

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



EFFECTO DE LA CO-INFECCIÓN DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* Y *FASCIOLA HEPATICA* EN LA FERTILIDAD DEL QUISTE HIDATÍDICO Y EN LA RESPUESTA INMUNE LOCAL DE TIPO CELULAR

CHRISTIAN ANDRÉS HIDALGO FRANCO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Directores de Tesis: Prof. Norbel Galanti y Dr. Rodolfo Paredes

2019

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

CHRISTIAN ANDRÉS HIDALGO FRANCO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Marzo de 2004.

Prof. Norbel Galanti

Director de Tesis

Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Rodolfo Paredes

Director de Tesis

Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. JOSÉ LUIS ARIAS

PROF. DR. CRISTIAN TORRES

PROF. DR. JUAN DIEGO MAYA

PROF. DR. ARTURO FERREIRA
Presidente Comisión de Examen

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no podría haber sido posible sin el apoyo y trabajo de la Dra. Carroll Stoores, quien además de brindar su amistad, participó activamente en la recolección y procesamiento de muestras, además extensas discusiones de resultados y protocolos. Los Drs. Felipe Corrêa, Mauricio Jiménez e Ismael Pereira también participaron en el proceso de recolección y procesamiento de las muestras. Un especial agradecimiento al profesor Dr. Rodolfo Paredes, quien ha sido una excelente guía durante los 9 años que hemos trabajado juntos.

También agradezco a los integrantes del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, con especial énfasis al Dr. Gonzalo Cabrera, quien en discusiones científicas aportó varias ideas que se desarrollaron en este trabajo. Se suman a mis agradecimientos las Dras. Lucía Valenzuela, Sofía Sepúlveda, Yael Mendel y el Dr. Santiago Ramírez, con quienes no solo aprendí técnicas relevantes para el desarrollo de este trabajo, si que también forjamos una amistad importante. Al jefe del laboratorio, y director de esta tesis, Prof Norbel Galanti agradezco por su guía y consejos.

A los trabajadores de las plantas faenadoras Matadero La Pintana en Santiago, Matadero La Estancia en Illapel, Frigosorno en Osorno, Agromarín y Matadero Magallanes en Punta Arenas, quienes permitieron el ingreso a su lugar de trabajo y obtener las muestras con la mejor de las disposiciones.

Un especial agradecimiento al Dr. Cristian Álvarez, quien amablemente gestionó mi pasantía en el Instituto de Parasitología en Suiza y quien me permitió entablar relaciones de cooperación internacional con dicho grupo además de ofrecerme su amistad y compartir sus conocimientos sobre enfermedades parasitarias.

A los integrantes del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, especialmente a Cecilia Carter, quien siempre ha tenido la mejor disposición para resolver todos los problemas y ha sido muy eficiente en todos los trámites durante el transcurso del doctorado.

A Verónica Guzmán, quien fue un pilar fundamental de guía en los momentos más difíciles durante la ejecución de este trabajo de investigación

A mis padres, Carmen Franco y Jorge Hidalgo, quienes han sido una fuente de apoyo emocional, intelectual y económico importante para sacar adelante esta tesis. A mi hermano Gabriel Hidalgo y pareja Walesca Contreras por compartir conmigo momentos muy especiales que fueron críticos en la última etapa de esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a mi pareja, Gemma Rojo, quien ha sido una fuente constante de motivación para completar esta etapa, entregando su energía inagotable y aportando ideas para futuras investigaciones.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN	14
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO I	29
Objetivo.....	29
Materiales y métodos.....	29
Resultados	42
Discusión	66
CAPÍTULO II	75
Objetivo.....	75
Materiales y métodos.....	75
Resultados	78
Discusión	84
CAPÍTULO III	88
Objetivo.....	88
Materiales y métodos.....	88
Resultados	88
Discusión	91
CONSIDERACIONES FINALES	93
BIBLIOGRAFÍA.....	95

RESUMEN

La co-ocurrencia de parásitos o “poliparasitismo” en un mismo hospedero es un hecho bien documentado en la literatura médica, veterinaria y zoológica. La mayoría de los animales que existen en la naturaleza y humanos que viven en zonas rurales, albergan varias especies de parásitos de forma concurrente. Los helmintos parásitos son un grupo muy diverso de organismos que poseen diferentes aspectos morfológicos y moleculares, además de adoptar distintos estados de desarrollo durante su ciclo de vida. Dentro de sus hospederos, los helmintos recurren a diferentes estrategias para sobrevivir, ya sea migrando por diferentes órganos durante sus estadios de desarrollo o permaneciendo en un mismo nicho. Estas diferentes estrategias de vida están asociadas a la respuesta inmune que gatillan en su hospedero. Las interacciones entre parásitos diferentes cuando modulan el sistema inmune de un mismo hospedero pueden ser sinérgicas o antagónicas dependiendo del tipo de respuesta inmune que se genera contra cada especie de parásito. El tipo de respuesta inmune general que ocurre contra helmintos parásitos se cataloga como “Th2-like”. Se caracteriza por tener altos niveles de citoquinas propias del perfil Th2 sumada a la proliferación de linfocitos T reguladores, macrófagos activados de forma alternativa y secreción de IL-10 y TGF- β . A pesar de ser una respuesta muy eficiente para contener al parásito, rara vez es capaz de eliminar completamente la infección.

En Chile, existen dos especies de helmintos zoonóticos que frecuentemente cohabitan un mismo hospedero rumiante: *Echinococcus granulosus* y *Fasciola hepatica*. Ambos parásitos se alojan en el hígado de su hospedero, sin embargo, *Echinococcus granulosus* es capaz de diseminarse por todo el organismo, siendo el pulmón

la segunda víscera donde se aloja con mayor frecuencia. Son causa de graves enfermedades en el ser humano y de importantes pérdidas económicas en animales productivos. La respuesta inmune que ambos parásitos son capaces de gatillar es similar. Así, en ensayos de inmunización en modelos animales, sueros obtenidos desde animales inmunizados con antígenos provenientes de parásitos del género *Fasciola* reconocen diversas proteínas obtenidas desde lisados de protoescólices de *Echinococcus granulosus*. Del mismo modo, sueros obtenidos desde animales inmunizados con antígenos provenientes de *Echinococcus granulosus* identifican proteínas de parásitos del género *Fasciola*, lo que permite postular que la co-infección de un mismo individuo con ambos parásitos debería presentar una interacción sinérgica. Contrario a ello, la presencia de *Fasciola hepatica* se asocia a cambios en la frecuencia de presentación de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* en los animales que presentan co-infección; la cantidad de quistes hidatídicos alojados en hígado es menor y los que se encuentran en pulmones son más pequeños y presentan un pobre desarrollo.

Dado que las interacciones que ocurren entre dos parásitos están íntimamente relacionadas a la especie del hospedero que las alberga, en este trabajo se investigaron tres aspectos fundamentales: la respuesta inmune que ocurre en bovinos y ovinos sobre el metacestodo y su relación sobre la fertilidad de los quistes hidatídicos; la variabilidad intraespecífica de *Echinococcus granulosus* en bovinos y ovinos y su relación con aspectos biológicos como el tamaño de los quistes o la respuesta inmune presente en la capa adventicia y por último, si la co-infección con *Fasciola hepatica* influye en el desarrollo de los quistes hidatídicos en bovinos y ovinos.

Se realizaron visitas a diferentes plantas faenadoras del país para obtener quistes hidatídicos desde vísceras decomisadas de bovinos y ovinos. En cada caso, se recolectaron todos los quistes hidatídicos en la víscera afectada y se registró si el animal estaba concomitantemente infectado con *Fasciola hepatica*. Cada muestra fue medida y se tomaron muestras de DNA y de la pared del quiste para procesamiento histológico. En el presente trabajo se recolectaron 418 quistes hidatídicos en total, provenientes de 82 bovinos y 117 ovinos. En ovinos, no hubo casos de poliparasitismo con *Fasciola hepatica*, mientras que en bovinos, el 20% de las muestras de *Echinococcus granulosus* presentaron la presencia de *Fasciola hepatica* de forma concomitante. Los efectos del poliparasitismo se evaluaron sólo en bovinos, mientras que en ovinos se evaluaron las diferencias de capa adventicia y haplotipos entre quistes hidatídicos fértiles e infértiles. Respecto a la respuesta inmune que ocurre en bovinos y ovinos sobre el metacestodo, se procesaron para análisis histológico 418 muestras de quistes hidatídicos, que generaron 674 bloques aptos para su análisis provenientes de 385 quistes hidatídicos (185 de bovinos y 200 de ovinos). En estas muestras se observó que existe un patrón diferencial de respuesta inmune en la capa adventicia; en bovinos, la capa adventicia, tanto en quistes hidatídicos fértiles como infértiles, posee un infiltrado inflamatorio caracterizado por macrófagos en empalizada en contacto directo con la capa laminar del parásito, desorganización y necrosis de la capa laminar, centros germinales de linfocitos, calcificaciones, células gigantes multinucleadas y eosinófilos. Sorprendentemente, varias muestras de quistes hidatídicos infértiles en hígado y pulmón presentaron células del hospedero en contacto directo con la capa germinal, hecho sin precedentes en la literatura antes de la realización de esta investigación. Por otra parte, en ovinos, los quistes hidatídicos fértiles rara

vez presentaron los componentes inflamatorios mencionados, y en quistes hidatídicos infértiles, si bien existe un componente inflamatorio en la capa adventicia, se encuentra generalmente bajo una capa de fibrosis que protege la capa laminar del parásito.

Respecto a la variabilidad intraespecífica de *Echinococcus granulosus* en bovinos y ovinos, se reporta la existencia de hasta 5 haplotipos diferentes dentro de un mismo hospedero. El hallazgo de que tanto bovinos como ovinos poseen múltiples haplotipos del parásito en su interior tiene implicancias tanto en la epidemiología molecular del parásito así como en la posible detección de focos hiperendémicos de infección. Por otra parte, no existe una asociación del haplotipo con la fertilidad de los quistes hidatídicos o el patrón de capa adventicia; lo que confirma que la fertilidad de quistes hidatídicos está determinada individualmente por el hospedero. Finalmente, en bovinos, la co-infección con *Fasciola hepatica* posee un efecto paradójico, ya que altera la localización de los quistes hidatídicos, además de disminuir el tamaño y cantidad de quistes hidatídicos que se pueden encontrar por hospedero. Estos efectos se pueden interpretar como una relación antagónica. Sin embargo, la presencia de *Fasciola hepatica* se asocia con una ausencia de segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia, células del hospedero dentro de la capa germinal y de centros germinales de linfocitos en la capa adventicia de quistes hepáticos y a ausencia de calcificaciones, necrosis bajo la capa laminar y macrófagos en empalizada bajo la capa laminar de quistes pulmonares, indicadores de una respuesta inmune menos intensa y por lo tanto sugerente de un efecto sinérgico.

La comparación entre las capas adventicias de bovinos y ovinos, permite concluir finalmente que la diferencia de fertilidad de quistes hidatídicos entre ambas especies

está dada por factores intrínsecos y no por la co-infección con *Fasciola hepatica* o factores moleculares de *Echinococcus granulosus*. Sin embargo, la co-infección promueve un desplazamiento de quistes hidatídicos hacia los pulmones junto con un menor diámetro de quistes hidatídicos, lo que se podría interpretar como un antagonismo entre ambos parásitos. Por otra parte, hay evidencias de un efecto sinérgico en la infección parasitaria, al haber menor inflamación en la capa adventicia de los quistes hidatídicos en animales co-infectados. Estos resultados demuestran lo complejo que resulta el análisis de enfermedades parasitarias en animales, ya que el poliparasitismo ocurre de manera frecuente en los hospederos y rara vez es tomada en cuenta. Dado que dicho fenómeno puede alterar las características biológicas de los parásitos y en consecuencia, la forma en que la enfermedad se manifiesta en el hospedero, es que es un factor fundamental a tener en cuenta en infecciones naturales.

ABSTRACT

Polyparasitism, i.e. the occurrence of more than one parasite inside a host, is a well-documented fact in the medical, veterinary and zoological literature. Most of the animals that live in natural environments as well as humans in rural areas, are hosts of different parasite species. Parasite helminths are a heterogeneous group of organisms with different morphological and molecular features, which also adopt many different stages during their life cycles. To survive inside their host, these parasites use different strategies, such as migrating different viscera or establishing in one place. These different strategies are associated with the immune response triggered by the host. When there are different parasites modulating simultaneously the immune response, the interaction can be classified as synergic or antagonic, depending on the kind of immune response that is triggered. Generally, helminths elicit a Th2-like immune response, characterized by a Th2 cytokine profile, with regulatory T cells, alternative activated macrophages with secretion of IL-10 and TGF- β . Even though this response is very efficient in containing the parasite, rarely is able to eliminate it.

In Chile, there are two zoonotic helminths that frequently co-habit the same ruminant host: *Echinococcus granulosus* and *Fasciola hepatica*. Both of them use the liver as their primary target, however, *Echinococcus granulosus* is able to disseminate to different viscera, with lungs being its second preferred site. Both parasites are responsible for causing diseases in human beings as well as economic losses in productive animals. The immune response triggered against both parasites is very similar. In fact, sera from animals immunized with *Fasciola* antigens recognize in immunoassays proteins from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Likewise, sera from animals

immunized with *Echinococcus granulosus* antigens identify *Fasciola* antigens; this means that probably, the interaction between them should be synergic. However, in cattle, the presence of *Fasciola hepatica* is associated with changes in both the localization of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts and their presentation rate in co-infected animals: the amount of hepatic hydatid cysts is lower and the amount of small hydatid cysts in lungs is higher.

The interaction between parasites is also modulated by the host species, because of this, in this research work there are three main aspects: the immune response in cattle and sheep against the hydatid cysts and the relation with its fertility; the intraspecific variability of *Echinococcus granulosus* in cattle and sheep and its relation with both biological features and immune response against the metacestode; and finally, if *Fasciola hepatica* co-infection affects the development of hydatid cysts in cattle and sheep.

Routine visits to abattoirs located in different regions of Chile were carried out, and hydatid cysts were collected from both cattle and sheep. For each slaughtered animal with *Echinococcus granulosus* infection, every hydatid cyst present in the viscera were collected and the presence of *Fasciola hepatica* was recorded. Each hydatid cyst was measured, and both DNA and cyst wall samples were collected for molecular biology and histologic analysis, respectively. A total of 418 hydatid cysts were collected from 82 cattle and 117 sheep. In sheep, there were no animals co-infected with *Fasciola hepatica*, while in cattle, 20% of the samples had co-infection. Polyparasitism was only evaluated in cattle, while in sheep both haplotype and host immune response was evaluated in fertile and infertile hydatid cysts. To evaluate the immune response in cattle and sheep, the 418 hydatid cyst samples were processed for histo-

logical analysis. After quality control, 674 paraffin blocks from 385 hydatid cysts (185 from cattle and 200 from sheep) were analyzed. In these samples, a differential immune response pattern was observed; in cattle, the adventitial layer, in both fertile and infertile hydatid cysts, has an inflammatory infiltrate characterized by palisading macrophages in direct contact with the parasite laminated layer, which is disorganized and has necrotic areas, lymphocyte germinal centers, calcifications, giant multinucleated cells and eosinophils. Surprisingly, infertile cysts in both liver and lungs had host immune cells in contact with the germinal layer, an unprecedented finding before this research work. In sheep, fertile hydatid cysts rarely feature inflammatory infiltration, and while infertile hydatid cysts have an inflammatory component, usually is not in contact with the parasite laminated layer.

Regarding *Echinococcus granulosus* intraspecific variability in cattle and sheep hydatid cysts, the presence of up to 5 different haplotypes within the same host is reported. This finding, reported in both cattle and sheep, is relevant for the molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* as well in the identification of hyperendemic areas. There was no association between *Echinococcus granulosus* haplotype and hydatid cyst fertility nor the immune response against the metacestode, which confirms that hydatid cyst fertility is dependent of the host.

In cattle, polyparasitism of *Echinococcus granulosus* and *Fasciola hepatica* is paradoxical: co-infection was associated with antagonistic interaction features, such as smaller and fewer hydatid cysts per animal and a lack of fertile hepatic hydatid cysts. However, it was also associated with synergic interaction features, with both fewer hepatic hydatid cysts with laminated layer disorganization, host cells within the germinal layer and lymphocyte germinal centers in the adventitial layer and fewer lung hy-

datid cysts with calcifications, laminated layer necrosis and palisading macrophages under the laminated layer.

The difference of hydatid cyst fertility between cattle and sheep is not determined neither by *Fasciola hepatica* co-infection nor *Echinococcus granulosus* intraspecific variability, as evidenced by the analysis of the adventitial layer. However, polyparasitism was associated with both synergic and antagonic interactions. These results highlight the complexity of the study of parasite natural infection in animals, because polyparasitism is a common occurrence and rarely is given any consideration. Because polyparasitism can affect biological features of the parasite, and in consequence, how the disease manifests in the host, is a factor that always has to be considered in natural infections.

INTRODUCCIÓN

La co-infección con parásitos de diferentes especies en un mismo hospedero (poliparasitismo), es un hecho bien documentado en la literatura médica, veterinaria y zoológica. La mayoría de los animales que existen en la naturaleza y humanos que habitan zonas rurales, albergan varias especies de parásitos de forma concurrente (Behnke, 2008). A pesar de que el poliparasitismo puede afectar la permanencia del parásito en el hospedero, su transmisión a otros hospederos así como la recuperación de un individuo de una infección parasitaria, es un aspecto poco estudiado, particularmente en cuanto a las relaciones sinérgicas o antagónicas que pueden generarse entre dos parásitos que comparten un mismo hospedero (Blackwell et al., 2013). Las interacciones entre parásitos de especies distintas dentro de un mismo hospedero también se encuentran supeditadas a mecanismos físicos, de comportamiento, bioquímicos y principalmente inmunológicos por parte del hospedero que los alberga. En otras palabras, la capacidad de cada parásito de continuar o no su ciclo de vida, dependerá de las habilidades de transmisión del parásito, su patogenicidad, la interacción con otros parásitos y/o microorganismos, y los mecanismos de resistencia del hospedero (Gruner et al., 2009). Las interacciones entre parásitos al interior de un mismo hospedero pueden tener un origen casual o pueden establecerse debido a que la presencia de uno de los parásitos crea las condiciones adecuadas que facilitan o impidan, de forma directa o indirecta, la infección con la otra especie parasitaria (Behnke, 2008). De esta forma, el poliparasitismo puede aumentar o disminuir la susceptibilidad del hospedero hacia infecciones que en muchas ocasiones pueden resultar mortales (Booth and Bundy, 1992; Druilhe et al., 2005; Nacher, 2002;

Pedersen and Fenton, 2007). A pesar de que este aspecto es extremadamente relevante para la comprensión de la relación hospedero-parásito, existe escasa información en la literatura que permita determinar el efecto real de las co-infecciones parasitarias para la salud de su hospedero (Behnke, 2008). En consecuencia, se trata de un problema importante para la salud humana y animal.

Los parásitos helmintos son un grupo de animales extremadamente diversos. Se pueden clasificar en 4 grupos taxonómicos: nematodos, trematodos, cestodos y acantocéfalos, muchas veces con ciclos de vida muy diferentes entre ellos (Moreau and Chauvin, 2010). Son considerados “maestros de la inmunomodulación”; a pesar de presentar una gran diversidad de estrategias de infección, en general los helmintos inducen una polarización de la respuesta inmune del hospedero hacia una respuesta “Th2-like” (Everts et al., 2010; Mendez-Samperio, 2012; Moreau and Chauvin, 2010; Viney and Graham, 2013). Esta respuesta se caracteriza por un perfil de citoquinas alto en IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, en conjunto con altos niveles de IgG1 e IgE. Algunos autores también suman al perfil de citoquinas un incremento en los niveles de IL-10 y TGF- β (Paterson, 2013). En relación a la respuesta inmune celular, una polarización hacia Th2 está marcada por una mayor proliferación de eosinófilos, mastocitos y células caliciformes (Moreau and Chauvin, 2010) y un bajo nivel de proliferación de linfocitos T, excepto de un subgrupo que corresponde a linfocitos T reguladores (TRegs). Además, se ha establecido que en este tipo de respuesta inmune, otro subgrupo de células que proliferan preferentemente son los macrófagos activados de forma alternativa. Estos últimos también son conocidos como macrófagos M2 (Reyes and Terrazas, 2007). A pesar de que la respuesta Th2 es muy eficiente

para controlar la infección parasitaria, rara vez elimina completamente la presencia del parásito. Esto implica que los helmintos han desarrollado mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune de su hospedero, aprovechando a su favor los mecanismos de tolerancia y de minimización de la respuesta inflamatoria del hospedero (Everts et al., 2010).

Las interacciones biológicas entre organismos no simbióticos, es decir que no requieren de la relación entre ambos para su supervivencia, se pueden clasificar como sinergismo, en la que ambos organismos cooperan y se benefician, y antagónicas, en la que una o ambas especies se ve perjudicada por la presencia de la otra. En parásitos, las interacciones biológicas que se establecen cuando modulan el sistema inmune de su hospedero se categorizan como: i) expulsión no específica (interacción antagónica); ii) inmunidad cruzada (interacción antagónica); iii) inducción de un perfil Th1/Th2 protector para la otra especie (interacción antagónica); iv) inmunomodulación no específica (interacción sinérgica); y v) inducción de un perfil Th1/Th2 que favorece el crecimiento de la otra especie (interacción sinérgica) (Behnke, 2008).

Los estudios reportados en co-infecciones con dos parásitos de características similares señalan que en muchas ocasiones, la presencia de una especie compite por el nicho ecológico, en desmedro de la otra; particularmente, los nematodos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* compiten por el mismo nicho dentro de su hospedero, siendo el primero capaz de impedir el desarrollo del segundo. Sin embargo, esta asociación de carácter antagónico solo se establece en un tipo específico de hospedero (hospederos del género *Galleria*) (Gruner et al., 2009). De manera similar, estudios realizados co-infectando ratas con *Moniliformis moniliformis* e *Hymenolepis di-*

minuta (un acantocéfalo y cestodo, respectivamente), se determinó que a pesar que ambos parásitos utilizan el mismo sitio anatómico del hospedero (intestino anterior), al existir co-infección, *Hymenolepis diminuta* se desplaza hacia una zona posterior del intestino. Sin embargo, dado que *Hymenolepis diminuta* es más longeva, cuando *Moniliformis moniliformis* muere, *Hymenolepis diminuta* vuelve a su sitio anatómico de preferencia. Es interesante destacar que este desplazamiento ocurre solo en ratas y no en otros roedores, como hámsteres (Behnke, 2008). Estos ejemplos resaltan la importancia de la especie del hospedero al momento de caracterizar el tipo de interacción (antagónica o sinérgica) que pueden tener dos especies de helmintos parásitos.

