



Tesis Doctoral Propuesta para Mención Internacional:

"Estudio de los mecanismos de inmunomodulación por *Fasciola hepatica*: Apoptosis y linfocitos T reguladores"

"Study of the mechanisms of immunomodulation used by *Fasciola hepatica*: Apoptosis and regulatory T cells"

Tesis presentada por **Alejandro Escamilla Sánchez**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Bajo la dirección del Dr. José Pérez Arévalo

y la codirección de Dra. M^a José Bautista Pérez y Dra. Verónica María
Molina Hernández.

TITULO: *Estudios de los mecanismos de inmunomodulación por Fasciola hepática: Apoptosis y linfocitos T reguladores*

AUTOR: *Alejandro Escamilla Sánchez*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio de los mecanismos de inmunomodulación por *Fasciola hepatica*: apoptosis y linfocitos T reguladores

DOCTORANDO/A: Alejandro Escamilla Sánchez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En la Tesis Doctoral se ha realizado un estudio de los mecanismos de inmunomodulación de la respuesta inmune por *Fasciola hepatica in vivo* en oveja y cabra. Para el desarrollo de la Tesis ha sido necesario realizar varias experiencias con rumiantes: Trabajo 1: 20 ovejas de 7 meses de edad sacrificadas a los 8, 28 días pos-infección y 17 semanas post-infección. En esta experiencia se estudió la apoptosis de eosinófilos en lesiones hepáticas mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Los resultados fueron publicados en la revista **Veterinary Parasitology, 2016, 216:84-88.**

Para el segundo trabajo se realizó un ensayo con 25 ovejas de 6 meses de edad que fueron sacrificadas a los 0, 1, 3, 9 y 18 días post-infección. Se estudió la apoptosis de leucocitos peritoneales mediante inmunocitoquímica, citometría de flujo y microscopía electrónica. Los resultados fueron publicados en la revista **Veterinary Parasitology, 2017, 238: 49-53.**

Estos dos trabajos han sido la primera descripción de la apoptosis causada por *F. hepatica* en rumiantes, y sugieren que la apoptosis de eosinófilos en hígado y peritoneo, así como macrófagos y linfocitos peritoneales puede constituir un importante mecanismo de modulación de la respuesta del hospedador tanto en fases tempranas como crónicas de la infección.

Para el tercer trabajo se emplearon dos ensayos, uno con 18 ovejas y otro con 18 cabras para estudiar la distribución de linfocitos T reguladores (Foxp3) en lesiones hepáticas y en nódulos linfáticos hepáticos en fases tempranas y crónicas de la infección. Los resultados sugieren que *F. hepatica* induce, tanto en la oveja como en la cabra, una importante expansión de linfocitos Foxp3+ en lesiones hepáticas desde fases tempranas de la infección, y en fases tardías en la proximidad de canalículos biliares hiperplásicos donde viven los parásitos adultos, modulando así la respuesta para facilitar su supervivencia. Estos resultados han sido publicados en la revista **Veterinary Parasitology, 2016: 230: 14-19.**

Tanto los estudios de apoptosis como de distribución de linfocitos Foxp3 han sido realizados en colaboración con la Dra. Verónica Molina Hernández entre los años 2014-2016, periodo en el que disfrutó de un contrato Post-doc en la Queens Belfast University (School of Biological Sciences), Reino Unido. El doctorando realizó dos estancias de 3 meses cada una en dicha Universidad para realizar parte de los estudios de la Tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 7 de Julio de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Pérez Arévalo Fdo.: María José Bautista Pérez Fdo.: Verónica Molina Hernández

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	13
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	25
RESUMEN	33
ABSTRACT	39
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	47
1.- Etiología y distribución.	49
2.- Ciclo biológico.	51
3.- Patogenia.	54
3.1.- Lesiones.	57
3.2.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos	61
4.- Respuesta inmunitaria frente a <i>Fasciola hepatica</i>	61
4.1.- Introducción	61
4.2.- Respuesta inmunitaria natural.....	62
4.3.- Respuesta inmunitaria adquirida.....	65
4.4.- Papel de los eosinófilos en infecciones por helmintos.....	71
4.5.- Papel de los Linfocitos T reguladores (Tregs) en infecciones por helmintos .	74
5.- Inmunomodulación y evasión de la respuesta inmunitaria ejercida por <i>Fasciola hepatica</i>	75
5.1.- Localización final del parásito	76
5.2.- Glucocálicz	76
5.3.- Evasión de la acción del sistema del complemento	77
5.4.- Cambios antigénicos durante la migración parasitaria	77
5.5.- Capacidad migratoria a través del parénquima hepático	78
5.6.- Modulación del tipo de respuesta hacia Th2 y su influencia en otras infecciones.....	78
5.7.- Inmunomodulación de los linfocitos T reguladores FoxP3 (Tregs FoxP3)....	79
5.8.- Productos de excreción y secreción de <i>Fasciola hepatica</i> (FhESP): Potentes moléculas inmunomoduladoras.....	80
5.9.- Apoptosis de células efectoras mediada por <i>Fasciola hepatica</i>	81
PRIMER TRABAJO	87
Abstract.....	90

1.- Introduction	92
2.- Materials and methods	93
2.1.- <i>Experimental design</i>	93
2.2.- <i>Histopathology and fluke burdens</i>	94
2.3.- <i>Immunohistochemistry (IHC)</i>	94
2.4.- <i>Transmission electron microscopy (TEM)</i>	95
2.5.- <i>Gross lesions evaluation and cell counting</i>	95
2.6.- <i>Statistical analyses</i>	96
3.- Results	96
3.1.- <i>Gross pathology and fluke burdens.</i>	96
3.2.- <i>Histopathological study.</i>	96
3.3.- <i>Apoptosis detected by caspase-3 expression</i>	97
3.4.- <i>Apoptosis detected by transmission electron microscopy</i>	99
4.- Discussion.....	99
Acknowledgments.....	102
References.....	102
SEGUNDO TRABAJO	109
Abstract.....	112
1.- Introduction	112
2.- Materials and methods	113
2.1.- <i>Experimental design</i>	113
2.2.- <i>Peritoneal cell populations</i>	114
2.3.- <i>Immunocytochemistry</i>	114
2.4.- <i>Cell counting from immunocytochemistry</i>	115
2.5.- <i>Annexin V flow cytometry assay</i>	115
2.6.- <i>Transmission electron microscopy</i>	116
2.7.- <i>Statistical analysis</i>	116
3.- Results	116
3.1.- <i>Peritoneal leucocyte populations</i>	116
3.2.- <i>Apoptosis detected by caspase-3 expression</i>	117
3.3.- <i>Annexin V flow cytometry assay</i>	118
3.4.- <i>Apoptosis detected by transmission electron microscopy</i>	119
4.- Discussion.....	120

Acknowledgments.....	122
Appendix A. Supplementary data	122
References	123
TERCER TRABAJO	127
Abstract.....	130
1.- Introduction	131
2.- Materials and methods.....	132
2.1.- <i>Experimental design</i>	132
2.2.- <i>Fluke burdens and histopathology</i>	132
2.3.- <i>Immunohistochemistry</i>	133
2.4.- <i>Cell counting</i>	133
2.5.- <i>Statistical analysis</i>	134
3.- Results	134
3.1.- <i>Fluke burdens</i>	134
3.2.- <i>Gross and histopathological study</i>	135
3.3.- <i>CD3 and Foxp3 expression in the liver</i>	136
3.4.- <i>Hepatic lymph nodes</i>	138
4.- Discussion.....	140
Acknowledgments.....	142
References.....	143
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES	161
CONCLUSIONS.....	167
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
ANEXO I.- Materiales y Métodos	201
Objeto.....	203
1.- Carga Parasitaria (Primer y Tercer Trabajo)	203
2.- Población de leucocitos peritoneales (Segundo Trabajo).....	203
3.- Estudio de la anatomía patológica del hígado (Primer y Tercer Trabajo).....	204

4.- Inmunohistoquímica (IHQ, Primer y Tercer Trabajo) e inmunocitoquímica (ICQ, Segundo Trabajo).....	205
5.- Tinción de Hansel (Primer Trabajo).....	207
6.- Microscopía electrónica de transmisión (Primer y Segundo Trabajo)	208
7.- Citometría de flujo con kit Anexina V/PI (Segundo Trabajo).....	210
ANEXO II.- Anatomía Patológica Hepática	215
Objeto.....	217
Anatomía patológica del hígado en fases tempranas de la infección.....	217
Anatomía patológica del hígado en fases crónicas de la infección.....	218
ANEXO III.- Imágenes Complementarias	221
ANEXO IIIa.- Imágenes Primer Trabajo	223
ANEXO IIIb.- Imágenes Segundo trabajo	233
ANEXO IIIc.- Imágenes Tercer Trabajo	241
ANEXO IV.- Técnica TUNEL.....	247
Objeto.....	249
Materiales y Métodos.....	249
Resultados	250
ANEXO V.- Comunicaciones y Premios.....	253
Comunicaciones a congresos	255
Premio.....	257
ANEXO VI.- Publicaciones.....	259

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en este apartado a todas esas personas que han permitido de una forma u otra, que este trabajo salga adelante.

En primer lugar a mi director de Tesis, José Pérez Arévalo, por haber confiado en mí desde el primer momento, darme la libertad que a veces te he reclamado para llevar a cabo las investigaciones, por haberme motivado en cada una de mis caídas y haber sabido valorar mis éxitos. Gracias de corazón desde el punto profesional y, sin duda, desde lo personal.

A mi codirectora M^a José Bautista, por haber sido un apoyo incondicional durante todos estos años, por todas las palabras de aliento cuando se han torcido las cosas y por disfrutar cada logro tanto de mi tesis como de mi vida personal, como si fueran tuyos. Eres un pilar fundamental en el grupo.

A mi otra codirectora, Verónica Molina, gracias por haber apostado tanto, por enseñarme que se puede ser una gran compañera de trabajo, una gran profesional y a la vez una gran amiga, sin darle muchas vueltas. Gracias por todo lo que me has enseñado, desde Belfast hasta Córdoba, desde el Castillo de Carrickfergus hasta el cultivo de macrófagos de médula ósea de ratón *in vitro*. Mis estancias, y mi proceso de tesis, no hubiera sido igual sin tu ayuda. Gracias de todo corazón.

A la Cátedra de Parasitología, en especial a Álvaro Martínez, a Javier Martínez, a Maribel Acosta, a Leandro Buffoni, a Rafael Zafra y a Raúl Pérez por toda la ayuda prestada, en lo personal y en lo profesional. Sois grandes, y formáis un gran equipo, sin ustedes no hubiera sido posible sacar a delante un proyecto de esta envergadura. En especial, a Álvaro por la indudable ayuda que me ha prestado desde el primer momento en todo lo que lo he necesitado y en especial en el segundo trabajo de esta Tesis. Y a Leandro y Raúl, por su amistad y por todos esos días en la granja, en el laboratorio o con un café que hemos compartido. Gracias a todos.

A todos mis compañeros del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, a los de ayer y los de hoy. A los que se fueron y dejaron huella, a los que volverán y a los que permanecen...¡Gracias! Me llevo grandes momentos con muchos de vosotros, grandes amistades y sé que el futuro nos volverá a cruzar en el camino: Fernando, M^a Ángeles, Raquel, Joao, Silvia, Paola, Isabel, Teresa, Irene, Jaime, Abelardo, Gema, Yolanda, Antonio, Mari, Inma. Todos, de alguna forma u otra me habéis aportado algo.

Al Dr. John Dalton, por permitirme realizar mis estancias en su equipo de trabajo en la Queen's University of Belfast, por su hospitalidad y por todo lo que me aportó durante dichos períodos.

No puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer su humanidad, su cariño, su profesionalidad, sus palabras de aliento, sus consejos profesionales y personales a Fátima Garrido y a Elena Mozos, gracias por la mano que me habéis tendido siempre.

A Estefanía, mi compañera inseparable durante toda mi Tesis Doctoral, dentro y fuera de ella. Gracias por todos y cada unos de los cafés que nos hemos tomado, porque cada uno tenía una historia, una anécdota, un desahogo y muchas risas. Gracias por las palabras de apoyo, por tu cercanía y por ser una de esas amigas que nunca fallan, que siempre están contra viento y marea y a las que se les echa de menos cuando llevas unos días sin hablar. Gracias por tanto.

A todos mis amigos, por haber soportado mis encierros, mi estrés y por apoyarme siempre en cada locura. A Cristi, Cristina, Marina, Antonio, Dani, Gloria, Laura, Julieta, Damián, Mónica, Lucas, Ana... A mi compañera de promoción, y eterna amiga Ana Escandón, por haberme animado siempre a ser el freaky de la Anatomía Patológica que soy hoy día y por no fallar nunca, aunque sea para una charla, a pesar de la distancia.

A mis padres por haberme enseñado siempre que la constancia y el trabajo tienen sus frutos. Por haberme dado tantas palabras de aliento cuando lo he necesitado, por haber soportado mis cambios de humor en épocas de mucho estrés y por poner la mano en el fuego por mí incondicionalmente cuando ni yo era capaz de hacerlo. A mis hermanos Vero, Cristi y Adri y mi cuñado Kiko, por enseñarme que no todo se aprende en los libros y darme todo ese cariño que tantas veces se necesita. Todos, sois mi ejemplo a seguir. Por supuesto, a mis abuelos, que sé que han compartido conmigo todos los momentos que me han llevado hasta aquí...desde algún punto del universo.

A Antonio, esta Tesis es tan tuya como mía. Gracias por los abrazos, por las palabras terapéuticas, por las miradas sanadoras, por no dejar de creer nunca en mí y en todas mis locuras, por haber sido el pilar de todo esto y de todo lo que vendrá. Gracias por compartir tanto conmigo, por enseñarme tanto y por hacerme mejor persona. Esto ha sido tan solo un capítulo más. A tu familia, ahora también la mía: Antonio, Belí, David, Alicia, María y Mario, gracias por haberme alentado siempre que lo he necesitado, por haber sido un apoyo fundamental de todos mis proyectos y por hacerme las cosas un poco más fáciles haciéndome sentir que todo esto merecería la pena algún día.

A todos los que están, mil gracias, y también a todos los que no he nombrado pero que han formado parte de este trabajo de una forma o de otra.

"Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro".

Santiago Ramón y Cajal.

" Si el elefante quisiera, vencería al león, solo tiene que creerlo"

José Indalecio Sánchez, mi abuelo.

ABREVIATURAS

ABC: Avidina-Biotina-Peroxidasa
ADCC: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.
DE: Desviación estándar
DC: Células dendríticas.
Dpi: días post-infección
ECP: proteína catiónica eosinofílica
EDN: neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO: Peroxidasa propia de los eosinófilos
EO: Eosinófilos
ESP: Productos de excreción y secreción
F. gigantea: *Fasciola gigantea*
F. hepatica: *Fasciola hepatica*
FhCL1: catepsina L1 de *F. hepática*
FhESP: productos de excreción-secreción de *F. hepatica*
FhHDM-1: *Fasciola hepatica*- Helminth defence molecules-1
FL: Folículos linfoides
GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Macrófago
g.: gramos
H-E: hematoxilina-eosina
ICQ: Inmunocitoquímica.
IFN- γ : interferón-gamma
Ig: Inmunoglobulina
IHQ: Inmunohistoquímica
IL-4: interleuquina 4
iNOS: Óxido Nítrico sintasa inducible
ITT: ovejas de Java de cola delgada
NEJs: formas juveniles recientemente desenquistadas
ml: mililitros
MBP-1: Proteína básica mayor-1 de los eosinófilos.
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
mm: milímetros
mM: Milimolar
NEJs: Larvas juveniles de *Fasciola hepatica* recién desenquistadas.
NK: Natural Killer

NLH: Nódulos linfáticos hepáticos

PBS: tampón fosfato salino

Pi: post-infección

RT: Room Temperature

Spi: semanas post-infección

Teg: Antígenos tegumentales de *F. hepática*.

TBS: Tampón salino Tris

Tc: linfocitos T citotóxicos

TC: trayectos crónicos

TCBZ: Triclabendazol.

TCR: receptor de linfocitos T

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

Th: linfocitos T colaboradores

Th0: linfocitos colaboradores maduros aún no han recibido un estímulo para la
respuesta

Th1: respuesta inmunitaria tipo 1

Th2: respuesta inmunitaria tipo 2

TLR: receptor de tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : factor de necrosis tumoral beta

Tregs: linfocitos T reguladores

UC: Uninfected control

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fasciolosis es una enfermedad causada por el trematodo *Fasciola hepatica* y se considera una de las enfermedades parasitarias de mayor repercusión sanitaria y económica en la ganadería ovina y bovina de todas las regiones templadas del planeta (Rojo-Vázquez y cols., 2012; Charlier y cols., 2014a), habiéndose estimado pérdidas de hasta 3,000 millones de dólares (Spithill y cols., 1999; Piedrafita y cols., 2010; Toet y cols., 2014).

Durante los últimos años, se ha observado un progresivo aumento en la prevalencia de la fasciolosis en Europa, probablemente debido al desarrollo de resistencia frente a los antihelmínticos de elección más eficaces, aunque también se ha sugerido que el cambio climático, con inviernos cada vez más suaves, puede haber contribuido a dicha elevación (Fairweather, 2011; Fox y cols., 2011). En España, la prevalencia de la enfermedad es muy variable dependiendo de la región, debido a distintos factores que influyen directamente en el ciclo biológico del parásito como, por ejemplo, la humedad. De manera que, en regiones húmedas, como puede ser Galicia, se describe una prevalencia en ovejas del 83%, con un porcentaje de fasciolosis activa del 59,5% (Paz-Silva y cols., 2003) y en bovinos del 67% (Arias y cols., 2013), o bien en la Comunidad Autónoma de Castilla y León con un 59,3% de prevalencia de ovejas infectadas (Martínez-Valladares y cols., 2013). Mientras que, en áreas mucho más secas de Andalucía como Córdoba y Granada, tan sólo se detectó un 3% de fasciolosis caprina en los animales testados (Martínez Moreno y cols., 1996).

Igualmente, se ha de destacar que la infección humana por *F. hepatica* es una zoonosis emergente en áreas de América del Sur, Asia y África, en las que se han estimado entre 2,7 y 17 millones de personas afectadas (Mas Coma y cols., 2005; Nguyen y cols., 2011), adquiriéndose la infección vía ingesta de agua o vegetales contaminados con metacercarias.

La intensidad del proceso patológico está en función de la dosis infectante y de la pauta de reinfección, pudiendo diferenciarse entre procesos agudos de alta mortalidad o, lo que es más frecuente, procesos crónicos con marcada repercusión en la producción cárnica, láctea y lanar, así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Schweizer y cols., 2005).

En la actualidad, la lucha contra la fasciolosis en rumiantes está basada casi exclusivamente en el empleo profiláctico y terapéutico de antihelmínticos. Sin embargo,

dichos tratamientos tienen varios inconvenientes como el corto período de acción de los fármacos, lo que posibilita las reinfecciones si el animal continúa pastando en prados contaminados, obligando a un uso repetitivo en zonas endémicas con el consiguiente coste económico y riesgo de adquirir resistencia a dichos fármacos. El triclabendazol es el antihelmíntico más eficaz contra *F. hepatica*, ya que es el único activo frente a formas inmaduras y maduras del parásito (Boray y cols., 1983), mientras que otros antihelmínticos sólo son efectivos en las fases maduras de 8 a 14 semanas post-infección (Kelley y cols., 2016). Su uso extensivo ha dado lugar a cepas resistentes del parásito que se han extendido por numerosos países. En España, se ha descrito resistencia frente a este fármaco y además frente a otros antihelmínticos como el albendazol y clorsulón (Alvarez-Sánchez y cols., 2006; Sanabria y cols., 2013).

La obtención de vacunas eficaces frente a helmintos, entre ellos *F. hepatica*, es un reto importante para la comunidad científica ya que se trata de un parásito complejo con numerosos mecanismos de evasión y/o modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador. Esto supone una desventaja para el desarrollo de vacunas eficaces (Flynn y cols., 2010; Morphew y cols., 2013; Toet y cols., 2014; Molina-Hernández y cols., 2015).

Puesto que *F. hepatica* habitualmente cursa con infecciones crónicas, es un factor esencial el conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmunitaria efectiva del hospedador implicados en la eliminación de los parásitos, lo que permitiría seleccionar de una forma racional el adyuvante, antígeno y pautas de vacunación más adecuados para potenciar dicha respuesta eficaz (Flynn y cols., 2010).

