

# Informe final publicable de proyecto

## MECANISMOS MOLECULARES DE LA INMUNIDAD DESARROLLADA DURANTE LA FASCIOSIS BOVINA

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_156295

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2022

**FREIRE GARD, Teresa Inés** (Responsable Técnico - Científico)

**UBIOS GALAIN, Diego Mauricio** (Investigador)

**DA COSTA, Valeria** (Investigador)

**FESTARI CHIARLONE, María Florencia** (Investigador)

**LANDEIRA ESCAMES, Mercedes** (Investigador)

**RIET CORREA, Franklin** (Investigador)

**SARAVIA DE MELO, Anderson** (Investigador)

**CIAPPESONI SCARONE, Carlos Gabriel** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

## Resumen del proyecto

Fasciola hepática, conocido en nuestro país como saguaypé, es un parásito helminto altamente prevalente en Uruguay, y es responsable de grandes pérdidas económicas vinculadas a la producción pecuaria, principalmente a nivel de la producción cárnica y lechera bovina. La problemática de la fasciolosis ha aumentado ya que, además de haberse reportado resistencia parasitaria a las drogas anti-parasitarias, los animales infectados presentan una fuerte inmunoregulación inducida por el parásito. Esto significa que el sistema inmune del animal infectado está atenuado, llevando a su mal funcionamiento. Sin embargo, los protagonistas moleculares implicados en este proceso todavía no se encuentran del todo identificados. En este proyecto profundizamos en el estudio de dos moléculas que median este estado inmunológico de baja reactividad. Además, abordamos procedimientos que nos permiten estudiar si la afectación que causa el parásito al sistema inmune puede impactar negativamente en las defensas preventivas inducidas por vacunas. Para ello, estudiamos y caracterizamos al sistema inmune durante todas las etapas de la infección, en ratones y en bovinos, lo que nos ha permitido confirmar el papel de dos moléculas centrales en el desarrollo de la respuesta inmune y que favorecen la supervivencia del parásito impidiendo su eliminación a través de esta.

**Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Inmunología**

**Palabras clave: fasciolosis / inmunoregulación / vacunas /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Las helmintiasis en animales de producción representan un importante problema socio-económico, ya sea por su implicación en salud pública dado su potencial zoonótico o por las pérdidas productivas que ocasionan en el ganado [1-2]. Estas parasitosis ocasionan una disminución de la producción, aumento de los costos productivos de ganado [1]. Entre los helmintos de mayor prevalencia en bovinos en Uruguay, se encuentra Fasciola hepática [1], también conocido como saguaypé, que ocasiona principalmente pérdidas en la producción cárnica y lechera bovina debido a una disminución de la ganancia de peso y de la fertilidad de los animales infectados, el decomiso de hígados en los frigoríficos o la reducción en la producción de carne, leche, lana, así como también los gastos relacionados al uso de anti-helmínticos [3-8]. Se estima que anualmente más de 700 millones de animales dentro del stock ganadero global corren riesgo de infección, y genera pérdidas anuales calculadas en 3.2 billones de dólares [7, 9-10]. En los últimos 10 años se evidenció un aumento de la prevalencia y distribución de la fasciolosis en Uruguay. Datos del 2018 demuestran que F. hepática se encuentra distribuida en todo el territorio uruguayo, con una prevalencia que asciende al 38% [11] y se asocia a un menor peso, menor índice de grasa y de calidad de carcasa lo que demuestra el claro impacto de este trematodo en la producción cárnica nacional.

Estudios en las últimas dos décadas sobre la inmunidad contra F. hepática desarrollada por el hospedero infectado, han llevado a conocer los sofisticados mecanismos de modulación (“manipulación”) inmunológica que induce el parásito en su beneficio, lo cual genera el desarrollo de una respuesta inmune ineficiente contra el propio parásito, o, incluso, contra otros patógenos [12-15]. De hecho, se ha reportado que la infección por F. hepática aumenta la susceptibilidad a contraer otras enfermedades infecciosas secundarias, como Mycobacterium bovis, Salmonella dublin, Clostridium haemolyticum y Clostridium novy [12-16].