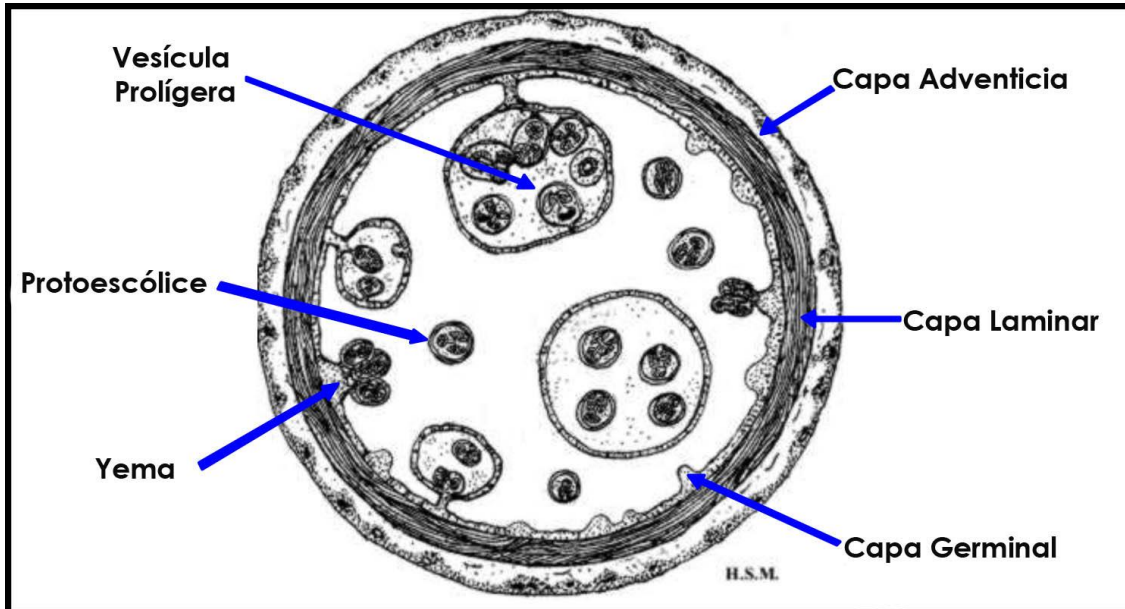
En la literatura también existen ejemplos de sinergia y antagonismo entre parásitos helmintos y organismos unicelulares. Un ejemplo de antagonismo queda de manifiesto en infecciones murinas con el nematodo *Litomosoides sigmodontis*. La presencia de este parásito previene la infección con el protozoo *Plasmodium berghei*. Esta protección se establece solamente cuando el nematodo está en su fase de microfilaremia y se pierde cuando los ratones carecen del gen que codifica para la citoquina IL-10. Una de las probables causas de esta protección pareciera ser la reacción cruzada de anticuerpos originados como respuesta al nematodo, que afectarían al protozoo. Además, en estos estudios se estableció que los hospederos murinos presentaron una mayor proporción de linfocitos T citotóxicos activados, sugiriendo fuertemente la participación de este tipo de células en la eliminación del protozoo (Fernandez Ruiz et al., 2009). Por otra parte, un ejemplo de sinergia ocurre al realizar co-infecciones de helmintos gastrointestinales de la especie *Heligmosomoides polygyrus*

con la bacteria *Bordetella bronchiseptica* que normalmente coloniza el sistema respiratorio del hospedero. En estos estudios se observó que dicha co-infección aumentaba la cantidad de huevos eliminados por *Heligmosomoides* e incrementaba los niveles de infección bacteriana pulmonar que agravan el cuadro respiratorio generado por *Bordetella* (Lass et al., 2013). En ratones, individuos que son infectados primero con *Heligmosomoides polygyrus* y luego con *Leishmania infantum* (protozoo) presentan una interacción de tipo sinérgica, ya que la respuesta inmune específica que ocurre contra *Leishmania infantum* le permite a *Heligmosomoides polygyrus* producir más huevos y ser más longevo (Gonzalez-Sanchez et al., 2018). En otras ocasiones se ha establecido que la co-infección con dos helmintos parásitos puede tener efectos positivos para su hospedero: ratones co-infectados experimentalmente con *Schistosoma mansoni* (trematodo) y *Toxocara canis* (nematodo), presentaron menores títulos de anticuerpos e índices de mortalidad comparados con ratones infectados solamente con *Toxocara canis* (Garza-Cuartero et al., 2014). Estos antecedentes resaltan la complejidad del estudio del poliparasitismo, ya que se deben tener en cuenta las especies de helmintos que parasitan, el tipo de respuesta inmune que gatillan dentro de su hospedero y la especie del hospedero que está siendo parasitada. En seres humanos, el poliparasitismo puede estar asociado a cuadros patológicos más severos, es así como la co-infección en niños con *Ascaris sp.* y *Giardia sp.* agrava cuadros de malnutrición en comparación a cuando estos parásitos se presentan de forma individual (Geus et al., 2019). En adultos, la co-infección con *Plasmodium falciparum*, *Blastocystis sp* y nematodos de los géneros *Ancylostoma* y *Necator*, puede ocurrir hasta en un 60% de los individuos estudiados en países africanos, sin embargo, no se asocian a cambios en la severidad de las enfermedades causadas

(Dawaki et al., 2019). Por último, en niños con infecciones crónicas de *Schistosoma haematobium* generan linfocitos T CD4+ de memoria que les confiere resistencia a la infección por *Plasmodium falciparum* (Lyke et al., 2017). Estos antecedentes demuestran que las interacciones entre parásitos en sus hospederos son un fenómeno complejo y que debe ser estudiado de forma específica en cada especie de hospedero.

En el ganado bovino y ovino chileno, existen dos especies de helmintos zoonóticos que frecuentemente co-habitan un mismo hospedero: *Echinococcus granulosus* y *Fasciola hepatica*, un cestodo y un trematodo, respectivamente. *Echinococcus granulosus* posee un ciclo de vida indirecto (Silva-Alvarez et al., 2015) en el que rumiantes y el ser humano participan como hospederos intermediarios y los cánidos como definitivos. Los hospederos intermediarios, al consumir el estadio infectante del parásito, desarrollan a nivel hepático, pulmonar y en otras vísceras el estado de metacestodo de *Echinococcus granulosus*, conocido como hidátide o quiste hidatídico (Agudelo Higueta et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo de un quiste hidatídico fértil



Se observan las capas germinal y laminar del parásito envueltas por la capa adventicia. Desde la capa germinal se producen tanto yemas como vesículas prolíferas. El interior de la cavidad se encuentra llena con el líquido hidatídico, donde flotan los protoescolices, estadio infectante para el hospedero definitivo (Cabezón, C, et al, 2003).

Fasciola hepatica por su lado posee también un ciclo de vida indirecto; sin embargo los rumiantes participan como hospederos definitivos, albergando la forma adulta del parásito dentro de los canalículos biliares (Wuhrer et al., 2004). A pesar de ser de clases taxonómicas diferentes, existen varias características comunes para ambos parásitos. Tanto *Fasciola hepatica* como *Echinococcus granulosus* son capaces de secuestrar y cubrirse con glicolípidos originados por el hospedero, lo que se relacionaría a mecanismos de mimetismo molecular, tendientes a evitar una excesiva respuesta inmune efectora y de forzar respuestas de tolerancia por parte del hospedero. El secuestro de glicolípidos del hospedero por parte de ambos parásitos, determina que la respuesta inmune genere anticuerpos capaces de reconocer antígenos de

superficie comunes entre *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus*, disminuyendo la especificidad de los métodos de diagnóstico serológicos: sueros de pacientes humanos infectados con *Echinococcus granulosus* reconocen antígenos presentes en el tegumento y sistema digestivo de *Fasciola hepatica* (Wuhrer et al., 2004). Por otra parte, se ha establecido que sueros de animales infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* o con *Echinococcus granulosus* detectan antígenos del trematodo *Schistosoma mansoni*. Al inmunizar por separado conejos con *Fasciola gigantica* (trematodo), *Trichinella spiralis* (nematodo) o *Echinococcus granulosus* (cestodo), los sueros obtenidos de estos animales detectan a cada una de las especies parasitarias de manera independiente en ensayos de Western Blot y ELISA. Así, al separar electroforéticamente antígenos de *Fasciola gigantica*, los sueros de conejos inmunizados con *Echinococcus granulosus* detectan bandas de 205, 166, 45 y 32 kDa. A su vez, al realizar el ensayo inverso, los sueros de conejos inmunizados con *Fasciola gigantica* son capaces de reconocer bandas de 205, 148 y 32 kDa en lisados de protoescolices de *Echinococcus granulosus* (Abdel-Rahman et al., 2003). No existe información acerca de la participación de la reacción antigénica cruzada en la interacción entre los dos parásitos.

Al ser helmintos, tanto *Fasciola hepatica* como *Echinococcus granulosus* inducen una respuesta "Th2-like" y poseen diversas estrategias para modificar la respuesta inmune efectora que produce el hospedero en contra ellos. Ambos parásitos poseen en su genoma secuencias nucleotídicas que codifican para proteínas que pertenecen a la familia de proteínas CD59 (regulador negativo del sistema del complemento), lo que implica que en la evasión del sistema del complemento, poseen al menos una

estrategia similar (Shi et al., 2014). Una característica de las infecciones crónicas con helmintos es la presencia de macrófagos activados de forma alternativa (en ratones conocidos como macrófagos M2); estos macrófagos al ser estimulados con IL-4 e IL-13, expresan Arginasa-I que metaboliza la L-arginina hacia prolina, poliaminas y urea, promoviendo un perfil de reparación tisular con baja actividad microbicida. Dentro de los marcadores moleculares que han sido descritos para el reconocimiento de este tipo de macrófagos, además de Arginasa-I, se encuentran Fizz1, Ym1, TREM-2, AMCase, mMGL1 y mMGL2. Cuando se realizan infecciones experimentales en ratones con *Fasciola hepatica* o con *Taenia crassiceps* (parásito del mismo orden que *Echinococcus granulosus*), los macrófagos expresan Fizz1, Ym1 y Arginasa-1. Es interesante que los macrófagos obtenidos desde la cavidad peritoneal de ratones infectados experimentalmente con *Taenia crassiceps*, son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T naïve, lo que se ha asociado a un incremento de la expresión de receptores PD-L1 y PD-L2 en la membrana de dichos macrófagos (Reyes and Terrazas, 2007). Ya que las células dendríticas son las responsables de establecer que tipo de respuesta inmune adaptativa se ejecuta, se ha investigado la modulación de la actividad de dichas células por parte de *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus*. Es así como el Antígeno B de *Echinococcus granulosus*, al interactuar con células dendríticas mediante receptores aún no descritos (aunque considerando que el antígeno B es una lipoproteína la interacción podría ser vía receptores scavenger tipo A), es capaz de activar IRAK1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1), lo que produce una disminución de la secreción de IL-12 y por lo tanto, polariza hacia una respuesta adaptativa Th2 convencional. En el caso de *Fasciola hepatica*, este mismo fenómeno ocurre mediante la presencia de antígenos en el tegumento del parásito,

que inhiben la producción de NF- κ B p65, lo que lleva a una disminución de IL-12 y la subsecuente polarización hacia una respuesta Th2 (Everts et al., 2010). En el caso de ambos parásitos, la modulación de células dendríticas pareciera ser TLR independiente. Dado que *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus* se cubren con glicolípidos de su hospedero, es posible que la respuesta provocada en las células dendríticas corresponda a tolerancia inmunológica en conjunto con una respuesta clásica Th2, resultando en el perfil de respuesta Th2 modificada. Además, ambos parásitos poseen productos de excreción/secreción que alteran la función de las diferentes células del sistema inmune. Por ejemplo, otra de las funciones descritas para el antígeno B de *Echinococcus granulosus* (específicamente la porción C-terminal del monómero más pequeño de 12 kDa), es la de actuar como una serpina (inhibidor de serin proteasas) y en consecuencia inhibir la elastasa y la quimotaxis de neutrófilos (Molehin et al., 2012). *Fasciola hepatica* en cambio posee una estrategia diferente, ya que actúa mediante la secreción de catepsinas. Estas cistein-proteasas son capaces de inhibir la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas, impidiendo la activación de linfocitos T (Everts et al., 2010). Además dichas proteasas inhiben directamente la proliferación de linfocitos T (Sharaf et al., 2016) y actúan degradando el receptor TLR3 dentro del macrófago, bloqueando una vía de señalización hacia una respuesta Th1 (McVeigh et al., 2012). En cuanto a co-infecciones entre *Echinococcus granulosus* y otros parásitos, un estudio realizado en ovinos y caprinos en Tanzania, determinó que solo un 9% y 23% de los animales parasitados presentaban *Echinococcus granulosus* o *Cysticercus tenuicollis* como infección única, y que por razones logísticas no fue posible relacionar qué efectos tenían en sus hospederos o entre los parásitos la ocurrencia de ambos cestodos de forma simultánea.

nea (Miran et al., 2017). En otro estudio realizado en bovinos de Etiopía, se analizaron prevalencias y fertilidad de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* y cisticercos de *Cysticercus bovis*, y si bien la presencia de los parásitos están asociados a una menor condición corporal de los animales, los autores solo plantean que existe la posibilidad de que podrían estar co-infectando de forma simultánea a dichos animales (Beyene and Hiko, 2019). Debido a que estas patologías se notifican en plantas faenadoras, y dada la estructura en que ocurre la faena, logísticamente es complejo determinar efectivamente cuáles son los animales que presentan parásitos de forma simultánea.

Nuestro grupo de investigación por muchos años se ha enfocado en el estudio de los quistes hidatídicos en bovinos, particularmente en lo relativo a la fertilidad de los quistes hidatídicos, un aspecto importante de la biología de *Echinococcus granulosus* (Paredes et al., 2011; Riesle et al., 2014). Los quistes hidatídicos fértiles se caracterizan por la producción de protoescólices, estadio infectante para el hospedero definitivo (cánidos). Contrariamente, quistes hidatídicos infértiles no producen protoescólices y por lo tanto son incapaces de continuar el ciclo de vida del parásito. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la fertilidad/infertilidad de quistes hidatídicos aún no han sido dilucidados (Paredes et al., 2007). Sin embargo, la respuesta inmune local del hospedero intermediario contra el parásito ha sido propuesta como la causa más probable de la infertilidad de quistes hidatídicos (Amri et al., 2007; Rigano et al., 2007; Rigano et al., 1995; Shepherd et al., 1991; Vuitton, 2003; Zheng, 2013). El bovino ha sido el principal modelo de estudio, ya que en Chile la mayor proporción de quistes hidatídicos que se encuentran en el pulmón de estos

animales son de tipo infértil. Debido a que gran parte de los bovinos estudiados estaban co-infectados con *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus* (Stoore et al., 2018), surge la pregunta si dicho poliparasitismo podría estar relacionado con la alta proporción de quistes hidatídicos infértiles que usualmente se encuentra en el ganado bovino chileno, contrariamente a lo que se ha observado en bovinos residentes en otras partes de la orbe (Andresiuk et al., 2009). Este es un tema de particular importancia considerando la participación de bovinos en la mantención del ciclo de vida del parásito y su vinculación con la infección en humanos.

La modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero mamífero hacia una respuesta “Th2-like” descrita tanto para *Fasciola hepatica* como para *Echinococcus granulosus*, sugiere que la relación que se establecería en una co-infección con ambos parásitos debería ser de carácter sinérgico. A pesar de esto, la presencia de *Fasciola hepatica* induce cambios en la frecuencia de presentación de los quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* en los bovinos que presentan dicha co-infección. Así, la cantidad de quistes hidatídicos alojados en hígado de hospederos bovinos co-infectados por ambos parásitos es casi nula y en pulmón, es más frecuente encontrar quistes hidatídicos pequeños en animales co-infectados (Stoore et al., 2018). Dado que *Fasciola hepatica* provoca una gran fibrosis del parénquima hepático, la inhabilidad de *Echinococcus granulosus* de desarrollarse en el hígado puede ser debida a una expulsión no específica. Sin embargo, el pobre desarrollo en pulmón sugiere la existencia de un efecto de carácter sistémico provocado por *Fasciola hepatica*. Los efectos en el hospedero que produce *Fasciola hepatica* en co-infecciones con otros patógenos está bien documentada: *Fasciola hepatica* inhibe la respuesta Th1 contra

Bordetella pertusis (O'Neill et al., 2001), inhibe la respuesta inmune celular contra *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn et al., 2007) y al co-infectar individuos con *Toxoplasma gondii*, dicho protozoo es capaz de suprimir la respuesta “Th2-like” y de macrófagos M2 que genera *Fasciola hepatica* (Miller et al., 2009). A pesar de encontrarse frecuentemente co-infectando un mismo hospedero, no existen trabajos que documenten la interacción directa o indirecta (por modulación del sistema inmune) entre *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus*.

Un aspecto crítico que considerar es la variabilidad genética que existe para la especie *Echinococcus granulosus*. Mediante estudios de amplificación y secuenciación de segmentos parciales de genes mitocondriales, se determinó que existían 10 “genotipos” diferentes de *Echinococcus granulosus*, denominados G1-G10; en ese momento, se determinó que las cepas G1-G3 provenían desde quistes hidatídicos ovinos, G4 equino, G5 bovino, G6 camello-cabra, G7 porcino y G8-G10 indeterminados (Bowles et al., 1992). Esta nomenclatura, que se sigue utilizando aún en ciertas publicaciones científicas, es incorrecta. Actualmente, gracias a estudios de secuenciación completa de genes mitocondriales, se ha determinado que existen sub-especies de *Echinococcus*; se denomina “*Echinococcus granulosus sensu lato*” cuando se habla del parásito en términos generales (como se ha mencionado a lo largo de esta introducción); se denomina *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) al parásito asociado a quistes hidatídicos en ovinos, *Echinococcus equinus* (equinos), *Echinococcus ortleppi* (bovinos), *Echinococcus canadensis* (cérvidos), *Echinococcus intermedius* (cerdos, camellos), *Echinococcus felidis* (ciclo león – cebra) (Thompson, 2017). Dentro de muestras de *Echinococcus granulosus* s.s., existe una gran variabi-

lidad intraespecífica, lo que da origen a diferentes haplotipos. El haplotipo denominado Eg01 se encuentra distribuido en todo el mundo, incluyendo Chile, afectando a diferentes hospederos intermediarios (Alvarez Rojas et al., 2017). Se ha propuesto que los haplotipos de *Echinococcus granulosus* s.s. podrían correlacionarse con aspectos biológicos del parásito, como la fertilidad de quistes hidatídicos (Romig et al., 2015); hecho que se descarta en los resultados de esta tesis.

Por los motivos anteriormente expuestos, se caracterizó el tipo de respuesta inmune local que se genera a nivel de la capa adventicia de quistes hidatídicos obtenidos desde 2 hospederos intermediarios diferentes: bovinos y ovinos en diferentes áreas geográficas del país y bajo 2 condiciones: con y sin la presencia de *Fasciola hepatica*. Esto implicó realizar el estudio histológico de los tipos celulares presentes en la capa adventicia de quistes hidatídicos, así como de las características morfológicas de la capa laminar y germinativa del parásito. Concomitantemente, se determinó el haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s. presente en las muestras de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, y se correlacionó con el estado de fertilidad y características biológicas. Utilizando métodos estadísticos, se determinó si la presencia de *Fasciola hepatica* y/o la respuesta inmune específica de cada hospedero intermediario son determinantes en el desarrollo de los quistes hidatídicos. Los resultados de esta tesis permiten comprender mejor un poliparasitismo pobremente estudiado y aporta al conocimiento de la biología de *Echinococcus granulosus* s.s., agente causal de una enfermedad parasitaria de alta prevalencia en nuestro país.

HIPÓTESIS

Considerando que el poliparasitismo ocurre de forma natural en animales y seres humanos junto con que las interacciones entre parásitos son específicas para el hospedero que las alberga y analizando nuestros resultados previos que demuestran que animales co-infectados con *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus* presentan un patrón de distribución de quistes hidatídicos diferencial, es que se propone la siguiente hipótesis: **“*Fasciola hepatica* posee una interacción antagónica con *Echinococcus granulosus*, promoviendo la infiltración de macrófagos y linfocitos en la capa adventicia de quistes hidatídicos de rumiantes e induciendo su infertilidad”**

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta inmune de tipo celular producida localmente contra quistes hidatídicos en presencia y ausencia de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos, y relacionarla con las características morfológicas *Echinococcus granulosus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Caracterizar el infiltrado celular presente en cortes histológicos de la capa adventicia y las características morfológicas de la capa laminar y germinal de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* obtenidos desde hígado y pulmón de bovinos y ovinos en presencia y ausencia de co-infección con *Fasciola hepatica*.
- 2.- Analizar la variabilidad intraespecífica del *Echinococcus granulosus* y su asociación a las características morfohistológicas de la capa adventicia de los quistes hidatídicos obtenidos desde hígado y pulmón en bovinos y ovinos
- 3.- Determinar si la presencia de *Fasciola hepatica* en rumiantes se correlaciona con una alteración del estado de fertilidad del quiste y/o de la morfología del metacestodo de *Echinococcus granulosus*.

CAPÍTULO I

Objetivo

Caracterizar el infiltrado celular presente en cortes histológicos de la capa adventicia y las características morfológicas de la capa laminar y germinal de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* obtenidos desde hígado y pulmón de bovinos y ovinos en presencia y ausencia de co-infección con *Fasciola hepatica*

Materiales y métodos

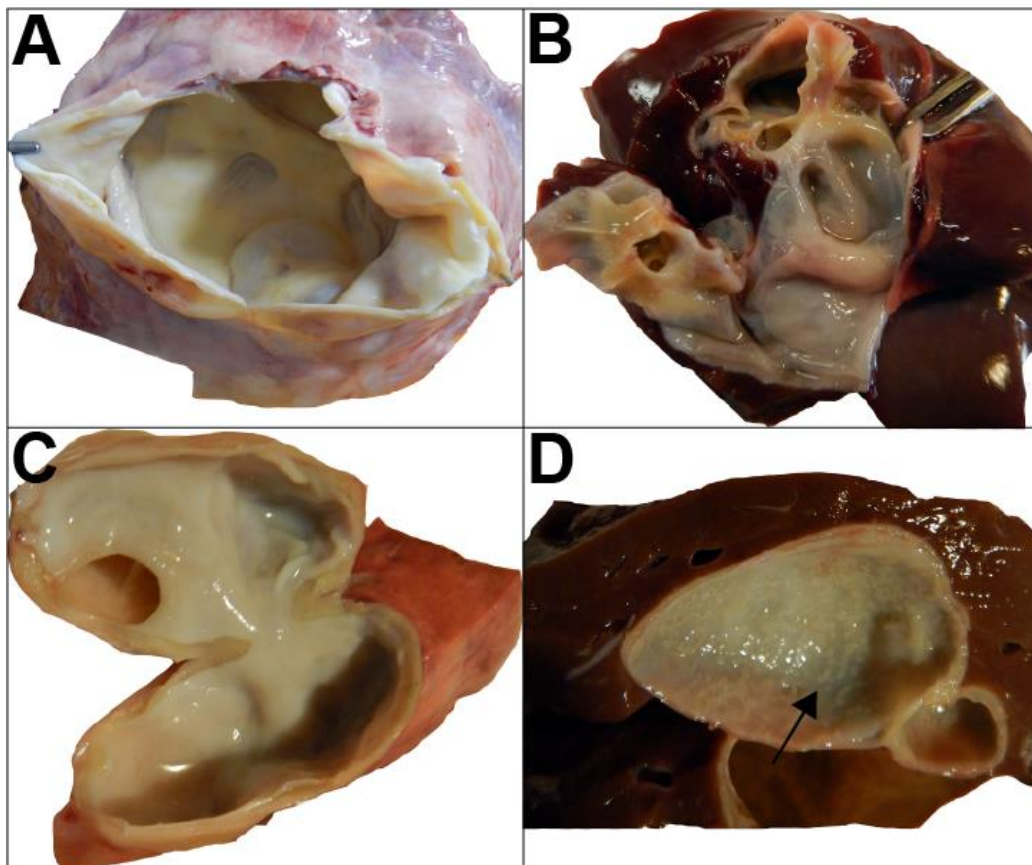
Se obtuvieron muestras de quistes hidatídicos desde bovinos y ovinos en mataderos de las siguientes ciudades en cinco Regiones de Chile: Illapel (Región de Coquimbo, bovino); Santiago (Región Metropolitana, bovinos y ovinos), Rancagua (Región de O'Higgins, bovinos), Osorno (Región de Los Lagos, bovinos y ovinos) y Punta Arenas (Región de Magallanes, bovinos y ovinos). Se destaca que Punta Arenas está libre de *Fasciola hepatica*.

En terreno, para cada animal faenado se inspeccionaron las vísceras (hígado y pulmón) decomisadas por el personal de la planta faenadora. Se registró cuántos quistes hidatídicos había en cada víscera y se recolectaron todos los quistes hidatídicos sin importar el tamaño, los que se depositaron en bolsas ziploc dentro de un cooler refrigerado a 4°C. La presencia *Fasciola hepatica* se realizó confirmando directamente tanto la presencia del trematodo en los canalículos biliares como con signos macroscópicos asociados a su presencia: canalículos biliares engrosados, fibrosis hepática extensa y bilis negra.

En el laboratorio, cada quiste hidatídico se procesó de la siguiente manera:

1. Asignación de un número correlativo, comenzando con la muestra EG01
2. Medición del diámetro en milímetros con un pie de metro digital.
3. Extracción de 20 mL (o menos dependiendo del tamaño) de líquido hidatídico para disminuir la presión interna.
4. Utilizando un bisturí estéril, se abrió el quiste por su eje longitudinal mayor
5. Determinación de fertilidad macroscópica: se clasificó como “fértil” a aquellos quistes hidatídicos que presentaran protoescólices flotando en el líquido hidatídico de la cámara interna del quiste junto con yemas adheridas a la capa germinal (Figura 2).

Figura 2. Aspecto macroscópico de quistes hidatídicos fértiles e infértiles desde pulmón e hígado de bovinos y ovinos.

