

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**DISBIOSIS INTESTINAL PRODUCIDA POR
EXCRETADO-SECRETADO DE *FASCIOLA HEPATICA*,
INDEPENDIENTE DE ÁCIDOS BILIARES**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTORA:

MARIA CAROLINA ORTIZ CÁCERES

ASESOR:

MSc. EDUARDO GUSHIKEN IBAÑEZ

LIMA - PERÚ

2021

Tabla de contenidos

Resumen	3
Abstract	4
Estado del arte	6
1. Generalidades sobre <i>F. hepatica</i> y fasciolosis	6
1.1. Ciclo de vida	6
1.2. Infección	6
1.2.1. Fase aguda	7
1.2.2. Fase crónica	7
1.2.3. Rol del E/S durante la infección	8
2. Mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune	8
2.1. Inhibición de respuesta adaptativa: Células dendríticas y T helper	9
2.2. Inhibición de respuesta innata: inflammasoma, citoquinas pro inflamatorias	10
2.3. Efectos fuera del hígado	11
3. Homeostasis y microbiota	12
3.1. Rol de microbiota en homeostasis inmunológica intestinal	12
3.2. Eje hígado-intestino-microbiota	13
4. Afecciones hepáticas y disbiosis	14
4.1. Asociación de afecciones con fasciolosis	14
4.2. Disbiosis generada por afecciones	14
4.3. Alteración de componentes de ácidos biliares	16
4.4. Infección por otros helmintos	17
Problema de investigación	18
Estrategia de abordaje	21
Referencias	23

Resumen

Fasciolosis es una enfermedad causada por *Fasciola hepatica*, un parásito globalmente distribuido. El helminto ingresa a través del sistema digestivo y se aloja en los conductos biliares. En fase crónica, la infección produce afecciones hepáticas.

El parásito puede residir en el hígado por décadas, pues ha generado mecanismos para evadir al sistema inmune del hospedero. Por ejemplo, productos de su excretado/secretado (E/S) inhiben la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas, la activación de células T y respuestas proinflamatorias. Esto sugeriría que el parásito influye sobre diferentes órganos mediante la liberación del E/S al sistema circulatorio. En ese sentido, el eje hígado-intestino-microbiota podría alterarse si es que un patógeno puede modular la respuesta inmune del intestino.

No obstante, se ha determinado que afecciones hepáticas como cirrosis y hepatocarcinoma - ambas consecuencias de fasciolosis - generan disbiosis intestinal debido al cambio en la composición de los ácidos biliares, un importante regulador de la microbiota. Sin embargo, se desconoce si el E/S de *F. hepatica* puede alterar la microbiota intestinal.

Dado que el E/S de *F. hepatica* tiene un efecto sistémico, es probable que esta modulación también ocurra a nivel intestinal, pues se ha demostrado que sus componentes, que modulan la respuesta inmune, se transportan por el torrente sanguíneo y conductos biliares hasta el intestino. Asimismo, otros helmintos intestinales pueden afectar la microbiota mediante su E/S. Por ello, el presente

trabajo analizará la capacidad del E/S de *F. hepatica* de generar disbiosis, independiente del efecto de ácidos biliares.

Para confirmar que la alteración en la abundancia y composición de la microbiota intestinal se debería al transporte del E/S por el sistema circulatorio, se proponen dos aproximaciones: primero, inyectar E/S de *F. hepatica* en ratones por un periodo determinado, y analizar el contenido fecal para determinar la composición de la microbiota intestinal antes y después de la inyección. Asimismo, para aislar el efecto de la liberación de E/S al torrente sanguíneo durante una infección *in vivo* de otros efectos locales o sistémicos, se propone evaluar el cambio en la microbiota a partir de un sistema parabionte con ratones infectados y no infectados.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, microbiota intestinal, ácidos biliares, modulación inmunológica.

Abstract

Fascioliasis is a disease caused by *Fasciola hepatica*, a globally distributed parasite. The helminth enters through the digestive system and settles in the bile ducts. In the chronic phase, the infection causes liver disease.

The parasite can reside in the liver for decades, as it has generated mechanisms to evade the host immune system. For example, its excretory-secretory products (ESPs) inhibit the antigen-presenting capacity of dendritic cells, T-cell activation and proinflammatory responses. This would suggest that the parasite influences different organs through the release of ESPs into the circulatory system. In that

sense, the liver-gut-microbiota axis might be altered if a pathogen can modulate the gut immune response.

However, it has been determined that liver conditions such as cirrhosis and hepatocarcinoma - both consequences of fascioliasis - generate intestinal dysbiosis due to a change in the composition of bile acids, an important microbiota regulator. However, it is unknown whether or how *F. hepatica* ESPs can alter the intestinal microbiota.

Since *F. hepatica* ESPs have a systemic effect, it is likely that this modulation also occurs at the intestinal level, as its components, that have been shown to modulate the immune response, are transported through the bloodstream and bile ducts to the intestine. Likewise, other intestinal helminths can affect the microbiota by means of their ESPs. Therefore, the present work will analyze the ability of *F. hepatica* ESPs to generate dysbiosis, independent of the effect of bile acids.