Los mecanismos inmunomoduladores que utiliza el parásito han sido descritos gracias a la utilización de modelos animales experimentales, principalmente en ratón [17-24], e incluyen el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 con un gran componente regulador (Th2/Treg) y la presencia de citoquinas inmunosupresoras (como IL-10, TGFβ) [17,19-20,22-23,25-31]. Esto se encuentra asociado a la producción de anticuerpos ineficaces, al incremento de células

T reguladoras, la activación alternativa de macrófagos así como la modulación de la activación y función de células dendríticas, esenciales en la activación de la respuesta inmune adaptativa la cual activa linfocitos específicos de moléculas parasitarias [17,19-20,22-23,25-31]. Además, otros trabajos han reportado que la inmunidad Th2/Treg no es efectiva para combatir al parásito, mientras que las respuestas de tipo Th1 estarían asociadas con una mayor resistencia a la infección [32].

En hospederos naturales, como el ganado, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que utiliza el parásito para modular la respuesta inmune del hospedero son precarios. En este contexto se consideran valiosos los abordajes que permitan

identificar moléculas claves en el hospedero que medien la inmunomodulación dirigida por el parásito, y que eventualmente puedan ser utilizadas como elementos para el diagnóstico, o mejor aún, para la prevención o tratamiento de la fasciolosis bovina. Las propiedades inmunoregulatoras de *F. hepática* [12, 33-36], nos conducen a preguntarnos si el parásito puede también afectar la respuesta inmune contra otros patógenos inducidas por diferentes vacunas, algunas de las cuales son obligatorias en nuestro país. Una de las propiedades características de las vacunas es su capacidad de desarrollar de memoria inmunitaria, por lo tanto, buscamos analizar si las respuestas inmunes de memoria generadas por la vacunación se ven afectadas durante la fasciolosis bovina. Esto es de suma importancia, ya que podría comprometer el estado sanitario de los bovinos de producción.

Este proyecto conjuga dos grandes objetivos generales que giran en torno a la inmunidad de bovinos infectados con el parásito trematodo *F. hepática*: i) Determinar el papel inmunoregulator de moléculas expresadas en las células inmunes del hospedero bovino y ii) Analizar si la infección por *F. hepática* atenúa la inmunidad humoral y celular de memoria desencadenada con la vacunación contra otros patógenos. De esta forma, el primer objetivo general se centra en identificar blancos moleculares en el hospedero bovino que podrían bloquearse para prevenir o tratar la fasciolosis bovina, mientras que el segundo objetivo general busca determinar si la fasciolosis bovina puede aumentar la susceptibilidad a infecciones por otros patógenos en bovinos vacunados antes o después de la infección.

Durante este proyecto, y con tales objetivos, hemos estudiado el sistema inmune en animales infectados experimentales con el parásito (ratones y bovinos) para poder identificar la función de determinadas moléculas inmunoregulatoras y para poder caracterizar la respuesta inmune en el bovino infectado. Por otro lado, hemos puesto a punto técnicas moleculares y celulares que permiten el estudio del sistema inmune bovino, así como la respuesta inmune inducida por vacunas.

### **Metodología/Diseño del estudio**

El modelo murino de infección fue seleccionado por permitirnos un mayor conocimiento de la respuesta inmune, así como por contar con estrategias que nos permitieron modular la función de determinadas moléculas. Principalmente hemos trabajado con la molécula inmunoregulatora y antioxidante hemoxigenasa-1 a través de la inducción e inhibición farmacológica, en condiciones experimentales puestas a punto por nuestro equipo de investigación. Por otro lado, hemos trabajado con animales transgénicos a los cuales se les puede depletar las células que expresan el receptor MGL y por lo tanto evaluar la situación inmunológica en su presencia o ausencia.

La gravedad provocada por la infección fue cuantificada a través de la determinación de los signos clínicos. La expresión de moléculas y células fue analizada por citometría de flujo utilizando suspensiones celulares provenientes de animales infectados y controles.