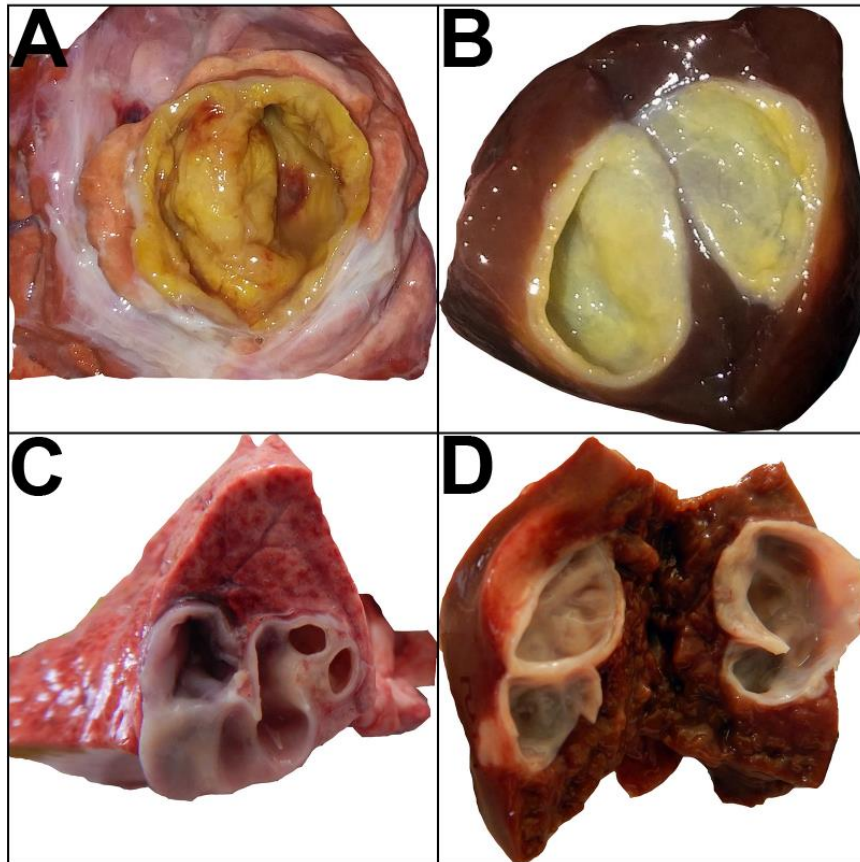


Imágenes macroscópicas de quistes hidatídicos fértiles de pulmón e hígado Bovino (A y B) y Ovino (C y D). Los quistes hidatídicos fértiles se caracterizan por tener una capa laminar gruesa de color blanco que se desprende fácilmente de la capa adventicia, junto con protoescólices flotando en el líquido hidatídico y yemas adheridas en la cara interna del quiste (flecha negra).

6. Determinación de viabilidad de protoescólices: se tomó con una pipeta Pasteur una gota que contuviera entre 20 a 100 protoescólices aproximadamente y se depositó en un portaobjetos, al que se le agregó una gota de Azul de Tripán y se observaron al microscopio de campo claro.

7. Se consideró “infértil” aquellos quistes hidatídicos con ausencia de protoescólices en su interior (Figura 3). Esta ausencia se comprobó microscópicamente revisando segmentos de capa germinal al microscopio. Aquellos quistes hidatídicos con 0% de viabilidad de protoescólices también fueron considerados infértiles.

Figura 3. Aspecto macroscópico de quistes hidatídicos infértiles e infértiles desde pulmón e hígado de bovinos y ovinos.



Imágenes macroscópicas de quistes hidatídicos infértiles de pulmón e hígado Bovino (A y B) y Ovino (C y D). Se puede observar que los quistes hidatídicos infértiles de bovino poseen una capa laminar amarilla, a diferencia de los quistes infértiles de ovinos.

8. Los quistes se fotografiaron para obtener un registro del color de la capa laminar junto con la cantidad de cámaras internas del quiste y color del líquido hidatídico.

9. Se obtuvo un segmento de la capa germinal para la extracción de DNA y posterior determinación del genotipo. Este segmento se depositó en un microtubo de 1,5 mL con 1 mL de DNAzol.

10. Se obtuvieron 2 trozos de la pared de cada quiste, que contuvieran tejido del parénquima, capa adventicia y laminar. Este trozo se depositó en un frasco de 50 mL con 25 mL de All-Fix, un fijador análogo de la formalina.

Para realizar el estudio histológico de la capa adventicia, las muestras fijadas se orientaron para realizar el corte de forma transversal. Se depositaron en cassettes de biopsia y fueron incluidas en parafina utilizando un procesador automático de tejidos Leica con un programa de 12 horas. Los bloques de parafina fueron hechos en un centro de inclusión Leica. Luego, cada bloque fue cortado en un micrótopo Leica y se obtuvieron cortes de 5 μ m de grosor. Finalmente, las láminas fueron teñidas con la técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE).

Protocolo de tinción con HE

I. Desparafinación y Rehidratación

- Incubar placas en estufa a 60°C por 1 hora
- 10 minutos en Neoclear (Merck) I
- 5 minutos en Neoclear II
- 5 minutos en Etanol 100% I
- 5 minutos en Etanol 100% II
- 5 minutos en Etanol 95% I
- 5 minutos en Etanol 95% II
- 5 minutos en Etanol 80%
- 5 minutos en Etanol 70%
- 5 minutos en Agua Destilada

II. Tinción

- Incubación 4 minutos en Hematoxilina modificada según Gill III (Merck)
- 1 minuto en agua corriente corriendo
- 6 segundos en Alcohol Ácido (70% Etanol, 0,3% Ácido Clorhídrico)
- 5 segundos en agua corriente
- 10 segundos en Azulador (5% NaHCO₃, 166 mM MgSO₄)
- 5 segundos en agua corriente

III. Deshidratación

- 15 segundos en Etanol 95% I
- 15 segundos en Etanol 95% II
- 15 segundos en Etanol 95% III
- 3 minutos en Etanol 100% I
- 3 minutos en Etanol 100% II
- 5 minutos en Neoclear I
- 10 minutos en Neoclear II
- Montaje definitivo con Neomount (Merck).

Para realizar el estudio de los patrones de fibrosis presentes en la capa adventicia, se realizó la técnica histoquímica de Perls-Van Gieson. Se utilizó un kit DiaPath #010237 y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para el estudio específico de los macrófagos presentes en la capa adventicia, se realizaron 3 técnicas de inmunohistoquímica:

Protocolo de inmunohistoquímica para detección específica de macrófagos:

- Desparafinar y rehidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

- Incubar placas con solución de tripsina (0,05%) por 15 minutos a 37°C en cámara húmeda
- Enfriar placas por 10 minutos a temperatura ambiente
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween-20 0,05%
- Bloquear unión inespecífica de proteínas con Background Block (Cell Marque #927B-05)
- Incubar con Anticuerpo Monoclonal MA1-80446 (ThermoFisher Scientific #MAC387) diluido 1:200 en Background Block por 1 hora.
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Bloquear peroxidasa endógena con solución de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 minutos.
- Realizar 3 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Incubar con Anticuerpo Secundario conjugado a HRP, AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch #115-035-003) diluido 1:1000 en Background Block por 1 hora.
- Realizar 4 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Realizar detección del anticuerpo con el kit DAB-Plus Substrate Kit (Life Technologies #002020) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Realizar contratinción de núcleos con Hematoxilina por 30 segundos
- Deshidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

Protocolo de inmunohistoquímica para detección específica de Arginasa-I:

- Desparafinar y rehidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

- Incubar placas 20 minutos en buffer de recuperación antigénica Citrato (1M Citrato de Sodio, 0,05% Tween) en microondas a mínima potencia.
- Enfriar placas por 20 minutos a temperatura ambiente
- Incubar con Anticuerpo Policlonal Anti-ARG1 (Sigma-Aldrich #SAB2108591) diluido 1:500 en Background Block por 12 horas a 4°C.
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Bloquear peroxidasa endógena con solución de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 minutos.
- Realizar 3 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Incubar con Anticuerpo Secundario conjugado a HRP, AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch #111-035-144) diluido 1:1000 en Background Block por 1 hora.
- Realizar 4 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Realizar detección del anticuerpo con el kit DAB-Plus Substrate Kit (Life Technologies #002020) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Realizar contratinción de núcleos con Hematoxilina por 30 segundos
- Deshidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

Protocolo de inmunohistoquímica para detección específica de Nitrotirosina:

- Desparafinar y rehidratar muestras siguiendo el protocolo de HE
- Incubar placas 20 minutos en buffer de recuperación antigénica Citrato (1M Citrato de Sodio, 0,05% Tween) en microondas a mínima potencia.
- Enfriar placas por 20 minutos a temperatura ambiente

- Incubar con Anticuerpo Monoclonal Anti-Nitrotirosina (Sigma-Aldrich #SAB5200009) diluido 1:400 en Background Block por 12 horas a 4°C.
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Bloquear peroxidases endógenas con solución de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 minutos.
- Realizar 3 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Incubar con Anticuerpo Secundario conjugado a HRP, AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch #115-035-003) diluido 1:1000 en Background Block por 1 hora.
- Realizar 4 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Realizar detección del anticuerpo con el kit DAB-Plus Substrate Kit (Life Technologies #002020) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Realizar contratinción de núcleos con Hematoxilina por 30 segundos
- Deshidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

Protocolo de inmunohistoquímica para detección específica de células de *Echinococcus granulosus*:

- Desparafinar y rehidratar muestras siguiendo el protocolo de HE
- Incubar placas con solución de tripsina (0,05%) por 15 minutos a 37°C en cámara húmeda
- Enfriar placas por 10 minutos a temperatura ambiente
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween-20 0,05%
- Bloquear unión inespecífica de proteínas con Background Block (Cell Marque #927B-05)

- Incubar con Anticuerpo Policlonal EgAldo (Donado por el Dr. Henrique Ferreira Bunselmeyer, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) diluido 1:1000 en Background Block por 12 horas a 4°C.
- Realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Bloquear peroxidases endógenas con solución de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 minutos.
- Realizar 3 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Incubar con Anticuerpo Secundario conjugado a HRP, AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch #111-035-144) diluido 1:1000 en Background Block por 1 hora.
- Realizar 4 lavados de 2 minutos con PBS-Tween 0,05%
- Realizar detección del anticuerpo con el kit DAB-Plus Substrate Kit (Life Technologies #002020) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Realizar contratinción de núcleos con Hematoxilina por 30 segundos
- Deshidratar muestras siguiendo el protocolo de HE

Protocolo de análisis morfohistológico de capa adventicia con tinción HE:

Cada placa se observó al microscopio de campo claro para evaluar que contuviera los siguientes elementos: capa laminar, capa adventicia, parénquima del órgano parasitado. Para las placas que tuvieran alguno de estos 3 elementos ausentes, se desgastaron 250 µm del bloque de parafina y se volvió a observar con tinción de HE. Si en esta segunda placa nuevamente había alguno de estos 3 elementos ausentes, se volvía a desgastar 250 µm del bloque para una tercera tinción con HE. Si la terce-

ra placa tampoco contenía los tres elementos mencionados, esa muestra se descarta. Se definieron 10 criterios de análisis morfohistológico:

Segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia

Al observar la capa laminar de *Echinococcus granulosus* por microscopía óptica se puede identificar esta capa por su color eosinofílico y estriaciones entre capas formando líneas paralelas. La capa laminar está en contacto tanto con las células de la capa germinal del parásito, hacia el interior del quiste, como con las células del hospedero en la capa adventicia en parte más exterior del metacestodo. Se consideró como “presente” este hallazgo morfohistológico cuando se encontraran fragmentos de la capa laminar dentro de la capa adventicia, así como la infiltración de células del hospedero entremedio de las láminas de la capa laminar.

Necrosis entre la capa laminar y adventicia

Entre la capa laminar y adventicia, es posible distinguir una zona eosinofílica intensa, que capta más eosina que la capa laminar o el citoplasma de las células de la capa adventicia y no posee una organización en fibras como el colágeno. La confirmación de este hallazgo fue realizada con la técnica histoquímica de Van Gieson.

Calcificaciones en la capa adventicia

Las calcificaciones a nivel histológico son basófilas y se tiñen intensamente con hematoxilina. Se consideró como “presente” este hallazgo histológico cuando se observaron zonas teñidas intensamente con hematoxilina en ausencia de células.

Células del hospedero en la capa germinal

La capa germinal del parásito se encuentra protegida por una matriz extracelular llamada capa laminar que la separa del sistema inmune de su hospedero y le permite

discriminar qué elementos del hospedero son capaces de ingresar al interior del quiste (macromoléculas principalmente). La presencia de células del hospedero dentro del quiste hidatídico se consideró como “presente” cuando se observaron células en la cara interna del quiste hidatídico cuyos núcleos y tamaño fueran superiores a las células de la capa germinal. Este hallazgo morfohistológico se confirmó realizando de forma simultánea las técnicas de inmunohistoquímica contra macrófagos y células del parásito.

Células gigantes multinucleadas en la capa adventicia

El infiltrado inflamatorio presente en la capa adventicia está compuesto por diversas células, entre ellas se pueden identificar las células gigantes multinucleadas, que son consideradas las primeras en formarse a raíz de la reacción del sistema inmune contra un cuerpo extraño. Se consideró como “presente” este hallazgo al visualizar en la capa adventicia, al menos 5 células multinucleadas que estuvieran en contacto con la capa laminar.

Macrófagos en empalizada bajo la capa laminar

Bajo la capa laminar se observan macrófagos en empalizada a lo largo de la capa adventicia, con su citoplasma en contacto directo con la capa laminar y/o con el material eosinofílico (necrosis) que se forma bajo ésta. Se consideró como “presente” este hallazgo si al menos una porción de la capa laminar tuvo éste tipo de células en contacto directo.

Centros germinales de linfocitos

Dentro de la capa adventicia se pueden observar cúmulos de linfocitos formando centros germinales. Se consideró como “presente” cuando dentro de la capa adventicia se pudo observar al menos 1 centro germinal.

Presencia de eosinófilos en la capa adventicia

Los eosinófilos se observan asociados a los centros germinales de linfocitos, infiltrando la capa laminar y/o difusos en la capa adventicia. Se consideró como “presente” cuando se observaron al menos 5 eosinófilos por campo de aumento mayor (40X).

Localización de la capa de fibrosis

La reacción de fibrosis en la capa adventicia que encapsula al metacestodo puede tener 4 disposiciones distintas. El Patrón de Fibrosis I, consiste en una cápsula fibrótica que separa el infiltrado inflamatorio del parénquima del órgano. El Patrón de Fibrosis II, es una cápsula fibrótica que separa la capa laminar del parénquima del órgano, con ausencia de inflamación. El Patrón de Fibrosis III, es una cápsula fibrótica que separa la capa laminar del infiltrado inflamatorio. El Patrón de Fibrosis IV, es la ausencia de una cápsula fibrótica, en cambio, las fibras colágenas se encuentran de forma difusa entre el infiltrado inflamatorio.

Grosor de la capa laminar

Al medir los grosores de la capa laminar, se establecieron tres categorías: capa laminar delgada (promedio $<30 \mu\text{m}$); capa laminar intermedia (promedio entre 30 a $100 \mu\text{m}$) y capa laminar gruesa (promedio $>100 \mu\text{m}$).

Análisis estadístico

Para cada uno de los criterios, se utilizará la prueba exacta de Fischer para determinar si existe asociación entre la presencia o ausencia de *Fasciola hepatica* y la presencia o ausencia de cada criterio.

Resultados

Obtención de muestras

En la Región Metropolitana (RM), se realizaron 3 visitas al Matadero Lo Blanco, 1 al matadero CAMER y 1 al matadero Linderos: Se obtuvieron 102 quistes hidatídicos de bovinos, 49 en hígado y 53 en pulmón; en ovinos se obtuvieron 11 quistes hidatídicos, 5 en hígado y 6 en pulmón. En la Región de O'Higgins (VI) se realizaron 2 visitas al Matadero FAENAGRO: Se obtuvieron 5 quistes hidatídicos de bovinos, 4 en hígado y 1 en pulmón. En la Región de Coquimbo se realizaron 2 visitas al Matadero La Estancia: Se obtuvieron 2 quistes hidatídicos de bovinos, ambos de hígado. En la Región de Los Lagos (X) se realizaron 4 visitas al Matadero FRIGOSORNO: Se obtuvieron 46 quistes hidatídicos de bovinos, 5 en hígado y 60 en pulmón y 2 visitas al Matadero MAFRISUR: Se obtuvieron 71 quistes hidatídicos de ovinos, 19 de hígado y 52 de pulmón. En la Región de Magallanes (XII), se realizaron 4 visitas al Matadero AGROMARÍN y 3 visitas al Matadero Magallanes: Se obtuvieron 48 quistes hidatídicos en bovinos, 28 en hígado y 20 en pulmón; en ovinos se obtuvieron 133 quistes hidatídicos, 61 en hígado y 72 en pulmón (Tabla 1).

Tabla 1. Número total de quistes hidatídicos obtenidos desde pulmón e hígado de bovinos y ovinos faenados en 5 regiones de Chile.

	Bovinos (n = 82)								Ovinos (n = 117)								Total	
	Distomatosis +				Distomatosis -				Distomatosis +				Distomatosis -					
	Pulmón		Hígado		Pulmón		Hígado		Pulmón		Hígado		Pulmón		Hígado			
	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I		
RM	0	5	0	15	4	44	0	34	0	0	0	0	0	0	6	0	5	113
IV	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
VI	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
X	3	19	0	0	0	21	0	3	0	0	0	0	0	0	51	0	20	117
XII	0	0	0	0	0	20	1	27	0	0	0	0	34	38	30	31	181	
Total	3	24	0	15	4	86	1	70	0	0	0	0	34	95	30	56	418	

F = Quiste hidatídico fértil; I = Quiste hidatídico infértil. n = número de animales muestreados.

Análisis de co-infección

En bovinos, de un total de 117 quistes hidatídicos pulmonares, 27 fueron recolectados desde animales co-infectados con *Fasciola hepatica*, lo que corresponde a un 23% de las muestras. En hígado, de 86 quistes hidatídicos, 15 presentaron co-infección, lo que corresponde a un 17,4%. Del total de 203 quistes hidatídicos, 42 fueron recolectados desde animales co-infectados con *Fasciola hepatica*, lo que corresponde a un 20,6% global de co-infección.

Análisis de fertilidad

De los 418 quistes hidatídicos obtenidos, 72 fueron fértiles, arrojando un porcentaje de fertilidad global del 17%. Sin embargo, existen diferencias tanto a nivel geográfico como por especie hospedera (Tabla 2).

Tabla 2. Fertilidad de quistes hidatídicos de según región geográfica, especie hospedera y co-infección con *Fasciola hepatica*.

	Bovinos				Ovinos	
	Distomatosis +		Distomatosis -		Distomatosis -	
	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado
Región Metropolitana	0%	0%	9%	0%	0%	0%
Región de Coquimbo	n/a		n/a	0%	n/a	
Región de O'Higgins	n/a		0%	0%	n/a	
Región de Los Lagos	13%	n/a	0%	0%	0%	0%
Región de Magallanes	n/a		0%	3,5%	47%	49%
Total según co-infección	7,14%		3,1%		n/a	
Total según hospedero	3,79%				29,76%	

En bovinos, no se encontraron quistes fértiles en hígado en animales co-infectados con *Fasciola hepatica*. Este análisis no se puede realizar en ovinos, ya que no se encontraron en matadero ovinos infectados con *Fasciola hepatica*.

Análisis morfohistológico

A partir de los 418 quistes hidatídicos obtenidos, se realizaron 787 bloques histológicos. Aquellos bloques que no contaran con los elementos necesarios para el análisis en 3 placas consecutivas fueron eliminados; esto ocurrió en 112 bloques de parafina. En consecuencia, de los 418 quistes hidatídicos obtenidos, se analizaron 674 bloques, provenientes de 385 quistes hidatídicos (185 de bovinos y 200 de ovinos). Para aquellas muestras de quistes hidatídicos que contaran con 2 o más bloques de parafina aptos para el análisis de las diez categorías nombradas, las placas obtenidas se analizaron en conjunto para obtener un consenso de los elementos histopatológicos presentes; a modo de ejemplo, si para la muestra EG102, en 3 bloques diferentes, 2 de ellos contenían eosinófilos a nivel de la capa adventicia y uno de ellos no, queda registrado como positivo a eosinófilos. El total de cortes histológicos realizados se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidad de cortes histológicos realizados para cada técnica.

	Cortes realizados	Cortes descartados	Placas analizadas
HE	1010	336	674
VG	140	0	140

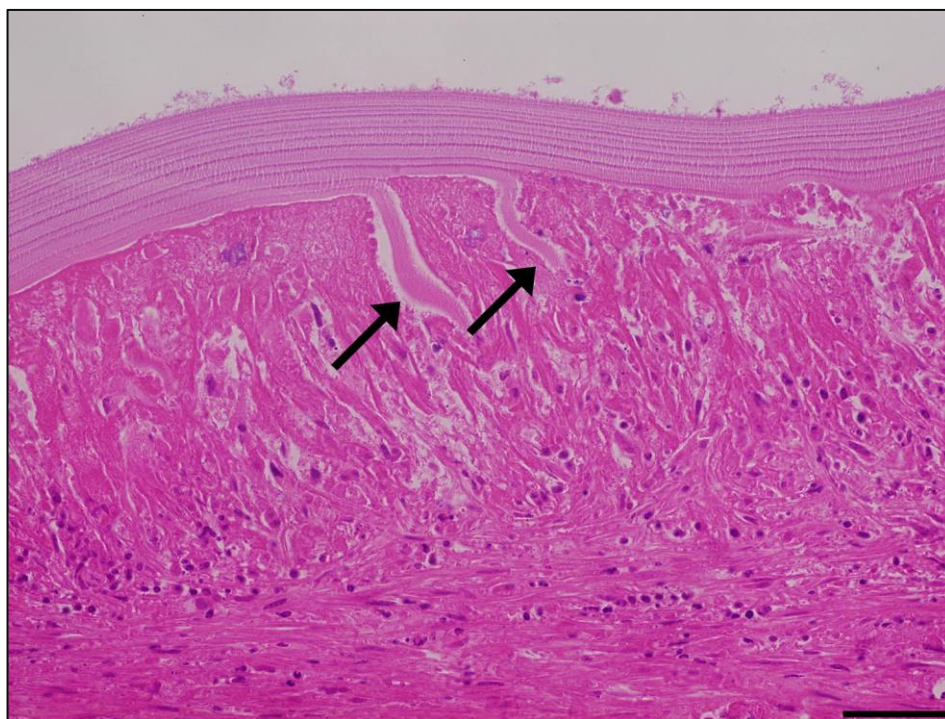
HE = Hematoxilina-eosina. VG = Van Gieson.

Dado que no se obtuvieron quistes hidatídicos en ovinos que estuvieran co-infectados con *Fasciola hepatica*, el análisis morfohistológico se enfocó entre las diferencias de capa adventicia entre quistes fértiles e infértiles. En bovinos, el análisis está enfocado en las diferencias entre animales co-infectados.

I. Segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia

En la Figura 4 se muestra una imagen representativa de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 4 el resultado del análisis.

Figura 4. Imagen representativa de segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia.



Microfotografía que demuestra la presencia de segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia (flechas). Tinción con HE, Barra de tamaño: 50 μ m.