To confirm that both the alteration in the abundance and composition of the gut microbiota are explained, at least partially, by the transport of the ESPs through the circulatory system, two approaches are proposed: first, to inject *F. hepatica* ESPs into mice for a given period, and to analyze the fecal contents to determine the gut microbiota composition before and after injection. In addition, to isolate the effect of ESPs release into the bloodstream during an *in vivo* infection from other local or systemic effects, we propose to evaluate the change in the microbiota using a parabiotic system with infected and uninfected mice.

Keywords: *Fasciola hepatica*, gut microbiota, bile acids, immunomodulation.

1. Estado del arte

Generalidades sobre *F. hepatica* y fasciolosis

Fasciolosis es una enfermedad infecciosa causada por el parásito *Fasciola hepatica* que invade al tejido hepático. Esta enfermedad se caracteriza por una fase aguda, en la que el parásito juvenil se moviliza hacia el hígado, y una fase crónica, etapa en la que se establece en los conductos biliares y alcanza la madurez sexual (1).

F. hepatica posee un ciclo de vida complejo, pues presenta varios estadios de desarrollo, un hospedero intermediario y un hospedero final. Se estima que en total el ciclo puede durar entre 14 a 23 semanas. Cuando un hospedero final, como un mamífero herbívoro o un humano, se encuentra infectado, este libera huevos del parásito adulto a través de las heces. En el exterior, estímulos ambientales, como temperatura, humedad y luz, inducen la eclosión del huevo e ingreso al estadio de miracidia (1,2). La miracidia penetra el tejido de especies gastrópodos del género *Lymnaeidae*, donde pasará por los estadios de esporozoito, redia y cercaria; fases en donde se divide clonalmente. Después de 4 a 7 semanas, la cercaria es expulsada del vector, convirtiéndose temporalmente en un parásito de vida libre acuático. Si la cercaria encuentra alguna superficie sólida -como la de una planta-, se adherirá y enquistará, entrando prontamente a la fase infectiva o de metacercaria (1,2).

Durante este estadio, el parásito puede permanecer viable por meses y es capaz de ingresar a su hospedero pasivamente, ya sea mediante la ingesta de agua

contaminada, consumiendo vegetales mal lavados o carne infectada mal cocida (2).

Una vez que la metacercaria ingrese al hospedero final empezará la fase aguda de la enfermedad, en la cual se movilizará en dirección al hígado. Tras la ingestión, el parásito en estadio larval sigue la vía del sistema digestivo, donde las proteasas ácidas del estómago digieren parcialmente la pared del quiste y las condiciones en el duodeno favorecen la liberación de los gusanos juveniles. Estos últimos atraviesan la pared duodenal e ingresan a la cavidad peritoneal para llegar desde el intestino al hígado; es ahí donde invaden y dañan la cápsula y parénquima hepáticos por alrededor de 5 a 6 semanas, causando los síntomas más habituales: fiebre, dolor abdominal, hepatomegalia, hipereosinofilia, anemia e incluso, afecciones respiratorias. La migración de los gusanos juveniles también puede inducir fibrosis, la cual, al igual que los síntomas, puede desarrollarse de 2 a 4 meses (1,2).

A partir de la 7ma-8va semana post-infección, se desarrolla la fase crónica de la enfermedad, en la cual los juveniles se establecen en los conductos biliares; donde adquirirán la madurez sexual y comenzarán a oviponer. En esta nueva fase, el hospedero desarrolla colangitis, colecistitis y la vesícula biliar junto con los ductos biliares se dilatan y engrosan. Estos dos últimos órganos especialmente, en presencia de los parásitos adultos, se obstruyen y producen cólicos biliares. Además, se ha documentado que durante la fase crónica se favorece, a su vez, el desarrollo de coinfecciones y afecciones hepáticas agravadas (1).

El proceso de invasión y establecimiento del parásito no sería posible sin la acción que desempeña el excretado-secretado (E/S), compuesto por un conjunto de proteínas y carbohidratos, que contribuye con el proceso de invasión a tejidos. Debido a que *F. hepatica* es un parásito hematófago y, por lo tanto, se encuentra en contacto directo con la sangre del hospedero final, este libera sus productos en el torrente sanguíneo, los cuales participan en la evasión y modulación de la respuesta inmune del hospedero (3). Interesantemente, se ha demostrado que los secretomas del estadio juvenil y del estadio adulto presentan diferente composición (3). Esto podría deberse a las distintas necesidades que se deben satisfacer en cada etapa de crecimiento.

Mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune

Durante la activación de la respuesta inmune, la respuesta adaptativa mediada por células T, las células T colaboradoras (Th por sus siglas en inglés T helper) juegan un papel importante. Estas estimulan distintas células del sistema inmune, regulando su polarización, replicación y respuesta ante diferentes estímulos (como la presencia de un parásito). Existen diferentes tipos de respuestas Th, las más estudiadas, Th1 y Th2, estimulan una respuesta necesaria para eliminar infecciones bacterianas intracelulares y parásitos extracelulares, respectivamente. Asimismo, la respuesta T-reguladora (Treg) permite la no eliminación (total o parcial) del agente activador de la respuesta inmune, en muchos casos generando un estado de tolerancia. Como es de esperar, más de una respuesta Th puede activarse al mismo tiempo para mantener la homeostasis inmunológica de los

tejidos involucrados. Esta se puede ver alterada por algún evento determinado (por ejemplo, una infección o reparación de tejidos) (3,4).

