

Plan de Gestión de Datos

INFORMACION SOBRE EL PROYECTO

1. – Título del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

“INFLUENCIA DEL CONTEXTO EN LA ESTRATEGIA DE DEFENSA CONTRA PARÁSITOS” (85520240100059LI)

- Título del Proyecto (en inglés)

“INFLUENCE OF CONTEXT ON THE DEFENSE STRATEGY AGAINST PARASITES”

-Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El resultado de la interacción hospedador-parásito puede variar en gran medida, tanto para el hospedador (ej. mayor o menor virulencia) como para el parásito (ej. mayor o menor desarrollo/replicación/reproducción y transmisión). Las consecuencias de la exposición de un hospedador a un patógeno se reflejan en un gradiente de escenarios, ej.: ausencia completa de infección, individuos sanos con altas intensidades de infección, o muerte del hospedador. Estos diversos resultados influyen de manera crucial en las dinámicas de los patógenos y en el impacto que éstos tienen sobre las poblaciones de hospedadores. En respuesta a la infección, los hospedadores pueden responder a partir de dos estrategias de defensa. Pueden resistir, mediante mecanismos que reducen el éxito del parásito; o pueden tolerar la infección, invirtiendo en procesos que reducen el daño del parasitismo. Ambas estrategias suponen un costo energético para el hospedador, y redundan en perjuicios y beneficios que influyen de manera determinante en la interacción hospedador-parásito y sus consecuencias. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado estudios centrados en investigar la relación entre ambas estrategias y su variabilidad en diferentes sistemas parásito-hospedador. La variabilidad de las estrategias ha sido principalmente asociada a diferentes genotipos, a efectos de la edad o a la dieta. Por otra parte, algunos estudios sugieren que decisiones como tolerar o resistir helmintos dependen de la exposición a estrés: animales bajo estrés nutricional elevan sus defensas contra helmintos y reducen sus cargas, mientras que animales no estresados las toleran. El presente proyecto intentará profundizar el conocimiento actual evaluando los mecanismos inmunes que median las estrategias de defensas bajo diferentes contextos, y que influyen sobre la modulación de la susceptibilidad de roedores como hospedadores y reservorios de patógenos, y las consecuencias sobre la virulencia y transmisión. Para ello se determinarán marcadores fisiológicos e inmunológicos de resistencia y tolerancia a *Trypanosoma cruzi* y/o *Trichinella spiralis* en ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus* var. *Wistar*) expuestas a diferentes desafíos ambientales. El conocimiento sobre cómo el contexto modula las



estrategias de defensa del hospedador, y en consecuencia el resultado de la interacción parásito-hospedador, es clave para lograr un entendimiento de las dinámicas de infección y la epidemiología de las enfermedades transmisibles.

-Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

The outcome of a host-parasite interaction may vary greatly, for the host (e.g. more or less virulence) or for the parasite (e.g. more or less transmission). The consequences that follow the exposure of a host to a pathogen may encompass a gradient of scenarios, some of which may be extreme: no infection, high intensity of infection but no disease, or death. These diverse set of outcomes influence crucially the dynamics of pathogens and their impact on host populations. In response to an infection, hosts may elicit two distinct defence strategies. They may resist, by mechanisms that reduce the parasite's success; or they may tolerate, by investing in processes that reduce the damage inflicted by the infection. Both strategies suppose an energetic cost for the host, and cause benefits and losses that influence the host-parasite interaction and its consequences. In the recent years, our group has carried out studies focused on investigating the relationship between both defence strategies and their variability in different host-parasite systems. The variability in the strategies has been associated with different genotypes, age or diet. On the other hand, some studies suggest that decisions like resisting or tolerating helminths depend on the exposure to stressing factors: animals under nutritional stress increase their defences reducing parasite burdens, whereas individuals not stressed tolerate them. The present project will attempt to deepen our current knowledge investigating the immune mechanisms underlying defence strategies under different contexts, which drive the modulation of rodent susceptibility to pathogen infection, and the consequences on virulence and transmission. To this aim, we will evaluate physiological and immunological markers of resistance and tolerance to *Trypanosoma cruzi* and *Trichinella spiralis* in laboratory rats (*Rattus norvegicus*, var. *Wistar*) exposed to different environmental challenges. Enhancing our understanding on how the context modulates the host's defence strategies, and as a consequence the outcome of a host-parasite interaction, is essential to achieve a better comprehension of infection dynamics and the epidemiology of transmissible diseases.

-Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano)

Resistencia/Tolerancia	
Interacción hospedador-parásito	Ecología de enfermedades

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en ingles)

Resistance/Tolerance Host-parasite interaction Disease ecology

2 – Datos de la Directora del Proyecto

- Nombre y Apellido

Andrea L. Racca

- Unidad Académica

Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET)

- Teléfono oficial de contacto

+ 54 9 3496 - 420639 Int. 111 – 353

-Teléfono movil de contacto

+ 54 9 342 5261339

-E-mail del Director/a del Proyecto

aracca@fcv.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar

El sistema en estudio está integrado por ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar) y dos parásitos *Trypanosoma cruzi* (*Try. cruzi*) y *Trichinella spiralis* (*Tri. spiralis*).

La instancia de trabajo con animales de laboratorio ya fue ejecutada en su totalidad (finalizando en diciembre de 2019).

Diseño experimental con ratas de laboratorio

Se utilizó un total de 128 ratas en 4 experimentos no simultáneos (32 ratas por experimento). Los tratamientos se implementaron durante 13 semanas.

Los 4 experimentos fueron de características similares (cada uno involucra 32 ratas en estudio + 8 ‘intrusos’), variando entre sí según la conformación evaluada de la relación hospedador-parásito:

- Experimento 1: los animales fueron inmunizados con albúmina sérica bovina (ASB).
- Experimento 2: a infectados con *Trichinella spiralis*
- Experimento 3: las ratas se infectaron con trypomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén)
- Experimento 4: los individuos se coinfectaron con los parásitos mencionados.

En cada uno de los experimentos se utilizó un diseño factorial 2x2, con restricción alimentaria (RA+) y conflicto social (CS+) como variables independientes. Luego de la aclimatación, los individuos de cada experimento fueron asignados, al azar, a uno de cuatro grupos de tratamientos (con 2 réplicas cada uno): i) Control (C) (n=8, 4 por réplica); ii) Restricción alimentaria (RA) (n=8, 4 por réplica); iii) Conflicto social (CS) (n= 8, 4 por réplica); y iv) Restricción alimentaria + conflicto social (RA+CS) (n=8, 4 por réplica). Cada semana, los individuos fueron pesados y medidos, se les extrajo muestra de sangre y se colectaron muestras individualizadas de materia fecal. Al finalizar los tratamientos los animales fueron eutanasiados según protocolo bajo anestesia profunda (CMC-ICIVET LITORAL). Pevio a la eutanasia, se registraron y tomaron las mismas medidas y muestras que se hicieron semanalmente durante cada experimento. Posteriormente, diversos órganos (bazo, estómago, intestino delgado, colon, corazón, hígado, pulmones, tejido adiposo, riñones, glándulas adrenales, timo, músculo esquelético, epidídimos y testículos) fueron pesados. De cada uno se obtuvieron dos alícuotas o dos porciones: una fue preservada en formol 10%, para su posterior estudio histopatológico, y la otra en crioviales a -80°C para técnicas de biología molecular.

En el caso particular del bazo, además se utilizó una porción para la recuperación de esplenocitos y su posterior cultivo celular. En primera instancia, dicha porción fue disgregada mecánicamente. Las células obtenidas se lavaron con PBS-Suero fetal bovino 3%, cuantificándose luego en cámara de Neubauer utilizando Azul de tripán como coloración vital. Luego, las células fueron resuspendidas en suero fetal bovino y DMSO al 10% y conservadas a -80°C en crioviales (4×10^8 aprox. cel/criovial) (Layland y col., 2010).