Tabla 4. Presencia o ausencia de segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	10*	2*	14	9
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	29*	33*	32	56

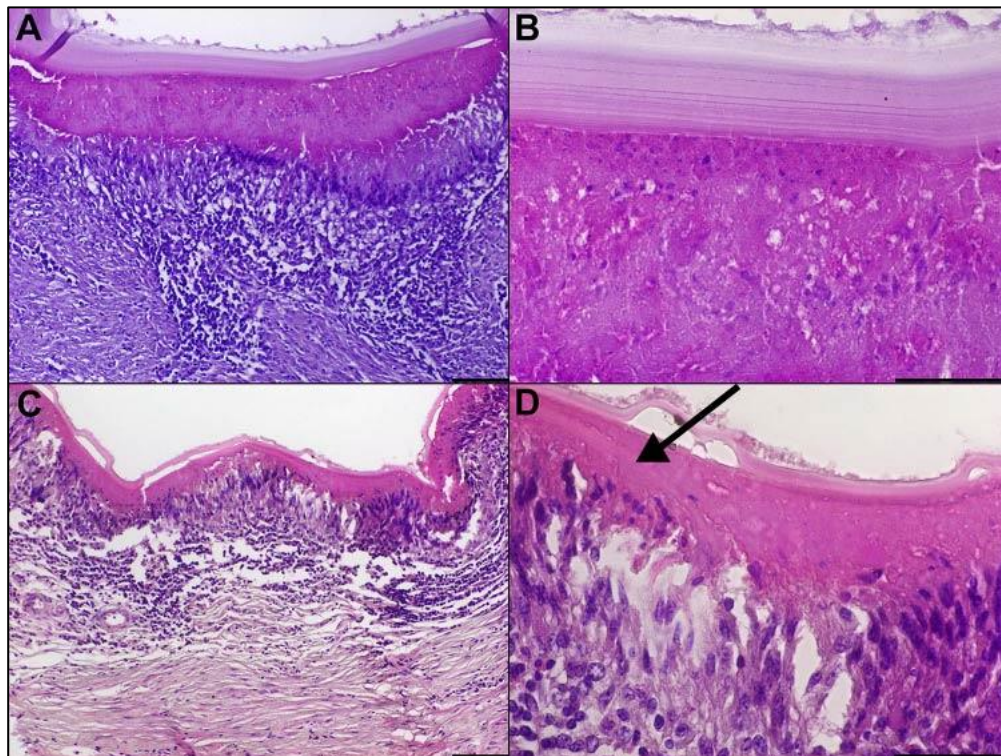
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	31	4	38	9
Infértil	33	7	61	16

En bovinos, la co-infección con *Fasciola hepatica* está asociada a la ausencia de segmentos de capa laminar dentro de la capa adventicia en quistes hidatídicos de hígado ($p = 0,0271$)*.

II. Necrosis entre la capa laminar y adventicia

Entre la capa laminar y adventicia, es posible distinguir una zona eosinofílica intensa, que capta más eosina que la capa laminar o el citoplasma de las células de la capa adventicia y no posee una organización en fibras como el colágeno. En la Figura 5 se muestra una imagen representativa de este hallazgo morfohistológico, con la confirmación por la técnica de Van Gieson en la Figura 6. Por último, en la Tabla 5 el resultado del análisis.

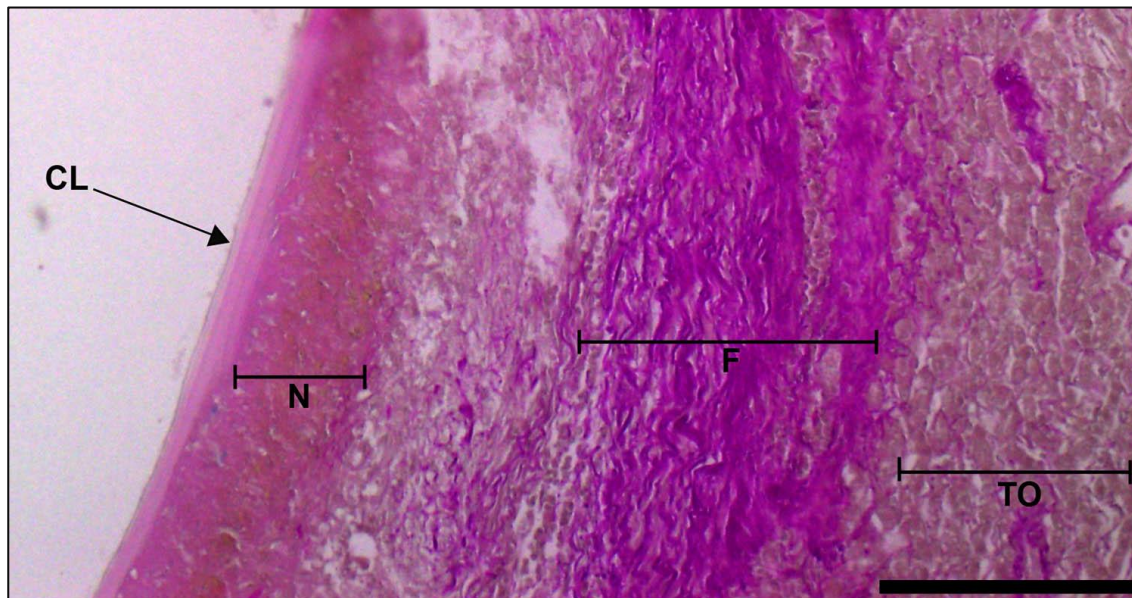
Figura 5. Imagen representativa de necrosis entre la capa laminar y adventicia.



Microfotografías que demuestran la presencia un material eosinofílico entre el infiltrado inflamatorio de la capa adventicia y la capa laminar. A, B: Quiste hidatídico infértil de pulmón. C, D: Quiste hidatídico infértil de hígado. La flecha en D indica un segmento de la capa lami-

nar que está dentro de esta zona. Tinción con HE, Barras de tamaño: A, C: 100 µm; B, D: 50 µm.

Figura 6. Técnica de Van Gieson que demuestra necrosis bajo capa laminar.



Microfotografía de un quiste hidatídico infértil hepático de bovino. Se observa que el material eosinofílico posee coloración anaranjada, mientras que las fibras colágenas se tiñen de un color fucsia intenso. CL = Capa laminar; N = Necrosis; F = Fibrosis; TO = Tejido del órgano. Barra de tamaño: 200 µm. Tinción de Van Gieson.

Tabla 5. Presencia o ausencia de necrosis bajo la capa laminar en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	1	11	12*	11*
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	15	47	24*	64*

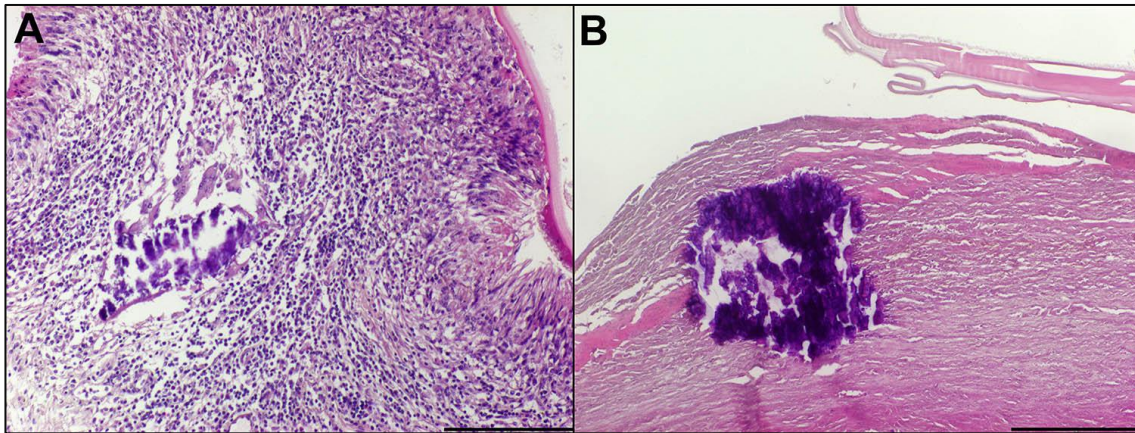
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	30†	5†	35‡	12‡
Infértil	19†	21†	30‡	47‡

En bovinos, la co-infección con *Fasciola hepatica* está asociada a la ausencia de necrosis bajo la capa laminar de quistes hidatídicos de pulmón ($p = 0,0432$)*. En ovinos, los quistes fértiles están asociados a una ausencia de necrosis bajo la capa laminar de quistes hidatídicos de hígado ($p = 0,0006$)† y pulmón ($p = 0,0002$)‡.

III. Calcificaciones en la capa adventicia

En la Figura 7 se muestra una imagen representativa de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 6 el resultado del análisis.

Figura 7. Imagen representativa de calcificaciones en la capa adventicia.



Microfotografías que demuestran la presencia de calcificaciones en la capa adventicia. A: Quiste hidatídico infértil de pulmón. B: Quiste hidatídico fértil de pulmón. Tinción con HE, Barra de tamaño: 200 μm .

Tabla 6. Presencia o ausencia de calcificaciones en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	7	5	23*	0*
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	34	28	74*	14*

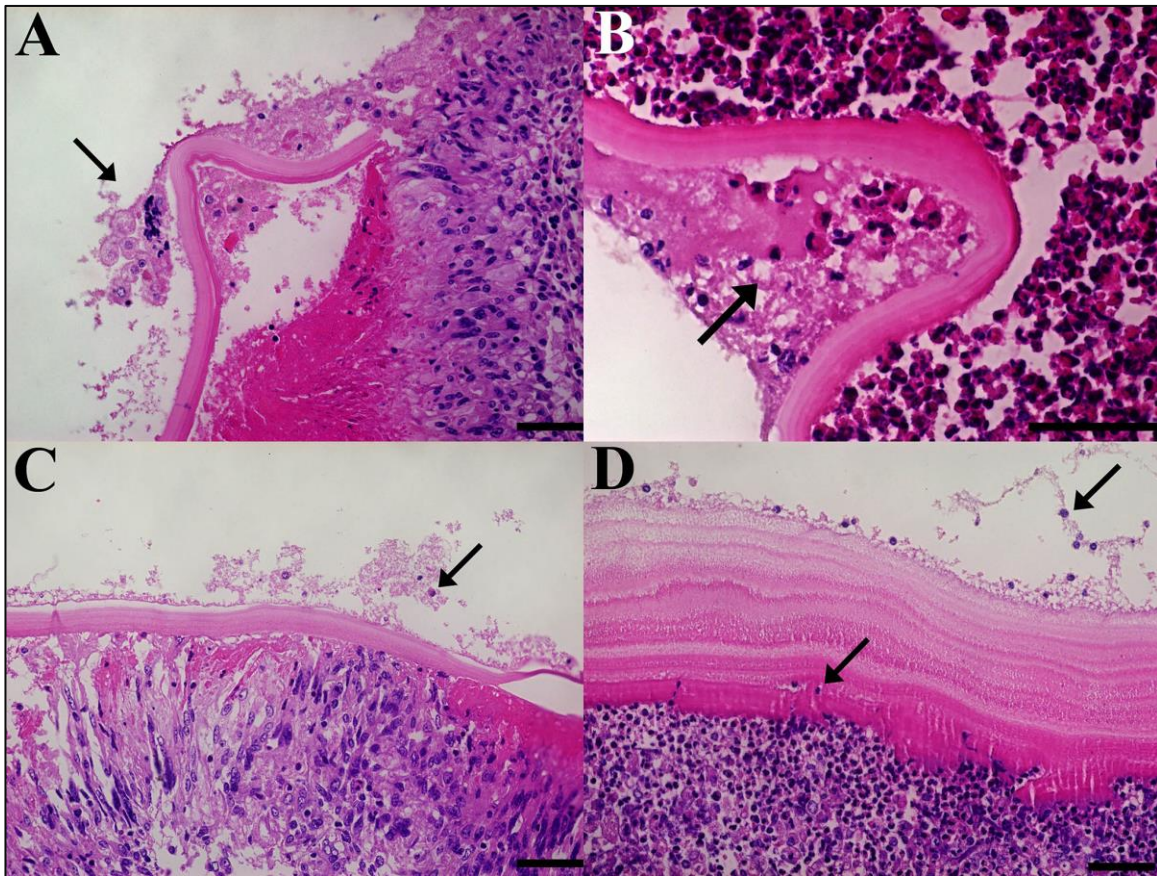
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	25	10	26†	21†
Infértil	19	21	28†	49†

En bovinos, la co-infección con *Fasciola hepatica* está asociada a la ausencia de calcificaciones en la capa adventicia de quistes hidatídicos de pulmón ($p = 0,0394$)*. En ovinos, los quistes fértiles de pulmón están asociados a una ausencia de calcificaciones en la capa adventicia ($p = 0,0426$) †.

IV. Células del hospedero en la capa germinal

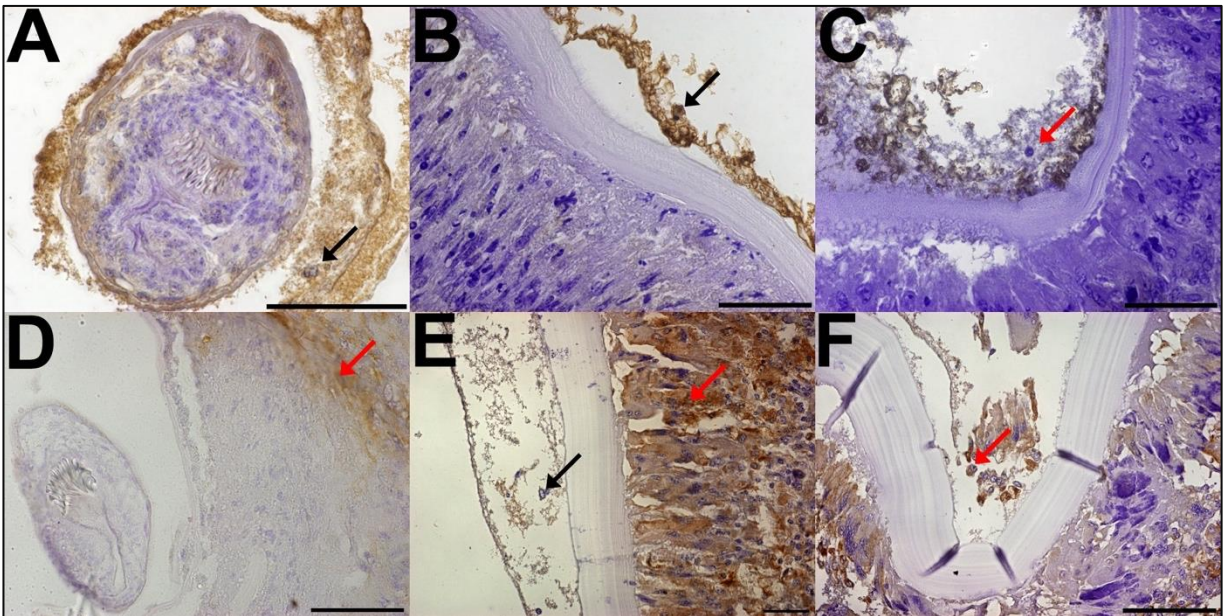
En la Figura 8 se muestran imágenes representativas de este hallazgo morfohistológico; en la Figura 9 se muestra la demostración de este hallazgo a través de inmunohistoquímica. Por último, en la Tabla 7 se muestra el resultado del análisis.

Figura 8. Imagen representativa de células del hospedero que infiltran la capa germinal del parásito.



Microfotografías que demuestran la presencia de células del hospedero (flechas) dentro de la capa germinal. Tinción con HE, Barra de tamaño: 50 μ m.

Figura 9. Ensayo de inmunohistoquímica que demuestra que son macrófagos del hospedero, y no células parasitarias, las que infiltran la capa germinal



Análisis inmunohistoquímico de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de *Echinococcus granulosus*. A y D: Protoescólice en quiste hidatídico fértil. B y E: Capa germinal de quiste hidatídico infértil sin infiltración de células del hospedero. C y F: Capa germinal de quiste hidatídico infértil con infiltración de células del hospedero. A, B, C: Ensayo de inmunohistoquímica contra aldolasa de *Echinococcus granulosus* (EgAldo), las flechas negras indican células del parásito positivas al marcador y la flecha roja indica célula del hospedero negativa al marcador. D, E, F: Ensayo de inmunohistoquímica contra macrófagos de bovino, la flecha negra indica células del parásito negativas al marcador y las flechas rojas indican células del hospedero positivas al marcador. Barras de tamaño: A, B, C, D, E: 50 μm , F: 100 μm .

Tabla 7. Presencia o ausencia de células del hospedero en la capa germinal de quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	12*	0*	14	9
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	41*	21*	61	27

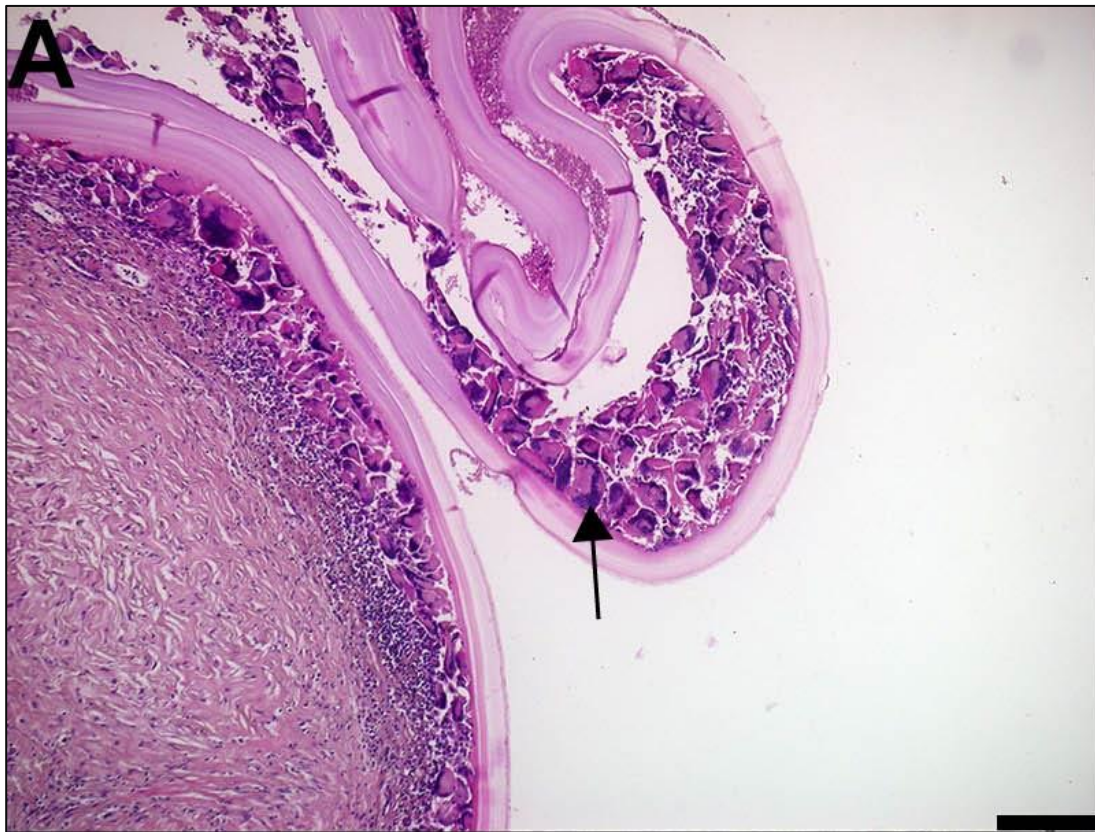
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	35†	0†	45	2
Infértil	28†	12†	77	0

La co-infección con *Fasciola hepatica* se asocia a una ausencia de células del hospedero dentro de la capa germinal ($p = 0,0152$)*. En ovinos, los quistes fértiles están asociados a una ausencia de células dentro de la capa germinal ($p = 0,0002$)†. En ambos casos, estas asociaciones ocurren solo en quistes hepáticos.

V. Células gigantes multinucleadas en la capa adventicia

En la Figura 10 se muestra una imagen representativa de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 8 el resultado del análisis.

Figura 10. Imagen representativa de células gigantes multinucleadas en la capa adventicia



Microfotografía que demuestra la presencia de células gigantes multinucleadas en la capa adventicia (flecha). Tinción de HE. Barra de tamaño: 200 μm.

Tabla 8. Presencia o ausencia de células gigantes multinucleadas en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	1	11	1	22
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	11	51	2	86

Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	33*	2*	40†	7†

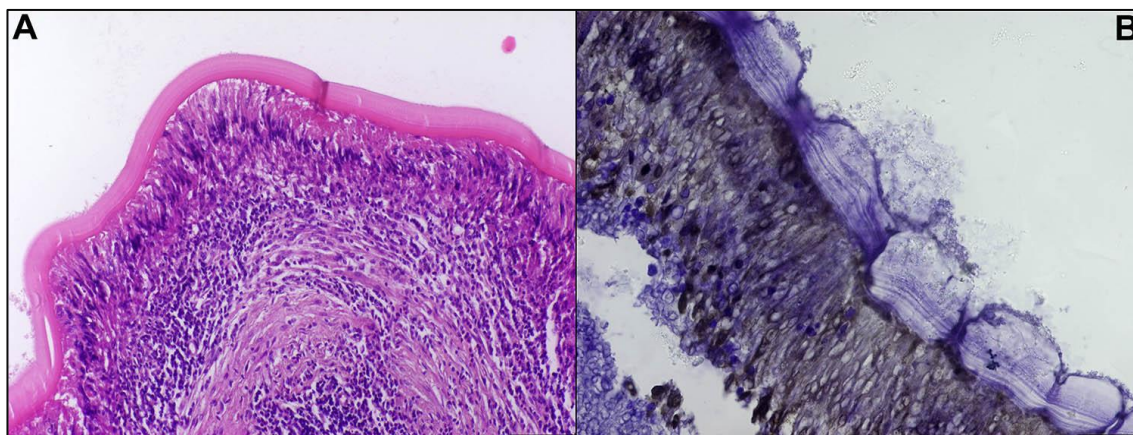
Infértil	23*	17*	52†	25†
----------	-----	-----	-----	-----

No hay asociación entre la co-infección con *Fasciola hepatica* y la presencia de células gigantes multinucleadas. En ovinos, los quistes fértiles están asociados a una ausencia de células gigantes multinucleadas en hígado ($p = 0,0004$)* y pulmón ($p = 0,0352$)†.

VI. Macrófagos en empalizada bajo la capa laminar

En la Figura 11 se muestra una imagen representativa de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 9 el resultado del análisis.

Figura 11. Imagen representativa de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar



Microfotografías que demuestran la presencia de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar. A: Capa adventicia de quiste hidatídico infértil de pulmón, las flechas indican los macrófagos en empalizada. B: Ensayo de inmunohistoquímica (IHQ) utilizando un anticuerpo contra macrófagos, las flechas indican las células positivas. A: Tinción con HE. Barras de tamaño: A: 100 μm , B: 50 μm

Tabla 9. Presencia o ausencia de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar de quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	2	10	5*	18*
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	1	61	3*	85*

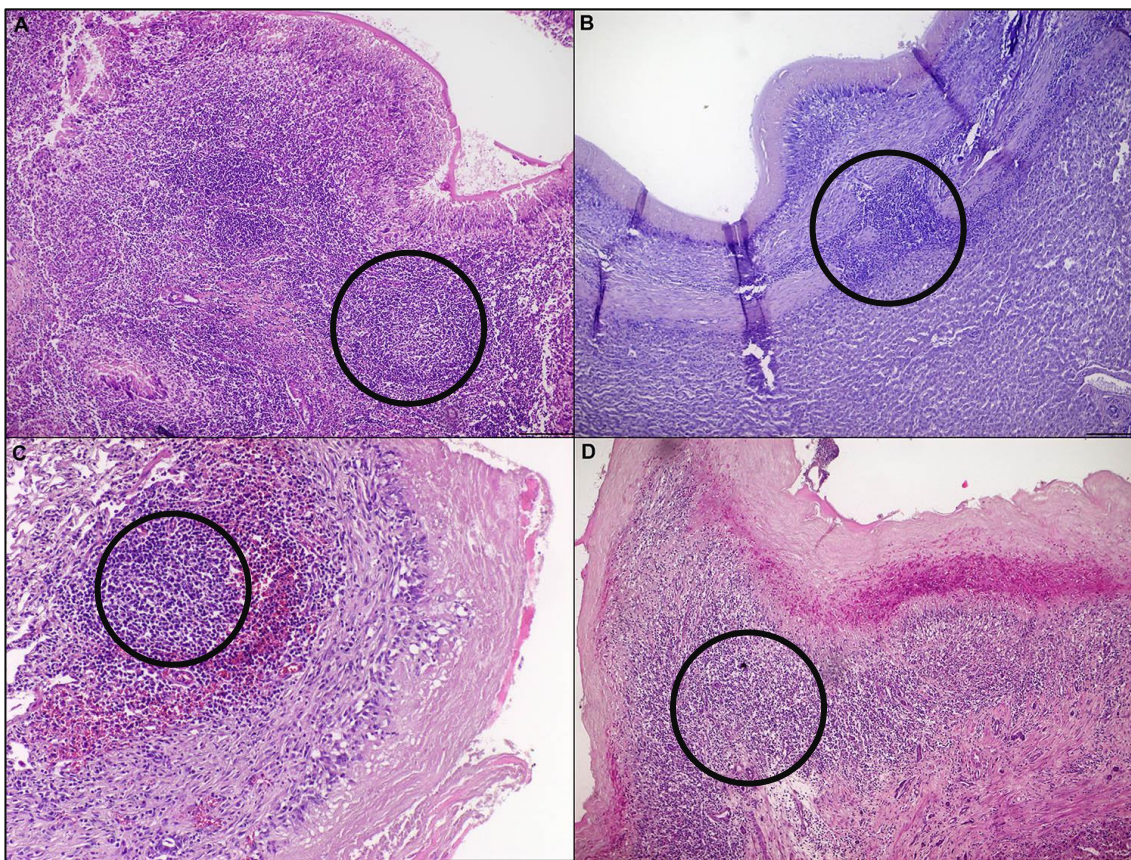
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	25†	10†	37	10
Infértil	18†	22†	48	29

La co-infección con *Fasciola hepatica* se asocia a una ausencia de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar en quistes hidatídicos de pulmón ($p = 0,0093$)*. En ovinos, los quistes fértiles de hígado están asociados a una ausencia de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar ($p = 0,0345$)†.