Hoy en día, se sabe que la fasciolosis puede originar una supresión del sistema inmunitario, particularmente de la respuesta Th1, así como problemas en la regulación del mismo, aumentando la susceptibilidad del animal parasitado a otras infecciones, como pueden ser la salmonelosis y tuberculosis, e incluso interfiriendo en las pruebas diagnósticas de dichas enfermedades (Flynn y cols., 2007; Claridge y cols., 2012). Este hecho, está contribuyendo incluso a la actual diseminación de la tuberculosis en países como Reino Unido, a pesar de los programas de diagnóstico y erradicación.

Desde hace mucho tiempo, se estudia el papel de los eosinófilos en la defensa y en la inmunidad del hospedador en infecciones por helmintos (especialmente frente aquellos

que tienen un estado de migración tisular como *F. hepatica*), así como su papel en la patología. En la bibliografía, se ha demostrado que las ovejas de Java de cola delgada (ITT) desarrollaron resistencias frente a la infección por *F. gigantica* pero no frente a *F. hepatica* (Piedrafita y cols., 2007) gracias al papel de los eosinófilos como inductores de una citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) contra *F. gigantica*. Es por ello, que el estudio de una posible inmunomodulación por parte de *F. hepatica* sobre estas células efectoras supone hoy día un punto importante para el conocimiento de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador por parte del parásito.

En la rata, se ha demostrado que la respuesta inmunitaria protectora ocurre durante los estadios tempranos tras la infección a nivel intestinal o peritoneal (Van Milligen y cols., 1998). Sin embargo, hasta la fecha, los ensayos vacunales en rumiantes se han centrado en estudios de estadios tardíos de la infección para evaluar la carga parasitaria y eliminación de huevos, lo que no ha permitido el estudio de los mecanismos de respuesta y/o modulación de la respuesta inmunitaria en fases tempranas de la infección, que es cuando ésta es eficaz para la eliminación de los parásitos en estadios juveniles. En un ensayo vacunal realizado por nuestro grupo en cabras sacrificadas a los 7-9 días post-infección, se observó que algunos de estos animales, tanto vacunados con catepsina L1 (Zafra y cols., 2013a), como con glutatión S-transferasa clase sigma (Zafra y cols., 2013b), existía un significativo descenso de las lesiones hepáticas asociadas a un significativo incremento de los eosinófilos peritoneales y de la expresión de iNOS en las células inmunes peritoneales, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de citotoxicidad celular, siendo el eosinófilo la célula efectora que jugaría un papel en la respuesta inmunitaria efectora en animales vacunados.

La apoptosis o muerte celular programada, se ha postulado como un proceso usado por los organismos para eliminar las células dañadas o innecesarias y, de este modo, prevenir condiciones patológicas manteniendo la homeostasis en los tejidos (Rosenberg, 2011). Los estudios publicados hasta la fecha, sobre la apoptosis causada por *F. hepatica* como mecanismo de evasión/modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, se centran en modelos murinos. En rata, se ha descrito la apoptosis mediada por caspasas de eosinófilos y macrófagos peritoneales (Serradell y cols., 2007; 2009). También, se ha descrito que *F. hepatica* induce la apoptosis de los eosinófilos en el infiltrado inflamatorio hepático en ratas *in vivo* (Guasconi y cols., 2012). Estudios

in vitro realizados en ratas (Serradell y cols., 2007; 2009; Guasconi y cols., 2012), demostraron que los productos de excreción y secreción de *F. hepatica* eran capaces de inducir la apoptosis de eosinófilos y de macrófagos peritoneales, lo que sugiere que la apoptosis de las células efectoras juega un papel fundamental en la evasión/supresión de la respuesta inmunitaria. Además, la apoptosis de los linfocitos ha sido previamente estudiada y juega un papel fundamental en infecciones por una gran variedad de helmintos como *Schistosoma japonicum* (Xu y cols., 2010; Han y cols., 2013), *S. mansoni* (Rumbley y cols., 2001), *Necator americanus* (Chow y cols., 2000) y *Taenia crassiceps* (Zepeda y cols., 2010). En determinadas ocasiones, se ha descrito la apoptosis de los colangiocitos inducida por *Opisthorchis viverrini*, otro trematodo hepático (Jasakul y cols., 2012). La apoptosis de otras células efectoras ha sido considerada como un mecanismo de inmunosupresión en infecciones parasitarias tanto intracelulares como extracelulares (Shin y cols., 2000; Pinheiro y cols., 2004).

Otra importante regulación de la homeostasis del sistema inmunitario es la ejercida por las células T reguladoras (Tregs). Éstas pueden suprimir la respuesta inmunitaria a antígenos propios y prevenir enfermedades autoinmunes, pero además pueden controlar la respuesta inmunitaria frente a bacterias, virus, parásitos y hongos. Esta limitación de la inmunopatología, asociada a las respuestas inmunitarias frente a patógenos, resulta beneficiosa para la supervivencia del patógeno en el hospedador (Mills, 2004; Belkaid, 2007). De esta manera, gran variedad de helmintos como *Teladorsagia circumcincta* (McNeilly y cols., 2013), *Schistosoma mansoni* (Mckee and Pearce, 2004), *Schistosoma japonicum* (Tang y cols., 2011), *Onchocerca volvulus* (Satoguina y cols., 2002), *Brugia malayi* (Babu y cols., 2006), *Heligmosomoides polygyrus* (Finney y cols., 2007) y *Trichuris muris* (Sawant y cols., 2014) inducen una expansión de células Tregs FoxP3+ que suprimen o modulan la respuesta inmunitaria del hospedador permitiendo, de este modo, la supervivencia durante largos períodos de tiempo. Algunos estudios *in vitro* han revelado que los macrófagos esplénicos vírgenes de ratón tratados con productos de excreción y secreción de *F. hepatica* (FhESP) se diferencian en macrófagos M2, sugiriendo ese control de la inmunomodulación también en este trematodo helminto.

En base a todos estos antecedentes mencionados, y ante la falta de estudios respecto a los procesos de evasión e inmunomodulación ejercidos por *F. hepatica* en los hospedadores naturales definitivos como son los pequeños rumiantes, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes **objetivos**:

1. Evaluación de la presencia y cuantificación de fenómenos apoptóticos en eosinófilos presentes en el infiltrado inflamatorio de hígados procedentes de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, tanto en las fases migratoria como biliar de la infección (**Primer trabajo**).
2. Evaluación de la presencia y cuantificación de apoptosis en las diferentes poblaciones de leucocitos localizadas en el peritoneo de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* durante la fase migratoria temprana de la infección (**Segundo trabajo**).
3. Evaluación de la presencia y distribución de linfocitos T reguladores FoxP3+ en el infiltrado inflamatorio de hígados y nódulos linfáticos hepáticos de ovejas y cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica* en estadios agudos y crónicos de la infección (**Tercer trabajo**).

RESUMEN

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* es una enfermedad económicamente muy importante en rumiantes en climas templados. *F. hepatica* ha desarrollado una amplia variedad de mecanismos para inmunomodular o suprimir la respuesta inmune del hospedador haciéndola inefectiva, esto permite la supervivencia del parásito durante años. Esto constituye un serio obstáculo para la creación de vacunas protectoras en rumiantes. El conocimiento de los mecanismos de inmunomodulación llevados a cabo por *F. hepatica* para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador es crucial para mejorar el diseño de vacunas.

En infecciones por helmintos, los eosinófilos juegan un importante papel tanto en el desarrollo de la patología como en la defensa del hospedador. La apoptosis de estas células efectoras ha sido descrita como uno de los principales mecanismos de inmunosupresión o evasión durante las infecciones por helmintos. Existen trabajos que sugieren que los productos de excreción y secreción de *F. hepatica* inducen la apoptosis de los eosinófilos y de macrófagos peritoneales *in vitro*, así en los infiltrados inflamatorios en ratas *in vivo*. El empleo de anticuerpos anti-caspasa 3 es un método fácil, reproducible y sencillo para estudiar la presencia de apoptosis. El primer objetivo de este estudio, incluido en el **Primer Trabajo** fue demostrar la existencia de este fenómeno, como método de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador en ovejas infectadas con *F. hepatica*, *in vivo*.

Veinte ovejas de 7 meses de raza Merina fueron usadas en este experimento, divididas en cuatro grupos (n=5). Los tres primeros grupos se infectaron oralmente con 200 metacercarias (mtc). El grupo 1 fue sacrificado a los 8 días post-infección (dpi); el grupo 2, a los 28 dpi, ambos para estudiar dos estadios tempranos de la infección; y el grupo 3, a las 17 semanas post-infección (spi) para el estudio de fases crónicas. El grupo 4 fue el control no infectado. El fenómeno de la apoptosis se determinó mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa en inmunohistoquímica, así como mediante un estudio ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras de hígados de las ovejas del grupo control negativo no mostraron células apoptóticas. A los 8 dpi, numerosas células inflamatorias asociadas a la periferia de los focos de necrosis resultado de la acción del parásito expresaron caspasa-3 en sus citoplasmas. La tinción de Hansel nos permitió identificar estas células como eosinófilos. El porcentaje de eosinófilos caspasa-3 positivas en torno a los focos de

necrosis fue de 46.1 y 53.9% a los 8 y 28 dpi, respectivamente. A los 17 dpi, sólo se evidenció apoptosis relacionada con grandes conductos biliares que contenían al adulto de *F. hepatica* en su interior. El estudio ultraestructural confirmó la presencia de eosinófilos apoptóticos en el infiltrado inflamatorio hepático, con cambios típicos de apoptosis como la fragmentación nuclear y la condensación periférica de la cromatina, mínima alteración de las organelas, así como la presencia de numerosos cuerpos apoptóticos envueltos por membrana celular.

En el **Segundo Trabajo** el objetivo fue el estudio de la apoptosis de los leucocitos peritoneales en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* durante la fase migratoria peritoneal en el hospedador. Fueron empleados cinco grupos, (n=5). El grupo 1 fue usado como control no infectado (control negativo), mientras que los grupos 2-5 fueron infectados oralmente con 200 mtc y sacrificados a los 1, 3, 9 y 18 dpi, respectivamente. El fenómeno de la apoptosis fue detectado mediante el empleo de tres métodos diferentes: 1) inmunocitoquímica empleando un anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa; 2) ensayo de citometría de flujo usando Anexina V-FITC/ yoduro de propidio; y 3) microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El recuento diferencial de leucocitos reveló que la mayoría de los granulocitos eran eosinófilos, los cuales aumentaban en número significativamente a los 9 y a los 18 dpi con respecto al grupo control negativo. El estudio inmunocitoquímico reveló que el porcentaje de leucocitos peritoneales caspasa-3⁺ incrementó significativamente desde los 3 dpi en adelante con respecto al grupo control. La citometría de flujo con anexina V detectó desde el 1 dpi un incremento muy significativo ($P < 0.001$) de macrófagos, linfocitos y granulocitos peritoneales en estado de apoptosis, los cuales permanecían más altos que en el control negativo hasta los 18 dpi. El estudio realizado con TEM confirmó la presencia de apoptosis en los eosinófilos peritoneales a los 18 dpi.

Los resultados recogidos en estos dos trabajos ponen de manifiesto por primera vez la presencia de apoptosis inducida por *F. hepatica* tanto en los leucocitos peritoneales durante su fase migratoria peritoneal, como durante su fase migratoria en el parénquima hepático, así como durante los estadios crónicos de la infección en ovejas *in vivo*. Además, estos resultados, sugieren la importancia de la inducción a la apoptosis para la supervivencia de las formas juveniles durante todo el estadio migratorio de la infección.

Las células T FoxP3 reguladoras actualmente tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune así como en la limitación de la inmunopatología durante las infecciones por helmintos. Hasta la fecha el papel de los linfocitos FoxP3+ no ha sido estudiado en rumiantes infectados con *F. hepatica*. El objetivo del **Tercer Trabajo** de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la presencia y distribución de linfocitos T reguladores en el hígado y en los nódulos linfáticos en ovejas y cabras infectadas con *F. hepatica* durante las fases agudas y crónicas de la infección.

Dieciocho ovejas de raza Merina de seis meses de edad y 18 cabras de raza Malagueña de similar edad fueron utilizadas. Las cabras fueron divididas en tres grupos (n=6). El grupo 1 fueron infectadas oralmente con 200 mtc y sacrificadas a los 9 días post-infección (dpi). El grupo 2 con 150 mtc y sacrificadas a las 15 semanas post-infección (spi). El grupo 3 no infectados. Las ovejas fueron divididas también en tres grupos (n=6). El grupo 4 infectadas con 200 mtc y sacrificadas a los 9 dpi. El grupo 5 con 150 mtc y sacrificadas a las 15 spi. Grupo 6 se utilizó como control no infectado. Se realizó un estudio histopatológico e inmunohistoquímico de cortes histológicos seriados separados 4 µm tanto de los hígados como de los nódulos linfáticos utilizando para ello un anticuerpo policlonal anti-CD3 en el primer corte y uno monoclonal anti-FoxP3 en el inmediatamente siguiente. Se realizó un recuento posterior de las células CD3+ y FoxP3+ tanto en infiltrado hepático como en nódulos linfáticos.

En las lesiones agudas hepáticas (9 dpi) se evidenció un incremento del número de CD3+ y FoxP3+ en ambas especies, lo que sugiere que los linfocitos T reguladores podrían tener un papel importante en la modulación de la respuesta inmune local que podría contribuir en la supervivencia de *F. hepatica* durante la fase migratoria. En nódulos linfáticos en fases agudas, solamente se vio un incremento de FoxP3 en cabras, mientras que los CD3+ aumentaron en ambas especies. A los 15 spi, este incremento de FoxP3+ se evidenció en ambas especies en nódulos linfáticos, aumentando además a nivel hepático, fundamentalmente alrededor de los grandes conductos biliares y granulomas, sugiriendo que FoxP3+ permite la supervivencia de adultos de *F. hepatica* y modula la respuesta para limitar el daño hepático. Este es el primer trabajo que describe la distribución de FoxP3+ en fases agudas y en crónicas de la infección en pequeños rumiantes y relaciona esta distribución con la supervivencia del parásito en el hospedador.

ABSTRACT

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* is an economically important disease of ruminants in temperate climates. *F. hepatica* has developed a variety of mechanisms to modulate or suppress the host response making it ineffective, which allows the parasite to survive in the host for years. The parasite host immune response modulation is a serious obstacle for developing protective vaccines for ruminants. The knowledge of the immunomodulation mechanisms carried out by *F. hepatica* to avoid the host immune response is a key to improve the vaccines development.

In helminth infections, eosinophils play important roles both in developing tissue pathology and in the host effector response. Apoptosis of effector cells such as eosinophils and macrophages may play a role in the host immune evasion/suppression induced by helminth infection. Studies in the rat model have demonstrated that secreted excretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to induce apoptosis in eosinophils and peritoneal macrophages *-in vitro-* and in the inflammatory infiltrate *- in vivo-*, suggesting that apoptosis of effector cells may play a role in the host immune evasion/suppression induced by *F. hepatica* infection. The use of activated caspase 3 antibodies is an easy, reliable and sensitive method to study the presence of apoptosis in tissue sections. The aim of this study, included in the **First Work** of this Thesis was to identify and quantify apoptosis of eosinophils in the hepatic inflammatory infiltrates of sheep challenged with *F. hepatica* during the migratory and biliary stages of infection.

Twenty 7-month-old female Merino-breed sheep were used for this study. The sheep were allocated into four groups of five animals each: groups 1, 2 and 3 were orally infected with one dose of 200 metacercariae (Ridgeway Research Ltd., Gloucestershire, UK); group 4 was used as the uninfected negative control. Animals were sacrificed by intravenous injection of thiobarbital at different stages of infection. Groups 1 and 2 were sacrificed at 8 and 28 days post-infection (dpi) to study the migratory stage of infection. The animals of group 3 were sacrificed at 17 weeks post-infection (wpi) to study the biliary stage of infection. Apoptosis was detected using two different methods: immunohistochemistry (IHC) with a polyclonal antibody anti-active caspase- an ultrastructural study with transmission electron microscopy (TEM).

Livers from group 4 showed no histopathological changes. At 8 dpi, numerous inflammatory cells located at the periphery of necrotic foci, as well as cell debris (apoptotic bodies), expressed caspase-3. The pattern of immunostaining was both

cytoplasmic and nuclear. Serial sections stained with Hansel's technique allowed us to identify eosinophils. The percentage of caspase-3+ eosinophils with respect to caspase-3- eosinophils at the periphery of necrotic foci was 46.1% and 53.9% at 8 and 28 dpi, respectively. At 17 wpi, eosinophils located the inflammatory infiltrate surrounding some hyperplastic bile ducts, often containing adult flukes, showed numerous caspase-3+ cells. The TEM study confirmed apoptosis in eosinophils in livers from groups 1 and 2. The ultrastructural study confirm the eosinophil apoptosis in the inflammatory infiltrate. Apoptotic TEM changes consisted of margination-condensation of chromatin (early changes) and cytoplasmic and nuclear fragmentation while maintaining cell membranes and organelles, and the presence of several apoptotic bodies. The high percentage of apoptotic eosinophils during the migratory stage of infection

The aim of the **Second Work** was to evaluate the presence and number of inflammatory peritoneal leucocytes undergoing apoptosis in peritoneal fluid from sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the peritoneal migratory stages in the host. Twenty five- merino sheep were used. They were divided into five groups (n=5): Group 1 was used as an uninfected control group (UC) and groups 2-5 were orally infected with one dose of 200 *F. hepatica* metacercariae and sheep from these groups were sacrificed by an intravenous injection of thiobarbital at 1, 3, 9, and 18 dpi, respectively. Apoptosis was detected using three different methods: 1) immunocytochemistry (ICC) with a polyclonal antibody anti-active caspase-3; 2) Flow cytometry assay using the Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) kit; and 3) transmission electron microscopy (TEM).

A differential peritoneal leucocyte count during the course of *F. hepatica* infection showed that the most of granulocytes were eosinophils, which increase their number at 9 and 18 dpi compared with the uninfected control group. The immunocytochemical study revealed an increase of caspase-3+ leucocytes from 3 dpi onwards with respect to uninfected control group. The Annexin V assay with flow cytometry detected significant increase ($P < 0,001$) of peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes in apoptosis from 1 dpi onwards, which were higher than negative control until 18 dpi. The TEM study confirmed apoptosis in peritoneal eosinophils from 18 dpi.

All these results from the First and Second Work are the first descriptions of apoptosis induced by *F. hepatica* in both peritoneal leucocytes during the peritoneal migratory

stage, and eosinophils from the inflammatory infiltrate during the migratory stage in the hepatic parenchyma, as well as, during the chronic stages of infection in sheep *in vivo*. These results suggest that apoptosis of eosinophils, macrophages and lymphocytes induced by *F. hepatica* may play an important role as a mechanism of modulation of the host immune response, facilitating the parasite survival during the migratory and biliary stages of infection.

Foxp3⁺ regulatory T cells represent a lymphocyte subset with an important role in the maintenance of immune system homeostasis and they have a crucial role in immune responses by limiting immunopathology associated with anti-pathogen immune responses- including helminth infections-, but they can also be beneficial to the pathogen through subversion of the host protective immune response. To date, the distribution and role of Foxp3⁺ Tregs has not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants, although it has been suggested that they may play a role in immunomodulation caused by *F. hepatica*. The aim of the **Third Work** of this Thesis was to evaluate the presence of Foxp3⁺ Tregs in liver and hepatic lymph nodes (HLN) from experimentally infected sheep and goats during acute and chronic stages of infection.

Eighteen six-month-old male Malagueña goats and 18 six-month-old Merino sheep were used in this study. Goats were allocated into three groups (n=6). Group 1 was orally infected with 200 mtc and sacrificed at 9 dpi. Group 2 infected with 150 mtc and sacrificed at 15 wpi. Group 3 was used as uninfected control. Sheep were allocated also into three groups (n=6). Group 4 was orally infected with 200 mtc and sacrificed at 9 dpi. Animals from group 5 were infected with 150 mtc and sacrificed at 19 wpi. Pathological and immunohistochemical studies were carried out on 4- μ m serial sections using a polyclonal anti-CD3 and monoclonal anti-Foxp3 antibodies. All the CD3⁺ and Foxp3⁺ cells were count in serial sections of both hepatic inflammatory infiltrate and in hepatic lymph nodes HLN from sheep and goats.