Para profundizar en el estudio de la infección aguda y crónica y en el bovino, realizamos infestaciones experimentales en novillos Angus, parte de los cuales fueron tratados con el anti-helmíntico triclabendazole. Se obtuvieron muestras biológicas de estos animales por aproximadamente 9 meses, las cuales fueron procesadas y estudiadas posteriormente para:

- 1) Análisis de carga parasitaria
- 2) Análisis sanguíneo por hemograma completo
- 3) Recuento diferencial de leucocitos en sangre
- 4) Análisis del metabolismo y daño hepático
- 5) Análisis de la respuesta inmune específica contra *F. hepática*

Determinamos el título de anticuerpos específicos contra el parásito (respuesta humoral específica) y cuantificamos las citoquinas presentes en circulación IFN $\gamma$  (Th1), IL-4 (Th2) e IL-10 (Treg) y producidas por células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) estimuladas con antígenos parasitarios (respuesta inmune celular específica).

Para el estudio de la respuesta inmune inducida por vacunas, se consideró que los animales fueron vacunados contra el virus de la fiebre aftosa, clostridios, queratoconjuntivitis, y contra infecciones virales y bacterianas respiratorias. Se pusieron a punto algunas técnicas necesarias para medir respuestas específicas a estos patógenos

### **Resultados, análisis y discusión**

Los resultados que mostraremos forman parte de la tesis doctoral de la M $\acute{a}$ g. Monique Costa, que va a ser defendida el año que viene. Los resultados obtenidos han sido publicados durante la ejecución de este proyecto, los cuales se adjuntan como documentos accesorios.

1) Antioxidants (Basel). 2021 doi: 10.3390/antiox10121938.

Heme-Oxygenase-1 Attenuates Oxidative Functions of Antigen Presenting Cells and Promotes Regulatory T Cell Differentiation during *Fasciola hepatica* Infection

En este trabajo mostramos que la molécula inmunoreguladora hemoxigenasa-1 aumenta durante la infección parasitaria en murinos y se expresa en células inmunológicas que permiten la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. La expresión de la hemoxinasa se asocio con la presencia de Tregs, indicando que podría estar vinculada con el desencadenamiento de la respuesta inmune reguladora desde los inicios de la infección. Al inhibir la hemoxigenasa, su capacidad reguladora disminuye y los ratones poseen menos daño hepático y signos clínicos., indicando su papel fundamental en el establecimiento de la infección parasitaria.

2) Sci Rep. 2022 Oct 21;12(1):17661. doi: 10.1038/s41598-022-21520-w.

Macrophage Gal/GalNAc lectin 2 (MGL2)+ peritoneal antigen presenting cells during *Fasciola hepatica* infection are essential for regulatory T cell induction

Para estudiar la función de la molécula MGL en la inmunoregulación, utilizamos ratones transgénicos a los cuales se les puede depletar las células que expresen MGL. Al hacerlo, encontramos menores signos clínicos asociados a la infección y menores niveles de linfocitos T reguladores, indicando la clara función inmunoreguladora de estas células, que a su vez expresan otras moléculas reguladoras.

3) Exp Parasitol. 2022 Jul;238:108285. doi: 10.1016/j.exppara.2022.108285

Liver function markers and haematological dynamics during acute and chronic phases of experimental *Fasciola hepatica* infection in cattle treated with triclabendazole.

En los bovinos infectados pudimos analizar los marcadores funcionales hepáticos e hematológicos durante la fase aguda y crónica experimental y a su vez compararla con el tratamiento de elección utilizando el triclabendazole. Mostramos que hay una aumento abrupto de la aspartato aminotransferase y gammaglytamytransferreas (enzimas funcionales hepáticas). Más adelante en la infección los eosinófilos aumentaron y se correlacionaron significativamente con la carga parasitaria encontrada. Un resultado inesperado fue que el tratamiento con Triclabendazole no pudo remover completamente los parásitos, poniendo en riesgo el tratatamiento de la fasciolosis.