VII. Centros germinales de linfocitos

En la Figura 12 se muestran imágenes representativas de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 10 el resultado del análisis.

Figura 12. Imagen representativa de centros germinales de linfocitos



Microfotografías que demuestran la presencia de centros germinales de linfocitos capa adventicia. A: Quiste hidatídico infértil de pulmón; B: Quiste hidatídico infértil de hígado; C: Quiste hidatídico fértil de pulmón; D: Quiste hidatídico fértil de hígado. Los círculos indican los centros germinales de linfocitos. Tinción con HE, Barra de tamaño: 200 μ m

Tabla 10. Presencia o ausencia de centros germinales de linfocitos en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	8	4	2*	21*
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	3	59	5*	83*

Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente

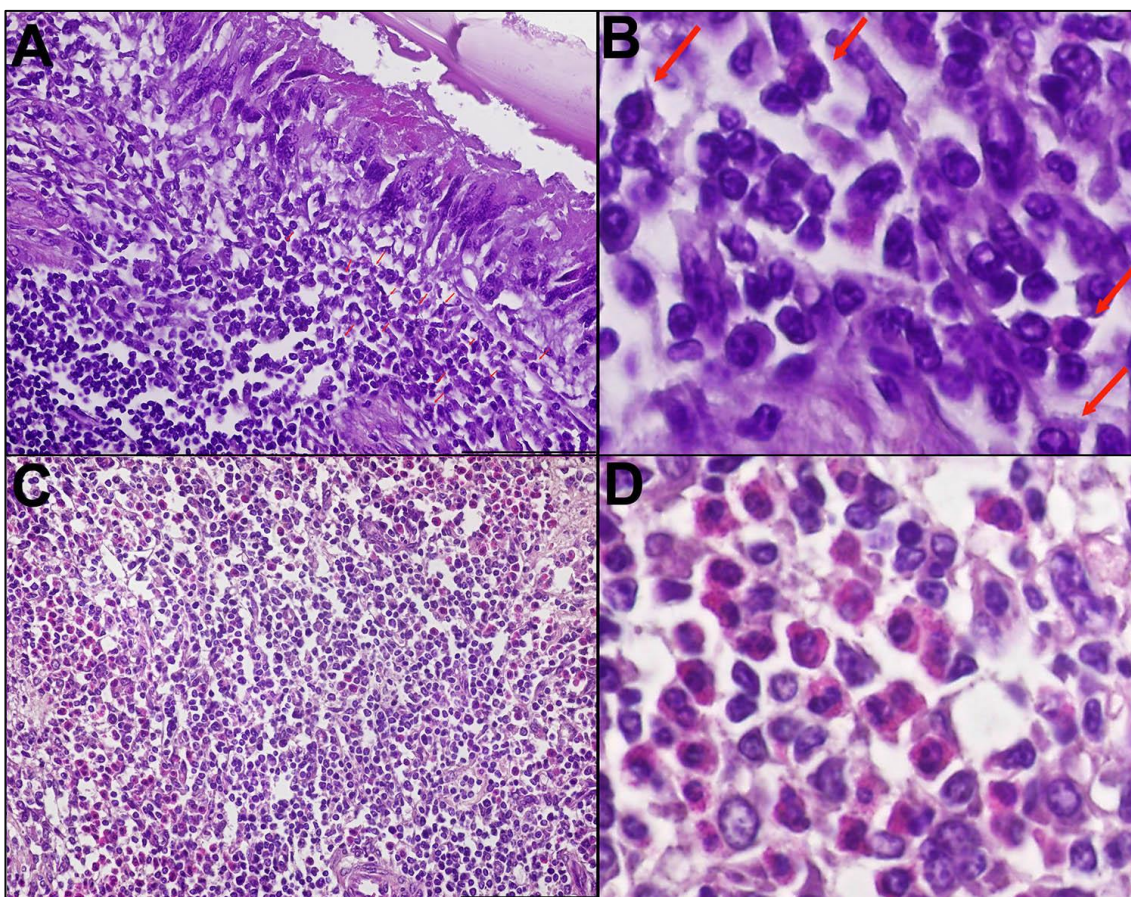
Fértil	22†	13†	31	16
Infértil	14†	26†	46	31

La co-infección con *Fasciola hepatica* se asocia a una ausencia de centros germinales de linfocitos en quistes hidatídicos de pulmón ($p < 0,0001$)*. En ovinos, los quistes fértiles de hígado están asociados a una ausencia de centros germinales de linfocitos ($p = 0,0212$)†.

VIII. Presencia de eosinófilos en la capa adventicia

En la Figura 13 se muestran imágenes representativas de este hallazgo morfohistológico y en la Tabla 11 el resultado del análisis.

Figura 13. Imagen representativa de eosinófilos en la capa adventicia



Microfotografías que demuestran la presencia de infiltrado de eosinófilos a nivel de la capa adventicia. A: Capa adventicia de quiste hidatídico infértil de pulmón, las flechas rojas indican

eosinófilos, los que se muestran con mayor detalle en B. C: Capa adventicia de quiste hidatídico fértil de hígado con un abundante infiltrado de eosinófilos, que se ven con mayor detalle en D. Tinción con HE, Barra de tamaño: 100 μ m.

Tabla 11. Presencia o ausencia de eosinófilos en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	0	12	2	21
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	0	62	1	87

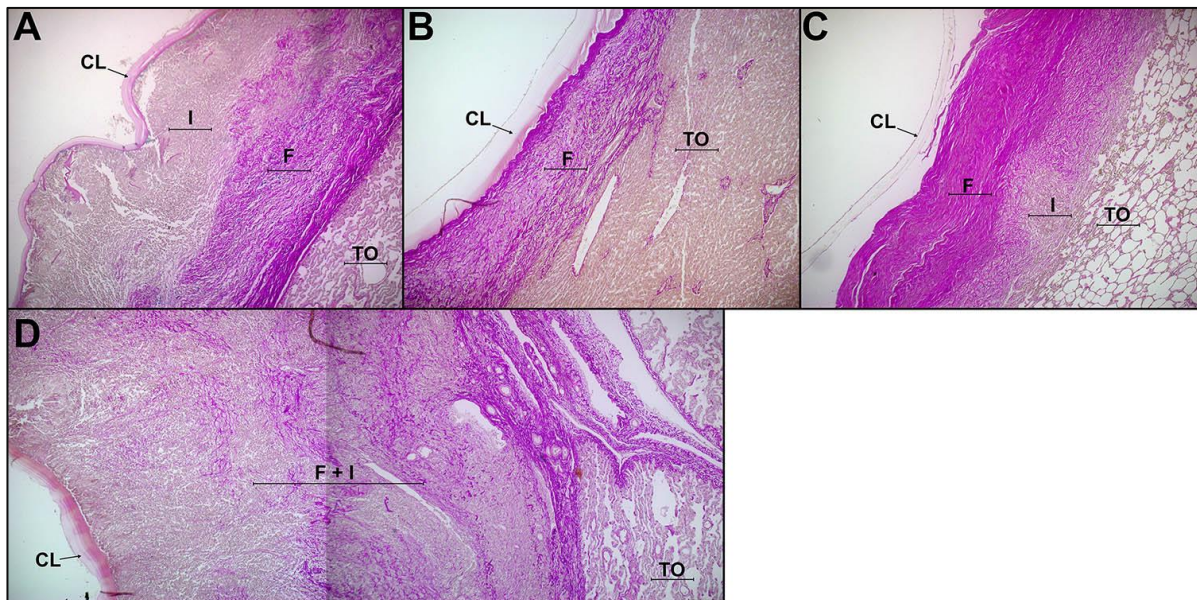
Ovino	Hígado		Pulmón	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Fértil	29*	6*	35*	12*
Infértil	13*	27*	28*	49*

No hay asociación entre la co-infección con *Fasciola hepatica* y la presencia eosinófilos en la capa adventicia. En ovinos, los quistes fértiles están asociados a una ausencia de eosinófilos en la capa adventicia de quistes hidatídicos de hígado y pulmón ($p < 0,0001$)*.

IX. Localización de la capa de fibrosis

Los patrones de Fibrosis I a IV se ilustran en la Figura 14; en la Tabla 12 se analizan los resultados de acuerdo a co-infección y en la Tabla 13 se analizan las diferencias de fibrosis entre quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovinos y ovinos.

Figura 14. Imagen representativa de los patrones de fibrosis de quistes hidatídicos



Microfotografías que demuestran que la localización de la fibrosis en la capa adventicia varía en su localización. A) Patrón I: fibrosis entre infiltrado inflamatorio y parénquima. B) Patrón II: fibrosis entre capa laminar y parénquima. C) Patrón III: fibrosis entre capa laminar e infiltrado inflamatorio. D) Patrón IV: fibrosis difusa. CL = Capa laminar; F = Fibrosis; I = Infiltrado inflamatorio; TO = Tejido del Órgano. Tinción de Van Gieson, Barra de tamaño: 200 μ m.

Tabla 12. Disposición de la fibrosis dentro de la capa adventicia en quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado/Pulmón			
	Patrón I	Patrón II	Patrón III	Patrón IV
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	29	2	0	4
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	142	1	1	6
Ovino	Hígado/Pulmón			
	Patrón I	Patrón II	Patrón III	Patrón IV
Fértil	0	61*	21*	0
Infértil	1	23*	92*	1

No hay asociación entre la co-infección con *Fasciola hepatica* y el patrón de fibrosis ($p > 0,9999$). En ovinos, los quistes fértiles se asocian a un Patrón de Fibrosis II mientras que los quistes infértiles se asocian a un patrón de Fibrosis III ($p < 0,0001$)*.

Tabla 13. Disposición de la fibrosis dentro de la capa adventicia entre quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovinos y ovinos.

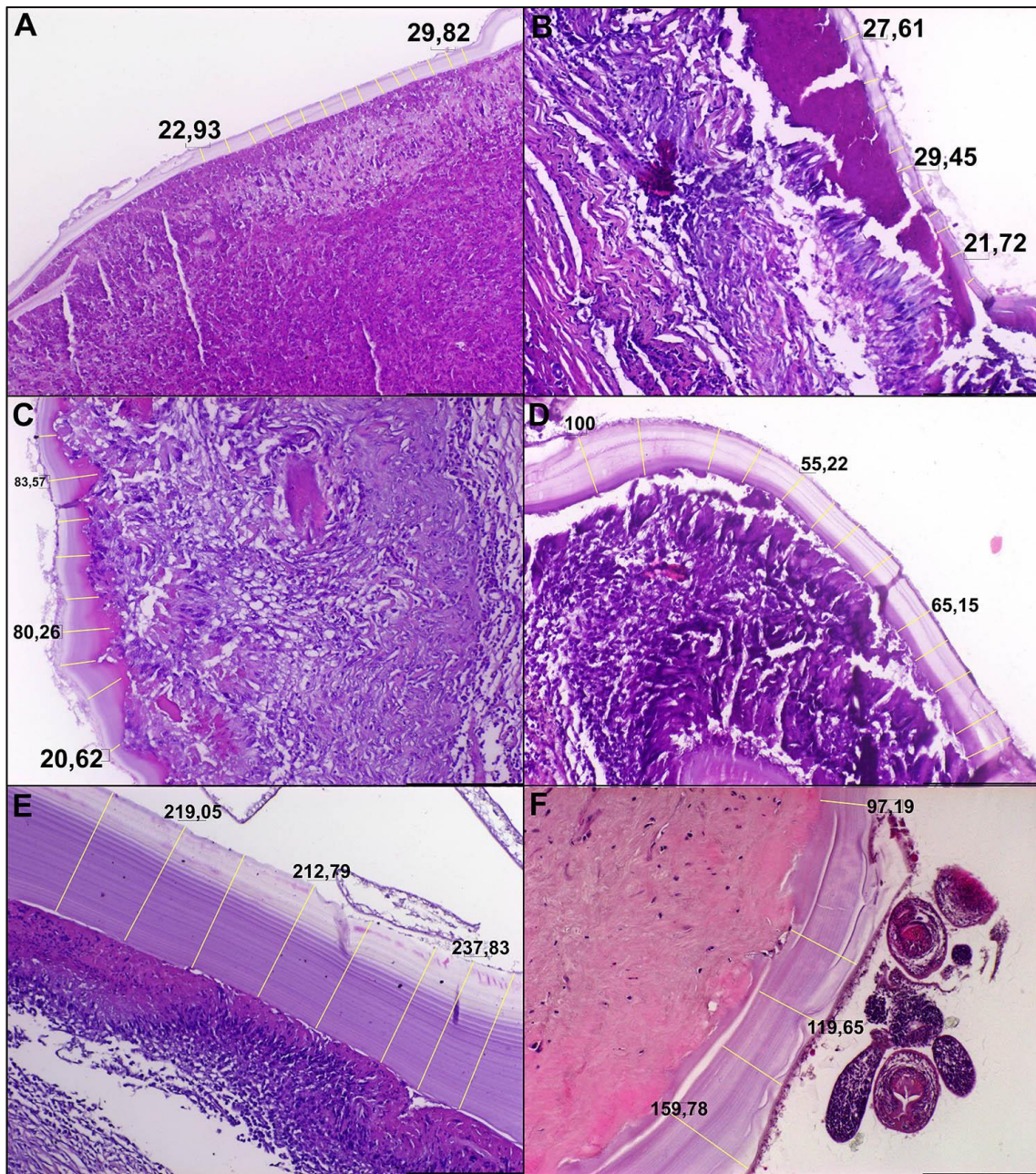
Quistes Hidatídicos Fértiles				
	Patrón I	Patrón II	Patrón III	Patrón IV
Bovinos	3*†	2*	1†	0
Ovinos	0*†	61*	21†	0
Quistes Hidatídicos Infértiles				
	Patrón I	Patrón II	Patrón III	Patrón IV
Bovinos	168‡	1	0‡	10
Ovinos	1‡	23	92‡	1

En quistes hidatídicos fértiles de ovinos se asocian a los patrones II ($p = 0,0002$)* y III ($p = 0,0017$)† debido a la ausencia de infiltrado inflamatorio en contacto directo con la capa laminar, característico del Patrón I de fibrosis. Esta tendencia se repite en los quistes hidatídicos infértiles, en donde los quistes infértiles de ovinos se asocian a los patrones II y III mientras que los quistes infértiles de bovinos se asocian casi exclusivamente al patrón de fibrosis I ($p < 0,0001$) ‡.

X. Grosor de la capa laminar

En la figura 15 se demuestran las tres categorías de capa laminar junto con la forma en que se mide su grosor y en la Tabla 14 se encuentra el resultado del análisis.

Figura 15. Imagen representativa de los tres grosores de capa laminar y la metodología empleada para determinar su grosor



Microfotografías que demuestran la variabilidad del grosor de la capa laminar. A: Quiste hidatídico infértil de hígado, B, C y D: Quistes hidatídicos infértiles de pulmón. E: Quiste hidatídico fértil de pulmón. F: Quiste hidatídico fértil de hígado. Los números representan valores en micrómetros de las mediciones del grosor de la capa laminar. A y B representan una capa

laminar delgada; C y D una capa laminar intermedia; E y F una capa laminar gruesa. Tinción con Hematoxilina-Eosina, Barra de tamaño: 200 μm

Tabla 14. Grosor de la capa laminar de quistes hidatídicos de hígado y pulmón obtenidos desde bovinos y ovinos.

Bovino	Hígado			Pulmón		
	Delgada	Intermedia	Gruesa	Delgada	Intermedia	Gruesa
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	11*	1*	0	2†	15	3†
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	36*	24*	1	26†	60	0†

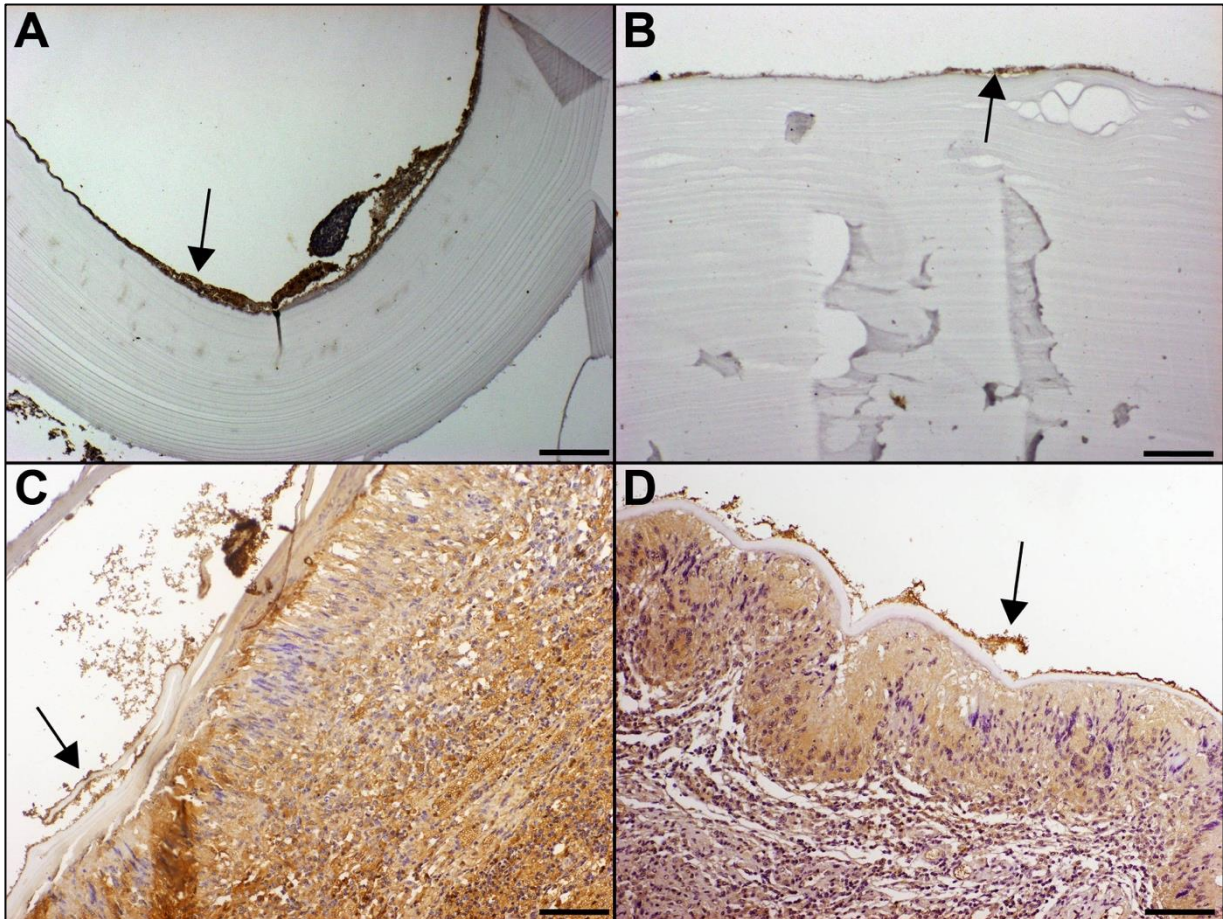
Ovino	Hígado			Pulmón		
	Delgada	Intermedia	Gruesa	Delgada	Intermedia	Gruesa
Fértil	10‡	19	6‡	13	19^	15^
Infértil	22‡	17	1‡	41	31^	5^

La co-infección con *Fasciola hepatica* se asocia a capas laminares delgadas en quistes hidatídicos de hígado ($p = 0,0467$)* y más gruesas en pulmón ($p = 0,0022$)†. En ovinos, los quistes fértiles están asociados a capas laminares gruesas en hígado ($p = 0,0127$)‡ y pulmón ($p = 0,0077$)^.

Estudio de poblaciones de macrófagos presentes en la capa adventicia

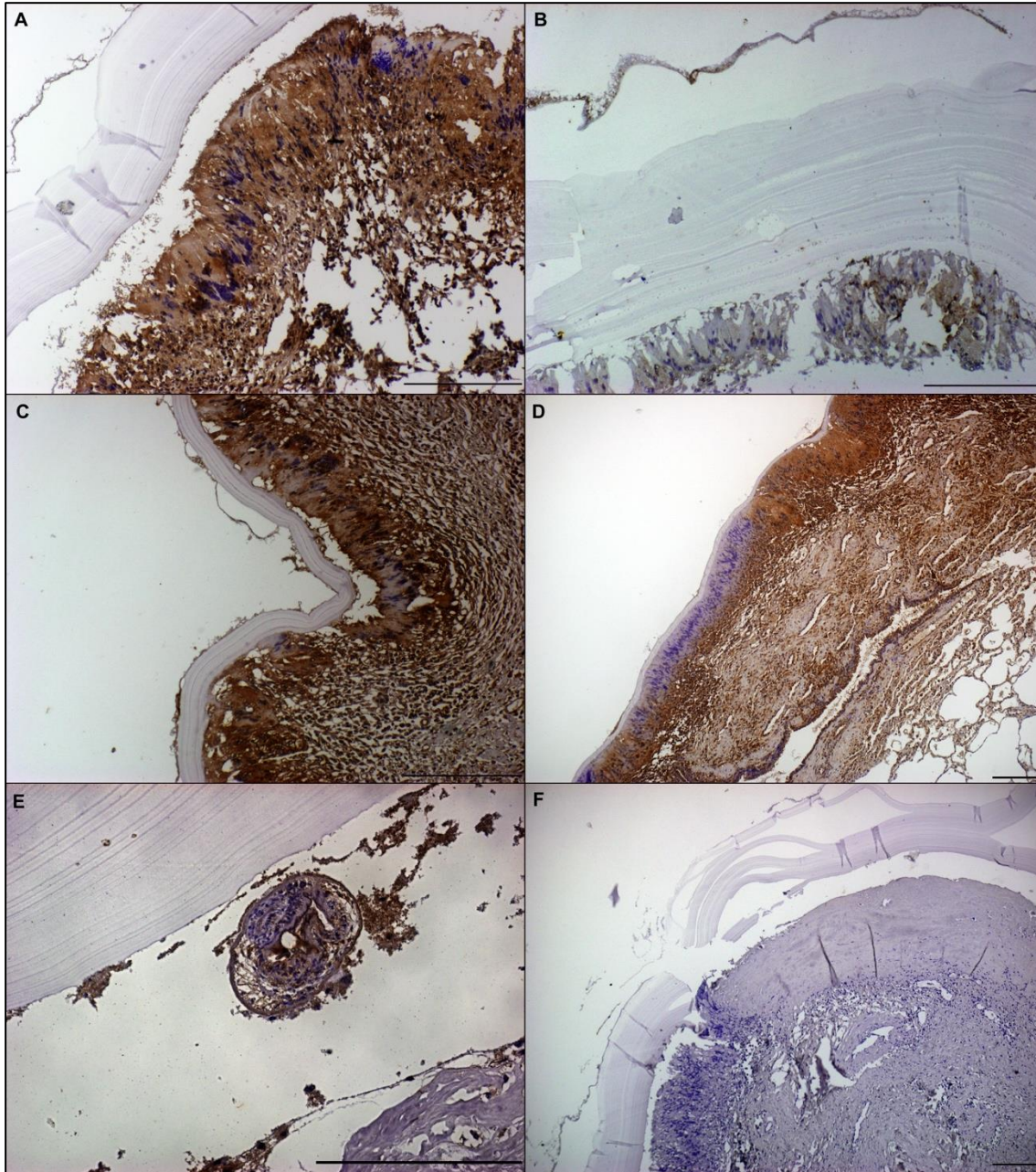
En la Figura 16 se encuentran los resultados del marcador Nitrotirosina (Macrófagos M1) y en la Figura 17 los resultados del marcador Arginasa-1 (Macrófagos M2).