At 9 dpi, a significant increase of CD3⁺ and Foxp3⁺ regulatory T cells was found in the hepatic inflammatory infiltrated of both goats and sheep. These results suggest that Foxp3 regulatory T cells could have an important role in the modulation of local immune response allowing the survival of *F. hepatica* during the migratory stage of infection in sheep and goats. The HLN from acute stages only showed an increase of

Foxp3⁺ in goats while the CD3⁺ cells were higher in both species compare with negative control. At 15-19 wpi, the Foxp3⁺ regulatory T cells increase in both species in HLN, rising also their number in the hepatic parenchyma, mainly around large biliar ducts and granulomas, suggesting that FoxP3⁺ cells allow the survival of adult of *F. hepatica* and modulate the immune response to limit the hepatic damage. In conclusion, the results of the third work are the first report describing the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells in acute and chronic hepatic lesions and HLN of *F. hepatica* infected goats and sheep. The expansion of regulatory T cells in acute and chronic hepatic lesions may be involved in parasite survival as well as in minimising tissue pathology.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- ETIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) es un helminto hermafrodita que se clasifica dentro del phylum Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea, orden Equinostomiformes y familia Fasciolidae. Con una foliácea y aplanada dorso-ventralmente (Figura 1) y mide entre 18 y 51 mm de largo y de 4 a 13 mm de ancho. Este helminto presenta una coloración parda grisácea y su parte anterior forma una prominencia cónica a partir de la cual el cuerpo se ensancha para formar los denominados “hombros”. Posee dos ventosas próximas entre sí, una ventral de mayor tamaño y otra oral. El parásito está dotado de un tegumento con espinas dirigidas caudalmente, cuya función es tanto mantener la posición en el interior de los conductos biliares como erosionar el parénquima hepático y los vasos sanguíneos (Bennett, 1975). Las formas adultas de este parásito se localizan en los conductos biliares mayores y vesícula biliar de gran cantidad de especies, aunque se consideran más susceptibles los rumiantes, principalmente ovinos (Manga y cols., 1990; Konopka, 1993; Mitchell, 1995), caprinos (Khallaayoune y cols., 1991) y bovinos (González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995). Con respecto a la receptividad de los hospedadores definitivos es variable, estableciéndose una clasificación de los mismos en tres grupos. En el primer grupo, se incluyen aquellos hospedadores que reaccionan rápidamente frente al parásito, evitando su desarrollo; el segundo grupo, incluye los que reacciona con retraso ante la invasión parasitaria ya implantada; y, en último lugar, los mamíferos más susceptibles, en los que existe una alta productividad parasitaria y una marcada patogenicidad (oveja, cabra y conejo).

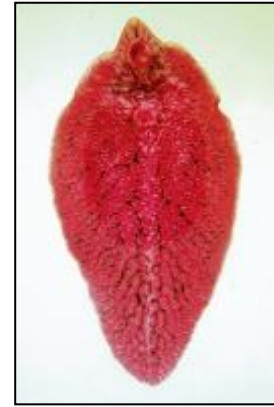


Fig. 1.- Ejemplar adulto de *Fasciola hepatica*. Imagen extraída de Mas-Coma y cols. 2014.

La fasciolosis causada por *F. hepatica* (Andrews, 1999) es considerada una de las enfermedades parasitarias de mayor repercusión sanitaria y económica en la ganadería de rumiantes de todas las regiones templadas del planeta. Se han estimado las pérdidas anuales causadas por este proceso en más de 3,000 millones de dólares a nivel mundial, afectando principalmente a la ganadería de bovino y ovino (Spithill y cols., 1999; Mas-Coma y cols., 2005; Piedrafita y cols., 2010; Toet y cols., 2014).

En España, se ha descrito parasitación por *F. hepatica* en ovejas, cabras, vacas, gamos, cerdos, jabalíes, asnos, caballos, conejos, liebres y, también, en la especie humana, conformándose este proceso como una enfermedad zoonótica (Rojo-Vázquez y Ferre, 1999). La prevalencia de la enfermedad, en nuestro país, es muy variable dependiendo de la región, debido a distintos factores que influyen directamente en el ciclo biológico del parásito. Un factor que resulta decisivo es la humedad, en Galicia, por ejemplo, se describe una prevalencia en ovejas del 83%, con un porcentaje de fasciolosis activa del 59,5% (Paz-Silva y cols., 2003), mientras que, en áreas mucho más secas de Andalucía como Córdoba y Granada, tan sólo se detectó un 3% de fasciolosis caprina en los animales testados (Martínez Moreno y cols., 1996).

Durante los últimos años se ha venido observando un progresivo aumento en la prevalencia de la fasciolosis en Europa, probablemente debido al desarrollo de resistencia frente a fármacos antihelmínticos (Fairweather, 2011; Fox y cols., 2011; Dalton y cols., 2013), aunque también puede ser debido a factores climatológicos debido a inviernos más cálidos que permiten la actividad del hospedador intermediario (*Galba truncatula*) durante más tiempo (Fox y cols., 2011) y la presencia a su vez del estadio infectante del parásito (metacercaria) (Charlier y cols., 2014a).

Se trata, además, de una zoonosis creciente habiéndose estimado que existen entre 2,7 y 17 millones de personas afectadas con 180 millones de personas en riesgo, siendo especialmente alta la prevalencia en la zona de los Andes (Bolivia, Perú y Ecuador); encontrándose una prevalencia más baja en zonas de Egipto, sureste de Asia e Irán (Mas Coma y cols., 2005; McManus y Dalton, 2006; Mas Coma y cols. 2009; González y cols., 2011; Molina-Hernández y cols., 2015). En estos casos, se adquiere la infección mediante la ingesta de agua o vegetales contaminados con metacercarias de *F. hepatica*. Sin embargo, altas prevalencias en humanos no parecen estar correlacionadas con altas prevalencias en el ganado (Mas-Coma y cols., 2014). Los casos de zoonosis en España parecen estar infravalorados y, fundamentalmente, confinados al norte del país (Sorribes y cols., 1990), con casos importados y autóctonos recientes (Turrientes y cols., 2004).

2.- CICLO BIOLÓGICO.

Se ha de tener en cuenta que este parásito presenta un ciclo biológico indirecto (Fig. 2) con un marcado estenoxenismo en cuanto a su hospedador intermediario, requiriendo moluscos del género *Galba* (anteriormente conocido como género *Lymnaea*) para completar su ciclo. Específicamente la especie *Galba truncatula* (previamente *Lymnaea truncatula*) se considera el principal hospedador intermediario (Fig. 3a). Este caracol muestra una amplia distribución geográfica, si bien suele encontrarse en zonas húmedas y encharcadas. El ciclo biológico de *F. hepática* completo engloba unas 14 a 23 semanas (Mas Coma y cols., 2003) y consiste en cinco fases que engloban:

- 1.- Salida de los huevos del hospedador definitivo al medio ambiente y su posterior desarrollo.
- 2.-Eclósión de los miracidios y su búsqueda activa de un hospedador intermediario, generalmente un molusco gasterópodo, *Galba truncatula*.
- 3.- Desarrollo y multiplicación de los miracidios dentro del hospedador intermediario.
- 4.- Salida de la cercaria del hospedador intermediario y su enquistamiento.
- 5.- Ingestión de las formas infectivas (metacercarias, Fig. 3b) por parte de los hospedadores definitivos y el desarrollo de las formas adultas.

En los hospedadores definitivos infectados por adultos de *F. hepatica*, el parásito adulto, tras 7-8 semanas de migración por el parénquima hepático, alcanzará los conductos biliares y la vesícula biliar. Allí, puede llegar a producir de 20000-24000 huevos (Boray, 1969). Desde esta localización eliminan huevos no embrionados al ambiente, los cuales completarán su desarrollo en el exterior. Estos huevos pasan de la vesícula biliar al intestino mezclados con la bilis y salen al exterior con las heces (Graczyk y Fried, 1999; Rojo-Vázquez y Ferre, 1999).

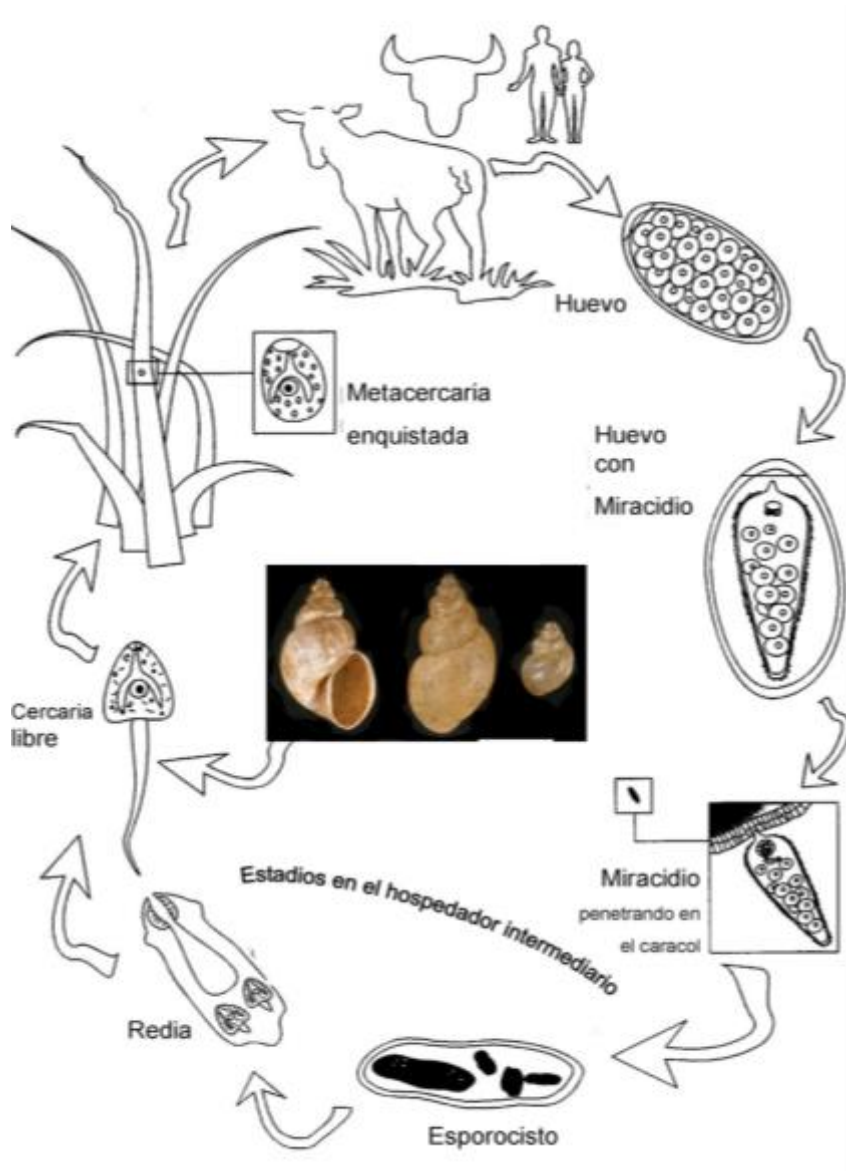


Fig. 2.- Esquema del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Extraído desde J.P. Dalton. Fasciolosis. CABI Publishing. 1999.

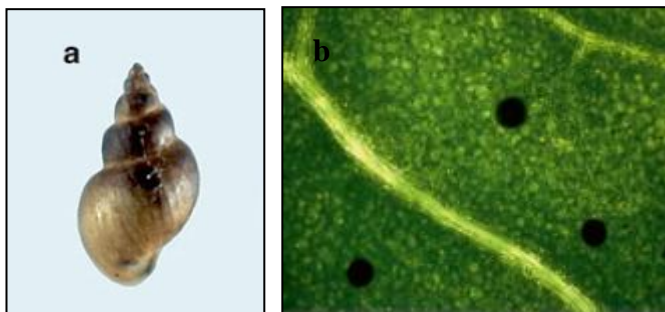


Figura 3a- Espécimen del principal hospedador intermediario: *Galba truncatula* de Europa. **Figura 3b.-** Metacercarias enquistadas en la superficie de una hoja de crecimiento en zonas acuosas. Ambas imágenes son extraídas de Mas-Coma y cols. 2014.

Los huevos son ovoides y operculados con un tamaño de 130 a 150 μm de largo por 60 a 90 μm de ancho y pueden permanecer viables en las heces entre 3 semanas y varios meses, dependiendo de las condiciones ambientales y de la época del año, lo que supone una importante repercusión en la prevalencia de la enfermedad en las zonas de climas propicios. La viabilidad del huevo es mayor en invierno que en verano (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960).

Tras un periodo de maduración y activación a temperatura ambiente y a la luz, los huevos eclosionan un miracidio, el cual se introduce en el hospedador intermediario. La entrada en el hospedador intermediario se produce a través del epitelio columnar del pulmón del caracol y, al penetrar en el molusco, los miracidios pierden los cilios y se transforman en los denominados esporocistos (Hope-Cawdery y cols., 1978; Boch y Supperer, 1986). Los esporocistos se dirigen hacia el hepatopáncreas del molusco y en su interior se forma el siguiente estado larvario, llamado redia, que posee una ventosa y un tubo digestivo primitivo y se alimenta de los tejidos del caracol. Si las condiciones ambientales son adecuadas, las redias evolucionan dando lugar al siguiente estadio larvario, la cercaria. Sin embargo, si no lo son, se puede producir una segunda generación de redias a partir de las anteriores. Se considera que de un solo miracidio se pueden generar hasta un total de 600 cercarias.

La cercaria, una vez que ha madurado, sale de la redia y del hospedador intermediario hacia el exterior, donde pasa unas horas nadando en el agua. A continuación, busca una planta cercana y se mueve hacia las hojas de ésta, allí se deposita sobre la vegetación y se enquistada, rodeándose por una cubierta resistente y dando lugar a la metacercaria, forma infectante para los hospedadores definitivos (Andrews, 1999).

Aunque numerosos estudios afirman que las metacercarias pueden sobrevivir más de un año en los pastos, es muy probable que su viabilidad y, por lo tanto, su poder de infección no dure tanto tiempo, dependiendo de factores como la temperatura y humedad (Soulsby, 1965).

Normalmente, la infección en los rumiantes tiene lugar durante el pastoreo, durante la estabulación, con el agua de bebida o al administrar henos y ensilados mal realizados. No todas las metacercarias ingeridas se implantarán en el hígado, pudiendo perderse en la migración intraorgánica o eliminarse por las heces. La tasa de implantación media de

las metacercarias de *F. hepatica* se encuentra aproximadamente en el 40% (Rojo-Vázquez y Ferre, 1999).

El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en el interior del hospedador definitivo en dos fases: la primera o de activación, acontece en el rumen y se inicia gracias a la alta concentración de dióxido de carbono, el ambiente reductor y la temperatura, cercana a los 39°C; la segunda o de emergencia, ocurre en el intestino delgado, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es desencadenada por la bilis y por el propio parásito (Dixon, 1966; Smith y Clegg, 1981; Sukhdeo y Mettrick, 1987).

Una vez libres las denominadas formas juveniles recientemente desenquistadas (en inglés *Newly Excysted Juveniles* o NEJs), éstas atraviesan la pared intestinal y se dirigen al peritoneo, desde donde pueden colonizar cualquier tejido cercano, como los nódulos linfáticos locales, aunque lo más normal es que penetren dentro del hígado. Es posible que esta predilección por el tejido hepático sea debida a la proximidad anatómica y se produzca de forma aleatoria (Sukhdeo y Mettrick, 1986, 1987).

3.- PATOGENIA

La patogenia de la fasciolosis fue descrita detalladamente durante los años 60 y 70 por distintos autores (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Sinclair, 1967, 1968, 1970; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977).

Las importantes pérdidas que la fasciolosis causa en ganado ovino en numerosas regiones geográficas, han motivado que la patología de la fasciolosis ovina debido a *F. hepatica* haya sido ampliamente estudiada (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977). Sin embargo, en el caso del ganado caprino dichos estudios son más limitados y recientes (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999; Zafra y cols., 2013).

El periodo de incubación incluye desde la ingestión de las metacercarias hasta la aparición de los primeros síntomas. La maduración y crecimiento de los parásitos

envuelve un periodo de 12-16 semanas periodo durante el cual *F. hepatica* viaja entre y dentro de los órganos, principalmente a través del peritoneo e hígado (Behm y Sangster, 1999). Debido a que una sola larva puede pasar varias veces por la misma zona del parénquima hepático durante la migración, es posible encontrar lesiones agudas y lesiones más organizadas en la misma sección del tejido.

A.- Estadio prehepático:

Se inicia sobre 72 horas tras haber sido ingeridas las metacercarias. En este momento, ya es posible encontrar formas parasitarias juveniles en la cavidad abdominal, después de haber atravesado la pared intestinal (Kendall y Parfitt, 1962). Esta fase suele ser asintomática. Ocasionalmente, *F. hepatica* puede migrar a otros órganos distintos al hígado, por ejemplo, al pulmón, provocando neumonía y pleuritis fibrosa (Boray, 1969). Durante este periodo, las formas juveniles del parásito van a interactuar con los leucocitos peritoneales de diferentes formas. Existen estudios que demuestran que 4 horas después de la inyección intraperitoneal en ratas de juveniles recién desenquistados, provocan un considerable incremento de eosinófilos rodeando al parásito y llegando incluso a provocar su muerte (Duffus y Franks, 1980a).

B.- Estadio hepático: Los parásitos comienzan a llegar al hígado a las 90 horas post-infección (pi). Normalmente, los lóbulos hepáticos que están más próximos al intestino delgado (lóbulo izquierdo, en el caso de pequeños rumiantes, o lóbulo ventral, en otras especies) suelen ser los más afectados, produciéndose una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967). Dentro de esta fase, a su vez, se diferencian dos periodos:

- Fase parenquimatosa: Se produce la migración de las formas larvarias del parásito a través del parénquima hepático.
- Fase biliar: En la cual las formas adultas alcanzan los conductos biliares y vesícula biliar.

Algunas especies, como la oveja (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977), el conejo (Urquhart, 1956) o el ratón (Dawes, 1961, 1963a, b), son bastante permisivas a la infección y la fase biliar es muy frecuente. En otras, sin embargo, como la humana (Chen y Mott, 1990), sobreviven pocos parásitos a la fase migratoria y su presencia en conductos biliares es menos frecuente.

El daño hepático causado por la migración del parásito y la intensidad del proceso patológico está en función de la dosis infectante y de la pauta de reinfección, pudiendo diferenciarse entre procesos agudos de alta mortalidad o, lo que es más frecuente, procesos crónicos con marcada repercusión en las producciones cárnica, láctea y lanar, así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Behm y Sangster, 1999; Mulcahy y cols., 1999; Maqbool y cols., 2000; Schweizer y cols., 2005).

En el caso de la oveja (Pérez y cols., 2002) y cabra (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999), se ha demostrado que infecciones con dosis pequeñas y repetidas (de manera similar a las que se producen de forma natural) inducen lesiones hepáticas más severas que una única dosis infectante, aún cuando el número de metacercarias totales administradas sea el mismo. Estos resultados sugieren que, en la oveja y la cabra, la respuesta inmunitaria local puede contribuir al daño hepático durante la fase migratoria. Se ha de tener en cuenta, al menos en pequeños rumiantes, la relación inversa existente entre la dosis infectante y la tasa de implantación de la misma (Kendall y Parfitt, 1962), lo cual podría explicarse por fenómenos de competencia biológica entre las larvas juveniles o por el hecho de que a mayor dosis infectante, más exacerbada es la reacción inmunitaria del hospedador (Boray y cols., 1967).

Por otra parte, el crecimiento de las formas inmaduras durante la migración hepática hace que aumenten de tamaño, provocando un incremento de las lesiones y de la respuesta inflamatoria inducida (Behm y Sangster, 1999). Sin embargo, se ha descrito que el daño hepático causado por el parásito durante la fase migratoria se debe, principalmente, a la acción mecánica causada por las espinas y la ventosa oral. Aún así, es difícil evaluar el grado de importancia de las espinas sobre el daño hepático y si su ausencia disminuiría o no la irritación en conductos biliares (Behm y Sangster, 1999).