Durante la infección por *F. hepatica*, la regulación de la respuesta inmune por parte de las células Th también juega un rol importante. El éxito en la supervivencia del parásito dentro del hospedero radica en el desarrollo de diferentes mecanismos de evasión y control de la respuesta inmune innata y adaptativa (3).

Se sabe que, durante la fase aguda, el parásito en estadio juvenil puede inducir una fuerte respuesta inmune Th2; a medida que progresa la infección, las respuestas Th2 y Treg son exacerbadas. Por otro lado, en la fase crónica, las respuestas Th1 y Th2 se suprimen y se induce sólo una respuesta tolerogénica (3,5). De esta manera, el parásito modula la respuesta inmune adaptativa del hospedero.

La capacidad de *F. hepatica* de modular la respuesta inmune se refleja a través de la actividad de inmunomoduladores secretados. Varios estudios indican que células presentadoras de antígenos pueden ser afectadas por el E/S de *F. hepatica* y, con ello, generar cambios en la activación células T (6-8). De acuerdo con estudios hechos en ratones, se observó que los componentes del E/S -proteínas de bajo peso molecular y glicanos- pueden inhibir la maduración de células dendríticas (CDs) estimulada por diferentes patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (6-8); en consecuencia, la secreción de diferentes citoquinas para la diferenciación de células T y la capacidad de presentación de antígenos de

las CDs fueron suprimidas y/o alteradas en presencia de estos componentes. Sobre la activación de células T, se encontró que proteínas de bajo peso molecular presentes en el E/S de *F. hepatica* eran las responsables de establecer diferenciación tolerogénica dependiente de IL-27 secretada por CDs, previamente estimuladas con LPS (8); es decir, una vez que las CDs han sido activadas, el E/S es capaz de reprogramarlas a un fenotipo tolerogénico. Asimismo, en otro estudio se observó que en macrófagos peritoneales de ratones BALB incubados con E/S, también se redujo la capacidad de presentación de antígenos, y, en cambio, produjo anergia en células T colaboradoras, modulada por el receptor de reconocimiento de patrones (PPR por sus siglas en inglés Pattern Recognition Receptor) Dectin-1 (9). Finalmente, *F. hepatica* también puede evadir la respuesta inmune adaptativa mediante la liberación de la proteasa Catepsina L1, presente en el E/S (5). En experimentos *in vitro*, se ha observado que esta proteasa puede clivar la región bisagra de anticuerpos (5) potencialmente evitando una respuesta celular citotóxica mediada por anticuerpos; y evitar la proliferación de linfocitos T clivando el receptor CD4 (5).

Por otro lado, también se ha observado que el E/S de *F. hepatica* puede modular la inmunidad innata. Esto se logra a partir de un grupo de proteínas denominado moléculas de defensa del helminto o HDMs, las cuales tienen estructura similar a las moléculas del hospedero, permiten al parásito mimetizarse y no ser reconocido por el sistema inmune, así como controlar algunas funciones inmunológicas del organismo (10). Por ejemplo, se ha observado *in vitro*, que la proteína FdHDM-1 de *F. hepatica* es capaz de inhibir la señalización del complejo inflamasoma - principal regulador post-traducciona l de la citoquina proinflamatoria IL-1 β - en

macrófagos activados por LPS (10-12), es decir afecta la respuesta Th1 inducida por LPS en macrófagos al evitar la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β . Otro estudio indicó que la proteína de tipo HDM Fh15, es capaz de reducir el impacto de las tormentas de citoquinas como IL-6, TNF- α , e IFN- γ ; evitando la activación de macrófagos *in vivo* en ratones tratados con LPS (13). Un tercer estudio demostró que la glutatión-S-transferasa de *F. hepatica* (nFhGST) también puede reducir la inflamación mediada por LPS y suprimir la activación de la vía de NF- $\kappa\beta$, vía de señalización que se activa en presencia de diferentes PAMPs (14). Un ejemplo final de la actividad inmunomoduladora del parásito es mediante la excreción de FhTLM, una proteína que presenta una estructura similar a TGF- β de mamífero, que es altamente expresada por juveniles y desempeñaría una función antiinflamatoria en el hospedero durante esta etapa, evitando así su eliminación (5). Estos ejemplos demuestran cómo factores liberados por *F. hepatica* pueden afectar la señalización celular, disminuyendo la actividad pro-inflamatoria, lo que probablemente favorezca su establecimiento y reproducción en el tejido infectado.