Figura 16. Ensayo de inmunohistoquímica para el marcador Nitrotirosina en quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovinos co-infectados con *Fasciola hepatica*



Análisis inmunohistoquímico de quistes hidatídicos utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-Nitrotirosina (SAB5200009). A = Quiste hidatídico fértil de animal co-infectado con *Fasciola hepatica*. B = Quiste hidatídico fértil de animal sin co-infección con *Fasciola hepatica*. C = Quiste hidatídico infértil de animal co-infectado con *Fasciola hepatica*. D = Quiste hidatídico infértil de animal sin co-infección con *Fasciola hepatica*. Las flechas indican células de la capa germinal del parásito positivas al marcador. Marca de anticuerpo detectada con DAB. Barra de tamaño: 100 μ m.

Figura 17. Ensayo de inmunohistoquímica para el marcador Arginasa-1 en quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovinos co-infectados con *Fasciola hepatica*



Análisis inmunohistoquímico de quistes hidatídicos utilizando el anticuerpo Policlonal Anti-ARG1 (SAB2108591). A = Quiste hidatídico fértil de animal co-infectado con *Fasciola hepatica*. B = Quiste hidatídico fértil de animal sin co-infección con *Fasciola hepatica*. C = Quiste hidatídico infértil de animal co-infectado con *Fasciola hepatica*. D = Quiste hidatídico infértil

de animal sin co-infección con *Fasciola hepatica*. E = Protoescólices positivos al marcador. F = Control Negativo. Barra de tamaño: 200 μ m.

Discusión

El metacestodo de *Echinococcus granulosus* causa en los bovinos una reacción granulomatosa que se caracteriza por la acumulación de células de origen monocítico, cuya función se cree que está dirigida para aislar y destruir a un cuerpo extraño persistente. El hito de la reacción granulomatosa son un tipo especial de macrófagos activados llamados células epiteloides y células gigantes multinucleadas (Díaz et al., 2000). La capa adventicia usualmente se describe como una capa fibrosa debido a la reacción del hospedero (Barnes et al., 2011; Dorosti et al., 2016; Kul and Yildiz, 2010; Lewall, 1998; Rogan et al., 2015; Sakamoto and Cabrera, 2003; Vatankhah et al., 2015; Vismarra et al., 2015) y existen varios estudios en bovinos que describen los componentes celulares de esta capa. Un estudio de quistes hidatídicos fértiles en hígado mostró que la capa adventicia de dichos quistes contiene un número significativo de Linfocitos B, algunos polimorfonucleares y monocitos (Vatankhah et al., 2015). Otro estudio comparó las capas adventicias entre quistes hidatídicos de ovinos y marsupiales, y describieron que los quistes hidatídicos fértiles poseían macrófagos con citoplasma espumoso y células gigantes multinucleadas ó con tejido fibroso de granulación sin células (Barnes et al., 2011); en dicho estudio los autores plantean si existe la posibilidad que los quistes hidatídicos fértiles se pudieran seguir desarrollando bajo condiciones inflamatorias. El estudio más completo de la capa adventicia de quistes hidatídicos infértiles, fue desarrollado por Sakamoto y Cabrera (Sakamoto and Cabrera, 2003). Describen que la capa adventicia de quistes hidatídi-

cos infértiles contienen linfocitos, macrófagos, granulocitos y células gigantes multinucleadas que infiltran la capa adventicia; también reportan que según el tamaño de los quistes hidatídicos varían las células presentes en la capa adventicia: quistes infértiles pequeños están rodeados de macrófagos, mientras que quistes grandes están rodeados de eosinófilos. Los resultados presentados en esta tesis expanden los hallazgos reportados por los autores antes citados, ya que se agrega al infiltrado inflamatorio la desorganización de la capa laminar (Figura 4) y la infiltración de quistes hidatídicos infértiles con células del hospedero (Figuras 8 y 9). La desorganización de la capa laminar es una observación crítica; esta matriz extracelular es secretada por el parásito y contiene glicosilaciones tipo-O e inositol hexakisfostato (InsP_6); estas características están relacionadas con la sobrevivencia del parásito dentro de su hospedero intermediario y se ha propuesto que la capa laminar inhibe la respuesta inflamatoria local (Diaz et al., 2015). Se ha demostrado en ratones que tanto macrófagos como células dendríticas se activan con porciones de la capa laminar (Casaravilla et al., 2014). Por otra parte, está descrito que partículas de la capa laminar inhiben la proliferación de macrófagos (Seoane et al., 2016) e inducen la producción de arginasa (que inhibe la producción de especies reactivas de nitrógeno) (Amri and Touil-Boukoffa, 2015). De hecho, quistes hidatídicos infértiles están correlacionados con mayores niveles de especies reactivas de nitrógeno, y se ha propuesto como un mecanismo de ataque, debido a que las células del hospedero no pueden ingresar al interior del quiste (Zeghir-Bouteldja et al., 2013).

En los resultados de esta tesis, hay claras señales que las células del hospedero están involucradas en la necrosis de la capa laminar (Figura 6) así como de su desorganización (Figura 4) e infiltración dentro del quiste (Figuras 8 y 9). Dicha desorgani-

zación y destrucción podría estar ocurriendo por la secreción tanto de catepsina K (Diaz et al., 2000) como de MMP-9 (Marco et al., 2006) por parte de los macrófagos en contacto directo con la capa laminar. La presencia de células del hospedero en contacto directo con las células del parásito es un hecho sin precedentes en la literatura. Tanto el líquido hidatídico como la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles poseen proteínas del hospedero (Aziz et al., 2011; Paredes et al., 2011). Cómo estas proteínas logran entrar al quiste no está claro: la capa germinal está formada por un sincitio citoplasmático que proyecta microtricas hacia la capa laminar, ambas estructuras parasitarias forman una barrera que impide el paso de células y macromoléculas hacia el interior del metacestodo (Thompson, 2017). Los resultados obtenidos indican que las células del hospedero logran desarmar la capa laminar del parásito e ingresar al interior del quiste, causando su destrucción.

La producción tanto de la capa laminar como de protoescolices es un evento que requiere una gran cantidad de recursos metabólicos por parte de la capa germinal (Thompson, 2017). Debido a que los quistes infértiles poseen un infiltrado inflamatorio que rodea la capa laminar y que la va delaminando, las células de la capa germinal continuarán secretando ésta matriz extracelular en desmedro de la producción de protoescolices, manteniendo la infertilidad del quiste. Eventualmente, las células del hospedero logran superar la capacidad de producción de capa laminar e infiltran el metacestodo, destruyéndolo.

Estos resultados se encuentran publicados en:

Hidalgo C, Stoore C, Strull K, Franco C, Corrêa F, Jiménez M, et al. (2019) **New insights of the local immune response against both fertile and infertile hydatid cysts**. PLoS ONE 14(1): e0211542

Respecto a la co-infección con *Fasciola hepatica*, nuestro grupo de investigación es pionero en investigar el efecto del poliparasitismo en bovinos y ovinos infectados naturalmente. En bovinos faenados en la Región Metropolitana, animales que tuvieran sólo infección con *Echinococcus granulosus*, los quistes hidatídicos se distribuyen equitativamente entre hígado, pulmón o ambas vísceras. Por otra parte, en bovinos que albergan simultáneamente *Echinococcus granulosus* y *Fasciola hepatica*, los quistes hidatídicos se distribuyen preferentemente en pulmón y con mucha menor frecuencia en hígado (Stoore et al., 2018). Este trabajo corrobora que el efecto de *Fasciola hepatica* es global: tanto en bovinos de la Región Metropolitana como Los Lagos, la cantidad de quistes hidatídicos en hígado es menor que en pulmón al haber co-infección (Tabla 1). Al analizar los porcentajes de fertilidad según la región, sólo hubo quistes hidatídicos fértiles hepáticos en la Región de Magallanes, donde *Fasciola hepatica* se encuentra ausente y que hace más robusta la determinación de que ambos parásitos poseen una relación de tipo antagónico. No obstante, la ausencia de *Fasciola hepatica* no se relaciona con mayores porcentajes de fertilidad de quistes hidatídicos, por lo que se descarta la co-infección como factor responsable de la infertilidad de quistes hidatídicos en bovinos. Las causas de esta relación antagónica no están descritas, pero debido al daño que *Fasciola hepatica* induce en el parénquima hepático tanto en infecciones agudas como crónicas (Sohair and Eman, 2009),

se propone que las oncosferas de *Echinococcus granulosus* no logran desarrollarse en hígado y mueren, quedando solo aquellas que continuaron vía linfática hacia el pulmón (Stoore et al., 2018).

A nivel de la capa adventicia, la presencia concomitante de *Fasciola hepatica* se asoció a un patrón inflamatorio menos agresivo, con una mayor proporción de quistes hidatídicos hepáticos con una ausencia de centros germinales de linfocitos, segmentos de capa laminar en la capa adventicia y células del hospedero dentro del quiste. En pulmón, se asocia con una ausencia de calcificaciones, necrosis bajo la capa laminar y presencia de macrófagos en empalizada bajo la capa laminar. Estos hallazgos sugieren en primera instancia un efecto sinérgico: la infección con *Fasciola hepatica* está asociada con una modulación de la respuesta inmune en macrófagos de su hospedero, en que se estimula la fibrosis y se inhibe la actividad de los receptores TLR3 y TLR4 (ambos asociados con la activación de una respuesta T_H1) (Fu et al., 2017). Esta propuesta significaría una mayor cantidad de macrófagos ARG1 positivos en la capa adventicia de quistes hidatídicos en presencia de *Fasciola hepatica* y una menor cantidad de especies reactivas de nitrógeno (evidenciado con la presencia nitrotirosina (Ferrer-Sueta et al., 2018)); sin embargo, Arginasa-1 está presente en macrófagos tanto en presencia y ausencia de co-infección, así como en las mismas células del parásito (Figura 17); por otra parte, el marcador de nitrotirosina también fue positivo en células del parásito en quistes hidatídicos fértiles e infértiles, con y sin co-infección (Figura 16). Con estos resultados se descarta que el efecto de *Fasciola hepatica* esté relacionado con estos marcadores y, por lo tanto, el estímulo inflamatorio provocado localmente por la reacción contra cuerpo extraño que se ge-

nera en los quistes hidatídicos en bovinos sería mayor al efecto inmunomodulador sistémico que efectúa *Fasciola hepatica* en su hospedero.

Los resultados obtenidos en ovinos revelan tres aspectos importantes. En primer lugar, no se encontró evidencias de infecciones crónicas con *Fasciola hepatica* en ovinos, dado que en las regiones estudiadas donde se encuentra este parásito, no hubo ovinos faenados que presentaran lesiones hepáticas compatibles con distomatosis. En comunicación personal con los médicos veterinarios de las plantas faenadoras de la Región Metropolitana y Los Lagos, atribuyen este hecho a que los ovinos sufren infecciones agudas con *Fasciola hepatica* y mueren en los predios antes de ser faenados. Este hecho se contrapone con el informe de hallazgos patológicos en plantas faenadoras emitido por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) el 2018, en que de un total de 66.113 de ovinos faenados fuera de la Región de Magallanes, se reportaron 716 casos de distomatosis, lo que corresponde a un 1,08% del total de ovinos faenados (SAG, 2018). Dado que el informe del SAG desglosa los casos de distomatosis según hospedero ó región, no se puede precisar en que región ocurrieron dichos decomisos para comprobar que el poliparasitismo entre *Echinococcus granulosus* y *Fasciola hepatica* no ocurre; sin embargo, la prevalencia de la enfermedad en ovinos detectada en matadero es baja, por lo que la ocurrencia de dicho poliparasitismo debe ser un hecho poco frecuente, a diferencia de lo que ocurre en bovinos.

En segundo lugar, el patrón de fibrosis e inflamatorio de las capas adventicias de quistes hidatídicos fértiles e infértiles en bovinos y ovinos presentó marcadas diferencias. En bovinos, los quistes hidatídicos infértiles se caracterizan por un patrón de fibrosis I, es decir, hay un infiltrado inflamatorio en contacto directo con la capa lami-

nar del parásito, que es encapsulado por una reacción fibrótica. En ovinos en cambio, los quistes hidatídicos infértiles se caracterizan por un patrón de fibrosis III, es decir, hay una reacción fibrótica en contacto directo con la capa laminar, y bajo ésta, un infiltrado inflamatorio. En ambos casos existe un componente inflamatorio, sin embargo la reacción de resolución fibrótica en los quistes hidatídicos impide que haya un contacto directo de las células inflamatorias con la capa laminar. En infecciones experimentales de canguros, que son hospederos intermediarios muy susceptibles a la infección con *Echinococcus granulosus*, se observa un patrón de fibrosis I en quistes hidatídicos fértiles (Barnes et al., 2011), lo que contradice los resultados obtenidos en bovinos (que presentan el mismo patrón de fibrosis), sin embargo es importante mencionar que los marsupiales Australianos, a diferencia de los bovinos, solo tomaron contacto con el parásito a principios del 1900 (Jenkins and Macpherson, 2003). En seres humanos, los quistes hidatídicos se describen con un patrón de fibrosis II, es decir, una reacción de resolución fibrosa que rodea la capa laminar en ausencia de infiltrado inflamatorio; sin embargo, no existen publicaciones que comparen los tipos de capa adventicia entre quistes hidatídicos fértiles e infértiles, ya que estos últimos rara vez se publican.

En tercer lugar y de singular importancia, los porcentajes de fertilidad de quistes hidatídicos en ovinos, que históricamente se reportaban sobre el 80% (González, 1981; Muñoz and Sievers, 2005), fueron de 0% en 11 y 71 quistes hidatídicos obtenidos en las Regiones Metropolitanas y de Los Lagos, respectivamente, y 47-49% de fertilidad en la Región de Magallanes. En otras partes del mundo, se han reportado bajos porcentajes de fertilidad en quistes hidatídicos de ovinos, desde 4,6%

(Garippa, 2006), 6,45% (Chaligiannis et al., 2015) a un 47,6% (Chihai et al., 2016), sin embargo, la gran mayoría de los autores reportan porcentajes de fertilidad sobre el 60% (Abdel-Baki et al., 2018; Almalki et al., 2017; Azami et al., 2013; Brik et al., 2018; Moudgil et al., 2019; Odongo et al., 2018). Existen varios factores que podrían explicar la diferencia de fertilidad de quistes hidatídicos, tales como la edad de los animales, la alimentación, el tamaño de los quistes hidatídicos y los tratamientos antiparasitarios que han recibido. Al trabajar directamente en el sector de decomisos de vísceras para obtener las muestras, es información de los animales que no se pudo evaluar. La metodología empleada en este trabajo, que consistió en muestrear todos los quistes hidatídicos presentes en las vísceras decomisadas también es responsable de tener porcentajes de fertilidad menores a otros estudios, en que por lo general se consideran solo los quistes de mayor tamaño, asumiendo lo constatado por Gusbi y colaboradores, en que todos los quistes hidatídicos encontrados en un animal son fértiles o infértiles (Gusbi et al., 1991); sin embargo, es importante destacar que dicho experimento fue realizado en una infección experimental de 13 individuos (número menor al de animales muestreados en esta tesis). En la literatura se acepta que los quistes hidatídicos de ovinos son más fértiles que los de bovinos (Zhang et al., 2003), aunque existen países que reportan porcentajes de fertilidad similares en bovinos (Andresiuk et al., 2009; Dan et al., 2018). Se ha descartado que el tamaño del quiste es condición necesaria para considerarlo fértil, ya que se ha publicado que existen quistes hidatídicos fértiles de 2 mm (Thompson, 2017); se ha sugerido que la víscera afectada podría determinar la fertilidad del quiste hidatídico (Zeghir-Bouteldja et al., 2017), y aunque se ha publicado que existen animales con quistes fértiles y quistes

“menos fértiles” (Zeghir-Bouteldja et al., 2013), no está descrito en la literatura que co-existan quistes hidatídicos fértiles e infértiles dentro de un mismo animal.

CAPÍTULO II

La metodología empleada de muestrear todos los quistes hidatídicos presentes en el animal permitió detectar 6 individuos (5 bovinos y 1 ovino) con infecciones mixtas de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, hecho que no está publicado en la literatura.

Objetivo

Analizar la variabilidad intraespecífica del *Echinococcus granulosus* y su asociación a las características morfohistológicas de la capa adventicia de los quistes hidatídicos obtenidos desde hígado y pulmón en bovinos y ovinos

Materiales y métodos

Las muestras de capa germinal y/o protoescólicas obtenidas en el capítulo anterior fueron sometidas a un protocolo de extracción de DNA con un kit comercial (Relia-Prep gDNA Tissue Miniprep System, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo 50 µL de DNA purificado.

Las muestras de DNA se procesaron en el Instituto de Parasitología de la Universidad de Zürich para amplificar y secuenciar completamente el gen mitocondrial *cox1*. Se procesaron aquellas muestras de DNA obtenidas desde animales con infecciones mixtas fértiles/infértiles además de muestras que provinieran de animales con más de 5 quistes hidatídicos que fueran todos fértiles o infértiles.

Protocolo de amplificación por PCR para gen *cox1* completo (1609 bp)

- Se sintetizaron los siguientes partidores en la empresa IDT-Technologies:

5' TTA CTGCTAATAATTTTGTGTCAT 3' (24 nucleótidos, 25% GC, Tm: 56°C)

5' GCATGATGCAAAAGGCAAATAAAC 3' (24 nucleótidos, 38% GC, Tm: 67°C)

Ambos partidores se diluyeron a una concentración final de 100 μ M

- Se realizó el mix de PCR utilizando el kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), para cada reacción se siguió el siguiente protocolo:

- 5X Phusion HF Buffer: 10 μ L
- 10 mM dNTPs: 1 μ L
- 10 μ M Partidor F: 2,5 μ L
- 10 μ M Partidor R: 2,5 μ L
- Agua libre de nucleasas: 28,5 μ L
- Polimerasa DNA Phusion: 0,5 μ L
- Muestra DNA (50 ng): 5 μ L

- La amplificación se realizó en un termociclador T100 (Bio-Rad) con el siguiente programa:

1. 98°C por 30 segundos
2. 98°C por 10 segundos
3. 59°C por 30 segundos
4. 72°C por 45 segundos
5. Repetir 34 veces pasos 2-4
6. 72°C por 10 minutos

- La visualización de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1% en buffer SB [5mM Borato de Sodio decahidrato, 5mM Ácido Bórico] con Gel-Red 1X. Se utilizaron 5 μ L de producto de PCR en 1 μ L de Buffer de Carga 6X junto con un estándar de peso molecular de 1 kb. Cada gel se corrió a 80v por 45 minutos. Final-

mente, los geles se fotografiaron en un fotodocumentador de geles Bio-Rad bajo luz UV.

Secuenciación gen *cox1* completo (1609 bp)

- Los productos de PCR positivos para la amplificación fueron purificados utilizando el kit Minielute PCR Purification Kit (Qiagen) y cuantificados utilizando un equipo nanodrop (BioRad).

- Se realizaron 2 reacciones de secuenciación por cada muestra, para obtener ambas hebras del gen. Se utilizaron 288 ng de producto purificado por cada reacción. Las muestras fueron procesadas en la empresa Microsynth (Zürich).

Determinación de haplotipos de *Echinococcus granulosus*

Desde GenBank, se descargaron todas las secuencias depositadas en la base de datos que correspondieran al gen *cox1* de *Echinococcus granulosus* s.s. que tuvieran 1609 pares de bases.

Utilizando el software Geneious v11.1.5, se procesaron los datos enviados de la secuenciación para producir 1 secuencia de consenso por muestra. Las muestras secuenciadas luego se alinearon para producir 1 archivo Phylip (.phy). Este archivo se cargó en el software TCS v1.21 para determinar los haplotipos. A cada muestra que no tuviera un haplotipo publicado en GenBank se le asignó la sigla EgCHL seguido por un número correlativo partiendo desde el 22 (ya se encuentran publicados 21 haplotipos diferentes para muestras en Chile).

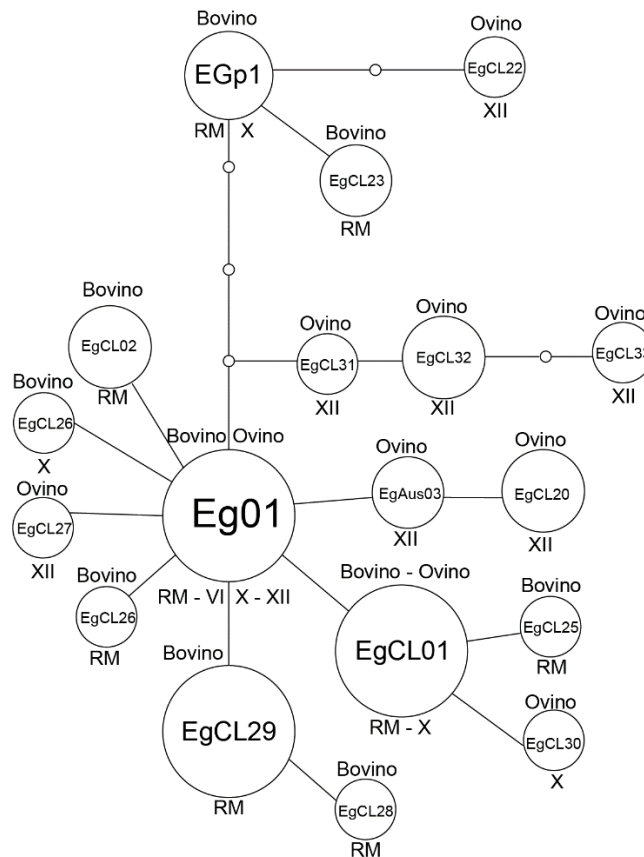
Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas de Mann-Witney, Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey de múltiples comparaciones, para determinar si existe relación entre el haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s. y el tamaño de los quistes hidatídicos y/o su fertilidad.

Resultados

Se obtuvieron 66 secuenciaciones completas del gen mitocondrial *cox1* desde 10 animales (7 bovinos y 3 ovinos) que albergaran más de 1 quiste hidatídico. La cantidad de quistes hidatídicos por animal varió entre 2 a 12. En total, se encontraron 16 haplotipos diferentes de *Echinococcus granulosus* s.s., de los que solo 6 se encontraban publicados previamente: Eg01 (JQ250806) descrito en Irán, Jordania, China, Perú, Algeria, Australia, China, India y Rusia; EGp1 (AB522646) descrito en Nepal; EgAus03 (KT968704) descrito en Australia y los haplotipos EgCL01 (KX227116), EgCL02 (KX227117) y EgCL20 (KX227135) descritos en Chile. Los 10 haplotipos nuevos fueron agregados a la base de datos de GenBank bajo los números de acceso MK139300-MK1393305 y MK399399-MK399402 bajo los nombres EgCL22, 23, 25, 26, 28-33. El mapa de haplotipos obtenidos para las muestras analizadas se encuentra en la Figura 18.

Figura 18. Red de haplotipos obtenidos desde animales que albergaron múltiples quistes hidatídicos en 4 regiones de Chile



Red de haplotipos para las 66 secuencias para el gen mitocondrial *cox1* de *Echinococcus granulosus sensu stricto*. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo. RM = Región Metropolitana, VI = Región de O'Higgins, X = Región de Los Lagos, XII = Región de Magallanes.

Dos animales, un ovino (Animal #6) y un bovino (Animal #8) presentaron 5 haplotipos diferentes de *Echinococcus granulosus* s.s. El Animal #6 albergaba 7 quistes hidatídicos: 3 en hígado, cada uno de un haplotipo diferente (EgAus03, EgCL31 and Eg01) y 4 en pulmón, tres del haplotipo EgCL32 y uno del haplotipo EgCL33. El animal #8 albergaba 8 quistes hidatídicos, 1 en corazón y 7 en pulmón; el haplotipo que se encontró en corazón fue EgCL25 y cuatro haplotipos diferentes se encontraron en pulmón (Eg01 (1 quiste), EGp1 (2 quistes), EgCL01 (2 quistes) y EgCL02 (3 quistes));

curiosamente, el haplotipo encontrado en corazón presentaba una deleción en la posición 909, generando un producto de 1608 pares de bases. Los animales #5, #7 y #9 albergaron 3 haplotipos diferentes de *Echinococcus granulosus* s.s. cada uno; el Animal #5 presentó 6 quistes hidatídicos en pulmón, dos del haplotipo EGp1, dos del haplotipo EgCL01 y dos del haplotipo EgCL23; el Animal #7 presentó 8 quistes hidatídicos, el haplotipo Eg01 se encontró en 4 quistes de pulmón y dos de hígado, el haplotipo EGp1 se encontró en 1 quiste de pulmón y el haplotipo EgCL26 en un quiste hepático; el animal #9 tuvo en pulmón 1 quiste del haplotipo Eg01 y 5 quistes del haplotipo EgCL01, mientras que en hígado tuvo 4 quistes del haplotipo EgCL01 y un quiste del haplotipo EgCL30. Los animals #3 y #10 tuvieron dos haplotipos diferentes; el animal #3 tuvo 1 quiste pulmonar y dos hepáticos del haplotipo EgCL20 y un quiste hepático del haplotipo EgCL22; el animal #10 tuvo en pulmón 1 quiste del haplotipo EgCL28 y 8 quistes del haplotipo EgCL29 mientras que en hígado hubo 3 quistes del haplotipo (EgCL29). Finalmente, los animales #1, #2 y #4 presentaron solo 1 haplotipo. Toda la información respecto a la especie animal, órgano, tamaño, fertilidad y haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s. se encuentra en la Tabla 15.

