Zhao, A., Urban, J. F., Sun, R., Stiltz, J., Morimoto, M., Notari, L., Madden, K. B., Yang, Z., Grinchuk, V. & Ramalingam, T. R. (2010).** Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6921-6929.
- Zhao, Y., Oberley, T. D., Chaiswing, L., Lin, S., Epstein, C. J., Huang, T. & Clair, D. S. (2002).** Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene*, 21(24), 3836-3846.

- Zhou, J., Liao, H., Li, S., Zhou, C., Huang, Y., Li, X., Liang, C. & Yu, X.** (2015). Molecular identification, immunolocalization, and characterization of *Clonorchis sinensis* triosephosphate isomerase. *Parasitology Research*, 114(8), 3117-3124.
- Zindl, C. L., Lai, J., Lee, Y. K., Maynard, C. L., Harbour, S. N., Ouyang, W., Chaplin, D. D. & Weaver, C. T.** (2013). IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), 12768-12773.
- Zinsser, V. L., Farnell, E., Dunne, D. W. & Timson, D. J.** (2013). Triose phosphate isomerase from the blood fluke *Schistosoma mansoni*: biochemical characterisation of a potential drug and vaccine target. *FEBS Letters*, 587(21), 3422-3427.