4) Estudio de la respuesta inmune humoral y celular.

Hemos analizado la respuesta inmune celular, encontrando que luego en la etapa crónica hay un predominio de citoquinas inmunoreguladoras en relación al control. Además, vimos que los ganglios, hígados y bazos de los animales infectados presentaron menor capacidad de producir citoquinas con respecto a los animales control. Por otro lado, hemos sido capaces de establecer técnicas que permitan el estudio de los anticuerpos específicos durante la fasciolosis, encontrando un pico agudo alrededor de los 40 días post-infección y un descenso abrupto durante el estadio crónico, lo cual coincide con la etapa donde el parásito vive en los conductos biliares.

## Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo nos ha permitido acercarnos al conocimiento de las moléculas y células implicadas en la regulación inmune durante la infección parasitaria. A pesar de que todavía no tenemos los resultados finales que nos podrán permitir dilucidar como la inmunoregulación influye en la inmunidad inducida por vacunas, nos encontramos actualmente en condiciones de poder continuar y profundizar. Ya tenemos en nuestra posesión los principios activos de alguna de las vacunas de interés. También estamos incorporando las técnicas de medición de la respuesta inmune humoral contra la fiebre aftosa, una vacuna de uso obligatorio en este país. Estamos convencidos que este proyecto ha sido clave no solamente en la generación de conocimiento científico de vanguardia, sino además en la formación de recursos humanos y establecimiento de colaboradores.

## Referencias bibliográficas

1. Villa-Mancera, A. and A. Reynoso-Palomar, *Acta Trop*, 2019. 193: p. 169-175.
2. Webb, C.M. and M.M. Cabada, *Curr Opin Infect Dis*, 2018. 31(5): p. 409-414.
3. Arbabi, M., et al., *Vet World*, 2018. 11(12): p. 1648-1655.
4. Ashrafi, K., et al., *Travel Med Infect Dis*, 2014. 12(6 Pt A): p. 636-49.
5. El-Tahawy, A.S., E.K. Bazh, and R.E. Khalafalla, *Vet World*, 2017. 10(10): p. 1241-1249.
6. Howell, A., et al., *Prev Vet Med*, 2015. 121(1-2): p. 41-8.
7. Happich, F.A. and J.C. Boray, *Aust Vet J*, 1969. 45(7): p. 329-31.
8. Sargison, N.D. and P.R. Scott, *Vet Rec*, 2011. 168(6): p. 159.
9. Mazeri, S., et al., *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 7319.
10. Molento, M.B., et al., *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 2018. 12: p. 1-3.
11. da Costa, R., Tesis de Maestría en Salud Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 2019.
12. Byrne, A.W., et al., *Transbound Emerg Dis*, 2019. 66(2): p. 785-796.
13. Garza-Cuartero, L., et al., *Vet Pathol*, 2014. 51(2): p. 385-92.
14. Howell, A.K., et al., *Prev Vet Med*, 2018. 150: p. 70-76.
15. Naranjo Lucena, A., et al., *Vet J*, 2017. 222: p. 9-16.
16. Rahman, A., et al., *Parasit Vectors*, 2017. 10(1): p. 228.
17. Alvarado, R., et al., *FASEB J*, 2017. 31(1): p. 85-95.
18. Carasi, P., et al., *Front Immunol*, 2017. 8: p. 883.
19. Guasconi, L., et al., *Immunobiology*, 2018. 223(12): p. 834-838.
20. Guasconi, L., L.S. Chiapello, and D.T. Masih, *Immunobiology*, 2015. 220(7): p. 934-9.
21. Noya, V., et al., *Parasitol Res*, 2016. 115(3): p. 1053-63.
22. Noya, V., et al., *Sci Rep*, 2017. 7: p. 40615.
23. Rodriguez, E., et al., *Front Immunol*, 2017. 8: p. 264.
24. Rodriguez, E., et al., *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. 9(12): p. e0004234.
25. Aldridge, A. and S.M. O'Neill, *Eur J Immunol*, 2016. 46(5): p. 1180-92.
26. Dalton, J.P., et al., *Vet Parasitol*, 2013. 195(3-4): p. 272-85.
27. Falcon, C.R., et al., *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e114505.
28. Finlay, C.M., et al., *Parasite Immunol*, 2017. 39(10).
29. Harn, D.A., et al., *Immunol Rev*, 2009. 230(1): p. 247-57.
30. Musah-Eroje, M. and R.J. Flynn, *Curr Opin Microbiol*, 2018. 46: p. 80-85.
31. Rodriguez, E., et al., *Sci Rep*, 2017. 7: p. 46748.
32. Baska, P., et al., *Acta Parasitol*, 2013. 58(4): p. 453-62.
33. *Vet Rec*, 2012. 170(21): p. 530.
34. Byrne, A.W., et al., *Transbound Emerg Dis*, 2019.
35. Claridge, J., et al., *Nat Commun*, 2012. 3: p. 853.
36. Jones, T.O., *Vet Rec*, 2012. 170(24): p. 630.
37. Rodriguez, E., et al., *Enzyme Microb Technol*, 2018. 117: p. 45-55.
38. Garcia, E.P., et al., *Int J Oncol*, 2016. 48(5): p. 2113-23.
39. Ubillos, L., et al., *Int J Cancer*, 2016. 138(7): p. 1719-31.
40. Frigerio, S., Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA., 2019.
41. Escribano, C., Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA., 2019.
42. Mulcahy, G., et al., *Vaccine*, 1998. 16(9-10): p. 932-9.
43. Sanchez-Vazquez, M.J. and F.I. Lewis, *Vet Parasitol*, 2013. 193(1-3): p. 307-11.
44. Agropecuario, P., Montes Narbondo, Eds. <https://www.planagropecuario.org.uy>, 2019.
45. Copola, B., Bienestar y Salud animal. <https://www.planagropecuario.org.uy>, 2019.
46. Cesar, D., Bienestar y Salud animal. <https://www.planagropecuario.org.uy>, 2019.
47. Macchiaroli, M., H.A. Morena, and S.M. Estein, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/523/MACCHIAROLI%2C%20MARTIN.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, 2016.

48. Carreto, L., [https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R84/R84\\_25.htm](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R84/R84_25.htm), 2016.
49. Mederos, A. and G. Pigurina, <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/tb/pol/2002/informe-1.pdf>, 2016.
50. Alcaraz, M.J., P. Fernandez, and M.I. Guillen, *Curr Pharm Des*, 2003. 9(30): p. 2541-51.
51. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Transl Res*, 2016. 167(1): p. 7-34.
52. Sass, G., et al., *Hepatology*, 2003. 38(4): p. 909-18.
53. Soares, M.P. and F.H. Bach, *Trends Mol Med*, 2009. 15(2): p. 50-8.
54. Soares, M.P., et al., *Curr Opin Pharmacol*, 2009. 9(4): p. 482-9.
55. Araujo, E.C., et al., *Vet Res*, 2013. 44: p. 89.
56. Epiphanyo, S., et al., *Cell Host Microbe*, 2008. 3(5): p. 331-8.
57. Iborra, S. and D. Sancho, *Immunobiology*, 2015. 220(2): p. 175-84.
58. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 491-529.
59. Happich, F.A. and J.C. Boray, *Aust Vet J*, 1969. 45(7): p. 326-8.
60. Fiel, C.A., et al., *Vet Parasitol*, 2012. 187(1-2): p. 217-26.
61. Guzman, E., et al., *J Immunol*, 2014. 193(1): p. 208-22.
62. Fecher, P., et al., *Cells*, 2018. 7(6).
63. Konforte, D., N. Simard, and C.J. Paige, *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 1781-7.
64. Benallaoua, M., et al., *Arthritis Rheum*, 2007. 56(8): p. 2585-94.
65. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Curr Drug Targets*, 2010. 11(12): p. 1485-94.

## **Licenciamiento**

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