Interesantemente, otras investigaciones han demostrado que el efecto inmunosupresor del parásito puede extenderse incluso a áreas alejadas del foco de infección. Por ejemplo, se ha observado que, en células del bazo, la infección de *F. hepatica* suprime la respuesta inmune Th1, dependiente de IL-4, mediante un tipo de catepsina L, lo que favorece la persistencia de coinfecciones bacterianas como *Bordetella pertussis*, bacteria causante de la tos ferina y que afecta al sistema respiratorio (15,16). De igual forma, la infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino, sería favorecida por la coinfección de *F. hepatica*, según

lo revisado en tejido pulmonar de animales infectados (17). Estas evidencias sugieren que debe haber alguna vía de comunicación y transporte que permita una modulación inmunológica a nivel sistémico.

Homeostasis y microbiota

Un importante punto de regulación de la homeostasis inmunitaria se encuentra a nivel del tracto intestinal. La microbiota gastrointestinal engloba al ecosistema microbiano establecido en el colon, el cual evolutivamente ha desarrollado una relación simbiótica con el hospedero (18,19). Se ha comprobado que un balance en la composición de microorganismos proporciona diversos beneficios para la salud y puede ser afectado por factores ambientales y genéticos (18). Por otra parte, una mala alimentación o una patología, pueden generar disbiosis, es decir, un desbalance en la composición y/o abundancia de la flora intestinal, lo que hace más vulnerable al hospedero a contraer enfermedades (18,19).

Anteriores estudios han demostrado que esta interacción microbiota intestinal-humano impactaría también en la respuesta inmune del hospedero (18-20). Esto es mediado por la generación de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), producidos por géneros bacterianos comensales tales como *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcaceae* y *Eubacterium* (19,20). Según el estudio de Smith et al., se demostró que la adición de tres SCFAs - acetato, butirato y propionato - a la dieta de murinos libres de gérmenes restauró la cantidad de células T reguladoras colónicas y contribuyó a su protección contra el desarrollo de colitis (21). Asimismo, el estudio de Fukuda et al. evidenció que el

género *Bifidobacterium* incrementa la defensa intestinal mediante la producción de acetato en ratones infectados con una bacteria enterohemorrágica (22). Por otra parte, se ha visto la participación de los SCFAs en la activación de un mecanismo que induce la transcripción de genes asociados a inmunidad: el metabolito butirato favorece la transcripción de genes de la producción de mucus, fortaleciendo así la barrera innata. Otras estrategias de protección mediadas por la microbiota incluyen la síntesis de moléculas bactericidas y competencia entre bacterias comensales y patógenas por nichos, en un proceso llamado resistencia a colonización (19,20).

La microbiota intestinal también puede ejercer un rol en la actividad del hígado por medio del eje hígado-intestino. Ya que ambos órganos están conectados a través de los conductos biliares, la vena porta y por el sistema circulatorio, existe una comunicación constante y bidireccional. Una de las vías involucra el transporte de productos de digestión, los cuales ingresan primero por el intestino; luego, los nutrientes son absorbidos por el epitelio intestinal y posteriormente se transportan mediante la vena porta hacia al hígado, donde finalmente serán metabolizados, almacenados o distribuidos (23,24). De igual manera, desde el hígado se liberan principalmente ácidos biliares, que son metabolizados por la microbiota y generan un efecto antimicrobiano y protector tanto en el intestino como cuando retorna al hígado (24,19). Estos productos, así como otras moléculas resultantes de la fermentación y digestión realizada por la microbiota, también pueden modular elementos en el hígado. No obstante, es posible que algunos organismos se movilicen desde el intestino hasta el hígado, a través de la vena porta. Sin embargo, el hígado ha desarrollado, de forma evolutiva, respuestas

inmunológicas innatas y adaptativas locales que evitan el ingreso de organismos patógenos y, por ende, el desarrollo de futuras afecciones hepáticas (23,25).

Afecciones hepáticas y disbiosis

En el caso de fasciolosis, se ha documentado la asociación entre las fases invasivas del parásito y la generación de afecciones hepáticas. Una de ellas es fibrosis, la cual es relacionada frecuentemente con el daño hepático producido por *F. hepatica*; el daño en el tejido activa a las células estrelladas humanas del hígado (HSCs), favoreciendo la expresión de genes relacionados a fibrosis, como genes de colágeno I y alfa-actina de músculo liso, entre otros (25,26). Otra afección asociada es cirrosis hepática, considerada una condición posterior a fibrosis y que en estudios anteriores *in vivo* se ha visto presente en casos de animales y humanos con fasciolosis (26). Como última condición, se presenta al carcinoma hepatocelular (HCC). A diferencia de los otros casos, ha sido menos reportado en fasciolosis; sin embargo, la modulación de la respuesta inmune generada por el parásito también podría activar vías de proliferación, como el sistema pleiotrópico de TGF- β (5,26). Sin embargo, aún se requiere mayor información sobre su asociación con cáncer en humanos.

A su vez, se ha reportado que las patologías hepáticas se asocian a procesos de disbiosis intestinal (19,26). Es posible que esta relación se deba a una mayor permeabilidad del intestino, acompañado de un mal funcionamiento del hígado -posiblemente por daño en el tejido hepático-, lo que impide que este órgano controle la presencia de individuos patógenos en la microbiota y, por tanto, se

genere un desbalance en la misma (19,27). En el caso de fibrosis y eventual cirrosis hepática, estudios señalan el incremento de géneros bacterianos generalmente considerados patogénicos y la reducción de especies comensales en la microbiota intestinal (27,28).

Esto se debería, al menos en parte, a la baja producción de ácidos biliares bacteriostáticos (27,28), los cuales generan inmunosupresión, favoreciendo la continuidad de la disbiosis. A su vez, la deficiencia en el funcionamiento del hígado contribuiría al enlentecimiento de la movilidad gastrointestinal, lo que favorece la mayor disponibilidad de nutrientes a la microbiota y, con ello, estimula el crecimiento excesivo de ciertas familias bacterianas potencialmente patogénicas tales como *Enterobacteriaceae* y *Fusobacteriaceae* (28,29).

Por otra parte, el desarrollo de hepatocarcinoma favorece el crecimiento excesivo de bacterias del género *Helicobacter* y *Clostridium*, así como de *E. coli* (24,28,29). Cabe resaltar que este desequilibrio en la microbiota también podría generar un desbalance en los metabolitos que produce, afectando su función homeostática. Se ha visto que, en casos de HCC, la microbiota produce una mayor cantidad de toxinas y otros componentes como los ácidos desoxicólico y litocólico, metabolitos secundarios que promueven la hepatocarcinogénesis (19,25,27-29). Sin embargo, aún no se tiene un conocimiento exhaustivo sobre la contribución de la microbiota intestinal en el desarrollo de HCC (27,29).

La capacidad de modular la diversidad de la microbiota intestinal desde el hígado es mediada por la secreción de ácidos biliares primarios, como son el ácido cólico y ácido desoxicólico (30). Se sabe que los ácidos biliares son importantes moduladores de la microbiota intestinal (19) y, por tanto, su composición es esencial para esta actividad. Por ejemplo, en un estudio realizado en ratones, se observó que un mayor consumo de ácido cólico, incrementa la población de *Firmicutes*, en un 98% con respecto a los ratones control, mientras que se inhibe significativamente la presencia de *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, especies asociadas a disbiosis (30). Estos resultados son importantes, pues estos tres filos dominan la microbiota intestinal, junto con el filo *Proteobacteria* (19). Además, se han documentado cambios similares en la microbiota de individuos con cirrosis, en donde aumenta la proporción de *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, mientras *Bacteroidetes* disminuye (28,29). Al igual que la mayoría de trabajos sobre composición de microbiota y enfermedad, estos estudios han expuesto una probable causalidad, así como una clara relación microbiota-salud/enfermedad (disbiosis); sin embargo, los mecanismos moleculares que realiza dicha composición microbiana se desconocen.

Otro estudio indicó que, bajo una dieta alta en grasa, se alteraron los niveles de ácidos biliares, se incrementó su producción y, posteriormente, se generaron cambios en la composición de la microbiota (31). En fasciolosis, también se han observado alteraciones en la producción de ácidos biliares de murinos, como el aumento en la concentración y excreción de bilirrubina entre los 3 y 6 meses de infección (32).

Se ha observado que algunos helmintos intestinales tienen la capacidad de producir directamente disbiosis intestinal por la excreción de productos de excretado-secretado (ESPs) (33,34). Se ha documentado que varios parásitos, incluyendo *T. suis*, *O. ochengi* y *H. polygyrus*, son capaces de liberar moléculas bactericidas que afectan directamente a la microbiota y esta acción sería utilizada como un mecanismo en la competencia por nutrientes (33,34). Además, se ha observado que algunas de estas moléculas corresponden a proteínas formadoras de poros, según lo encontrado en parásitos del género *Trichuris* (34). Por otro lado, también se han descubierto efectos indirectos de los ESPs a través de cambios fisiológicos que, en consecuencia, afectan a la microbiota intestinal (34). Ejemplo de ello es la actividad moduladora de los ESPs en el reconocimiento de microorganismos mediante la alteración en la expresión de PRRs así como la actividad de células inmunes, algo que también se ha visto en *F. hepatica* como mecanismo de evasión a la respuesta inmune (33). Finalmente, se ha correlacionado la inhibición del complejo inflammasoma inducido por parásitos con la generación de disbiosis intestinal (33).

Por lo tanto, debido a que factores secretados por *F. hepatica* son capaces de modular la respuesta inmune, por ejemplo la alteración de la respuesta Th1 en macrófagos a través de la proteína FhHDM-1 del E/S (33), así como, la capacidad de afectar la respuesta inmune en tejidos alejados al sitio de infección (17), y la liberación del E/S al torrente sanguíneo (3), es razonable pensar que *F. hepatica* pueda afectar la composición de la microbiota mediante la modulación de esta respuesta inmune en el intestino.