En cuanto a la ventosa oral, es la vía a través de la cual *F. hepatica* obtiene la mayoría de los nutrientes. Mediante esta ventosa, los parásitos jóvenes perforan y destruyen los hepatocitos, aspiran los restos celulares hasta la faringe y los ingieren, lo que implica un considerable daño tisular (Dawes y Hughes, 1964). Otro mecanismo que contribuye al daño tisular serían los denominados productos de excreción-secreción (FhESP) tóxicos liberados por el parásito, entre los cuales se han aislado diversas proteasas que

ayudarían al parásito a digerir los tejidos adyacentes al mismo, facilitando la formación de los trayectos migratorios. Estos productos tóxicos también producen necrosis de los hepatocitos (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996) y son capaces de producir una disminución en su capacidad metabólica, especialmente de las enzimas microsomiales (Lenton y cols., 1996).

3.1.- Lesiones

Normalmente, las lesiones más evidentes en la fasciolosis se producen a nivel de hígado y nódulos linfáticos locales. El tránsito de las formas juveniles del parásito no produce reacciones evidentes en la pared intestinal ni en la cavidad abdominal, excepto pequeños focos hemorrágicos en peritoneo, donde el parásito queda temporalmente adherido (Kelly, 1993).

Las lesiones producidas en el hígado por *F. hepatica* se clasifican en dos grupos dependiendo de la fase evolutiva en la que se encuentre el proceso; el primero, coincide con la fase parenquimatosa o migratoria, mientras que el segundo, se corresponde con la localización biliar de los parásitos adultos (Dow y cols., 1968).

3.1.1.- Fase parenquimatosa:

3.1.1.1.- Lesiones macroscópicas

Durante esta fase, se produce una gran variedad de lesiones, principalmente de tipo traumático, aunque existe un componente de necrosis por coagulación relacionado posiblemente con algunos productos de excreción tóxicos (FhESP) eliminados por el parásito (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996).

El tiempo de llegada de las larvas a la cápsula hepática depende de la especie hospedadora y de la virulencia de la cepa parasitaria, entre otros factores. Sinclair y cols. (1967) determinaron que en ovino se producía a las 90 horas pi. Sin embargo, en ensayos experimentales se ha visto la llegada a las 48 horas. Bajo la cápsula hepática, se pueden comenzar a localizar numerosas fasciolas juveniles a partir de los 10 días post-infección (dpi) durante una primoinfección. Sin embargo, en las reinfecciones, la llegada del parásito es más temprana, debido posiblemente a que se produce una migración más rápida (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

En la 1ª semana post-infección (spi), ya se puede observar una moderada congestión del lóbulo izquierdo del hígado, observándose a los 7 dpi focos hemorrágicos (Zafra et al., 2013a, 2013b), y a los 9 dpi ya se observan los primeros trayectos parasitarios, los cuales presentan un aspecto blanquecino, miden entre 0,5 y 2 mm de ancho y de 5 a 15 mm de largo, son tortuosos y se localizan principalmente en la superficie diafragmática del hígado, bajo la cápsula de Glisson (Zafra et al., 2013a, 2013b). A partir de la 3ª spi, los trayectos adquieren una tonalidad amarillenta, presentan bordes blancos y hacen prominencia sobre la superficie hepática. A veces, pueden aparecer áreas hemorrágicas entre varios trayectos cercanos. En la 6ª spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, se hacen más anchos (2-3 mm) y están llenos de sangre, lo que les confiere un matiz rojo oscuro. Es común observar placas hemorrágicas de mayor tamaño (hasta 1 cm.) en la superficie visceral del lóbulo izquierdo. A la 8ª spi, la mayoría de los trayectos ya no presentan convexidad, debido principalmente a la pérdida de su contenido; por otro lado, la superficie rugosa de la cápsula hepática favorece la aparición de adherencias fibrinosas con órganos adyacentes (Sinclair, 1967, Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Las lesiones descritas anteriormente pueden sufrir modificaciones según la carga parasitaria que reciban los animales. Según Ross y cols. (1967), se pueden distinguir infecciones severas (más de 5.000 metacercarias ingeridas) e infecciones moderadas (entre 700 y 1.000 metacercarias ingeridas), tomando como animal de referencia la oveja.

Normalmente, la mayoría de los parásitos alcanzan los conductos biliares, pero algunos de ellos pueden quedar enquistados en el parénquima hepático. Estos quistes están constituidos por un contenido oscuro formado por sangre, detritus y excrementos de *F. hepatica*, que con el paso del tiempo será rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo. Finalmente, se convertirán en quistes caseosos, que pueden mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Kelly, 1993). Concretamente, en el caso de las cabras, se ha descrito que las principales lesiones hepáticas son la perihepatitis fibrosa y abundantes trayectos tortuosos, más severos en animales reinfectados que en los infectados por una sola dosis, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez y cols., 1998).

3.1.1.2.- Lesiones microscópicas

Entre la 1ª y la 3ª spi, la migración de las formas inmaduras de *F. hepatica* da lugar a túneles que contienen detritus celulares y sangre; aún así, las hemorragias suelen ser discretas, salvo las que se originan a nivel subcapsular (Dow y cols., 1968). Los túneles, en esta fase, se hallan ocupados por necrosis, detritus celulares y eosinófilos y todo ello está rodeado por hepatocitos degenerados infiltrados por eosinófilos y macrófagos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993; Zafra et al., 2013a, 2013b). En los trayectos más antiguos, el infiltrado de eosinófilos es denso en la periferia, mientras que la zona central está ocupada por una masa de detritus celulares embebidos dentro de una matriz amorfa eosinofílica. Posteriormente, esta zona central se retrae y el infiltrado de eosinófilos disminuye, aumentando el número de macrófagos y también existe un pequeño número de linfocitos y fibroblastos (Dow y cols., 1968). Durante esta fase, los parásitos frecuentemente atraviesan los vasos sanguíneos provocando flebitis, y en el caso de las venas hepáticas, trombosis. Por el contrario, en los espacios porta cercanos a los trayectos, se establece un infiltrado inflamatorio, así como edema, que puede llegar a estenotar o incluso colapsar las venas portales (Dow y cols., 1968; BVA's TDC, 1974; Rushton y Murray, 1977). Otra lesión característica de las infecciones primarias agudas en la fasciolosis es la aparición de microabscesos en el parénquima hepático. La cicatrización de los trayectos parasitarios se completa entre la 12ª y 16ª spi, momento en el que la lesión es reemplazada por tejido fibroso (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977). En cabra y oveja, los trayectos que han originado abundantes detritus celulares pueden tardar varias semanas más en ser reabsorbidos, permaneciendo con un centro necrótico acidófilo constituido por detritus celulares rodeados por células gigantes multinucleadas y células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y fibrosis periférica (Pérez y cols., 1999, 2003).

3.1.2.- Fase biliar

3.1.2.1.- Lesiones macroscópicas

Aunque es posible observar parásitos de forma aislada en conductos biliares a la 4ª spi, lo normal es que la fase biliar se establezca a partir de la 12ª spi (Rushton y Murray, 1977). A partir de este momento, los principales conductos biliares van a estar dilatados y sus paredes engrosadas debido a la carga parasitaria, por lo cual harán prominencia sobre la cara visceral del hígado, especialmente los conductos terminales, tanto por su expansión como por la pérdida de parénquima hepático que los recubre (Ross y cols.,

1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993; Pérez y cols., 1999, 2003). En las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es una fibrosis periportal, acompañada de proliferación y engrosamiento de los conductos biliares, que da un aspecto de pseudolobulillos a la superficie hepática (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 1999).

3.1.2.2.- Lesiones microscópicas

El hallazgo microscópico más característico de la fase biliar es la hiperplasia epitelial que tiene lugar en los conductos biliares (Sinclair, 1967; Rushton y Murray, 1977). Es frecuente que se produzca necrosis de la mucosa de los conductos que contienen parásitos, pudiendo extenderse en ocasiones a otras capas más profundas (Sinclair, 1967).

Según Meeusen y cols. (1995), en las infecciones primarias crónicas la lesión más llamativa es la fibrosis periportal, acompañada de proliferación de los conductos biliares e infiltrado linfoplasmocitario. Estas lesiones implican pérdida de parénquima hepático y la consiguiente alteración de la arquitectura normal del órgano.

En los conductos biliares de menor tamaño también se observa un engrosamiento fibroso de la pared, aunque la hiperplasia de las células mucosas es más rara. Muchos de estos pequeños ductos están llenos de huevos del parásito. Los huevos de *F hepatica* se observan por primera vez en los conductos de mayor tamaño a las 12 spi, pero en la 20 spi ya aparecen en otros conductos mucho menores, algunos de ellos de localización periférica, en los que no se localizan parásitos adultos (Dow y cols., 1968). La ruptura de la pared de estos conductos biliares y de vasos sanguíneos asociados es un hecho común y, frecuentemente, va asociado a la aparición de infartos (Ross y cols., 1967).

En la especie caprina, particularmente tras infecciones repetitivas, se han descrito lesiones en hepatocitos consistentes en dilatación de retículo endoplasmático liso (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999), dado que esta organela cumple importantes funciones en el metabolismo y detoxificación de numerosos tóxicos. Esta lesión podría estar originada por los productos de excreción secretados por el parásito (FhESP).

3.2.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos

Los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) de animales infectados de manera natural o experimental con *F. hepatica* suelen mostrar un severo aumento de tamaño (Chauvin y cols., 1995). En el caso de infecciones severas, la médula aparece enrojecida al corte (Zafra y cols., 2008).

Microscópicamente, este aumento del tamaño del nódulo se suele deber a la hiperplasia de los folículos linfoides y cordones medulares, la cual oscila entre moderada y severa. También puede aparecer a veces, aunque en menor medida, una discreta hiperplasia de las áreas paracorticales. En cuanto a la coloración medular, observada macroscópicamente, se debe a focos hemorrágicos (agudos o crónicos) que se asocian con la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina. Con menor frecuencia, puede aparecer un leve infiltrado de eosinófilos en cordones medulares y áreas paracorticales (Zafra y cols., 2008). Igualmente, se comprueba que durante la fasciolosis se produce un aumento en la ratio linfocitos T CD4/CD8 (Meeusen y cols., 1995).

4.- RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *Fasciola hepatica*

4.1.- Introducción

El sistema inmunitario de los animales ha evolucionado para proporcionar una defensa eficaz contra un amplio rango de organismos infecciosos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Los mecanismos de defensa se pueden dividir en dos sistemas distintos:

- Inmunidad natural o innata: este tipo de inmunidad no requiere un contacto previo con el agente invasor para desarrollarse, es una respuesta rápida y de amplio espectro y se encuentra mediada por el sistema del complemento, macrófagos y otras células defensivas no específicas como las células “*natural killer*” (NK) y las células dendríticas. Este tipo de inmunidad es fundamental para el reconocimiento precoz de los microorganismos y actúa como eslabón

previo para el posterior desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida, la cual a su vez modula y dirige al sistema inmunitario innato (Roitt, 2001).

- ***Inmunidad adquirida***: Es más lenta pero mucho más específica; está mediada por linfocitos T y linfocitos B, que a su vez actúan sobre varios elementos del sistema inmune (Roitt, 2001).

4.2.- Respuesta inmunitaria natural

Las barreras fisiológicas naturales como la piel, mucosas, ácidos gástricos, temperatura corporal, etc., conforman un primer eslabón defensivo frente a la infección por algunos agentes; pero, generalmente, son poco eficaces en infecciones por helmintos. De hecho, los jugos gástricos, más que destruir las metacercarias de *F. hepatica*, ayudan en el proceso de desenquistamiento (Dalton y Brindley, 1997).

Si el patógeno consigue superar estas primeras barreras fisiológicas, el sistema inmune innato desarrolla una respuesta basada en dos eventos: la liberación de sustancias bactericidas ó citocidas, que son capaces por sí mismas de destruir el agente; y el proceso de fagocitosis.

Como ejemplo del primer mecanismo defensivo dentro de la respuesta inmunitaria innata cabría destacar la acción del sistema del complemento. Este sistema está formado por una veintena de proteínas plasmáticas que actúan como una cascada enzimática y su activación resulta en una serie de productos capaces de lisar el agente invasor por ataque directo, formando poros en sus membranas (Roitt y cols., 2001). Además, la activación del sistema del complemento induce una respuesta inflamatoria y provoca la opsonización del agente, permitiendo su posterior fagocitosis por granulocitos y macrófagos (Mulcahy y cols., 1999).

Algunos tipos celulares del sistema inmunitario innato también reconocen las estructuras de carbohidratos de los microorganismos gracias a sus receptores de superficie, siendo capaces de destruir directamente al agente sin necesidad de una respuesta más elaborada y tardía. Además, la estimulación de dichos receptores induce a

los macrófagos a sintetizar citoquinas que, subsecuentemente, estimulan el crecimiento de los linfocitos e inducen una respuesta inmunitaria específica.

El reconocimiento inicial de las metacercarias y de los NEJs tiene lugar dentro del tracto intestinal y con una activación de la mucosa epitelial muy importante. Existen actualmente numerosos estudios enfocados en el reconocimiento de los NEJs, así autores como García-Campos y cols. en 2016, estudiaron el reconocimiento de los residuos de proteínas y carbohidratos glicosilados que se comportan como antígenos tegumentales (Teg) e inducen la proliferación de células T mediante la activación de células dendríticas (DC) (Aldridge y O'Neill, 2016). Mientras que el reconocimiento de la invasión de estos NEJs se encuentra actualmente bajo investigación, tenemos la certeza de *F. hepatica* tiene una influencia importantísima en un amplio rango de células efectoras de la inmunidad innata.

Las células dendríticas (que mayoritariamente residen en tejidos linfoides) poseen receptores similares a los de los macrófagos y pueden reconocer e interiorizar glicoconjugados de microorganismos, provocando una respuesta inmediata frente a estos agentes. Uno de los mecanismos clave que actualmente se considera muy relevante, es el hecho de que las DC sean diana de numerosas fracciones antigénicas y de proteínas específicas de parásitos capaces de modular el fenotipo de las DC suprimiendo su maduración (Hamilton y cols., 2009; Dowling y cols., 2010) generando efectos de tolerancia antigénica (Falcon y cols., 2010) que muestran, por consiguiente, efectos supresores en la autoinmunidad (Carranza y cols., 2012). Recientemente se han descrito mediadores específicos de esos efectos, como la molécula Knutz (Falcon y cols., 2014) o glicanos tegumentales (Aldridge y cols., 2016).

Recientemente se han descrito efectos similares en los mastocitos y células cebadas procedentes de ratones (Vukman y cols., 2013), pero la función de estos mastocitos no está realmente definida ni hay evidencia de que sea protectora en ratas (Van Milligen y cols., 1998). Estas células inflamatorias son residentes en tejidos que responden ante la activación tanto del sistema inmune innato como el adquirido produciendo y liberando diferentes mediadores inflamatorios presentes en sus gránulos citoplasmáticos (histamina, proteasas, carboxipeptidasas y proteoglicanos). Estas células son también capaces de sintetizar prostaglandinas, leucotrienos y determinadas citoquinas como el

factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) o interleuquina 4 (IL-4) (Prussin y cols., 2003). Además, son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unirse los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad (Gurish y cols., 2004; Yoshimoto y cols., 2006). Se estima que su papel es más determinante en estadios iniciales (peritoneo) de la infección (Doy y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Van Milligen y cols., 1998). Sin embargo, se ha descrito en bovinos que tras la infección con *F. hepatica* existe escasa evidencia del incremento de porcentaje de mastocitos (Bossaert y cols., 2000b; McCole y cols., 1998), mientras que en la infección con *F. gigantica* en búfalos se han descrito incrementos en el número de mastocitos en el infiltrado inflamatorio hepático (Molina y Skerratt, 2005).

En numerosos procesos parasitarios podemos encontrar una población de células cebadas residentes intraepiteliares (llamadas “leucocitos globulares”) responsables de los fenómenos de rechazo rápido de parásitos a nivel epitelial (Huntley y cols., 1984; Stankiewicz y cols., 1993; Balic y cols., 2000). Sin embargo, el origen de estos leucocitos globulares aún es campo de controversia pues también se ha demostrado en la especie caprina que expresan receptores $\gamma\delta$, como determinados linfocitos (Konno y cols., 1995).

No existen estudios sobre el papel de los basófilos en la infección con *F. hepatica*, pero se ha descrito que existe una breve elevación de la basofilia en circulación tras la infección (Poitou y cols., 1993). Conociendo el importante papel de los basófilos como las principales células secretoras de IL-4 en respuesta a antígenos tipo-proteasas (Sokol y cols., 2008) y debido a la abundante cantidad de proteasas que están presentes en la infección por *F. hepatica*, el estudio de los basófilos podría resultar una importante vía de investigación.

Las células fagocitarias, tanto macrófagos como neutrófilos, además de su función fagocítica, pueden liberar sustancias que actúan directamente contra el agente invasor como determinados reactivos derivados del óxido nítrico o especies activas de oxígeno: peróxido de hidrógeno y sus derivados (Roitt, 2001; Piedrafita y cols., 2007). Un estudio realizado en cabras infectadas con *F. hepatica* demostraron una deficiente respuesta fagocítica por parte de los neutrófilos comparada con los animales control, y

además dicha respuesta estuvo correlacionada con la carga parasitaria. (Martínez-Moreno y cols., 2000).

Otras células, como las llamadas “*Natural Killer*” (NK) presentan receptores en su superficie que pueden reconocer al agente invasor y provocar su citolisis (Fearon y Locksley, 1996). Estas células actúan en estrecho contacto con el agente diana (células tumorales, células infectadas por virus, etc.), sobre el cual liberan el contenido de sus gránulos (destacando la perforina) produciendo su destrucción.

Los parásitos de gran tamaño, como es el caso de los helmintos, no pueden ser fagocitados y parece ser que el organismo ha solucionado este problema mediante el desarrollo de un sistema de destrucción extracelular mediante los eosinófilos. Estas células son polimorfonucleares con gránulos caracterizados por su afinidad hacia colorantes ácidos (Butterworth y cols., 1981; Gleich y cols., 1984).

Tanto los eosinófilos como los macrófagos han demostrado un importante papel en ratas de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) contra *F. hepatica* (Van Milligen y cols., 1998), así como los macrófagos procedentes de bovino *in vitro* pueden matar NEJs (Duffus et al 1980), aunque este proceso ha sido cuestionado por autores como Glauert y cols. (1985). Los eosinófilos tienen receptores de superficie para el componente C3b del complemento y, al activarse dichos receptores, son capaces de generar metabolitos de oxígeno activo. Además, ciertos compuestos presentes en sus gránulos son capaces de provocar daños a nivel de la membrana del agente invasor (perforinas, etc.).

4.3.- Respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inmunitaria adquirida está mediada por dos poblaciones de linfocitos: los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. En comparación con el sistema inmune innato, el sistema inmune adquirido se caracteriza por presentar especificidad, memoria y capacidad para discriminar entre antígenos propios y extraños (Roitt y cols., 2001).

4.3.1.- Inmunidad celular

Los linfocitos T portan en su superficie receptores (TCR), que en colaboración con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son capaces de reconocer péptidos antigénicos específicos (Roitt, 2001). Otro receptor que se haya prácticamente en todos los linfocitos T y puede ser usado para distinguirlos de los linfocitos B es el CD2. Este CD2 está presente en la mayoría de los linfocitos T, timocitos y células NK. Por su parte, el receptor CD3 (molécula asociada a TCR), está presente en todos los linfocitos T maduros y timocitos (Roitt y cols., 2001).

A su vez, los linfocitos T pueden presentar o no otra serie de co-receptores, entre los que destacan los denominados CD4 y CD8 que desarrollan diferentes funciones y sirven de base para su clasificación (Bernard, 1984), dividiéndolos en dos poblaciones autoexcluyentes. Dentro de cada una de dichas subpoblaciones se pueden diferenciar linfocitos T de memoria (cuya función sería proporcionar una más rápida respuesta tras el contacto con un antígeno ya conocido) y linfocitos T no inmunizados específicamente contra ningún antígeno (Zuckermann y cols., 1996).

Los linfocitos T se clasifican en función de las características de su receptor principal. El receptor TCR es una proteína heterodimérica compuesta bien por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) o bien por cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2) que permite a las células T reconocer una gama muy amplia de anticuerpos (Mulcahy y cols., 1999; Roitt, 2001).

- 4.3.1.1.- *Linfocitos T $\gamma\delta$ +*

El papel de las células T $\gamma\delta$ no está esclarecido por completo (Girardi y cols., 2006). En el caso de los rumiantes, los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden dividir en dos poblaciones que difieren en su función y distribución orgánica (Davis y cols., 1996).