Tabla 15. Haplotipos de *Echinococcus granulosus* s.s. obtenidos desde quistes hidatídicos pulmonares y hepáticos de bovinos y ovinos.

# de Animal	Especie	Región	# de Quiste	Tamaño (mm)	Órgano	Fertilidad	Haplotipo
Animal #1	Bovino	X	1	63,74	Pulmón	Sí	Eg01
			2	11,01		No	Eg01
Animal #2	Bovino	XII	3	38,39	Hígado	Sí	Eg01
			4	16,17		No	Eg01
Animal #3	Ovino	XII	5	37,13	Pulmón	Sí	EgCL20
			6	22,19	Hígado	No	EgCL20
			7	9,92		No	EgCL20
			8	3,92		No	EgCL22
			9	22,4	Pulmón	No	Eg01
Animal #4	Bovino	VI	10	20,67	Hígado	No	Eg01
			11	15,81		No	Eg01
			12	14,9		No	Eg01
			13	11,41		No	Eg01
Animal #5	Bovino	RM	14	58,79	Pulmón	Sí	EGp1
			15	39,42		No	EGp1
			16	25,03		No	EgCL23
			17	16,5		No	EgCL23
			18	29,02		No	EgCL01
Animal #6	Ovino	XII	19	46,66	Pulmón	No	EgCL01
			20	37,38		Sí	EgCL32
			21	34,29		Sí	EgCL32
			22	40	Sí	EgCL32	
			23	38,09	Sí	EgCL33	
			24	37,74	Sí	EgAus03	
			25	33,25	Hígado	Sí	EgCL31
26	44,47	Sí	Eg01				
Animal #7	Bovino	X	27	35,405	Pulmón	No	Eg01
			28	48,09		No	Eg01
			29	36,32		No	Eg01
			30	35,18		No	Eg01
			31	46,865	No	EGp1	
			32	47,81	Hígado	No	Eg01
			33	46,65		No	Eg01
34	31,86	No	EgCL26				
Animal #8	Bovino	RM	35	26,58	Corazón	Sí	EgCL25
			36	24,87	No	Eg01	
			37	22,18	No	EGp1	
			38	63,18	Pulmón	No	EGp1
			39	43,5		No	EgCL01
			40	24,75		No	EgCL01
			41	26,28		No	EgCL02
			42	20,94		No	EgCL02
			43	19,24		No	EgCL02
			44	12,12	No	Eg01	
45	13,8	Pulmón	No	EgCL01			
46	14,17		No	EgCL01			
47	25,15		No	EgCL01			
48	24,55		No	EgCL01			
Animal #9	Ovino	X	49	21,17	No	EgCL01	
			50	34,67	No	EgCL01	
			51	24,4	Hígado	No	EgCL01
			52	17,84		No	EgCL01
			53	18		No	EgCL01
			54	28,3		No	EgCL30
Animal #10	Bovino	RM	55	30,84	No	EgCL28	
			56	28,62	No	EgCL29	
			57	30,41	Pulmón	No	EgCL29
			58	29		No	EgCL29
			59	16,1		No	EgCL29
			60	31,87		No	EgCL29
			61	30,21		No	EgCL29

62	23,03		No	EgCL29
63	23,88		No	EgCL29
64	8,25		No	EgCL29
65	10,18	Hígado	No	EgCL29
66	10,48		No	EgCL29

RM = Región Metropolitana, VI = Región de O'Higgins, X = Región de Los Lagos, XII = Región de Magallanes.

Respecto al tamaño de los quistes hidatídicos, los quistes hidatídicos fértiles son más grandes que los quistes hidatídicos infértiles ($p < 0,0001$, prueba de Mann-Whitney); esto ocurre tanto en bovinos ($p = 0,0318$, prueba de Mann-Whitney) como ovinos ($p < 0,0001$, prueba de Mann-Whitney). Los quistes hidatídicos fértiles poseen un diámetro promedio de 40,82 mm vs 25,65 mm de los quistes hidatídicos infértiles. Al asociar el tamaño con el haplotipo, EGp1 produjo los quistes de mayor tamaño, con un promedio de 46,09 mm ($\pm 16,36$ mm) mientras que el haplotipo EgCL29 produjo los quistes de menor tamaño, con un promedio de 22 mm ($\pm 9,106$ mm). Esta diferencia de tamaños es estadísticamente significativa (ANOVA, $F = 2,457$; $p = 0,0301$) (Figura 19). Los otros haplotipos encontrados no tuvieron asociaciones con el tamaño (Prueba de múltiple comparación de Tukey). No hubo asociación entre la fertilidad de los quistes hidatídicos y el haplotipo.

Figura 19. Tamaño promedio de quistes hidatídicos según haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s.

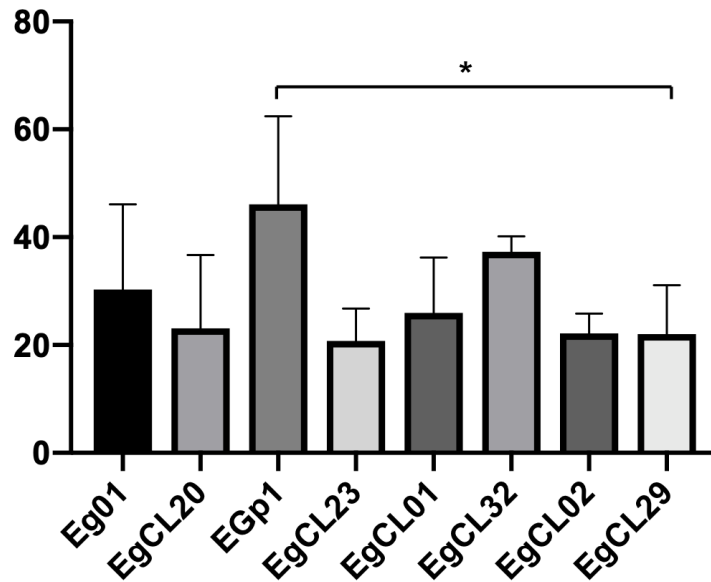
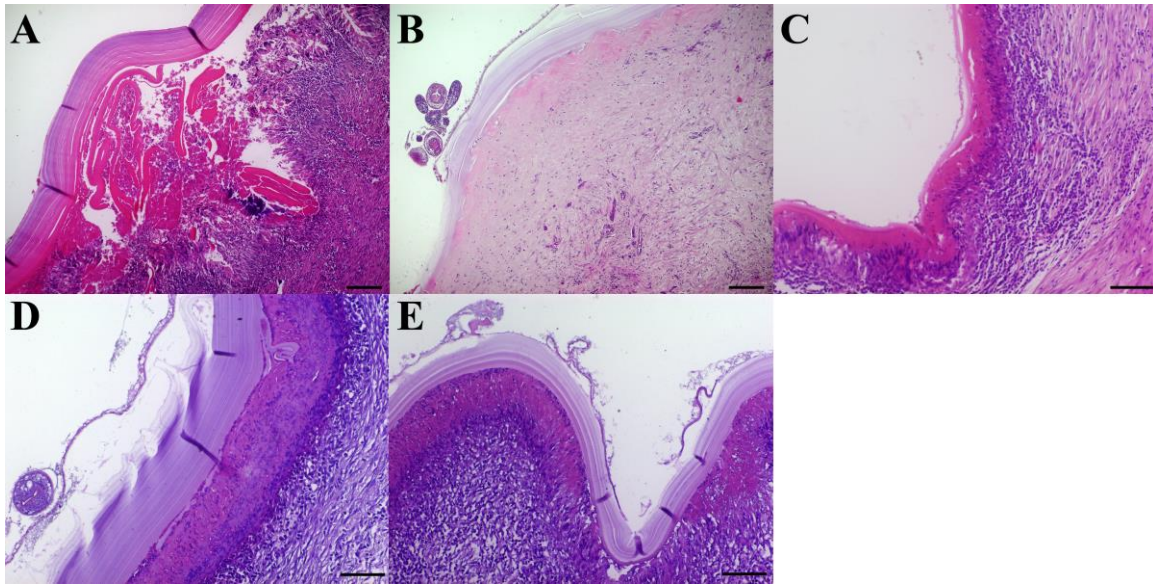


Gráfico de barras que representa el tamaño promedio (en milímetros) de los quistes hidatídicos según su haplotipo. * = Diferencia de tamaño es estadísticamente significativa.

Finalmente, no hubo asociación entre el haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s. y las características de la capa adventicia (Figura 20).

Figura 20. Características de capa adventicia de quistes hidatídicos según haplotipo de *Echinococcus granulosus s.s.*



Cortes histológicos de quistes hidatídicos fértiles e infértiles *Echinococcus granulosus s.s.* cuyo haplotipo fue determinado. A = Quiste hidatídico fértil haplotipo Eg01 con infiltrado inflamatorio. B = Quiste hidatídico fértil haplotipo Eg01 sin infiltrado inflamatorio. C = Quiste hidatídico infértil haplotipo Eg01 con infiltrado inflamatorio. D = Quiste hidatídico fértil haplotipo EGp1 con infiltrado inflamatorio. E = Quiste hidatídico haplotipo EGp1 con infiltrado inflamatorio. Tinción de HE. Barras de tamaño: A, B: 200 μm . C, D, E: 100 μm .

Discusión

Existe evidencia en la literatura que un hospedero intermediario puede albergar quistes de 2 haplotipos/genotipos diferentes de *Echinococcus granulosus* (s.s) (Casulli et al., 2012; Umhang et al., 2014; Umhang et al., 2013). Aunque previamente se ha publicado la presencia de *E. ortleppi* en Chile (Correa et al., 2018), de los 72 animales que presentaron más de un quiste, no se encontraron de forma simultánea ambos genotipos en los 10 individuos analizados (13% del total). Hasta la fecha no existen estudios detallados que den cuenta de la variabilidad intraspecífica de *Echinococcus granulosus s.s.* dentro de cada hospedero intermediario. En los resultados presenta-

dos, se reporta que hasta 5 haplotipos diferentes de *Echinococcus granulosus s.s.* pueden encontrarse en la misma víscera (Animal #8) o distribuidos en diferentes vísceras (Animal #6) (Tabla 15). Como se esperaba, también se encontró que un solo haplotipo se puede hallar en la misma víscera (animales #1 y #2) o en vísceras diferentes (animal #4) (Tabla 15). Esto implica que la variabilidad genética del parásito es más compleja de lo que se encuentra publicado y que estudiar todos los quistes hidatídicos de un mismo hospedero puede entregar información valiosa en áreas endémicas de la enfermedad (como la Región de Magallanes). En teoría, la presencia de múltiples haplotipos dentro de un mismo individuo puede explicarse con infecciones sucesivas del hospedero intermediario durante su vida o de un solo evento de infección con heces de un perro que albergue múltiples haplotipos del parásito adulto. Sin embargo, que existan múltiples genotipos dentro de un hospedero definitivo no se ha investigado en profundidad, solo existe un estudio que reporta una infección mixta de *Echinococcus granulosus s.s.* y *Echinococcus intermedius* en un perro callejero (Shariatzadeh et al., 2015). En seres humanos, que se considera un hospedero de punto final para el parásito, se han reportado infecciones mixtas de los genotipos *Echinococcus granulosus s.s.* y *Echinococcus intermedius* en un mismo paciente (Debiaggi et al., 2017; Oudni-M'rad et al., 2016). De todas formas, el hecho de encontrar múltiples haplotipos dentro de un mismo individuo podría ser indicador de un foco híperendémico de *Echinococcus granulosus s.s.* dentro de las áreas endémicas de la enfermedad. La combinación de trazabilidad animal con herramientas moleculares permitiría identificar dichas áreas y poder enfocar esfuerzos de control de la enfermedad. Respecto a la red de haplotipos (Figura 18), la mayoría de las muestras (18/66) pertenecen al haplotipo Eg01, considerado el haplotipo “fundador”, ya que se

encuentra distribuido en todo el mundo y se cree que fue el haplotipo del parásito presente al momento de la domesticación de los animales de producción (Yanagida et al., 2012). Este haplotipo ya había sido descrito en Chile (Alvarez Rojas et al., 2017), y se encontró en bovinos y ovinos de 4 regiones de Chile. La diversidad de haplotipos es similar a la descrita previamente (Alvarez Rojas et al., 2017), lo que confirma que *Echinococcus granulosus* s.s. presenta una alta diversidad genética en Sudamérica, contrario a lo afirmado por Yanagida y colaboradores (2012), que encontraron solo 3 haplotipos diferentes en 30 quistes hidatídicos en Perú.

Las diferencias de tamaño entre quistes hidatídicos fértiles e infértiles son concordantes con lo publicado previamente en bovinos (Stoore et al., 2018) y ovinos (Torgerson et al., 2009). La asociación entre tamaño y haplotipo es algo novedoso, ya que hasta la fecha, no existen una asociación entre las características biológicas del parásito y el haplotipo de *cox1*. Sin embargo, no hubo asociación entre haplotipo y la presencia de infecciones mixtas de quistes fértiles e infértiles, ya que tanto el haplotipo “fundador” Eg01 (Animales #1 y #2) como EGp1 (Animal #5) son capaces de producir en el mismo animal (Tabla 15), ambos tipos de quistes de forma simultánea. Una explicación para este hallazgo, dada la reacción inflamatoria rodeando los quistes hidatídicos fértiles, es que si los animales hubiesen sido faenados en una fecha posterior, todos los quistes hidatídicos recolectados hubiesen sido infértiles. A pesar de que los mecanismos moleculares involucrados en la fertilidad/infertilidad de los quistes hidatídicos siguen siendo desconocidos (Zeghir-Bouteldja et al., 2017), la respuesta inmune del hospedero (capa adventicia) contra el parásito sigue siendo la causa más probable (Vatankhah et al., 2018). Dado que ya se han descrito en detalle los componentes de la capa adventicia en quistes hidatídicos fértiles e infértiles de

bovino (Hidalgo et al., 2019) y ovino (resultados de la presente tesis), se puede hacer un análisis histológico que incluya el haplotipo como un factor. El haplotipo Eg01 puede generar quistes hidatídicos fértiles inflamatorios (Figura 20A) como no inflamatorios (Figura 20B) y quistes hidatídicos infértiles inflamatorios (Figura 20C). Del mismo modo, el haplotipo EGp1 puede generar quistes hidatídicos fértiles (Figura 20D) e infértiles (Figura 20E) con infiltrado inflamatorio. De esta forma, se descarta que el haplotipo de *Echinococcus granulosus* s.s. esté asociado a algún tipo específico de reacción por parte del sistema inmune del hospedero.

Estos resultados se encuentran en un manuscrito enviado a la revista *Parasitology Research*:

Hidalgo, Christian; Álvarez-Rojas, Cristian; Stoore, Carroll; Pereira, Ismael; Deplazes, Peter; Paredes, Rodolfo.

Multiple haplotypes of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in single naturally infected intermediate hosts

CAPÍTULO III

Se demostró que la presencia de *Fasciola hepatica* posee tanto aspectos de poliparasitismo antagónico al alterar la ubicación de los quistes hidatídicos y asociarse a capas laminares más delgadas, como aspectos sinérgicos, al asociarse a una respuesta inflamatoria menos agresiva al estar presente dentro del hospedero intermedio.

Objetivo

Determinar si la presencia de *Fasciola hepatica* en rumiantes se correlaciona con una alteración del estado de fertilidad del quiste y/o de la morfología del metacestodo de *Echinococcus granulosus*.

Materiales y métodos

Análisis estadístico

Los datos de fertilidad de quistes hidatídicos, tamaño, cantidad de quistes por animal se asociaron a la presencia o ausencia de *Fasciola hepatica* utilizando la prueba exacta de Fischer y t-student.

Resultados

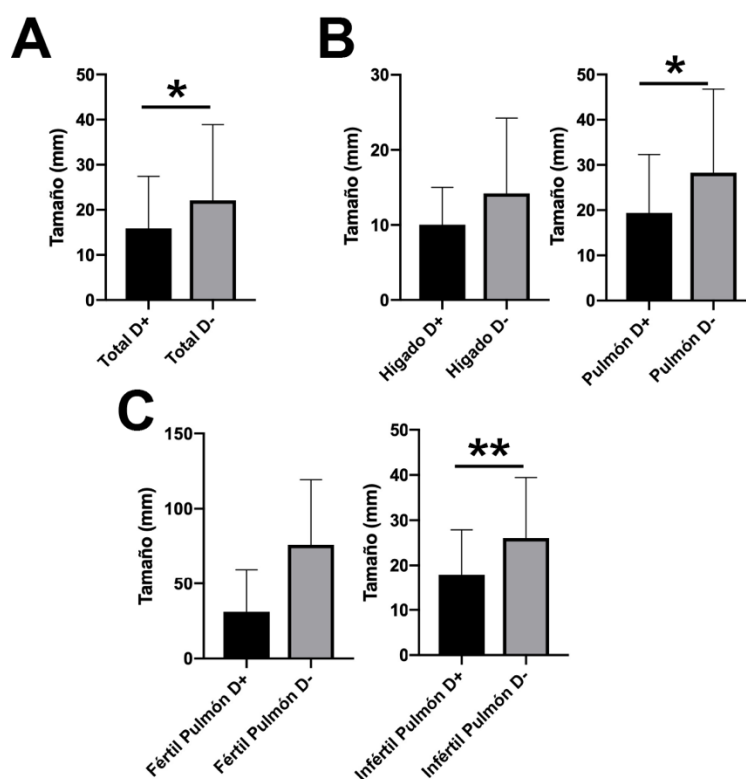
Al realizar el análisis estadístico, no hay asociación entre la co-infección y la fertilidad de los quistes hidatídicos en hígado ($p > 0,9999$), pulmón ($p = 0,3500$) o ambas vísceras ($p = 0,3661$) (Tabla 16).

Tabla 16. Quistes hidatídicos fértiles e infértiles obtenidos en hígado y pulmón de bovino, según co-infección con *Fasciola hepatica*.

	Hígado		Pulmón		Total	
	Fértil	Infértil	Fértil	Infértil	Fértil	Infértil
<i>Fasciola hepatica</i> (+)	0	15	3	24	3	39
<i>Fasciola hepatica</i> (-)	1	70	4	86	5	156

Respecto al tamaño de los quistes hidatídicos y co-infección con *Fasciola hepatica*, los quistes hidatídicos en general son más pequeños al haber co-infección ($p = 0,0243$) (Figura 21A), al desglosar el análisis, esta asociación ocurre en quistes hidatídicos de pulmón ($p = 0,0212$) (Figura 21B) de tipo infértil ($p = 0,0066$) (Figura 21C).

Figura 21. Tamaños promedios de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, de hígado y pulmón de bovinos según co-infección con *Fasciola hepatica*

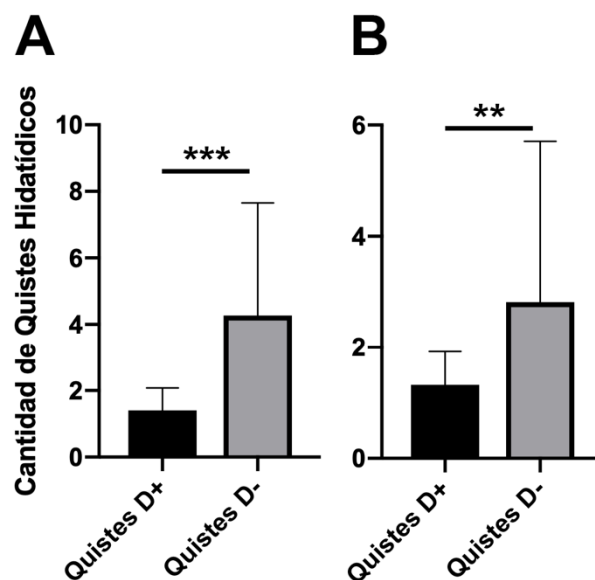


Comparación de tamaño de quistes hidatídicos según co-infección con *Fasciola hepatica*. A = Comparación entre todos los quistes obtenidos. B = Comparación entre quistes hidatídicos

de hígado y pulmón. C = Comparación de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de pulmón. * = diferencia estadísticamente significativa. D+ = *Fasciola hepatica* presente. D- = *Fasciola hepatica* ausente. Los resultados se expresan como el promedio más su desviación estándar.

Por último se comparó la intensidad de infección, es decir, la cantidad de quistes hidatídicos por animal según co-infección. La intensidad de infección global en bovinos fue de 3 quistes por animal; que varió según la región donde los animales fueron faenados: 2,3 en la Región Metropolitana, 1,8 en la Región de Los Lagos y 4,3 en la Región de Magallanes. Los animales co-infectados con *Fasciola hepatica* tuvieron una intensidad de infección promedio de 1,4 quistes por animal, mientras que los animales sin co-infección tuvieron una intensidad de infección promedio de 4,2 quistes por animal; esta diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,0006$) (Figura 22A); que se mantiene si del análisis se excluyen muestras obtenidas en la Región de Magallanes ($p = 0,0063$) (Figura 22B).

Figura 22. Intensidad de infección en bovinos de Chile según co-infección con *Fasciola hepatica*



A = Quistes hidatídicos obtenidos en todas las regiones. B = Quistes hidatídicos obtenidos fuera de la Región de Magallanes * = diferencia estadísticamente significativa. D+ = *Fasciola hepatica* presente. D- = *Fasciola hepatica* ausente. Los resultados se expresan como el promedio más su desviación estándar.

Discusión

Dado que la fertilidad de los quistes hidatídicos está relacionada con la intensidad de la respuesta inflamatoria en la capa adventicia (Hidalgo et al., 2019) y que la coinfección con *Fasciola hepatica* se asocia a una menor intensidad inflamatoria en la capa adventicia (Resultados del objetivo 1), es de esperarse que ambos factores estén relacionados. Si bien la presencia de *Fasciola hepatica* se asocia con una ausencia de quistes hidatídicos fértiles en hígado, no hay una asociación estadística entre la fertilidad de los quistes hidatídicos y la presencia concomitante de *Fasciola hepatica*. Dado que las muestras fueron obtenidas en plantas faenadoras desde modelos animales bajo infección natural, no se evaluaron variables tales como el estado nutricional de los hospederos, los esquemas de tratamientos antiparasitarios, la edad en que los animales adquirieron la infección y la presencia concomitante de otras enfermedades infecciosas y/o no-infecciosas. Está demostrado que, en niños, el poliparasitismo influye negativamente sobre su estado nutricional y los predispone a adquirir más infecciones parasitarias (Ross et al., 2017). Esto es un hecho posible en individuos jóvenes (terneros), pero en animales adultos por lo general la respuesta inmune antiparasitaria es bastante efectiva. En bovinos, está reportado que el poliparasitismo en animales adultos con *Fasciola hepatica* y *Dictyocaulus viviparus* es un hecho frecuente y que se asocia a una malnutrición de los animales y consecuente baja en la producción, en ausencia de enfermedad clínica (Murphy et al., 2006). Dicho trabajo menciona que las vacas lecheras tienen menor tendencia a ser tratadas

con antiparasitarios debido a la poca disponibilidad de fármacos con bajos periodos de resguardo y por lo tanto una merma en la producción debido a la leche que se debe descartar, a diferencia de lo que ocurre con bovinos para producción de carne, en que el periodo de resguardo solo es relevante al final de la vida productiva del animal. Una opción para aislar el efecto de antiparasitarios sería muestrear preferentemente vacas lecheras, aunque logísticamente es complejo, ya que son animales que se faenan cuando ya han cumplido su vida productiva. Por estos motivos, la manera en que se podrían estandarizar la mayor cantidad de variables y aislar el efecto de la interacción entre ambos parásitos sería realizando infecciones experimentales con un número fijo de oncósferas de *Echinococcus granulosus* s.s. y de metacercarias de *Fasciola hepatica* a diferentes tiempos.