Marcadores fisiológicos de tolerancia y/o resistencia

Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo:

Adicionalmente a los indicadores de condición de salud que ya fueron obtenidos en etapas previas del trabajo (peso testicular relativo, índice de masa corporal cambio post-infección, proteínas totales, albúmina, asparato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), gamma glutamil transfersasa (GGT) y creatinina quinasa), se determinará biomarcadores de estrés oxidativo con el fin de evaluar capacidad fisiología y metabólica del individuo, se medirá la actividad de enzimas con capacidad antioxidantes en hígado y daño oxidativo en lípidos.

Brevemente: se determinará la actividad antioxidante de superóxido dismutasa, (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutation S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18), glutation

peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), y glutathion reductasa (GR, EC 1.6.4.2), la competencia antioxidante contra radicales peróxidos (ACAP) y los niveles de peroxidación lipídica (LPO). Las actividades enzimáticas se medirán por triplicado, mediante método colorimétrico y se expresarán por miligramo de proteínas (Bradford, 1976). Se utilizará la metodología descrita en Ale y col., 2018.

Evaluación de perfiles inmunes:

Se llevará a cabo el análisis de la expresión de ARNm de diferentes citoquinas y factores de transcripción a partir de cultivos de esplenocitos (estimulados inespecíficamente con PMA junto a ionomicina) mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando metodología descrita por Layland y col., 2010 con algunas modificaciones. Este perfil de expresión se considerará como una medida de la capacidad de respuesta potencial del sistema inmune *in vivo*.

Brevemente: para el cultivo, los crioviales conservados a -80°C con células obtenidas del bazo y resuspendidas en suero fetal bovino y DMSO al 10%, serán descongelados y puestos con RPMI, suplementados con suero fetal bovino al 10% y antibiótico + antimicótico. En la placa se cultivarán 1×10^6 células/pocillo por duplicado y se realizará un basal por muestra. Se incubará en estufa gaseada overnight a 37°C , al siguiente día se estimulará con PMA junto a ionomicina (estimulante celular), a las 6 horas se cosecharán las células y mantendrán en trizol a -80°C con un mínimo de 30 días. Luego se realizará la extracción de ARN y transcripción inversa utilizando como enzima MMLV (virus de la leucina murina de Moloney), según instrucciones del fabricante.

Se evaluará mediante PCR en tiempo real (qPCR), marcadores de funciones efectoras antagónicas: genotipos de células T colaboradoras: Th1 (T-bet, IFN-gamma) /Th2 (GATA3, IL-4) y respuesta inmune reguladora (FoxP3 [factor de transcripción asociado a células T-helper regulatorias] (Ale y col., 2018) y las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β , que limitan la actividad efectora y el daño por ella ocasionada.

Examen histopatológico:

Se valorará el número de infiltrados tisulares y se realizará la cuantificación de células inflamatorias mediante un examen histológico de órganos seleccionados (hígado y corazón) así como la presencia de lesiones del estroma y del parénquima, donde se utilizarán los criterios de cuantificación con modificación por Caldas y col., 2008. De este modo se podrá evaluar el daño del tejido y su asociación con células del sistema inmune.

Otras variables -ya obtenidas- que se considerarán para los análisis de resistencia/tolerancia, a partir de este sistema, son:

- Indicadores de salud/patología de los individuos
- Prevalencia y cuantificación de la carga parasitaria (intensidad parasitaria) de *Try. cruzi* y *Tri. spiralis*.



<p>– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)</p>	
	NO
	<p>SI. Elija una de las opciones:</p> <p>se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes no se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible existe un contrato con un tercero que impide la divulgación Otro. Justifique. X</p> <p>Se solicita confidencialidad debido a que los resultados serán parte de una (o varias) publicación científica en revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.</p>
<p>– Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público.</p> <p>Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.</p>	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
X	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos: