

EVALUACIÓN DE MARCADORES DEL SISTEMA INMUNE EN ROEDORES SILVESTRES

Mauro Pergazere

Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET LITORAL), Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNL-CONICET), Argentina. R.P. Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Área: Ciencias de la Salud / Sub-área: Veterinaria.

Introducción

La salud de los animales silvestres es actualmente objeto de creciente interés debido a su relevancia en la salud pública, la conservación de especies y la producción animal (Beldomenico 2006). Las enfermedades infecciosas emergentes constituyen una carga significativa para la economía global y la salud pública (Morens *et al.* 2004). Una gran parte de las mismas son zoonosis, y la mayoría se originan en animales silvestres (Jones *et al.* 2008). Asimismo, muchas zoonosis de alta incidencia en el país (por ej. chagas, fiebre hemorrágica argentina, síndrome pulmonar por hantavirus, etc.) también poseen reservorios silvestres, especialmente roedores (por ej. leptospirosis, fiebre hemorrágica argentina, síndrome pulmonar por hantavirus, etc.). Por lo tanto, para comprender los determinantes del riesgo de la exposición humana a estas enfermedades, es necesario analizar los causales de la variación en la susceptibilidad del hospedador y en las dinámicas de infección en roedores. La interacción hospedador-parásito y sus consecuencias dependen de las circunstancias que rodean al hospedador a través de mecanismos que involucran al sistema inmune (Webster *et al.* 2002, Sapolsky 2002).

El sistema inmune de vertebrados se caracteriza por una serie de complejos mecanismos celulares y humorales altamente relacionados que median la integridad de los individuos. Estos mecanismos son mediados en gran parte por moléculas denominadas citoquinas (Murphy 2011). La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones y dirige el curso de las respuestas inmunes adaptativas posteriores. Las células del sistema inmune inespecífico expresan diversos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs). Los PRRs, como los receptores tipo Toll (TLR), activan las defensas del hospedador mediante diversas vías de señalización. La vía de NF- κ B es activada principalmente por productos bacterianos que inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 β y IL-6. Vías de señalización alternativas de algunas TLR inducen la expresión de citoquinas antivirales, como interferones tipo I (IFN- α e IFN- β) (Murphy 2011). En contraste, infecciones de larga duración con helmintos (Maizels & Yazdanbakhsh 2003) y artrópodos ectoparásitos (Boppana *et al.* 2009) inducen un fenotipo inmunológico anti-inflamatorio que afecta las respuestas mediadas por PRRs. Esta acción es mediada por la producción de factor de crecimiento transformante (TGF- β) e IL-10, que disminuyen la respuesta inflamatoria. En consecuencia, la interacción entre macroparásitos y vigilancia inmune innata es de gran valor biológico porque podría afectar la susceptibilidad individual a un amplio espectro de patógenos (Friborg *et al.* 2010).

Proyecto acreditado en el que se enmarca la investigación

- Análisis del perfil inmunológico Th1/Th2/Th17 en roedores silvestres y su relación con el parasitismo. CAI+D UNL. Período: 2013-2015. Director: Andrea Racca
- The dynamics of health of wildlife populations: what can faeces tell us? financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – PICT Bicentenario (Nº2202). Director: Pablo Beldomenico. Período: 2011-2014

Director y Co-Diretor del autor: Andrea Racca y Marcelo Ruiz

Objetivos

En el presente trabajo intenta aportar conocimiento a la respuesta inmune producto de la relación parásito-roedores en sistemas naturales, hasta ahora desconocidas. Como primer paso, nos propusimos determinar la relación de la expresión de citoquinas pro- y anti- inflamatorias (TNF e IL-1 β ; TGF- β respectivamente) y su variabilidad con respecto a estación, sexo y peso de roedores sigmodontinos (*Akodon azarae*) de zonas de islas del Delta del Paraná. Actualmente se está llevando a cabo la evaluación de carga parasitaria de estos mismos individuos.

Materiales y Métodos

Muestreo de roedores - Toma de datos y muestras

Se han llevado a cabo campañas (Período: 2010-2012) cada cinco semanas en las que se capturaron roedores sigmodontinos en sitios pre-seleccionados del área de estudio: zona de islas el delta del Paraná. El estudio tuvo una duración de 2 años, en los que se realizaron 20 campañas de muestreo. El procesamiento inicial de los animales se llevaba a cabo en un laboratorio de campo cercano a los sitios de captura. Luego de la anestesia y extracción de sangre por punción cardíaca, se procedía a la dislocación cervical de los roedores, tomándose datos y muestras de: especie, peso, edad, condición corporal, sexo y estado reproductivo, bazo, entre otros. Las muestras de sangre entera se conservaron a 4°C y las de bazo a -80°C hasta su utilización. Los cadáveres fueron depositados individualmente en bolsas de nylon con etanol 96% y transportados al laboratorio para examinarlos bajo lupa binocular en busca de ectoparásitos (tarea que se está llevando a cabo en estos momentos por otros integrantes del grupo).

Evaluación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias

Se cuantificaron los niveles de expresión de los ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de citoquinas pro- y anti-inflamatorias: TNF e IL-1 β ; TGF- β respectivamente, mediante técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, a partir de muestras de bazo de los roedores capturados. Para comenzar con el estudio se evaluaron individuos de las ultimas 3 campañas de una de las especies dominante: *Akodon azarae*.

Transcripción reversa: los tejidos fueron homogenizados directamente en reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de ARN total de cada muestra fue evaluada en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano. Para obtener al ADN copia, cantidades iguales de ARN total de cada muestra serán retro-transcriptas utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV RT, Promega). Los ADN copia provenientes de los ARNm de cada marcador fueron amplificados utilizando cebadores específicos.

Diseño de cebadores: se buscaron en primera instancia secuencias de ARN de cada citocina de la especie en estudio: *Akodon azarae*. Al no encontrarse indexadas en la bases de datos, se buscaron las especies filogenéticamente más relacionadas y se verificó que la secuencia de dichas citocinas se encontraran indexadas en la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A partir de aquellas secuencias de ARN de las especies encontradas (*Rattus norvegicus*, *Peromyscus maniculatus*, *Mus musculus*, *Microtus agrestes*, *Mesocricetus auratus*), se procedió a la realización de alineamientos múltiples; para tal fin se utilizó el programa VectorNTI versión 6.0. Luego de seleccionar regiones conservadas entre las especies analizadas, se procedió al diseño de los cebadores. En caso de que las regiones, correspondientes a los cebadores, no hayan presentado 100% homología entre las

especies analizadas, se procedió a generar cebadores degenerados. Se utilizaron los programas informáticos de libre acceso: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y The Primer Express® Software v3.0.1, para la confección de los mismos.

Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polimerase Chain Reaction - PCR) en tiempo real: La cuantificación relativa de la expresión de los genes codificantes de cada una de las citocinas evaluadas se realizó mediante PCR en tiempo real. La composición de la mezcla de reacción consistió en ADN polimerasa (Phire Hot Star, Thermo) (0,1 µl), y su buffer en concentración final 1X, dNTPs 0,8mM total final (100mM total, Life Technologies), SYBR Green 1X final (Cambrex Corp.) en concentraciones recomendadas por el fabricante. La concentración de los cebadores específicos (Life Technologies) fue establecida empíricamente. La concentración de ADNc que se utilizó fue obtenida a partir de la curva de eficiencia para cada molécula. Por último se llevó a un volumen final de 20 µl con agua ultra pura estéril. Los controles negativos se realizaron reemplazando el volumen de ADNc por agua ultra pura estéril. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La pureza de los productos de PCR fue confirmada mediante curvas de disociación y secuenciación. La β-actina (ACTB) fue utilizada como normalizador de la reacción. Los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando una eficiencia de la reacción del 100%.