2. Problema de investigación

Fasciolosis es una infección parasitaria, causada por el helminto *F. hepatica*. Esta enfermedad tiene un gran impacto en zonas rurales, principalmente en países en vías de desarrollo; a su vez, el cambio climático podría contribuir con la expansión de la enfermedad hasta llegar a zonas no endémicas (1,2). *F. hepatica* se aloja en los conductos biliares del hospedero y puede residir ahí por décadas. Esto puede inducir daño hepático irreversible que llegaría a ser mortal si no se da el tratamiento adecuado a tiempo (1). Para poder establecer una infección de tan larga duración, *F. hepatica* es capaz de alterar el sistema inmune hacia una respuesta tolerogénica (3,4,10). Una estrategia desarrollada por el parásito es la liberación de productos E/S, que pueden modificar la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero, e incluso, algunas investigaciones sugieren que tendría un efecto sistémico (15,17).

La capacidad de *F. hepatica* de modificar la respuesta inmune de manera sistémica sugeriría que el transporte de moléculas inmunosupresoras por el torrente sanguíneo favorece el desarrollo de coinfecciones bacterianas fuera del lugar de infección. En ese contexto, se desconoce el efecto de infecciones por *F. hepatica* sobre la microbiota intestinal. Esta última juega un rol importante en el eje hígado - intestino, pues modifica la actividad del hígado a través del metabolismo de ácidos biliares, contribuyendo a la inmunidad de este órgano (19,23-25). A su vez, la composición de la microbiota es afectada por la actividad hepática a través de los componentes de los ácidos biliares (19,23-25). Por ejemplo, se conoce que los ácidos biliares bajo condiciones pato-hepáticas pueden alterar la microbiota y, con ello, contribuir al desarrollo de la enfermedad hepática (3, 28,29).

Así como los componentes del E/S de *F. hepatica* modulan la respuesta inmune innata (i.e. inflammasoma) y adaptativa (i.e. presentación de antígenos, polarización de respuesta Th) y su potencial contribución a la modificación de la inmunidad en áreas alejadas a donde se localiza el parásito, también se ha visto la capacidad inmunomoduladora de otros helmintos como *Hymenolepis polygyrus* al infectar murinos, el cual induce la producción de células T con receptores tipo Toll 4 que favorecen la generación de TGF- β en vez de una respuesta inflamatoria, regulando así la homeostasis inmune de la mucosa intestinal (33). Con esta información, es razonable considerar que *F. hepatica* pueda modificar la composición de la microbiota, ya que esta última es finamente regulada por el sistema inmune (19). Respecto al intestino, teniendo en cuenta las vías circulatorias y biliares que lo conectan al hígado, estos datos apoyan la posibilidad de que el contenido del E/S podría a su vez diseminarse hacia el intestino y/o nodos linfáticos asociados a este órgano. Este tipo de actividad también se ha visto en otros helmintos intestinales como *Trichuris spp.*, los cuales tienden a secretar inmunomoduladores sobre la microbiota intestinal (33,34).

Esta es un área poco estudiada, pero que ha tomado fuerza en otras enfermedades infecciosas (18). Se sabe que en enfermedades hepáticas crónicas que también son inducidas por *F. hepatica*, como cirrosis, existe disbiosis (28,29), esto en parte por un cambio en la composición de ácidos biliares; sin embargo, no se sabe hasta qué punto la composición de la microbiota también puede verse afectada por un efecto directo de *F. hepatica*, como el E/S. Si *F. hepatica* tuviera un efecto real sobre la microbiota, esto podría sugerir una retroalimentación positiva en el

desarrollo de enfermedades hepáticas, en el cual, cambios en la composición de la microbiota intestinal afecten la funcionalidad del hígado, y este a su vez altera la composición de los ácidos biliares, que finalmente alterarán la composición de la microbiota intestinal.

Por lo tanto, para entender a profundidad la patogenia de fasciolosis, es necesario explorar el efecto directo del E/S de *F. hepatica* sobre la homeostasis inmunitaria a nivel de intestino. Para ello, se requiere generar evidencia inicial de que esto pueda ocurrir. Ya obtenida la información *in vitro* e *in vivo* que demuestre la capacidad del E/S de *F. hepatica* para modular la respuesta inmune - reflejado en un cambio en la composición de la microbiota -, el siguiente paso a considerar es si tiene un impacto negativo en la microbiota “normal” y si es aislado del efecto de los ácidos biliares.

En ese sentido, este trabajo hipotetiza que *F. hepatica* modifica la composición y abundancia de la microbiota intestinal a través de la secreción del E/S y su difusión a través del torrente sanguíneo, de manera independiente de la composición de ácidos biliares.

3. Estrategia de abordaje

Objetivo principal: Determinar la capacidad del E/S de *F. hepatica* de alterar directamente la composición y abundancia de la microbiota intestinal *in vivo*.

Para poder determinar el efecto del E/S de *F. hepatica* sobre la composición de la microbiota intestinal, se plantean 2 aproximaciones como tratamiento:

- i) Inoculación de E/S de *F. hepatica* en ratones y evaluación de su efecto sobre la composición microbiana mediante el análisis de heces (35,36).
- ii) Sistema parabionte (37), en el cual el sistema circulatorio de un ratón infectado con *F. hepatica* es conectado con un ratón no infectado, únicamente permitiendo el paso de sustancias presentes en el sistema circulatorio - entre otros, el E/S - separándose del efecto de otras sustancias como los ácidos biliares.