En cuanto al efecto de la co-infección sobre la intensidad de infección, la cantidad de quistes hidatídicos en bovinos disminuye al haber presencia de *Fasciola hepatica* (Figura 21A). Se ha propuesto que existe una asociación entre las variables climáticas y la intensidad de infección, dado que depende directamente de la viabilidad de las oncósferas. De hecho, altas temperaturas y exposición directa a la luz solar impiden a las oncósferas infectar a su hospedero intermediario (Wachira et al., 1991). Dado que la Región de Magallanes posee las condiciones climáticas para la supervivencia de la oncósfera y a la vez es libre de *Fasciola hepatica*; al excluir las muestras obtenidas en esta región, se mantiene la asociación entre menor cantidad promedio de quistes hidatídicos al haber co-infección con *Fasciola hepatica* (Figura 21B). Es importante mencionar que los valores de intensidad de infección obtenidos (3 quistes

por animal de forma global) son muy inferiores a lo reportado en la literatura para bovinos (Ibrahim, 2010; Lahmar et al., 2013).

CONSIDERACIONES FINALES

La fertilidad de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus*, que es notoriamente distinta entre bovinos y ovinos, es condicionada en gran medida por el patrón de fibrosis y la presencia de un infiltrado inflamatorio.

La variabilidad genética del parásito, expresada en los haplotipos de *Echinococcus granulosus* s.s., no influyen sobre las características biológicas del quiste hidatídico ni de la respuesta inmune en la capa adventicia. La presencia de múltiples haplotipos en un mismo individuo podría ser un indicador de áreas híperendémicas de la enfermedad.

La co-infección con *Fasciola hepatica* posee un efecto paradójico, porque se asocia a simultáneamente a una respuesta inmune menos agresiva (“positivo” para *Echinococcus granulosus*) y a menores tamaños e intensidad de infección (“negativo” para *Echinococcus granulosus*).

Si bien no hubo co-infección con *Fasciola hepatica* en ovinos, eso no confirma que los animales estuvieran afectados únicamente con *Echinococcus granulosus*, ya que existen otros metacestodos como *Cysticercus tenuicollis* y *Cysticercus ovis* presentes en Chile. Así mismo, en los bovinos que tuvieron co-infección entre ambos parásitos, no se descarta que pueda haber un tercer parásito ejerciendo un efecto sobre la respuesta inmune del hospedero, lo que podría explicar en parte el efecto paradójico de *Fasciola hepatica* en los resultados obtenidos.

El estudio del poliparasitismo en infecciones naturales es un trabajo laborioso que requiere de un equipo de investigación comprometido en registrar de manera precisa la mayor cantidad de información que los animales faenados entregan. Estos esfuerzos permiten comprender mejor el balance inmunológico que ocurre en hospederos parasitados, que perfectamente pueden ocurrir en seres humanos. Continuar con esta línea de investigación puede aportar antecedentes para comprensión de cómo ocurre la relación hospedero/parásito permitiendo avanzar en medidas de control y tratamiento contra enfermedades parasitarias en animales y humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Baki, A.S., E. Almalki, and S. Al-Quarishy. 2018. Prevalence and characterization of hydatidosis in Najdi sheep slaughtered in Riyadh city, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci.* 25:1375-1379.
- Abdel-Rahman, E.H., K.N. Abdel-Megeed, and N.M. Abuel-Ezz. 2003. Cross-reaction: a common trait among helminthes. *J Egypt Soc Parasitol.* 33:457-471.
- Agudelo Higueta, N.I., E. Brunetti, and C. McCloskey. 2016. Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol.* 54:518-523.
- Almalki, E., S. Al-Quarishy, and A.S. Abdel-Baki. 2017. Assessment of prevalence of hydatidosis in slaughtered Sawakny sheep in Riyadh city, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci.* 24:1534-1537.
- Alvarez Rojas, C.A., D. Ebi, R. Paredes, G. Acosta-Jamett, N. Urriola, J.C. Roa, C. Manterola, S. Cortes, T. Romig, J.P. Scheerlinck, and M.W. Lightowlers. 2017. High intraspecific variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Chile. *Parasitol Int.* 66:112-115.
- Amri, M., S.A. Aissa, H. Belguendouz, D. Mezioug, and C. Touil-Boukoffa. 2007. In vitro antihydatic action of IFN-gamma is dependent on the nitric oxide pathway. *J Interferon Cytokine Res.* 27:781-787.
- Amri, M., and C. Touil-Boukoffa. 2015. A protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase. *Acta Trop.* 149:186-194.
- Andresiuk, M.V., F.P. Gordo, C.C. Bandera, M.C. Elissondo, M. Dopchiz, and G. Denegri. 2009. *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. *Rev Argent Microbiol.* 41:218-225.
- Azami, M., M. Anvarinejad, B. Ezatpour, and M. Alirezaei. 2013. Prevalence of hydatidosis in slaughtered animals in Iran. *Turkiye Parazitol Derg.* 37:102-106.
- Aziz, A., W. Zhang, J. Li, A. Loukas, D.P. McManus, and J. Mulvenna. 2011. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics.* 74:1560-1572.
- Barnes, T.S., L.A. Hinds, D.J. Jenkins, H. Bielefeldt-Ohmann, M.W. Lightowlers, and G.T. Coleman. 2011. Comparative pathology of pulmonary hydatid cysts in macropods and sheep. *J Comp Pathol.* 144:113-122.
- Behnke, J.M. 2008. Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions or pure randomness? *Parasitology.* 135:751-766.
- Beyene, T., and A. Hiko. 2019. Zoonotic metacestodes and associated financial loss from cattle slaughtered at Yabello municipal abattoir, Borana-Oromia, Ethiopia. *Parasite Epidemiol Control.* 5:e00096.
- Blackwell, A.D., M. Martin, H. Kaplan, and M. Gurven. 2013. Antagonism between two intestinal parasites in humans: the importance of co-infection for infection risk and recovery dynamics. *Proc Biol Sci.* 280:20131671.

- Booth, M., and D.A. Bundy. 1992. Comparative prevalences of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworm infections and the prospects for combined control. *Parasitology*. 105 (Pt 1):151-157.
- Bowles, J., D. Blair, and D.P. McManus. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. 54:165-173.
- Brik, K., T. Hassouni, S. Youssir, S. Baroud, K. Elkharrim, and D. Belghyti. 2018. Epidemiological study of *Echinococcus granulosus* in sheep in the Gharb plain (North-West of Morocco). *J Parasit Dis*. 42:505-510.
- Casaravilla, C., A. Pittini, D. Ruckerl, P.I. Seoane, S.J. Jenkins, A.S. MacDonald, A.M. Ferreira, J.E. Allen, and A. Diaz. 2014. Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*. *Infect Immun*. 82:3164-3176.
- Casulli, A., M. Interisano, T. Sreter, L. Chitimia, Z. Kirkova, G. La Rosa, and E. Pozio. 2012. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol*. 12:377-383.
- Chaligiannis, I., S. Maillard, G. Boubaker, M. Spiliotis, A. Saratsis, B. Gottstein, and S. Sotiraki. 2015. *Echinococcus granulosus* infection dynamics in livestock of Greece. *Acta Trop*. 150:64-70.
- Chihai, O., G. Umhang, D. Erhan, F. Boue, N. Talambuta, S. Rusu, and M. Zamornea. 2016. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova. *J Helminthol*. 90:279-283.
- Correa, F., C. Stoore, P. Horlacher, M. Jimenez, C. Hidalgo, C.A. Alvarez Rojas, G. Figueiredo Barros, H. Bunselmeyer Ferreira, M. Hernandez, G. Cabrera, and R. Paredes. 2018. First description of *Echinococcus ortleppi* and cystic echinococcosis infection status in Chile. *PLoS One*. 13:e0197620.
- Dan, A., Z. Ronai, Z. Szell, and T. Sreter. 2018. Prevalence and genetic characterization of *Echinococcus* spp. in cattle, sheep, and swine in Hungary. *Parasitol Res*. 117:3019-3022.
- Dawaki, S., H.M. Al-Mekhlafi, and I. Ithoi. 2019. The burden and epidemiology of polyparasitism among rural communities in Kano State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 113:169-182.
- Debiaggi, M.F., S.V. Soriano, N.B. Pierangeli, L.E. Lazzarini, L.A. Pianciola, M.L. Mazzeo, S. Moguillansky, and J.A.B. Farjat. 2017. Genetic characterization of human hydatid cysts shows coinfection by *Echinococcus canadensis* G7 and *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 in Argentina. *Parasitol Res*. 116:2599-2604.
- Diaz, A., C. Fernandez, A. Pittini, P.I. Seoane, J.E. Allen, and C. Casaravilla. 2015. The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Exp Parasitol*. 158:23-30.
- Diaz, A., A.C. Willis, and R.B. Sim. 2000. Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Mol Med*. 6:648-659.
- Dorosti, Z., S. Tolouei, H. Khanahmad, R. Jafari, F. Jafaei, S.M. Sharafi, and H.Y. Darani. 2016. IL-4 gene expression in adventitial layer (fibrous layer) of hepatic ovine and bovine hydatid cysts. *J Parasit Dis*. 40:855-859.

- Druilhe, P., A. Tall, and C. Sokhna. 2005. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? *Trends Parasitol.* 21:359-362.
- Everts, B., H.H. Smits, C.H. Hokke, and M. Yazdanbakhsh. 2010. Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol.* 40:1525-1537.
- Fernandez Ruiz, D., B. Dubben, M. Saefel, E. Endl, S. Deininger, A. Hoerauf, and S. Specht. 2009. Filarial infection induces protection against *P. berghei* liver stages in mice. *Microbes Infect.* 11:172-180.
- Ferrer-Sueta, G., N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartesaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, and R. Radi. 2018. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev.* 118:1338-1408.
- Flynn, R.J., C. Mannion, O. Golden, O. Hacariz, and G. Mulcahy. 2007. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 75:1373-1381.
- Fu, Y., J.A. Browne, K. Killick, and G. Mulcahy. 2017. Network Analysis of the Systemic Response to *Fasciola hepatica* Infection in Sheep Reveals Changes in Fibrosis, Apoptosis, Toll-Like Receptors 3/4, and B Cell Function. *Front Immunol.* 8:485.
- Garippa, G. 2006. Updates on cystic echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia.* 48:57-59.
- Garza-Cuartero, L., A. Garcia-Campos, A. Zintl, A. Chryssafidis, J. O'Sullivan, M. Sekiya, and G. Mulcahy. 2014. The worm turns: trematodes steering the course of co-infections. *Vet Pathol.* 51:385-392.
- Geus, D., K.C. Sifft, F. Habarugira, J.C. Mugisha, C. Mukampunga, J. Ndoli, C. Bayingana, A. Sendegeya, P. Martus, K. Fraundorfer, G. von Samson-Himmelstjerna, J.B. Gahutu, C. Klotz, A. Aebischer, and F.P. Mockenhaupt. 2019. Co-infections with *Plasmodium*, *Ascaris* and *Giardia* among Rwandan schoolchildren. *Trop Med Int Health.* 24:409-420.
- González, H.P., J.; Ábalos, P. 1981. Fertilidad del quiste hidatídico entres especies animales en Chile y estudio de la vitalidad de sus escólicas. *Bol. Chile Parasitol.* 36:14-19.
- Gonzalez-Sanchez, M.E., M. Cuquerella, and J.M. Alunda. 2018. Superimposed visceral leishmanial infection aggravates response to *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasit Vectors.* 11:404.
- Gruner, D.S., A. Kolekar, J.P. McLaughlin, and D.R. Strong. 2009. Host resistance reverses the outcome of competition between microparasites. *Ecology.* 90:1721-1728.
- Gusbi, A.M., M.A. Awan, and W.N. Beesley. 1991. Experimental infection of Libyan sheep with *Echinococcus granulosus*. *Ann Trop Med Parasitol.* 85:433-437.
- Hidalgo, C., C. Stoore, K. Strull, C. Franco, F. Correa, M. Jimenez, M. Hernandez, K. Lorenzatto, H.B. Ferreira, N. Galanti, and R. Paredes. 2019. New insights of the local immune response against both fertile and infertile hydatid cysts. *PLoS One.* 14:e0211542.
- Ibrahim, M.M. 2010. Study of cystic echinococcosis in slaughtered animals in Al Baha region, Saudi Arabia: interaction between some biotic and abiotic factors. *Acta Trop.* 113:26-33.

- Jenkins, D.J., and C.N. Macpherson. 2003. Transmission ecology of Echinococcus in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology*. 127 Suppl:S63-72.
- Kul, O., and K. Yildiz. 2010. Multivesicular cysts in cattle: characterisation of unusual hydatid cyst morphology caused by Echinococcus granulosus. *Vet Parasitol*. 170:162-166.
- Lahmar, S., M. Trifi, S. Ben Naceur, T. Bouchhima, N. Lahouar, I. Lamouchi, N. Maamouri, R. Selmi, M. Dhibi, and P.R. Torgerson. 2013. Cystic echinococcosis in slaughtered domestic ruminants from Tunisia. *J Helminthol*. 87:318-325.
- Lass, S., P.J. Hudson, J. Thakar, J. Saric, E. Harvill, R. Albert, and S.E. Perkins. 2013. Generating super-shedders: co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *J R Soc Interface*. 10:20120588.
- Lewall, D.B. 1998. Hydatid disease: biology, pathology, imaging and classification. *Clin Radiol*. 53:863-874.
- Lyke, K.E., A. Dabo, C. Arama, I. Diarra, C.V. Plowe, O.K. Doumbo, and M.B. Sztein. 2017. Long-term Maintenance of CD4 T Cell Memory Responses to Malaria Antigens in Malian Children Coinfected with Schistosoma haematobium. *Front Immunol*. 8:1995.
- Marco, M., A. Baz, C. Fernandez, G. Gonzalez, U. Hellman, G. Salinas, and A. Nieto. 2006. A relevant enzyme in granulomatous reaction, active matrix metalloproteinase-9, found in bovine Echinococcus granulosus hydatid cyst wall and fluid. *Parasitol Res*. 100:131-139.
- McVeigh, P., A.G. Maule, J.P. Dalton, and M.W. Robinson. 2012. Fasciola hepatica virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect*. 14:301-310.
- Mendez-Samperio, P. 2012. Immunological mechanisms by which concomitant helminth infections predispose to the development of human tuberculosis. *Korean J Parasitol*. 50:281-286.
- Miller, C.M., N.C. Smith, R.J. Ikin, N.R. Boulter, J.P. Dalton, and S. Donnelly. 2009. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan Toxoplasma gondii and the Th2-inducing helminth Fasciola hepatica. *PLoS One*. 4:e5692.
- Miran, M.B., A.A. Kasuku, and E.S. Swai. 2017. Prevalence of echinococcosis and Taenia hydatigena cysticercosis in slaughtered small ruminants at the livestock-wildlife interface areas of Ngorongoro, Tanzania. *Vet World*. 10:411-417.
- Molehin, A.J., G.N. Gobert, and D.P. McManus. 2012. Serine protease inhibitors of parasitic helminths. *Parasitology*. 139:681-695.
- Moreau, E., and A. Chauvin. 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol*. 2010:428593.
- Moudgil, A.D., P. Moudgil, R.K. Asrani, and R.K. Agnihotri. 2019. Hydatidosis in slaughtered sheep and goats in India: prevalence, genotypic characterization and pathological studies. *J Helminthol*:1-5.
- Muñoz, J.P., and G. Sievers. 2005. Estudio de la fertilidad y viabilidad de quistes hidatídicos bovinos en Chile. *Parasitología latinoamericana*. 60:69-73.

- Murphy, T.M., K.N. Fahy, A. McAuliffe, A.B. Forbes, T.A. Clegg, and D.J. O'Brien. 2006. A study of helminth parasites in culled cows from Ireland. *Prev Vet Med.* 76:1-10.
- Nacher, M. 2002. Worms and malaria: noisy nuisances and silent benefits. *Parasite Immunol.* 24:391-393.
- O'Neill, S.M., K.H. Mills, and J.P. Dalton. 2001. Fasciola hepatica cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol.* 23:541-547.
- Odongo, D.O., C.M. Tiampati, E. Mulinge, C.K. Mbae, R.P. Bishop, E. Zeyhle, J. Magambo, M. Wasserman, P. Kern, and T. Romig. 2018. Prevalence and genotyping of Echinococcus granulosus in sheep in Narok County, Kenya. *Parasitol Res.*
- Oudni-M'rad, M., S. M'Rad, A. Ksia, R. Lamiri, M. Mekki, A. Nouri, H. Mezhoud, and H. Babba. 2016. First molecular evidence of the simultaneous human infection with two species of Echinococcus granulosus sensu lato: Echinococcus granulosus sensu stricto and Echinococcus canadensis. *Parasitol Res.* 115:1065-1069.
- Paredes, R., P. Godoy, B. Rodriguez, M.P. Garcia, C. Cabezon, G. Cabrera, V. Jimenez, U. Hellman, L. Saenz, A. Ferreira, and N. Galanti. 2011. Bovine (Bos taurus) humoral immune response against Echinococcus granulosus and hydatid cyst infertility. *J Cell Biochem.* 112:189-199.
- Paredes, R., V. Jimenez, G. Cabrera, D. Iraguen, and N. Galanti. 2007. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in Echinococcus granulosus hydatid cysts. *J Cell Biochem.* 100:1200-1209.
- Paterson, S. 2013. The immunology and ecology of co-infection. *Mol Ecol.* 22:2603-2604.
- Pedersen, A.B., and A. Fenton. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol.* 22:133-139.
- Reyes, J.L., and L.I. Terrazas. 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol.* 29:609-619.
- Riesle, S., M.P. Garcia, C. Hidalgo, N. Galanti, L. Saenz, and R. Paredes. 2014. Bovine IgG subclasses and fertility of Echinococcus granulosus hydatid cysts. *Vet Parasitol.* 205:125-133.
- Rigano, R., B. Buttari, E. Profumo, E. Ortona, F. Delunardo, P. Margutti, V. Mattei, A. Teggi, M. Sorice, and A. Siracusano. 2007. Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun.* 75:1667-1678.
- Rigano, R., E. Profumo, S. Ioppolo, S. Notargiacomo, E. Ortona, A. Teggi, and A. Siracusano. 1995. Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin Exp Immunol.* 102:281-285.
- Rogan, M.T., A.J. Bodell, and P.S. Craig. 2015. Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple? *Parasite Immunol.* 37:1-9.
- Romig, T., D. Ebi, and M. Wassermann. 2015. Taxonomy and molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato. *Vet Parasitol.* 213:76-84.

- Ross, A.G., K. Papier, R. Luceres-Catubig, T.N. Chau, M.T. Inobaya, and S.K. Ng. 2017. Poverty, Dietary Intake, Intestinal Parasites, and Nutritional Status among School-Age Children in the Rural Philippines. *Trop Med Infect Dis.* 2.
- SAG. 2018. Informe beneficio y hallazgos patológicos en mataderos nacionales 2017.
- Sakamoto, T., and P.A. Cabrera. 2003. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Trop.* 85:271-279.
- Seoane, P.I., D. Ruckerl, C. Casaravilla, A.A. Barrios, A. Pittini, A.S. MacDonald, J.E. Allen, and A. Diaz. 2016. Particles from the Echinococcus granulosus laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci Rep.* 6:39204.
- Sharaf, O.F., E.M. Amir, and Y.A. Hawash. 2016. Lympho-Proliferative Responses to Various Fasciola Hepatica Worm's Antigens: An in Vitro Study. *J Egypt Soc Parasitol.* 46:217-222.
- Shariatzadeh, S.A., A. Spotin, S. Gholami, E. Fallah, T. Hazratian, M. Mahami-Oskouei, F. Montazeri, H.R. Moslemzadeh, and A. Shahbazi. 2015. The first morphometric and phylogenetic perspective on molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato in stray dogs in a hyperendemic Middle East focus, northwestern Iran. *Parasit Vectors.* 8:409.
- Shepherd, J.C., A. Aitken, and D.P. McManus. 1991. A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol.* 44:81-90.
- Shi, Y., H. Toet, V. Rathinasamy, N.D. Young, R.B. Gasser, T. Beddoe, W. Huang, and T.W. Spithill. 2014. First insight into CD59-like molecules of adult Fasciola hepatica. *Exp Parasitol.* 144:57-64.
- Silva-Alvarez, V., A.M. Folle, A.L. Ramos, F. Zamarreno, M.D. Costabel, E. Garcia-Zepeda, G. Salinas, B. Corsico, and A.M. Ferreira. 2015. Echinococcus granulosus antigen B: a Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host-parasite interface. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 93:17-23.
- Sohair, I.B., and M.N. Eman. 2009. Histopathological and bacteriological studies on livers affected with fascioliasis in cattle. *Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology.* 22.
- Stoore, C., C. Andrade, C. Hidalgo, F. Correa, M. Jimenez, M. Hernandez, and R. Paredes. 2018. Echinococcus granulosus hydatid cyst location is modified by Fasciola hepatica infection in cattle. *Parasit Vectors.* 11:542.
- Thompson, R.C. 2017. Biology and Systematics of Echinococcus. *Adv Parasitol.* 95:65-109.
- Torgerson, P.R., I. Ziadinov, D. Aknazarov, R. Nurgaziev, and P. Deplazes. 2009. Modelling the age variation of larval protoscoleces of Echinococcus granulosus in sheep. *Int J Parasitol.* 39:1031-1035.
- Umhang, G., O. Chihai, and F. Boue. 2014. Molecular characterization of Echinococcus granulosus in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitol Res.* 113:4371-4376.
- Umhang, G., C. Richomme, J.M. Boucher, V. Hormaz, and F. Boue. 2013. Prevalence survey and first molecular characterization of Echinococcus granulosus in France. *Parasitol Res.* 112:1809-1812.

- Vatankhah, A., S.M.R. Ghaffari, R.G. Vatankhah, V. Piurko, J. Timar, A. Avan, and M.H. Jazayeri. 2018. Characterization of cellular and humoral immune responses to alkaline phosphatase from fertile hydatid cysts in the human peripheral blood. *J Cell Physiol*.
- Vatankhah, A., J. Halasz, V. Piurko, T. Barbai, E. Raso, and J. Timar. 2015. Characterization of the inflammatory cell infiltrate and expression of costimulatory molecules in chronic echinococcus granulosus infection of the human liver. *BMC Infect Dis*. 15:530.
- Viney, M.E., and A.L. Graham. 2013. Patterns and processes in parasite co-infection. *Adv Parasitol*. 82:321-369.
- Vismarra, A., C. Mangia, B. Passeri, D. Brundu, G. Masala, S. Ledda, M. Mariconti, F. Brindani, L. Kramer, and C. Bacci. 2015. Immuno-histochemical study of ovine cystic echinococcosis (*Echinococcus granulosus*) shows predominant T cell infiltration in established cysts. *Vet Parasitol*. 209:285-288.
- Vuitton, D.A. 2003. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop*. 85:119-132.
- Wachira, T.M., C.N. Macpherson, and J.M. Gathuma. 1991. Release and survival of *Echinococcus* eggs in different environments in Turkana, and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and livestock. *J Helminthol*. 65:55-61.
- Wuhrer, M., C. Grimm, R.D. Dennis, M.A. Idris, and R. Geyer. 2004. The parasitic trematode *Fasciola hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(beta1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. *Glycobiology*. 14:115-126.
- Yanagida, T., T. Mohammadzadeh, S. Kamhawi, M. Nakao, S.M. Sadjjadi, N. Hijjawi, S.K. Abdel-Hafez, Y. Sako, M. Okamoto, and A. Ito. 2012. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitol Int*. 61:599-603.
- Zeghir-Bouteldja, R., M. Amri, S. Bouaziz, D. Mezioug, and C. Touil-Boukoffa. 2013. Comparative study of nitric oxide (NO) production during human hydatidosis: relationship with cystic fluid fertility. *Parasitol Res*. 112:649-654.
- Zeghir-Bouteldja, R., A. Polome, S. Bousbata, and C. Touil-Boukoffa. 2017. Comparative proteome profiling of hydatid fluid from Algerian patients reveals cyst location-related variation in *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop*. 171:199-206.
- Zhang, W., J. Li, and D.P. McManus. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev*. 16:18-36.
- Zheng, Y. 2013. Strategies of *Echinococcus* species responses to immune attacks: implications for therapeutic tool development. *Int Immunopharmacol*. 17:495-501.