Análisis estadístico: se realizó un análisis multivariable con modelos mixtos lineales o lineales generalizados (según la distribución de la variable dependiente). Se incluyeron variables que fueron potencialmente enmascaradoras (peso, sexo, edad.).

Resultados

Se evaluaron un total de 24 roedores sigmodontinos *Akodon azarae*, de los cuales 19 fueron adultos y el resto subadultos (n=24).

Diseño de cebadores: Los mismos se confeccionaron tal como se describe en el punto anterior. Para TNF se utilizaron los siguientes par de cebadores específicos: sentido 5'GCCACGTTGTAGCAAACMA3' y anti-sentido 5'AGAACCTGGGAGTAGACVAG3 (producto 149pb); para IL-1: sentido 5'TCCATGAGCTTTGTACARGG3' y anti-sentido 5'TTGCTTGGGATCCACAYTCT3' (producto 141 pb); para TGF-β: sentido 5'AGGCTGTGCTCGCTTTGTAC3' y anti-sentido 5'GTTGTTGCGGTCCACCATTA3'(producto 131pb); para ACTB: sentido 5'GGGAAATYGTGCGTGACATC3' y anti-sentido 5'TTGCCAATRGTGATGACCTG3' (product0 139).

Análisis de los niveles de expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias: Mediante pruebas de correlación (Spearman's Rho) se comprobó que las citoquinas evaluadas: TNF, IL-1β y TGF-β no tuvieron asociación con la edad del roedor (p= 0.8263, p= 0.3268, p= 0.795; respectivamente). Para dicha evaluación se consideró el peso del roedor como "aproximación" de su edad (Jackson et al, 2015).

Se observó una asociación positiva significativa entre los valores de las citoquinas IL-1β y TNF (Pearson's correlation p=0.0001165).

De las citoquinas evaluadas, solo TNF mostró expresiones superiores en hembras que en machos, aunque sin diferencias significativas (Mann-Whitney tests).

Conclusiones

Los resultados demuestran que las hembras de *Akodon azarae* invierten en defensas genéricas, al verse aumentados los niveles de TNF, una de las principales citoquinas de la respuesta inmune innata. Este aumento sugiere un mecanismo

protector potencial en hembras frente a infecciones (en evaluación), a modo de garantizar una posible gestación.

Bibliografía

Beldomenico PM (2006) Medicina y animales silvestres: desafío para las ciencias veterinarias en el siglo XXI. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 5: 7-20

Boppana, V., Thangamani, S., Alarcon-Chaidez, F., Adler, A., Wikel, S., 2009. Blood feeding by the Rocky Mountain spotted fever vector, *Dermacentor andersoni*, induces interleukin-4 expression by cognate antigen responding CD4+ T cells. Parasit Vectors.

Friberg, I., Bradley, J., Jackson, J., 2010. Macroparasites, innate immunity and immunoregulation: developing natural models. Trends Parasitol. 26, 540-549.

Jackson JA, Hall AJ, Friberg IM, Ralli C, Lowe A, Zawadzka M, Turner AK, Stewart A, Birtle RJ, Paterson S, Bradley JE, Begon M. (2015) An Immunological Marker of Tolerance to Infection in Wild Rodents. PLoS Biol 2015 12(7): e1001901

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL & Daszak P., (2008) Global trends in emerging infectious diseases. Nature 451: 990-993

Kourilsky P & Truffa-Bachi P. (2001) Cytokine fields and the polarization of the immune response. Trends Immunol 22: 502-509.

Maizels, R., Yazdanbakhsh, M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat Rev Immunol 3, 733-744.

Morens DM, Folkers GK & Fauci AS (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature 430: 242-249.

Murphy, K. (2012). Janeway's Immunobiology, 8^{ed}. Ed. by. Garland Science, Taylor y Francis Group. New York.