En ambas aproximaciones y condiciones, se medirán los cambios en la composición de la microbiota mediante genotipificación por PCR de elementos palindrómicos repetitivos o REP-PCR, estandarizado para secuencias de la flora microbiana y, por tanto, se utilizarán secuencias ARN ribosomal 16S (38). A su vez, se hará el reconocimiento microbiológico de muestras cultivadas en placas de cultivo a partir de muestras de tejido intestinal. Estas técnicas permitirán una identificación de especies microbianas más precisa, desde una perspectiva molecular y microbiológica, respectivamente.

La abundancia se cuantificará por RNAseq, usando metodologías ya estandarizadas y establecidas previamente (39), bajo la premisa de que la abundancia de ARN es proporcional al número de individuos. Se tomará especial énfasis en la abundancia relativa de organismos asociados a enfermedades hepáticas según la literatura, como los géneros *Helicobacter*, *Clostridium* y *Enterobacteriaceae* (28,29); así como en el desbalance de filos dominantes, por ejemplo, el aumento de *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* (23,27-29).

La primera aproximación requerirá la estandarización de la cantidad de E/S secretado que permita la viabilidad de los individuos estudiados y la concentración de inóculo necesario para generar disbiosis intestinal. También se necesitará estandarizar la vía de inoculación (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal). Asimismo, esta aproximación permitirá determinar si hay o no una dosis-dependencia de E/S. La segunda permitirá trabajar con niveles y composición fisiológicos de E/S en sistema circulatorio, evitando el efecto de ácidos biliares (que no se movilizan a través del sistema circulatorio). Debido a que un ratón ha sido inoculado directamente con el E/S, este será capaz de desarrollar a futuro afecciones en la composición de ácidos biliares, propias de la enfermedad de fasciolosis. No obstante, en el caso del ratón no inoculado, sólo podrá experimentar cambios a nivel intestinal producidos por las moléculas secretadas por el mismo parásito, así, permitiendo descartar o no la generación de disbiosis intestinal independiente de ácidos biliares.

Para esta aproximación, se seguirán las metodologías usadas extensamente en diversos trabajos y resumidos en el trabajo de Bunster et al. (37).

Referencias

1. Ashrafi, K., Bargues, M. D., O'Neill, S., & Mas-Coma, S. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014;12(6): 636–649. doi:10.1016/j.tmaid.2014.09.006
2. Moazeni, M. & Ahmadi, A. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*, *Experimental Parasitology*. 2016;169:81–89. doi: 10.1016/j.exppara.2016.07.010.
3. Cwiklinski K, O'Neill SM, Donnelly S, Dalton JP. A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(9):558–568. doi:10.1111/pim.12343
4. William, R. *Inmunología*. Corporación para investigaciones biológicas; Colombia; 17ed. 2015.
5. Musah-Eroje, M., & Flynn, R. J. *Fasciola hepatica*, TGF- β and host mimicry: the enemy within. *Current Opinion in Microbiology*. 2018; 46: 80–85. doi: 10.1016/j.mib.2018.09.002
6. Falcón, C., et al. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010;137(1-2):36–46. doi:10.1016/j.vetimm.2010.04.007
7. Rodríguez, E., Carasi, P., Frigerio, S. & et al. *Fasciola hepatica* Immune Regulates CD11c+ Cells by Interacting with the Macrophage Gal/GalNAc Lectin. *Front. Immunol*.2017; 8:264. doi: 10.3389/fimmu.2017.00264
8. Falcón, C.R., Masih, D., Gatti, G., Sanchez M.C., Motrán C.C. and Cervi L. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS One*. 2014;9(12):e114505. doi: 10.1371/journal.pone.0114505.
9. Guasconi, L., Chiapello L.S. & Masih, D.T. *Fasciola hepatica* excretory-secretory products induce CD4+T cell anergy via selective up-regulation of PD-L2 expression on macrophages in a Dectin-1 dependent way, *Immunobiology*. 2015;220(7):934-939. doi: 10.1016/j.imbio.2015.02.001
10. Robinson, M.W., Donnelly, S, Hutchinson, A.T., To, J., Taylor, N.L., et al. A Family of Helminth Molecules that Modulate Innate Cell Responses via Molecular Mimicry of Host Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog*.2011;7(5):e1002042. doi: 10.1371/journal.ppat.1002042.
11. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immuno*.2019;10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084
12. Alvarado, R., To, J., Lund, M.E., et al. The immune modulatory peptide FhHDM-1 secreted by the helminth *Fasciola hepatica* prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting endolysosomal acidification in macrophages. *FASEB J*. 2017;31(1):85-95. doi:10.1096/fj.201500093R

13. Ramos-Benitez, M.J., et al. Fh15 blocks the lipopolysaccharide-induced cytokine storm while modulating peritoneal macrophage migration and CD38 expression within spleen macrophages in a mouse model of septic shock. *mSphere*. 2018;3:e00548-18. doi: 10.1128/mSphere.00548-18.
14. Aguayo, V., Valdés, B.N., Rodríguez-Valentín, M., et al. *Fasciola hepatica* GST downregulates NF- κ B pathway effectors and inflammatory cytokines while promoting survival in a mouse septic shock model. *Sci Rep*. 2019;9(1):2275. doi:10.1038/s41598-018-37652-x
15. Brady, M. T., S. M. O'Neill, J. P. Dalton, and K. H. G. Mills. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1999;67(10):5372-5378. PMID: 10496919
16. O'Neill, S. M., Mills, K. H. G., & Dalton, J. P. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol*. 2001; 23(10): 541–547. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00411.x.
17. Garza-Cuartero, L., O'Sullivan, J., Blanco, A., et al. *Fasciola hepatica* infection reduces *Mycobacterium bovis* burden and mycobacterial uptake and suppresses the pro-inflammatory response. *Parasite Immunol*. 2016;38(7):387-402. doi: 10.1111/pim.12326
18. Lazar, V., Ditu, L-M., Pircalabioru, G.G., et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front. Immunol*. 2018; 9:1830. doi: 10.3389/fimmu.2018.01830
19. Iacob, S., & Iacob, D. G. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front Microbiol*. 2019; 10:1676. doi:10.3389/fmicb.2019.01676
20. Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E., & Elinav, E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *The Journal of Immunology*. 2017: 198(2); 572–580. doi:10.4049/jimmunol.1601247
21. Smith, P. M., et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*. 2013: 341(6145); 569–573. doi:10.1126/science.1241165
22. Fukuda, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011: 469(7331); 543–547. doi:10.1038/nature09646
23. Stärkel, P., & Schnabl, B. Bidirectional Communication between Liver and Gut during Alcoholic Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*. 2016: 36(04); 331–339. doi http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1593882.
24. Tripathi, A., et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(7):397-411. doi:10.1038/s41575-018-0011-z.
25. Ohtani, N., & Kawada, N. Role of the Gut-Liver Axis in Liver Inflammation, Fibrosis, and Cancer: A Special Focus on the Gut Microbiota Relationship. *Hepatol Commun*. 2019 3(4), 456–470. doi:10.1002/hep4.1331

26. Machicado, C., Machicado, J. D., Maco, V., Terashima, A. & Marcos, L. A. Association of *Fasciola hepatica* Infection with Liver Fibrosis, Cirrhosis, and Cancer: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004962. doi:10.1371/journal.pntd.0004962
27. Son, G., Kremer, M. & Hines, I.N. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract.* 2010; 2010:453563. doi:10.1155/2010/453563
28. Albhaisi, S. A. M., Bajaj, J. S., & Sanyal, A. J. The role of the gut microbiota in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020;318(1):G84-G98. doi:10.1152/ajpgi.00118.2019
29. Fukui, H. Role of Gut Dysbiosis in Liver Diseases: What Have We Learned So Far? *Diseases.* 2019; 7(4):58. doi:10.3390/diseases7040058
30. Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(3):332–338. doi:10.1097/MOG.000000000000057.
31. Zheng, X., Huang, F., Zhao, A., et al. Bile acid is a significant host factor shaping the gut microbiome of diet-induced obese mice. *BMC Biol.* 2017;15(1):120. doi:10.1186/s12915-017-0462-7
32. Lopez, P., Gonzalez, P., Tunon, MJ & Gonzalez-Gallego, J. The effects of experimental fasciolosis on bilirubin metabolism in the rat. *Exp Parasitol* 1994; 78: 386–393.
33. Leung, J. M., Graham, A. L., & Knowles, S. C. L. Parasite-Microbiota Interactions With the Vertebrate Gut: Synthesis Through an Ecological Lens. *Front. Microbiol.* 2018; 9:843. doi:10.3389/fmicb.2018.00843
34. Midha, A., Schlosser, J. & Hartmann, S. Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:144. doi: 10.3389/fcimb.2017.00144
35. Cervi, L., Borgonovo, J., Egea, M., Chiapello, L., & Masih, D. Immunization of rats against *Fasciola hepatica* using crude antigens conjugated with Freund's adjuvant or oligodeoxynucleotides. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2004: 97(1-2); 97–104. doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.015
36. Ning, T., Gong, X., Xie, L. & Ma B. Gut Microbiota Analysis in Rats with Methamphetamine-Induced Conditioned Place Preference. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1620. doi: 10.3389/fmicb.2017.01620
37. Bunster, E. & Meyer, R.K. "An improved method of parabiosis." *The Anatomical Record.* 1933; 57(4): 339-343. <https://doi.org/10.1002/ar.1090570404>
38. Weinstock, G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012;489(7415):250-256. doi:10.1038/nature11553
39. Schwartz, M.H., Wang, H., Pan, J.N., et al. Microbiome characterization by high-throughput transfer RNA sequencing and modification analysis. *Nat Commun.* 2018; 9(1):5353. doi:10.1038/s41467-018-07675-z