La población más numerosa en rumiantes y la que mayormente aparece en sangre periférica no expresa CD2 y es CD4-/CD8- (Wyatt y cols., 1994), siendo únicamente CD3+ (Mackay y cols., 1989; Davis y cols., 1993). Ambas poblaciones expresan receptores con cadenas TCR-1, consistentes en heterodímeros $\gamma\delta$, al contrario que los heterodímeros $\alpha\beta$ de las células con receptores TCR-2 (CD4+ y CD8+).

En el caso de los rumiantes, los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ constituyen un componente del sistema inmune mayor que en otras especies (Hein y MacKay, 1991), llegando a representar hasta un 60-75% de los linfocitos periféricos circulantes en terneros neonatos, bajando más tarde al 10% en rumiantes adultos (Wyatt y cols., 1994; Caro y cols., 1998).

Estos linfocitos son escasos en los órganos linfoides periféricos de animales normales (como el bazo o los nódulos linfáticos); sin embargo, son la población linfoide dominante en los epitelios (Janeway y cols., 1988). Así pues, se ha comprobado la existencia de subpoblaciones de estas células en superficies epiteliales como la piel, glándula mamaria e intestino (Wyatt y cols., 1994; Navarro y cols., 1996; Girardi y cols., 2006).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ son los responsables de mantener la vigilancia inmunológica a nivel epitelial, monitorizando la integridad de los epitelios mediante el reconocimiento y destrucción de aquellas células alteradas, las cuales expresan en determinadas ocasiones (infecciones, neoplasias) un tipo molecular específico de MHC tipo I (Girardi y cols., 2006).

○ 4.3.1.2.- *Respuesta mediada por linfocitos T colaboradores (T helper cell, Th):*

Se han identificado dos subpoblaciones principales de linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th). Se han llamado células T “helper 1” (Th1) y “helper 2” (Th2). Pueden distinguirse por la combinación de citoquinas que son capaces de secretar.

- Células Th1: Responden a antígenos presentados por células dendríticas mieloides y por células B usando la molécula coestimuladora CD80. Se produce una respuesta Th1 y las células Th1 secretan IL-2, interferón gamma (INF- γ) y TNF- β . A las pocas horas de la estimulación antigénica, se promueve una respuesta inmune mediada por células y el retraso de una reacción de hipersensibilidad y de la activación de macrófagos.

- Células Th2: Responden a antígenos presentados por células dendríticas linfoides o plasmocitoides y por macrófagos, y menos a antígenos presentados por linfocitos B. Se induce una respuesta Th2, mediante la secreción de IL-4 y se produce una coestimulación a partir de CD86. Una

vez activadas, las células Th2 van a secretar IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Estas citoquinas de respuesta Th2 promueven la proliferación de linfocitos B así como la secreción de inmunoglobulinas, aumentando la producción de IgG1 e IgA hasta 20 veces y la producción de IgE hasta 1000 veces.

Ambas respuestas celulares están fuertemente asociadas proporcionando inmunidad frente a helmintos, pero sin embargo produce un descenso en decrece la resistencia frente a micobacterias y otros organismos intracelulares. (Tizard, Veterinary Immunology, 2012).

La respuesta inmunitaria generada frente a parásitos helmintos, y en particular frente a trematodos, está caracterizada por una respuesta inmune Th2, que involucra a citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, así como IgE y células efectoras especializadas como basófilos, mastocitos y eosinófilos (Abbas y cols., 1996; Klion y cols., 2004; Nutman y cols., 2013). Sin embargo, en la fasciolosis, no parece ser una respuesta realmente protectora. Las ovejas infectadas con *F. hepatica* presentan en el bazo una mezcla de citoquinas Th1/Th2, sin embargo, en el transcurso de la infección de ahí en adelante, se produce un aumento de la expresión génica de Th2, pero no de Th1 (Álvarez y cols., 2015). Se ha descrito, además, que la magnitud de esta respuesta Th2 está directamente relacionada con la carga parasitaria (Clery y cols., 1996).

El desencadenamiento de una respuesta Th2 parece asociado a una producción temprana de IL-4. El origen de esta liberación es poco claro, aunque probablemente se produzca por parte de macrófagos y algunas células T que se estimulen vía receptores de superficie diferentes a los de la lectina como por ejemplo, linfocitos $\gamma\delta$ + intraepiteliares, que son capaces de liberar citoquinas ante determinados estímulos (Ferrick y cols., 2000).

Si bien la mayoría de los parásitos son sensibles a esta respuesta inmunitaria tipo Th2 (sobre todo los nematodos intestinales), otros han evolucionado y han conseguido evitar dicha respuesta inmunitaria (Pritchard y cols., 1997). Diversos estudios sugieren que determinados helmintos provocan una respuesta inmunitaria Th2, de la cual son capaces de protegerse, para evitar los mecanismos defensivos potencialmente tóxicos dependientes de una respuesta Th1 (Finkelman y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991;

Allen y Maizels, 1997). Como un claro ejemplo de mecanismo dependiente de una respuesta inmunitaria tipo Th1 que se muestra eficaz frente a los procesos parasitarios, cabría destacar la acción citotóxica realizada por los macrófagos. Estas células, una vez activadas por la acción de diferentes citoquinas, intervienen como células efectoras en la inmunidad protectora frente a un amplio rango de parásitos protozoarios y helmintos como *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, ó *Schistosoma mansoni* (Mulcahy y cols., 1999).

Como la gran mayoría de los parásitos helmintos, la infección por *F. hepatica* provoca una respuesta inmunitaria tipo Th2. Así diversos estudios han demostrado que tanto la IgE (Bossaert y cols., 2000a) como los eosinófilos y las células cebadas (Bossaert y cols., 200b), juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria que tiene lugar específicamente en el hígado de vacas infectadas con *F. hepatica*. Varios trabajos previos ya habían descrito dicha importancia en la mucosa intestinal de ratas (Doy y cols., 1982; Van Milligen y cols., 1998; Kesik y cols., 2007) y de vacas (Wicki y cols., 1991) infectadas con *F. hepatica*.

Sin embargo, se ha descrito que esta respuesta tipo Th2 es incapaz de eliminar o detener al parásito (Mulcahy y cols., 1999), por lo que cabría suponer que *F. hepatica* puede superarla. Cabe incluso la posibilidad de que el parásito polarice la respuesta del hospedador hacia una respuesta Th2 para así defenderse de una respuesta Th1, la cual podría resultar más eficaz para controlar al parásito (Maizels y cols., 1998; Maizels y cols., 2004).

De hecho, en el caso de la fasciolosis, en las especies susceptibles se produce un cambio en el tipo de respuesta inmunitaria predominante desde un tipo Th1 (o Th0 en otras especies) inicial hacia una respuesta Th2 final en fases crónicas de la infección, lo cual resulta en beneficio para el parásito. Así, por ejemplo, el anticuerpo dominante en parasitaciones crónicas es la IgG1 en terneros, ovejas y ratas (O'Neill y cols., 2000), identificándose en estas especies también IgE (inmunoglobulinas características todas ellas de respuestas tipo Th2).

En cuanto a la respuesta temprana frente a la fasciolosis, un trabajo realizado en ganado vacuno por Clery y cols. (1998), concluyó que la infección con *F. hepatica* daba lugar a una proliferación de linfocitos con rápida producción de IFN- γ , lo que era indicativo de

un patrón Th1 en las fases iniciales del proceso. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infección y su ausencia en infecciones crónicas, demostraría la polarización de la respuesta en función del curso de la infección, permitiendo la supervivencia del parásito durante las fases crónicas de la infección.

○ 4.3.1.3 Linfocitos T citotóxicos (Tc)

Las células Tc (CD8+) son las encargadas de destruir aquellos virus, bacterias o protozoos que infectan las células del hospedador, tejidos trasplantados así como células cancerígenas (Roitt, 2001). Estos linfocitos se encuentran restringidos al MHC tipo I, estando su acción y activación controlada por parte de los linfocitos T colaboradores. Los antígenos derivados de los agentes infecciosos intracelulares son procesados en los endosomas y presentados juntos al MHC clase I en la superficie de la célula infectada. El reconocimiento de este complejo péptido-MHC clase I por parte de los receptores TCR- $\alpha\beta$ de linfocitos T CD8+ inicia el proceso de destrucción de la célula infectada, normalmente mediado por la producción de radicales libres de oxígeno y perforinas (Roitt, 2001). Por lo general, las células Tc no son capaces de mediar la eliminación de parásitos eucarióticos extracelulares, incluidos los helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

4.3.2.- Inmunidad humoral

La cinética que siguen las células B, en la bibliografía, tanto en animales infectados con *F. hepatica* solamente como infectados por el trematodo y vacunados, sugieren un papel protector. Chung y cols. (2012), destacaron el acumulo de células B CD19+ en el bazo de ratones infectados con *F. hepatica*. De igual forma autores como Zafra y cols. (2010) describieron un incremento de células IgG+ en la corteza de nódulos linfáticos hepáticos y en el hígado que cuya cifra incrementaba en animales vacunados. Igualmente, Molina y Skerratt (2005) un incremento en el infiltrado de células plasmáticas en el hígado de búfalos y terneros infectados con *F. gigantica*. En ovejas infectadas con *F. hepatica*, se describió un incremento del 11% en el número de células B reclutadas a nivel de nódulos linfáticos hepáticos (Meeusen y cols., 1995). La dinámica de la secreción de anticuerpos está relativamente descrita con una

seroconversión a las 4 semanas de la exposición de prácticamente todos los animales infectados experimentalmente (Flynn y Mulcahy, 2008). En ratas, durante las 10 primeras semanas se produce un incremento general de IgG1, IgG2 y de IgE y tan solo un descenso de IgM (Poitou y cols., 1993). Sin embargo, en el ganado bovino, el balance de isotipos fue a favor de IgG1 sobre IgG2, a pesar de que tanto en bovino como en ovino, el isotipo IgG2 se asocia con la expresión de resistencia o protección contra la infección (Pleasance y cols., 2011b; Golden y cols., 2010). La IgG2 se conoce como la responsable junto con los eosinófilos a través de una respuesta ADCC en ratas (Van Milligan y cols., 1998).

En la cabra, los niveles de IgG específicas anti-FhESP comienzan a ascender a las 2 spi, alcanzándose un pico de producción a las 12 spi, tras el cual se mantiene el nivel o desciende lentamente (Martínez-Moreno y cols., 1997; 1999).

4.4.- Papel de los eosinófilos en infecciones por helmintos

En el ganado bovino y en el ovino, *F. hepatica*, induce un incremento de eosinófilos tanto a nivel hepático como a nivel sistémico, dándose en *F. gigantica* el mismo fenómeno (Chauvin y cols., 2001; Zhan y cols., 2005) siendo uno de los acontecimientos principales, estando también íntimamente asociada a otras patologías gastrointestinales y al asma en humanos. Paradójicamente, en estudios vacunales realizados en terneros y cabras se produjo una reducción del porcentaje de eosinófilos (Wedrychowicz y cols., 2007; Zafra y cols., 2013a). Además de ello, se demostró que las ovejas de Java de cola delgada (ITT) desarrollaban resistencias frente a *F. gigantica* pero no frente a *F. hepatica*. Piedrafita y cols. (2007) demostraron el papel de los eosinófilos como ADCC contra *F. gigantica*, pero no contra *F. hepatica*; sin embargo, Pleasance y cols. (2011a) demostraron que la eosinofilia periférica no se relacionaba con una resistencia a *F. gigantica*.

Todos estos hechos, demuestran que los eosinófilos no actúan solamente a nivel del intestino o a nivel de la cavidad peritoneal si no, que su papel es muy importante en el propio hígado de las especies hospedadoras.

Desde hace mucho tiempo, se estudia este papel de los eosinófilos en la defensa y en la inmunidad del hospedador en infecciones por helmintos (especialmente frente a los que tienen un estado de migración tisular), así como su papel en la patología. A este respecto, es importante reseñar que el porcentaje de eosinófilos de forma normal en sangre circulante se sitúa en torno al 2-5%, mientras que en un individuo infectado por un parásito helminto este porcentaje de eosinofilia puede aumentar al 40% (Reimert y cols., 2006), lo cual denota la importante presencia de este tipo celular.

Morfológicamente, los eosinófilos se caracterizan por tener un núcleo bilobulado y tres tipos de gránulos citoplasmáticos diferentes: gránulos específicos, que tienen una estructura central cristaloides gránulos primarios, los cuales no poseen un núcleo cristaloides y aparecen en la maduración temprana; y gránulos pequeños, cargados de enzimas como la arilsulfatasa. Cuatro proteínas tóxicas específicas de los eosinófilos son almacenadas en sus gránulos: la proteína basal principal-1 (MBP-1), la peroxidasa propia de los eosinófilos (EPO), la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y la proteína catiónica eosinofílica (ECP). MBP-1, ECP y EPO son consideradas las toxinas más potentes frente a los helmintos (Walsh, 2001). De forma similar a como lo hacen los neutrófilos, los eosinófilos pueden fagocitar material extraño, así como bacterias, levaduras, e incluso parásitos, aunque con una menor eficacia (Shamri y cols., 2011).

Determinadas citoquinas son fundamentales para la supervivencia y la inducción de este tipo celular, como IL-5, IL-3 y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Sin la presencia de estas citoquinas, se produce la apoptosis de los eosinófilos en condiciones *in vitro* (Weller, 1994; Wardlaw y cols., 1995; Shin, 2000). Por otro lado, un tratamiento con corticoides, la unión con el receptor Fas o con CD69 pueden acelerar la muerte de los eosinófilos (Tsuyuki y cols., 1995). Principalmente, parece ser que su función requiere de IL-5, lo que sugiere una asociación con una respuesta inmune Th2 (Nizet, 2008).

Los eosinófilos no solo forman parte de la defensa del hospedador, si no que están directamente implicados en la patogénesis de la enfermedad y en el daño tisular. Los eosinófilos son capaces de causar daño mediante diversos mecanismos, incluyendo citotoxicidad, daño físico causado por la infiltración tisular (ocupación de espacio) y fenómenos tromboembólicos causados por una hipercoagulabilidad inducida por eosinófilos (Weller and Buley, 1994); sin embargo, mecanismos como la liberación del

contenido proteico de sus gránulos y otras sustancias citotóxicas son los que mejor se correlacionan con el daño tisular inducido por eosinófilos. De este modo, se ha demostrado en infecciones con *Brugia malayi* que la MBP-1 y la EPO tienen una regulación negativa de la patología inflamatoria en el pulmón, así como de las respuestas adaptativas (Cadman y cols., 2014). En modelos de *Brugia filariasis*, la presencia de eosinófilos es necesaria para destruir al parásito en infecciones primarias, pero no secundarias tanto de la microfilaria L3 de *B. pahangi* como de *B. malayi* (Ramalingam y cols., 2003; Simons y cols., 2005). Existen en la literatura muchos ejemplos de la muerte del parásito mediada por eosinófilos, como el hallazgo de gran cantidad de eosinófilos y de sus productos en torno a sitios de degeneración de las microfilarias en la oncocercosis (Ackerman y cols., 1990). Existen otros estudios que detallan el papel de los eosinófilos durante la infección por *Strongiloides stercoralis* poniendo en evidencia el importante papel como célula efectora durante la infección primaria, estando el contenido de los gránulos directamente relacionado con la muerte del parásito (Herbert y cols., 2000; Galioto y cols., 2006). Sin embargo, en infecciones secundarias, los eosinófilos tienen un papel más inmunomodulador y su presencia es necesaria para la implantación de una respuesta protectora mediada por IgM (Herbert y cols., 2000).

Estudios realizados en *Schistosoma mansoni* con líneas de ratones con una completa ablación de sus eosinófilos, comparándolas con las líneas *wild type*, no mostraban diferencias en la carga parasitaria, en el depósito de huevos ni en las lesiones hepáticas, sin embargo, sí que se evidenció una capacidad de los eosinófilos de concentrarse en los granulomas en respuesta a un estímulo Th2, sugiriendo un papel importante en la limpieza de los detritus celulares y el remodelado tisular (Swartz y cols., 2006). Así se demuestra en estas infecciones una protección del daño tisular *in vitro* pero no *in vivo*. Aunque es bien conocido que los eosinófilos actúan con capacidad defensiva en la mayoría de las situaciones, existen evidencias de que podrían tener un papel sinérgico y de colaboración con los helmintos (Ravin and Loy, 2016).

Los eosinófilos, por tanto, juegan un papel muy importante en el desarrollo de la patología tisular (Cadman y cols., 2014) y, también, en la respuesta inmunitaria efectiva del hospedador frente al parásito. En este sentido, en ratas infectadas con *F. hepatica*, se ha asociado una respuesta inmunitaria efectiva con un aumento del infiltrado de eosinófilos en la lámina propia del intestino en los estadios tempranos de la infección

(Van Milligen y cols., 1998;1999). En otro estudio realizado en ratas infectadas con *F. hepatica*, los eosinófilos peritoneales producen gran cantidad de óxido nítrico (Jedina y cols., 2011). Además, estudios previos sugieren que los eosinófilos de bovino incubados con suero de bovino son incapaces de provocar daño alguno a las formas juveniles de *F. hepatica*, sin embargo, la enzima MBP-1 obtenida de eosinófilos procedentes de bovinos es capaz de acabar con las formas juveniles del parásito a bajas concentraciones (Duffus y cols., 1980b).

4.5.- Papel de los Linfocitos T reguladores (Tregs) en infecciones por helmintos

Todos los agentes infecciosos se encuentran íntimamente relacionados con el sistema inmunitario del hospedador. De esta forma, bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos, son capaces de inmunomodular esta respuesta a favor de su transmisión y de su supervivencia en el hospedador. Pero los linfocitos Tregs son muy beneficiosos en muchas ocasiones para el hospedador, de manera que permiten una disminución de la inmunopatología asociada a enfermedades autoinmunes, así como a la sensibilidad a determinados patógenos. Pero en este contexto, la influencia que ejercen no siempre es benigna (Berkaid y Tarbell, 2009).

El tipo predominante de células Tregs es CD4+ y puede presentar en su superficie la cadena IL-2R α o expresar el factor de transcripción de FoxP3 o ambos (Gavin y cols., 2007). Los linfocitos Tregs que expresan a su vez FoxP3 pueden producir IL-10 e IL-35. La IL-10 puede producirse mediante una respuesta Th1 o bien durante una respuesta Th2 (que a su vez secretarían IL4) esto ha permitido que el grupo de linfocitos Tregs FoxP3+ productores de IL-10 esté bien definido por participar en ambas respuestas. Además, tenemos células Y productoras de TGF- β (originalmente llamadas Th3) y pueden tener también capacidades reguladoras.

Las poblaciones de células Tregs FoxP3+ se dividen en dos tipos principales según su origen: de origen tímico (o natural) -tTregs- e inducidos (o vía adaptativa). Los primeros, se producen en el timo y están presentes en el torrente sanguíneo antes de que el agente patógeno o el daño aparezca. Los Tregs de origen tímico tienen un fenotipo CD4+, CD8+ y FoxP3+ y su déficit resulta en enfermedades autoinmunes fatales (Rubtsov y cols., 2010). Además, las células T CD4+ pueden ser inducidas a presentar en su superficie FoxP3+ y adoptar funciones reguladoras, expandiendo incluso el rango

de las funciones Tregs hacia antígenos exógenos (Bluestone y Abbas, 2003). Se adquieren en el contexto de una infección o un proceso neoplásico (Adalid-Peralta y cols., 2011). Sin embargo, este fenotipo puede revertirse y perder la expresión de CD25 o de FoxP3 bajo determinadas condiciones.

En este sentido, existen algunas diferencias entre las infecciones por agentes microbianos y las ocasionadas por parásitos helmintos, mientras que en las infecciones víricas, bacterianas o causadas por protozoos, el aumento de la producción de IL-10 imparte resistencia a la infección (Couper y cols., 2008, Moore y cols., 2001), el papel de la IL-10 en las infecciones por helmintos, dominadas por una respuesta Th2, es mucho más complejo. Por ejemplo, se ha demostrado que es esencial para proteger frente a la inmunopatología en schistosomiasis crónicas, pero es igualmente necesaria en los estadios iniciales de la infección para establecer una respuesta Th2 dominante, incluso es necesaria para la expulsión de *Trichinella spiralis* del intestino (Helmbly y Grecis, 2003; Beiting y cols., 2007).

5.- INMUNOMODULACIÓN Y EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EJERCIDA POR *Fasciola hepatica*

Dada la naturaleza invasiva del parásito, éste queda expuesto de manera importante al sistema inmunitario, tanto humoral como celular, del hospedador. Pero a pesar de ello, *F. hepatica* puede sobrevivir en sus hospedadores durante largos periodos de tiempo (1-2 años en bovinos y hasta 20 años en oveja), hecho directamente relacionado con la capacidad de modulación de la respuesta inmune del hospedador.

Cada estadio del desarrollo parasitario puede ser antigénicamente diferente y esto provoca que la respuesta del hospedador frente a las infecciones por helmintos esté a veces caracterizada por una serie de discretas respuestas inmunitarias que envuelven diferentes periodos durante el curso de la infección. Una respuesta inmunitaria protectora directamente contra un solo estadio podría ser eludida con la diferenciación del parásito, ayudando a la supervivencia del patógeno y otorgándole una resistencia inmunomediada.

Hipotéticamente, la inmunomodulación de la respuesta inmunitaria debería ser beneficiosa para ambos, tanto para el hospedador como para el parásito, protegiendo al helminto de ser erradicado y, por otro lado, impidiendo una respuesta pro-inflamatoria excesiva que provocaría importantes daños tisulares. Sin embargo, cuando el sistema inmunitario contacta con la infección o con sus moléculas antigénicas comienza una intensa respuesta para intentar erradicar al parásito. Pero *F. hepatica*, a medida que aumenta su carga parasitaria y el tiempo post-infección es capaz de ir modulando esas respuestas permitiendo su supervivencia en detrimento del hospedador (Maizels y cols., 2004; van Riet y cols., 2007).

5.1.- Localización final del parásito

Tanto los antígenos como los huevos liberados por los parásitos adultos llegan al intestino a través de conductos biliares y colédoco junto a la bilis, lo cual limita en gran parte la respuesta inmunitaria que deberían inducir. Es por este motivo por el que los niveles de anticuerpos inducidos en ratones, ratas, ovejas y vacas descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen y Brandon, 1994; Clery y cols., 1996).

Por otra parte, los niveles de inmunoglobulinas en conductos biliares de vacas infectadas son 12 veces menores que los medidos en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Hughes y cols., 1981).

5.2.- Glucocáliz

Es lógico asumir que la mayoría de las interacciones entre el parásito y el hospedador tendrán lugar en la superficie parasitaria, la cual va a desarrollar un papel importante en la protección contra el sistema inmune (Mulcahy y cols., 1999). No existe evidencia de que el parásito absorba macromoléculas del hospedador en su superficie para enmascararse como sucede en otros parásitos, por ejemplo, *Schistosoma spp.* La superficie de *F. hepatica* es una membrana simple cubierta por un espeso glucocáliz polianiónico de unos 40 nm, compuesto por glucoproteínas que proyectan cadenas de oligosacáridos y gangliósidos terminados en ácido siálico. El glucocáliz superficial de *F. hepatica* puede contribuir a la evasión inmune de tres formas distintas: La

composición del glucocáliz sufre una serie de cambios durante el desarrollo del parásito en el hospedador, lo que hace que el sistema inmune tenga que luchar contra un “blanco variable” (Hanna, 1980 a,b). El glucocáliz se encuentra en un proceso continuo de muda y es reemplazado por vesículas secretoras del parásito. En las formas inmaduras del parásito, el cambio total del glucocáliz puede durar solamente 3 h (Hanna, 1980 b,c). Todo esto no permite que células defensivas como los neutrófilos y eosinófilos puedan establecer un contacto estrecho y suficientemente duradero con el parásito para permitir su degranulación y destrucción, ya que se desprenden junto al glucocáliz (Duffus y Franks, 1980a; Hanna, 1980b). La liberación de productos de desecho del glucocáliz puede crear un flujo circulatorio que dificulta la acción de los anticuerpos en una reacción inmunitaria potencialmente letal (Duffus y Franks, 1980a).

5.3. -Evasión de la acción del sistema del complemento

Las larvas recién desenquistadas son per se muy sensibles a la acción del sistema del complemento. Sin embargo, no se ha podido demostrar la unión de C3 a la superficie de las mismas, lo cual podría explicarse por la presencia de ácido siálico terminal en componentes del glucocáliz, el cual es capaz de evitar la activación del complemento por la vía alternativa (Baeza y cols., 1994). Del mismo modo, también se ha comprobado que existen mecanismos que bloquearían la vía clásica (Montgomery y cols., 1986). Todos estos factores podrían explicar la gran resistencia de las fasciolas juveniles recién desenquistadas a la acción del sistema del complemento.

5.4.- Cambios antigénicos durante la migración parasitaria

Los anticuerpos desarrollados en nódulos linfáticos mesentéricos son diferentes a los de nódulos linfáticos gastrohepáticos y a los del bazo, presentando diferentes patrones de reacción frente a diferentes antígenos. Igualmente, se provocan distintas respuestas isotípicas (por ejemplo, la producción de IgE es mucho mayor en los nódulos linfáticos hepáticos que en los mesentéricos o en el bazo, mientras que la de IgA es mayor en los nódulos linfáticos mesentéricos). Estos hallazgos sugieren una particular regulación de las citoquinas secretadas por las células T en cada una de estas zonas. Esta variación en el tipo de respuesta inmunitaria hace que ésta sea menos efectiva que si se tratase de un único mecanismo defensivo (Meeusen y Brandon, 1994).

5.5.- Capacidad migratoria a través del parénquima hepático

Los túneles migratorios del parénquima hepático de ovejas primoinfectadas con *F. hepatica* aparecen rodeados por granulocitos (eosinófilos y neutrófilos), macrófagos, y linfocitos T y B (Meeusen y cols., 1995). Sin embargo, mientras los parásitos jóvenes se hallan presentes en esos túneles, no se observa infiltración linfocitaria rodeándolos. En estadios posteriores el infiltrado celular se incrementa, pero sólo se observa junto a los espacios porta y zonas lesionadas, y no rodeando a las fasciolas. De esta forma, los parásitos tienen la suficiente motilidad como para “dejar atrás” al infiltrado inflamatorio; mientras éstos pueden atravesar el hígado sin obstáculos, los leucocitos tienen que abandonar los capilares sanguíneos del espacio porta y atravesar el tejido intersticial hasta llegar a los túneles en los que se encuentra el helminto (Meeusen y cols., 1995).

En el caso de las reinfecciones, los parásitos pueden avanzar más rápidamente al evitar zonas previamente lesionadas y únicamente migrar por zonas sanas, lo cual explicaría que en sucesivas reinfecciones los parásitos migren más rápidamente que en las primoinfecciones (Meeusen y cols., 1995).

5.6.- Modulación del tipo de respuesta hacia Th2 y su influencia en otras infecciones

Durante las infecciones por helmintos, la función de las células inmunes innatas como células dendríticas y macrófagos, son manipuladas por el parásito. Una vez infectado el hospedador, estas células desarrollan fenotipos que promueven la diferenciación de los linfocitos colaboradores Th2 produciendo citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13 y estimulando la secreción de anticuerpos IgG1, IgE e IgA.

Los linfocitos Tregs secretan citoquinas como IL-10 y TGF- β , con un papel antiinflamatorio fundamental, suprimiendo el desarrollo de células Th1 y limitando la magnitud de la respuesta Th2, permitiendo disminuir además el daño tisular hepático del hospedador. Esta capacidad de supresión de la respuesta inmune Th1 en el hospedador está directamente relacionado con un aumento de la susceptibilidad del

animal parasitado a otras infecciones como pueden ser la salmonelosis, clostridiosis y tuberculosis, e incluso interfiriendo pruebas diagnósticas de dichas enfermedades (Brady y cols., 1999; Flynn y cols., 2007; Dalton y cols., 2013).

En el caso de la tuberculosis, es bien conocido que la protección que se desarrolla frente a *Mycobacterium* está caracterizada por una fuerte respuesta Th1 específica, sin embargo, la coinfección con helmintos, impide esa respuesta Th1 necesaria para eliminar *Mycobacterium* derivándola hacia una respuesta inmune Th2 o un estado antiinflamatorio. Flynn y cols. (2007) demostraron que las células mononucleares aisladas de la sangre periférica (PBMCs) de animales infectados con *F. hepatica* y *Mycobacterium bovis* secretaban niveles reducidos de IFN- γ en respuesta a la estimulación con antígenos micobacterianos comparado con PBMCs de animales infectados solo con *M. bovis*. Garza-Cuartero y cols. (2016) describieron que *F. hepatica* era capaz de reducir la carga de *Mycobacterium bovis* y suprimir la respuesta pro-inflamatoria asociada.

En infecciones por *F. hepatica* se ha descrito que existe una inducción al fenotipo M2 de los macrófagos. Esto ocurre durante los tres primeros días post-infección en ratones. Al producirse esta inducción hacia la vía alternativa M2, estos macrófagos pierden su función efectora proinflamatoria, perdiéndose ligandos de receptores tipo TLR (Toll-like receptors) y contra *F. hepatica* pasando a una respuesta Th2 de tipo reparativo (Donnelly y cols., 2005, 2008).

La presencia de todos esos mecanismos inmunes (Th2, derivación hacia macrófagos M2) regulados por *F. hepatica* son de vital importancia para la protección de tejidos vitales, particularmente el hígado, del daño causado por la larva migrante.

5.7.- Inmunomodulación de los linfocitos T reguladores FoxP3 (Tregs FoxP3)

Grainger y cols. (2010) mostraron *in vitro* que los productos de excreción y secreción de la larva L4 de *Teladorsagia circumcincta* inducían la expresión de linfocitos Tregs FoxP3, un factor de transcripción íntimamente involucrado en la activación de linfocitos T CD4+. Sugiriendo, de esta forma, que el parásito podría inducir activamente las respuestas reguladoras de las células T durante la infección. De igual forma, estudios de

los estadios larvarios de *Ostertagia ostertagi* han demostrado que pueden suprimir la activación y proliferación linfocitaria *in vitro* (Gómez-Muñoz, 2004).

La inducción de células Tregs FoxP3 ha demostrado en muchas ocasiones ser un importante mecanismo mediante el cual determinados helmintos son capaces de reducir la respuesta inmune para aumentar su supervivencia. Un estudio realizado por McNeilly y cols. (2013), demostró que el estadio L4 de *T. circumcincta* elevaba el número de células Tregs FoxP3 en el abomaso en estadios tempranos de la infección.

Las infecciones crónicas que se producen en los helmintos, en los hospedadores mamíferos permiten el incremento de Tregs FoxP3 que suprimen de forma eficaz las respuestas Th1, Th2 y Th17. Al mismo tiempo, la producción de citoquinas inflamatorias

5.8.- Productos de excreción y secreción de *Fasciola hepatica* (FhESP): Potentes moléculas inmunomoduladoras

Donnelly y cols. (2005) demostraron que los ratones a los que se le administraron intraperitonealmente en tres ocasiones 10 µg de FhESP durante una semana, desarrollaron una respuesta inmunitaria Th2. Tras esta respuesta Th2 inducida, se pudo evidenciar la supresión del desarrollo de la respuesta Th1.

Estos FhESP se han conseguido separar por fracciones mediante cromatografía y se ha analizado su capacidad de mimetizar la actividad inmunomoduladora en infecciones *in vivo*. Robinson y cols. (2009) describen dos principales fracciones: la peroxirredoxina (FhPrx) y la molécula de defensa contra helmintos (FhHDM-1). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la FhPrx es responsable de activar al fenotipo M2 de los macrófagos, los cuales no responden a los estímulos inflamatorios clásicos y promueven la diferenciación de la respuesta inmunitaria hacia Th2. Rodríguez y cols. (2015) demostraron que los glicoconjugados de *F. hepatica* eran capaces de promover la producción de IL-4 e IL-10 y suprimir la producción de IFN γ por parte de los esplenocitos durante la infección, dilucidando con ello algunas de las moléculas responsables de la regulación inmunitaria. Además, la FhHDM-1 se ha propuesto como

similar a catelicidina en mamíferos lo que significa que controla la respuesta inmune innata en los hospedadores. La catelicidina más estudiada en humanos es la LL-37 y se expresa en neutrófilos, macrófagos y en células de mucosas epiteliales en respuesta a la estimulación por mediadores inflamatorios y microorganismos. De este modo, FhHDM-1 se ha llegado a proponer como un potencial agente terapéutico anti-sepsis (Robinson y cols., 2011)

5.9.- Apoptosis de células efectoras mediada por *Fasciola. Hepatica*

El proceso de la apoptosis se puede definir como “*el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos*”. Se producen una serie de estímulos o señales hacen que la célula decida su propia muerte, es lo que se ha calificado como la muerte que permite vivir.

Los organismos usan este proceso para eliminar todas aquellas células dañadas o innecesarias para prevenir condiciones patológicas y mantener la homeostasis tisular (Rosenberg, 2011). La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de aspártico, de ahí el nombre que reciben (*cystein-dependent aspartate-directed proteases*). Las caspasas son las encargadas, en último término, de iniciar el proceso de muerte celular y activan a otras enzimas que degradan múltiples proteínas, con el consiguiente desmantelamiento de la arquitectura celular. La implicación de estas proteasas en los procesos de apoptosis está ampliamente documentada, señalándose la caspasa-3 como la proteasa ejecutora del proceso en última instancia (Alnemri y cols., 1996; Taylor y cols., 2008).

El proceso de apoptosis puede ocurrir por dos mecanismos: 1- receptor de muerte o extrínseco y 2- mitocondrial o intrínseco (Devit y Marshall, 2011). El primer mecanismo involucra la unión u oligomerización de los receptores de muerte en la

superficie celular que disparan el proceso de apoptosis. Estos receptores en la superficie celular pertenecen a una superfamilia de una citoquina llamada Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Estos receptores se encuentran expresados en muchos tejidos y células. Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis mediada por estos receptores tiene un rol importante en una variedad de procesos biológicos como daño de tejidos, homeostasis inmunológica y protección contra microorganismos patógenos. En contraste, el mecanismo mitocondrial se pone en marcha mediante diferentes respuestas al estrés intracelular como son lesiones en el ADN, cambios en las concentraciones de calcio intracelular y estrés endoplasmático. La liberación mitocondrial del citocromo C es un evento constante en la apoptosis y desencadena la cascada de muerte celular dependiente de las enzimas caspasas, culminando en la fragmentación celular. (Yoon y cols., 2002; Canbay y cols., 2004).

Diferentes patógenos, entre los que encontramos virus, bacterias y protozoos han desarrollado estrategias para inducir la apoptosis de las células inmunitarias y no inmunitarias del hospedador (Luder y cols., 2001; Herold y cols., 2012). Incluso, en patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii* y *Leishmania spp.* utilizan la apoptosis de este modo (Bienvenu y cols., 2010).

En el caso de las infecciones ocasionadas por helmintos, la promoción de la muerte celular programada de las células efectoras facilita la proliferación del parásito, así como incrementa la longevidad de los helmintos dentro del propio hospedador mediante la disminución del número de células efectoras viables (Chow y cols., 2000).

Los autores Chen y cols. (2002) publicaron un trabajo donde sugerían que durante el estadio de schistosomula de *Schistosoma mansoni*, el parásito era capaz de liberar mediadores moleculares, a través de sus secreciones, que podían inducir la apoptosis de las células T de la piel, instaurándose como un mecanismo evasivo de la respuesta celular inicial por parte del hospedador.

Durante la migración de *F. hepatica* a través de los tejidos del hospedador, se produce un rápido cambio del glucocálix externo del tegumento del parásito, lo que previene el ataque de los granulocitos, debido a que los anticuerpos producidos comienzan a ser incapaces de adherirse a la superficie del parásito que se está renovando (Hanna, 1980

a,b). Esas glicoproteínas liberadas forman parte de FhESP y contactan directamente con el sistema inmunitario del hospedador induciendo la modulación del mismo de diferentes maneras. Además, estudios realizados mediante la inmunización de ratones con ESP de parásitos adultos de *Nippostrongylus brasiliensis*, demuestran que estos productos inducen una potente respuesta Th2, sugiriendo que el desarrollo y mantenimiento de este tipo de respuesta no es debido a un fallo en el desarrollo de una respuesta Th1, sino a una inducción de una significativa respuesta Th2 por parte del parásito (Maizels y cols., 2004).

F. hepatica puede sobrevivir en el hospedador durante largos periodos de tiempo. La inducción de las células efectoras del hospedador por parte de *F. hepatica* y de sus productos ha sido reconocida en numerosas ocasiones como un mecanismo eficaz para suprimir la respuesta inmunitaria (Serradell y cols., 2007, 2009; Guasconi y cols., 2012). Desde este punto de vista, los FhESP son capaces de inducir la apoptosis de los eosinófilos mediante la actuación sobre vías mitocondriales. La principal cascada activada por los FhESP que resulta en la apoptosis de los eosinófilos es la vía de la tirosin quinasa (Serradell y cols., 2007).

Serradell y cols. (2009), estudiaron el principal mecanismo a través del cual tanto el parásito adulto como sus FhESP mediaban la apoptosis de los eosinófilos. En ese trabajo de investigación, se reveló que FhESP incrementaban la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular, H₂O₂ causando la despolarización de la membrana mitocondrial, provocando la liberación del citocromo C y consecuentemente la activación de la cascada de las caspasas.

Guasconi y cols. (2012) ha descrito la capacidad de los FhESP de inducir la apoptosis de otras células efectoras, como macrófagos, durante un estudio in vitro que evaluaba los efectos de los FhESP en los macrófagos peritoneales obtenidos en ratones infectados con metacercarias de *F. hepatica*. Incluso, recientemente en una universidad de Arabia Saudí (Al-Megrin y Al-Qahtani, 2016) han descrito la activación de determinados genes que controlan la expresión de caspasa-3 así como de promotores de la apoptosis como Bax y Bcl-2, en hepatocitos de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*.

En la bibliografía sobre esta materia podemos encontrar además otros ejemplos concretos que relacionan a estos ESP directamente con la inducción de la apoptosis, habiéndose estudiado en determinados helmintos como en *Paragonimus westermani*, en

el cual se ha evidenciado *in vitro* que son capaces de disminuir, de un modo dosis dependiente, la supervivencia de eosinófilos, mediante la inducción a la apoptosis de los mismos (Shin, 2000). En el caso de FhESP, se ha demostrado que también tienen propiedades inmunomoduladoras tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, son capaces, por ejemplo, de suprimir la proliferación de linfocitos inducida por concavalina-A en ovinos (Jefferies y cols., 1996). Y se ha demostrado que participan en la liberación proteolítica de inmunoglobulinas (Heffernan y cols., 1991), que tienen función antioxidante (Hillyer y cols., 1992), promueven la supresión de la hipersensibilidad de tipo retardada (Cervi y cols., 1996).

La apoptosis, por tanto, se ha descrito que juega un papel muy importante en la patogénesis de gran cantidad de infecciones por helmintos (Zakeri, 2017), como *Schistosoma japonicum* (Xu y cols., 2010; Han y cols., 2013), *S. mansoni* (Rumbley y cols., 2001), *Necator americanus* (Chow y cols., 2000) y *Taenia crassiceps* (Zepeda y cols., 2010), permitiendo, mediante esta estrategia evasora del sistema inmunitario del hospedador, la supervivencia del parásito. Estos parásitos inducen la apoptosis de células efectoras como macrófagos, eosinófilos y de células dendríticas (Shin y cols., 2000; Semnani y cols., 2008; Yan y cols., 2008; Zepeda y cols., 2010; Nono y cols., 2012; Das Mohapatra y cols., 2014). Por lo que, la apoptosis se considera, finalmente, como un mecanismo inmunosupresor o evasor en infecciones por parásitos helmintos.

PRIMER TRABAJO

A. Escamilla, M. J Bautista, R. Zafra, I. L Pacheco, M. T Ruiz, S. Martinez-Cruz, A. Méndez, A. Martínez-Moreno, V. Molina-Hernández, J. Perez. 2016. Vet. Parasitol. 216, 84-88.

***Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep**

***Fasciola hepatica* Induces Eosinophil Apoptosis in the Migratory and Biliary Stages of Infection in Sheep**

A. Escamilla^a, M.J. Bautista^a, R. Zafra^a, I.L. Pacheco^a, M.T. Ruiz^a, S. Martínez-Cruz^b, A. Méndez^a, A. Martínez-Moreno^b, V. Molina-Hernández^c, J. Pérez^a,

^aDepartment of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^bDepartment of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain.

^cSchool of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK.

Corresponding author:

José Pérez,

Dep. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas

Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396

14014 Córdoba, Spain

Tel: +34 957218178, Fax: +34 957218682

e-mail: an1pearj@uco.es

Abstract

The aim of the present work was to evaluate the number of apoptotic eosinophils in the livers of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* during the migratory and biliary stages of infection. Four groups (n = 5) of sheep were used; groups 1-3 were orally infected with 200 metacercariae (mc) and sacrificed at 8 and 28 days post-infection (dpi), and 17 weeks post-infection (wpi), respectively. Group 4 was used as an uninfected control. Apoptosis was detected using immunohistochemistry with a polyclonal antibody against anti-active caspase-3, and transmission electron microscopy (TEM). Eosinophils were identified using the Hansel stain in serial sections for caspase-3, and by ultrastructural features using TEM. At 8 and 28 dpi, numerous caspase-3⁺ eosinophils were mainly found at the periphery of acute hepatic necrotic foci. The percentage of apoptotic eosinophils in the periphery of necrotic foci was high (46.1 to 53.9) at 8 and 28 dpi, and decreased in granulomas found at 28 dpi (6%). Transmission electron microscopy confirmed the presence of apoptotic eosinophils in hepatic lesions at 8 and 28 dpi. At 17 wpi, apoptotic eosinophils were detected in the infiltrate surrounding some enlarged bile ducts containing adult flukes. This is the first report of apoptosis induced by *F. hepatica* in sheep and the first study reporting apoptosis in eosinophils in hepatic inflammatory infiltrates *in vivo*. The high number of apoptotic eosinophils in acute necrotic tracts during the migratory and biliary stages of infection suggests that eosinophil apoptosis may play a role in *F. hepatica* survival during different stages of infection.

Key words: apoptosis; caspase-3; eosinophil; *Fasciola hepatica*; sheep.

Research Highlights:

- Eosinophil apoptosis was common in acute hepatic necrotic foci during the migratory stage in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*.
- Eosinophil apoptosis was also found in the periphery of enlarged bile ducts containing adult flukes.
- Eosinophil apoptosis may play a role for *F. hepatica* survival during the migratory and biliary stages of infection.

1. Introduction

Fasciola hepatica causes liver fluke disease in temperate climates and is responsible for major economic losses in animal production (Spithill et al., 1999). This disease is also considered a serious public health problem in humans (McManus and Dalton, 2006). *F. hepatica* often causes chronic infection, which implies the development of strategies by the parasite to modulate/suppress the host immune response (Dalton et al., 2013; Morphew et al., 2013). The parasite modulation of the host immune response is a serious obstacle to obtaining protective vaccines against *F. hepatica* in ruminants (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

In helminth infections, eosinophils play important roles either in developing tissue pathology (Cadman et al., 2014) and in the host effector response by releasing cytotoxic granule proteins and various lipid mediators (Klion and Nutman, 2004; Cadman et al., 2014). An effective response in rats infected with *F. hepatica* has been associated with a significant increase in eosinophil infiltration of the gut lamina propria in early post-infection stages (Van Milligen et al., 1998, 1999). In *F. hepatica* infected rats, peritoneal eosinophils producing very high levels of nitric oxide (NO) have been reported (Jedlina et al., 2011). In sheep, peritoneal eosinophils and macrophages, as well as mammary gland eosinophils from *Fasciola gigantica* resistant Indonesian thin-tail (ITT) sheep were able to kill juvenile *F. gigantica* in vitro by antibody-dependent cytotoxicity, but they did not kill larvae of *F. hepatica*, suggesting that eosinophils are important effector cells involved in the resistance of sheep to *F. gigantica* (Piedrafita et al., 2007). Previous studies have reported that bovine eosinophils incubated with bovine serum were unable to damage juvenile *F. hepatica*, but major basic protein (MBP) obtained from bovine eosinophils was able to kill juvenile *F. hepatica* at very low concentration (Duffus et al., 1980). Apoptosis of effector cells such as eosinophils has been reported as a mechanism of immunosuppression during helminth infections (Shin, 2000; Yan et al., 2008; Zepeda et al., 2010). It has been reported that *F. hepatica* induces eosinophil apoptosis in the hepatic inflammatory infiltrate in rats in vivo (Serradell et al., 2007). In vitro studies in the rat model have demonstrated that secreted excretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to induce apoptosis in eosinophils and peritoneal macrophages, suggesting that apoptosis in effector cells may play a role in the host immune evasion/suppression induced by *F. hepatica* infection (Serradell et al., 2007; Guasconi et al., 2012). Although the mechanisms of immune

modulation/suppression induced by *F. hepatica* are a serious obstacle to developing protective vaccines in ruminants (Molina-Hernández et al., 2015), to date, apoptosis has not been investigated in ruminants infected with *F. hepatica*. Several markers of apoptosis in tissue sections have been investigated, among them activated caspase-3 immunohistochemistry is considered an easy, sensitive, and reliable method for detecting and quantifying apoptosis in histological sections (Duan et al., 2003; Resendes et al., 2004). Transmission electron microscopy is also a useful technique to detect apoptotic cells and to identify eosinophils based on the morphological features of their cytoplasmic granules (Duffin et al., 2009) and it allow to evaluate ultrastructure of apoptotic eosinophils (Balic et al., 2006). The aim of the present work was to evaluate the presence and number of eosinophils undergoing apoptosis in hepatic inflammatory infiltrates from sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the migratory (8 and 28 days post-infection—dpi) and biliary stages of infection (17 weeks post-infection-wpi). Activated caspase-3 immunohistochemistry was used for quantifying eosinophil apoptosis and transmission electron microscopy was used to evaluate ultrastructure of apoptotic eosinophils.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Twenty 7-month-old female Merino-breed sheep were used for this study. All animals were obtained from a liver fluke-free farm. Animals were purchased at 1 month of age and housed indoors in the experimental farm of the University of Córdoba until they reached the appropriate age for challenge. All animals were tested monthly for parasite eggs by fecal sedimentation; the results were negative. In addition, all animals were tested for serum IgG specific for *F. hepatica* cathepsin L1 by ELISA prior to challenge and all of them were negative. The sheep were allocated into four groups of five animals each: groups 1, 2 and 3 were orally infected with one dose of 200 metacercariae (Ridgeway Research Ltd., Gloucestershire, UK); group 4 was used as the uninfected negative control. Animals were sacrificed by intravenous injection of thiobarbital at different stages of infection. Groups 1 and 2 were sacrificed at 8 and 28 days post-infection (dpi) and the animals of group 3 were sacrificed at 17 weeks post-infection (wpi). The experiment was approved by the Bioethics Committee of the University of

Cordoba (No. 1118) and was performed taking into account European (2010/63/UE) and Spanish (RD 1201/2005) directives on animal experimentation.

2.2. Histopathology and fluke burdens

At necropsy, the duodenum was ligated proximally and distally to the ductus choledochus (8–10 cm) and the liver was photographed on the visceral and diaphragmatic aspects for gross evaluation. Liver tissue samples showing hepatic lesions were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h, then routinely processed and embedded in paraffin wax. Four micron-thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathology. Fluke burden was conducted in animals from group 3 as follows: gallbladders were opened and flukes were recovered, then the bile ducts were carefully opened and flukes were removed with blunt forceps. Finally, the livers were cut into small pieces (1 cm³) and washed in hot water to collect the remaining flukes.

Hansel's stain was used in liver tissue sections to identify the presence of eosinophils. Two 4 µm-thick tissue serial sections were obtained. All these tissue sections were deparaffinized and dehydrated through a graded ethanol series. The first section was stained with Hansel's stain, the second by immunohistochemistry for active caspase-3. For Hansel's stain, tissue sections were incubated for 1 min with eosin, washed in distilled water and incubated for 1 min in methylene blue, then washed in distilled water, dehydrated and mounted.

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

Formalin-fixed, paraffin-embedded sections and the avidin-biotin-peroxidase method (Zafra et al., 2013b) were used for the IHC study. A polyclonal (pAb) rabbit anti-human caspase-3 anti-body (RP096, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) was used as a marker for apoptosis. The primary antibody reacts with cleaved activated caspase-3 but does not recognize full-length caspase-3 or other cleaved caspases; according to the manufacturer, this antibody cross-reacts with activated ovine caspase-3. Liver tissue

sections from 8 dpi in which apoptosis had been detected by transmission electron microscopy were used as positive controls.

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

For the ultrastructural study, fresh liver samples from groups 1, 2 and 4 were used. In groups 1 and 2, samples were collected from whitish tortuous tracts, cut into 1-mm cubes, fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. Thin sections (50 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined and photographed using a Jeol Jem1400 transmission electron microscope.

2.5. Gross lesions evaluation and cell counting

Gross pictures of livers were used to evaluate gross damage (hemorrhages and necrotic tracts at 8 and 28 dpi, and fibrosis and scars at 17 wpi) as reported Zafra et al. (2008) using the Image Pro6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). The perimeter of the diaphragmatic and visceral aspects of the liver was delineated and the total area obtained, then, the perimeter of the damaged areas was delineated and the area obtained. The percentage of damaged area was then expressed as mean value \pm SD per group.

Cell counting was carried out in 10 fields of 0.08 mm² per animal randomly selected at the periphery of necrotic foci (8 dpi), necrotic foci and granulomas (28 dpi) and inflammatory infiltrate surrounding large bile ducts with erosive cholangitis (17 wpi). Cell counting was carried out in tissue sections stained with Hansel's technique (eosinophils), and IHC (caspase-3+ eosinophils and apoptotic bodies). Results are given as mean \pm SD per group.

2.6. *Statistical analyses*

The Kolmogorov–Smirnov test was applied to decide whether distributions were parametric. Comparison between pairs of groups was made with the Mann–Whitney U test. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. *Gross pathology and fluke burdens.*

All control livers from group 4 showed no gross changes on either the diaphragmatic or visceral surface. Livers from group 1 showed numerous white spots with reddish spots and occasional whitish tortuous tracts ranging from 0.3 to 1 cm in length located on the liver surface, mainly on the diaphragmatic aspect of the left lobe. Livers from group 2 showed numerous whitish tortuous tracts ranging from 0.5 to 3 cm in length, whitish-grey patches ranging up to $1 \times 1 \times 2.5$ cm and occasional reddish spots, mainly involving the left lobe. Livers from group 3 showed enlarged, whitish gall bladders and bile ducts, which contained brown fluid and numerous adult flukes. Numerous tortuous greyish scars were found on the liver surface, mainly involving the left lobe. The percentage of damaged hepatic surface was 3.5 ± 1.2 at 8 dpi, 8.7 ± 2.3 at 28 dpi and 23.4 ± 6.7 at 17 wpi. The number of flukes in the five animals from group 4 was 54, 40, 41, 34 and 58 (mean 45.4 ± 10.14).

3.2. *Histopathological study.*

Livers from group 4 showed no histopathological changes. Portal spaces showed occasional lymphocytes, but eosinophils were not found in negative control livers. All animals from group 1 presented necrotic foci and focal hemorrhages mainly involving subcapsular areas. Necrotic foci showed abundant cell debris and mild to moderate infiltrates of eosinophils, often with pyknotic nuclei. Necrotic tracts started 0.5–1.5 mm behind migrating larvae. Livers from group 2 presented similar acute necrotic foci and tracts with eosinophil infiltration. In addition, the majority of necrotic foci were surrounded by a core of large activate macrophages and an outer layer of lymphocytes, plasma cells and eosinophils, conforming to the definition of a granuloma. Histopathological changes in the livers from group 3 were typical of chronic fasciolosis

Adult flukes were present within severely enlarged bile ducts often showing epithelial erosion, portal fibrosis and a variable amount of inflammatory infiltration, mainly composed of eosinophils, lymphocytes and plasma cells

3.3. Apoptosis detected by caspase-3 expression

Livers from negative control sheep (group 3) did not show caspase-3+ inflammatory cells. At 8 dpi, numerous inflammatory cells located at the periphery of necrotic foci, as well as cell debris (apoptotic bodies), expressed caspase-3, whereas the inflammatory infiltrate not associated with necrotic areas showed only occasional caspase-3+ inflammatory cells. The pattern of immunostaining was both cytoplasmic and nuclear. Serial sections stained with Hansel's technique allowed us to identify eosinophils (Figs. 1 and 2). The percentage of caspase-3+ eosinophils with respect to caspase-3– eosinophils at the periphery of necrotic foci was 46.1% and 53.9% at 8 and 28 dpi, respectively (Table 1), whereas at the periphery of granulomas, the percentage of caspase-3+ eosinophils was only 6% (Table 1). At 17 wpi, eosinophils located the inflammatory infiltrate surrounding some hyperplastic bile ducts, often containing adult flukes, showed numerous caspase-3+ cells (Fig. 3), whereas the inflammatory infiltrated not associated with enlarged bile ducts only showed occasional caspase-3+ cells.

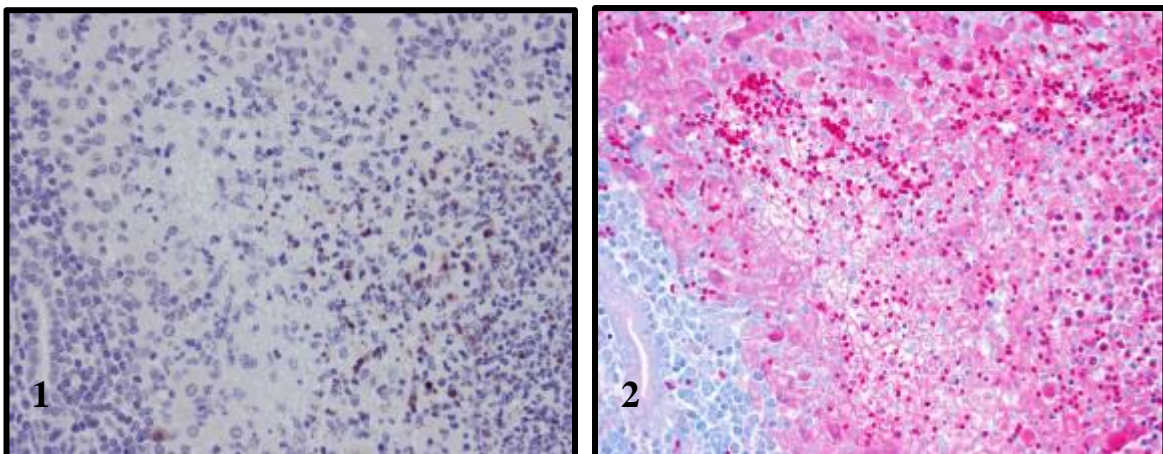


Fig. 1. Liver, 8 days post-infection. Caspase-3. Necrotic focus (N) showing cell debris and numerous inflammatory cells, many of them expressing caspase-3 (brown, arrow). Note a bile duct (B) with severe inflammatory infiltrate in the portal space negative for caspase-3 except for one cell (brown). ABC method, $\times 400$. **Fig. 2.** Liver, 8 days post-infection. Serial section of same area observed in Fig. 1. Note the bile duct (B) surrounded by a severe inflammatory infiltrate and a necrotic focus (N) with abundant cellular debris and moderate inflammatory infiltrate, the majority of cells with a red cytoplasm are eosinophils. Hansel staining, $\times 400$.

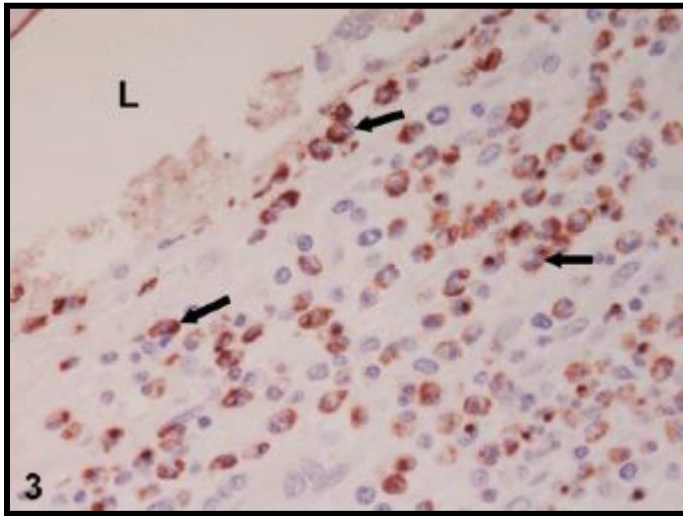


Fig. 3. Liver, 17 weeks post-infection. Detail of a bile duct showing the lumen (L) with lack of epithelium (erosive cholangitis) and numerous caspase-3+ cells in the associated inflammatory infiltrate. ABC method, $\times 400$.

Table 1.- Number of caspase-3+ eosinophils and apoptotic bodies in *F. hepatica* infected sheep at 8 days post-infection (dpi), 28 dpi and 17 weeks post-infection (wpi) and in negative control sheep. Results are expressed as mean \pm SD per field of 0.08 mm².

	8 dpi	28 dpi		17 wpi	controls
	NF	NF	Granulomas		
caspase-3 ⁺ eosinophils	10.6 \pm 1.8	13.7 \pm 5.7	1.3 \pm 1,0	17.3 \pm 7.8	0
caspase-3 ⁻ eosinophils	12.4 \pm 1.9	11.7 \pm 3.7	20.3 \pm 8.2	29.3 \pm 12.8	0
%caspase-3 ⁺ eosinophils	46.1	53.9	6.0	37.1	0
caspase-3 ⁺ A.B.	18.5 \pm 0.9	32.6 \pm 2.2	6.7 \pm 3.5	11.3 \pm 5.7	0

NF: necrotic foci; AB: apoptotic bodies. *Significant differences ($P < 0.05$) respect to 8 dpi. ‡Significant differences ($P < 0.05$) respect to NF at 8 and 28 dpi.

3.4. Apoptosis detected by transmission electron microscopy

The TEM study confirmed apoptosis in eosinophils in livers from groups 1 and 2. The ultrastructural features of eosinophils consist of a bilobed nucleus and typical cytoplasmic oval granules ranging from 0.5 to 1 μm in diameter with moderately electron dense matrix material and a highly electron dense crystalloid core (Fig. 4). Apoptotic TEM changes consisted of margination-condensation of chromatin (early changes) and cytoplasmic and nuclear fragmentation while maintaining cell membranes and organelles (Fig. 4).

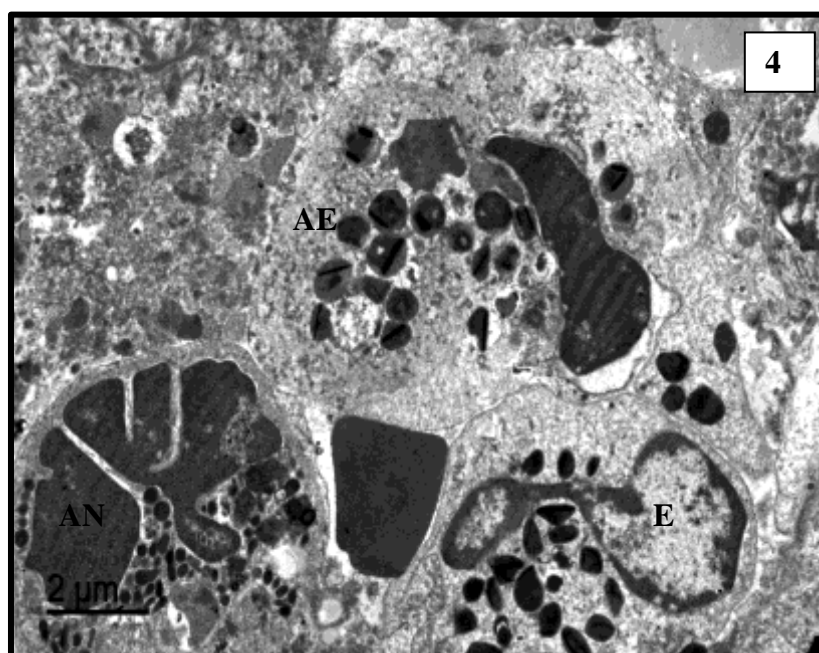


Figure 4. Liver, 8 days post-infection. Eosinophils showing normal ultrastructural features (E) and apoptotic eosinophils (AE) showing condensed, electron dense nuclei and typical granules with electron dense structures. An apoptotic neutrophil (AN) with a multilobed electron dense nucleus and typical round to oval electron dense cytoplasmic granules is also observed. Transmission electron microscopy. Bar = 2 μm .

4. Discussion.

Hansel's stain has been used to identifying and quantifying eosinophils in tissues (Nguyen et al., 2012). In the liver tissue sections examined in the present study, eosinophils were identified more easily using Hansel's stain than H&E staining. We used Hansel's stain as a counterstain for caspase-3 immunohistochemistry, but the dark

brown color of the immunostaining masked the bright red cytoplasmic granules of eosinophils and did not allow for the identification of this cell type, this is why we used serial sections.

Caspase-3 is an effector caspase that plays a crucial role during apoptosis, since it directly activates enzymes that are responsible for DNA fragmentation. Activated or cleaved caspase-3 has been used as a marker of apoptosis via immunohistochemistry in healthy tissues and in helminth-infected tissue sections (Resendes et al., 2004; Chen et al., 2008; Mkupasi et al., 2013). The absence of apoptotic inflammatory cells in non-infected control livers in the present study contrasts with the presence of apoptosis in healthy pig lymphoid tissues, and may be due to the small number of inflammatory cells present in the healthy sheep liver compared with those in lymphoid organs (Resendes et al., 2004).

In the present study, apoptotic eosinophils were also identified by TEM in liver samples at 8 and 28 dpi. Ultrastructurally, eosinophils were identified by the typical cytoplasmic granules with an electron dense core according to the features reported in human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. The condensation and fragmentation of the nucleus with an intact cytoplasmic membrane was found in apoptotic eosinophils in this work and has also been reported in TEM studies of human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. Apoptotic eosinophils attached to *Haemonchus contortus* in the gastric tip of sheep were degranulated (Balic et al., 2006); by contrast, in the present study, apoptotic eosinophils found in the liver during the migratory stage of *F. hepatica* contained typical granules. This finding suggests that during the migratory stage of *F. hepatica*, degranulation of eosinophils is not the cause of apoptosis.

During the migratory stage (8 and 28 dpi), acute necrotic foci and tracts were found behind migrating larvae, suggesting they induced hepatic necrotic tracts, in agreement with previous reports in sheep (Meeusen et al., 1995; Zafra et al., 2013a,b). The majority of apoptotic eosinophils were found in the periphery of these acute necrotic foci and tracts, while they were occasional in portal infiltrates and granulomas and inflammatory infiltrates not associated with necrotic foci or tracts. Moreover, in the chronic stage of infection (17 wpi), the majority of apoptotic eosinophils were found in the vicinity of large bile ducts, often containing adult flukes inside, and occasionally in

inflammatory infiltrates associated with granulomas, fibrotic chronic tracts or portal spaces with smaller bile ducts. This distribution of apoptotic eosinophils suggests that products released by migrating or adult *F. hepatica* may induce the local recruitment of eosinophils. It is possible that products released by *F. hepatica* induces eosinophil apoptosis, which is supported by in vitro studies reporting that the excretory products (ESP) of *F. hepatica* are able to induce apoptosis in rat eosinophils and macrophages (Serradell et al., 2007, 2009; Guasconi et al., 2012) and ESP from the trematode *Paragonimus westermani* are able to induce eosinophil apoptosis (Min et al., 2004). Alternatively, enzymes released by eosinophils may cause lytic necrosis and apoptosis, which is supported by the crucial role of eosinophil in mediating tissue damage and granuloma formation in *Schistosoma mansoni* (Silveira-Lemos et al., 2008). Further studies immunolocalizing ESP antigens from *F. hepatica* in hepatic tissue sections from infected sheep are required to confirm if *F. hepatica* ESP are able to induce apoptosis in sheep inflammatory cells.

Apoptosis of effector cells of the innate response such as eosinophils has been reported as a mechanism of local immunosuppression during helminth infections such as *P. westermani* (Shin, 2000; Min et al., 2004) and the cestode *Taenia solium* (Yanet et al., 2008) and *Taenia crassica* (Zepeda et al., 2010). In fasciolosis, eosinophils appear to play a crucial role in the effector host response; thus, an effective response in rats infected with *F. hepatica* has been associated with a significant increase in eosinophil infiltration of the gut lamina propria during early post-infection stages (Van Milligen et al., 1998, 1999). In *F. gigantica* resistant Indonesian thin-tail (ITT) sheep, peritoneal eosinophils and macrophages are able to kill juvenile *F. gigantica* in vitro by an antibody-dependent cytotoxicity mechanism dependent on NO production, but they do not kill the larvae of *F. hepatica*, suggesting that eosinophils are important effector cells involved in the resistance of sheep to *F. gigantica* (Piedrafita et al., 2007). The results of the present work revealed a high number of apoptotic eosinophils in acute necrotic foci at 8 and 28 dpi, while the number of apoptotic eosinophils decreased significantly in necrotic granulomas at 28 dpi. Since acute necrotic foci occur behind migrating larvae, and eosinophils are crucial effector of the effective host innate response, apoptosis of this effector cell may be an important mechanism used by *F. hepatica* larvae to evade the host innate response during the hepatic migratory stage in which the

parasites are more exposed to the host immune response than when they reach the biliary system.

In summary, the present work is the first report of eosinophil apoptosis during the migratory and biliary stages of *F. hepatica* infection in sheep. Eosinophil apoptosis was detected by active caspase-3 tissue expression and transmission electron microscopy, and it was found in a high number of eosinophils mainly located at the periphery of acute necrotic tracts during the migratory stage of infection, suggesting that this may be a mechanism by which the parasite evades the host response. Further studies are required to investigate the presence of apoptosis in other inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes as well as the presence of apoptosis in peritoneal inflammatory cells.

Acknowledgments

This work was supported by EU grants (FPVII-265862-PARAVAC, H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2009-08726. TEM studies were carried out by the Central Services for Research of the University of Córdoba (SCAI).

References

Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-115.

Cadman, E.T., Thyse, K.A., Bearder, S., Cheung, A.Y., Johnston, A.C., Lee, J.J., Lawrence, R.A., 2014. Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathog.* 10(3):e1003988. doi: 10.1371/journal.ppat.1003988.

Chen, K.M., Lee, H.H., Lai, S.C., Hsu, L.S., Wang, C.J., Liu, J.Y. , 2008. Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp.Parasitol.* 119, 385-390.

Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272-285.

Duan, W.R., Garner, D.S. Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme,E.A., 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 andcleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199,221–228.

Duffin, R., Leitch, A.E., Sheldrake, T.A., Hallett, J.M., Meyer, C., Fox, S., Alessandri, A.L., Martin, M.C., Brady, H.J., Teixeira, M.M., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2009. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. *FEBS Letters* 583, 2540-2546.

Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359-363.

Jedlina, L., Kozak-Lunggren, M., Wedrychowicz, H. 2011. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp. Parasitol.* 128, 291-297.

Klion, A.D. and Nutman, T.B., 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 30-37.

McManus, D.P. and Dalton, J.P., 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitol.*133, Suppl: S43-61.

Meeusen, E., Lee, C.S., Rickard, M.D., Brandon, M.R., 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17, 37-45.

Min, D.Y., Lee, Y.A., Ryu, J.S., Ahn, M.H., Chung, Y.B., Sim, S., Shin, M.H., 2004. Caspase-3-mediated apoptosis of human eosinophils by the tissue-invading helminth *Paragonimus westermani*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 133, 357-364.

Mkupasi, E.M., Sikasunge, C.S., Ngowi, H.A., Leifsson, P.S., Johansen, M.V., 2013. Detection of cysteine protease in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Vet. Parasitol.* 197, 360-363.

Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A, Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111.

Morphew, R.M., Hamilton, C.M., Wright, H.A., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Brophy, P.M., 2013. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by nonidet p40. *Vet. Parasitol.* 191, 379-385.

Nguyen, K.H., Suzuki, H., Wakasugi, T., Hohchi, N., Hashida, K., Kitamura, T., Shibata, M., 2012. Expression of epidermal growth factors, erbBs, in the nasal mucosa of patients with chronic hypertrophic rhinitis. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 74, 57-63.

Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N., Spithill, T.W., 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* 75, 1954-1963.

Resendes, A.R., Majo, N., Segales, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarias M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203-213.

Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., Masih, D.T., 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197-208.

Serradell, M.C., Guasconi, L., Masih, D.T., 2009. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 95-106.

Shin, M.H., 2000. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *Korean J. Parasitol.* 31, 17-23.

Silveira-Lemos, D., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Alves Oliveira, L.F., Costa-Silva, M.F., Matoso, L.F., de Souza, .LJ., Gazzinelli, A., Corrêa-Oliveira, R. 2008. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop.* 108:150-159.

Spithill, T.W., Smooker, P.M., Sexton, J.L., Bozas, E., Morrison, C.A., Creaney, J., Parsons, J.C., 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 377–401.

Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W. 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-27.

Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P., Bokhout, B.A., 1998. Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol.* 20, 285-292.

Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Bokhout, B.A., 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21, 243-251.

Yan, H.L., Xue, G., Mei, Q., Ding, F.X., Wang, Y.Z., Sun, S.H., 2008. Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin b1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 2151-2163.

Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martinez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Perez, J., 2013a. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *Comp. Pathol.* 148, 373-384.

Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Pacheco, I.L., Martinez-Moreno, A., LaCourse, E.J., Perally, S., Brophy, P.M., Perez, J., 2013b. Early hepatic and peritoneal

changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. Res. in Vet. Sci. 94, 602-609.

Zepeda, N., Solano, S., Copitin, N., Fernandez, A.M., Hernandez, L., Tato, P., Molinari, J.L., 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. Parasitol. Res. 107, 1129-1135.

SEGUNDO TRABAJO

A. Escamilla, R. Pérez-Caballero, R. Zafra, M.J. Bautista, I.L. Pacheco, M.T. Ruiz, S. Martínez-Cruz, A. Martínez-Moreno, V. Molina-Hernández, J. Pérez. 2017. Vet. Parasitol. 238, 49-53.

Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep

Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep

**A. Escamilla^a, R. Pérez-Caballero^b, R. Zafra^b, M.J. Bautista^a, I.L. Pacheco^a,
M.T. Ruiz^a, M^a S. Martínez-Cruz, A. Martínez-Moreno^b, V. Molina-Hernández^c,
J. Pérez^a.**

^aDepartment of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Córdoba, Spain

^bDepartment of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine,
University of Córdoba, Spain.

^cSchool of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK.

Corresponding author:

José Pérez,

Dep. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas

Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396

14014 Córdoba, Spain

Tel: +34 957218178, Fax: +34 957218682

e-mail: an1pearj@uco.es

Abstract:

Several immunomodulatory properties have been described in *Fasciola hepatica* infections. Apoptosis has been shown to be an effective mechanism to avoid the immune response in helminth infections. The aim of the present work was to study apoptosis in peritoneal leucocytes of sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the early stages of infection. Five groups (n=5) of sheep were used. Groups 2–5 were orally infected with 200 metacercariae (mc) and sacrificed at 1, 3, 9 and 18 days post-infection (dpi), respectively. Group 1 was used as the uninfected control (UC). Apoptosis was detected using three different methods: 1) immunocytochemistry (ICC) with a polyclonal antibody anti-active caspase-3; 2) an annexin V flow cytometry assay using the Annexin V-FITC/propidium iodide (PI); and 3) transmission electron microscopy (TEM). The differential leucocyte count revealed that the majority of peritoneal granulocytes were eosinophils, which increased significantly at 9 and 18 dpi with respect to the uninfected controls. The ICC study revealed that the percentage of caspase-3⁺ apoptotic peritoneal leucocytes increased significantly from 3 dpi onwards with respect to the uninfected controls. The flow cytometry annexin V assay detected a very significant (P<0.001) increase of apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes, which remained higher than in the UC until 18 dpi. Transmission electron microscopy studies also confirmed the presence of apoptosis in peritoneal eosinophils at 18 dpi. This is the first report of apoptosis induced by *F. hepatica* in the peritoneal leucocytes of sheep *in vivo*. The results of this work suggest the importance of apoptosis induction for the survival of the juvenile parasites in the peritoneal migratory stages of infection.

Key words: apoptosis; caspase-3; annexin-V; peritoneal leucocytes; *Fasciola hepatica*; sheep.

1. Introduction

During the migration of juvenile *Fasciola hepatica* through the peritoneal cavity, until their penetration into the hepatic parenchyma, the parasites secrete different molecules which interact with peritoneal leucocytes in different ways. Since it has been reported that the protective response against *F. hepatica* occurs during the early stages of infection, it would be of interest to study mechanisms of immunomodulation in target species at the peritoneal and early hepatic migratory stages. *In vitro* studies in the rat model demonstrated that secreted excretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to

induce apoptosis in eosinophils and peritoneal macrophages, suggesting that apoptosis of effector cells may play a role in the host immune evasion/suppression induced by *F. hepatica* infection (Serradell et al., 2007; Guasconi et al., 2012). In vivo studies in sheep have also revealed apoptosis of eosinophils in hepatic lesions both during acute and chronic stages of infection (Escamilla et al., 2016). To date, apoptosis of peritoneal inflammatory cells from sheep infected with *F. hepatica* in vivo has not been reported. Several markers of apoptosis in tissue sections have been investigated, among them activated caspase-3 immunohistochemistry is considered an easy, sensitive and reliable method for detecting and quantifying apoptosis in histological sections (Duan et al., 2003; Resendes et al., 2004). The annexin V/PI assay has also been used by several authors to evaluate the apoptosis phenomenon (Serradell et al., 2007; Chen et al., 2013).

The aim of the present work was to evaluate the presence and number of inflammatory peritoneal cells undergoing apoptosis in peritoneal fluid from sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the earlier peritoneal migratory stages (0, 1, 3, 9 and 18 days post-infection, dpi). Annexin V/PI flow cytometry and activated caspase-3 immunocytochemistry were used to quantify peritoneal inflammatory cell apoptosis, and transmission electron microscopy was used to evaluate the ultrastructure of apoptotic inflammatory cells.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Twenty-five 7-month-old female Merino sheep were used for this study. All animals were obtained from a liver fluke-free farm, and they were tested for *Fasciola* eggs by faecal sedimentation with negative results. They were allocated into five groups of five animals each: group 1 was used as an uninfected control (UC) group and groups 2–5 were orally infected with one dose of 200 *F. hepatica* metacercariae (Ridgeway Research Ltd., UK) administrated in gelatine capsules with a dosing gun. Sheep in groups 2–5 were sacrificed by an intravenous injection of thiobarbital at 1, 3, 9, and 18 days post-infection (dpi), respectively. The experiment was approved by the Bioethical Committee of the University of Córdoba (No. 1118) and was performed taking into account European (2010/63/UE) and Spanish (RD 1201/2005) directives on animal experimentation.

2.2. *Peritoneal cell populations*

Peritoneal washing was conducted immediately after the animals were euthanised following the methodology described by Zafra et al. (2013). Briefly, the abdominal cavity was washed with 60 ml sterile phosphate buffer saline (PBS) with 6 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pre-heated to 37°C. After a softly massaging for 1 min, 40 ml peritoneal fluid were recovered and centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the supernatant was eliminated. Subsequently, cellular pellets were resuspended using the afore-mentioned medium. Diff-Quick stained smears were used for differential cell count. A total of 600 cells per animal were counted and the percentage of eosinophils, lymphocytes, macrophages and neutrophils was obtained. Epithelial cells were not included in the cell counting. Extensions were manually performed in Vectabond-treated slides. After air drying, these extensions were fixed using acetone for 5 min and stored at -80°C for immunocytochemical studies.

2.3. *Immunocytochemistry*

A polyclonal rabbit anti-human caspase-3 antibody, (cat. No.RP096, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) was used. The primary antibody reacts with cleaved activated caspase-3 but does not recognise full-length caspase-3 or other cleaved caspases. According to the manufacturer, this antibody cross-reacts with activated ovine caspase-3. The avidin-biotin-peroxidase method (Zafra et al., 2013) was used for the immunocytochemical study. Briefly, defrosted peritoneal fluid smears were fixed in acetone for 10 min, and the endogenous peroxidase activity was quenched in H₂O₂ in methanol for 15 min, with agitation at room temperature (RT). Smears were washed for 10 min in PBS, and then they were incubated in PBS with 5% normal goat serum for 30 min at RT. Anti-caspase-3 antibody 1:100 was applied overnight at 4°C. After three 10 min rinses in PBS-T (PBS buffer with 0.1% Tween-20 detergent), a goat anti-rabbit immunoglobulin serum (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 was applied for 30 min as a secondary antibody. As the third reagent, an avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) was applied for one hour. Labelling was visualised by application of the NovaRED™ substrate kit (Vector Laboratories). Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin, dehydrated and mounted. In negative control slides, specific primary antibody was substituted with non-immune rabbit serum.

2.4. Cell counting from immunocytochemistry

Immunoreactive cells were counted using the Image Pro-plus software 6.0 (Media Cybernetics). Caspase-3⁺ and caspase-3⁻ peritoneal leucocytes were counted in 10 fields of 0.08 mm² per animal randomly selected from the smears. In animals with small numbers of peritoneal leucocytes, at least 300 cells per animal were counted. Results are given as mean \pm SD per group.

2.5. Annexin V flow cytometry assay

Cell density of peritoneal fluid pellets was adjusted to $2-5 \times 10^5$ cells/ml. Annexin V Kit (ANNEX100F, AbD Serotec-Bio-Rad Company- UK) for flow cytometry was used. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were suspended in 200 μ l of binding buffer. Then, 5 μ l of Annexin V-FITC was added to 195 μ l of the cell suspension mentioned before. This suspension was mixed and incubated for 10 min in darkness at RT. Subsequently, the suspension was washed in 200 μ l of pre-diluted (at 1:4) binding buffer. Next, the cells were resuspended again in 190 μ l of pre-diluted binding buffer. Finally, 10 μ l of propidium iodide solution was added to this suspension, and the samples were ready to analyse by flow cytometry. For a positive control, the cells were incubated with 3% formaldehyde in buffer for 30 min on ice. Then the formaldehyde was washed away, and the cells were resuspended in cold binding buffer and processed as a normal sample. A CyFlow Cube 6 cytometer (SysmexPartec, Germany) and specific protocol based on morphological features (forward scatter/side scatter) were used to determine the leucocyte populations in the peritoneal fluid. The apoptotic cells were identified because of the reactivity of fluorochrome (FL1 for Annex V and FL3 for propidium iodide). Peritoneal leucocytes were differentiated as viable (annexin V-negative and PI-negative) and apoptotic (annexin V-positive, PI-negative). The extent of apoptosis was expressed according to the percentage of each cell population that was apoptotic or viable. The results were analysed using the Flowing Software (University of Turku, Finland). Ten thousand events were acquired, and the total number of apoptotic cells versus viable cells were counted and expressed as percentages of the total number of peritoneal leucocytes acquired.

2.6. Transmission electron microscopy

For the ultrastructural study, fresh peritoneal cellular pellet samples from UC and 18 dpi groups were used. The remaining groups were not included in the TEM study because the pellet samples were too small for the ICC, flow cytometry and TEM studies. Peritoneal cell pellets were centrifuged at 1500 rpm for 10 min (4°C), cut into 1–3 mm cubes, fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. Thin sections (50 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined and photographed using a Jeol Jem 1400 transmission electron microscope at the Central Research Services (SCAI) of the University of Córdoba.

2.7. Statistical analysis

For the statistical analysis, the GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) was used. For each time-point of the experiment the expression of caspase-3 and Annexin V positive cells was compared using the one-way ANOVA test followed by the Tukey post hoc test for multiple comparisons of means. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Peritoneal leucocyte populations

The differential cell count for peritoneal leucocyte populations is given in Table 1. In the UC group and at 1 and 3 dpi, macrophages followed by lymphocytes were the two more abundant peritoneal leucocytes, with occasional neutrophils and eosinophils. At 9 dpi, a significant increase in eosinophils and a significant decrease in macrophages with respect to the UC group were observed, while the percentage of lymphocytes did not change significantly. At 18 dpi, the increase in the percentage of eosinophils and decrease in the percentage of macrophages with respect to the UC group was even more pronounced than at 9 dpi. The percentage of lymphocytes tended to decrease at 18 dpi with respect to the UC group, but the differences were not significant. Neutrophils were occasionally present in all groups and did not change significantly with respect to the UC group.

Table 1. Percentage of peritoneal leucocytes (mean±SD) in uninfected control and *Fasciola hepatica* infected sheep during early stages of infection.

Percentage of peritoneal leucocytes (%)				
Group	Lymphocytes	Macrophages	Neutrophils	Eosinophils
UC	36.4±14.0	60.0±14.7	1.1±2.0	2.7±1.1
1 dpi	35.4±15.8	61.4±28.0	1.9±2.7	1.4±2.2
3 dpi	44.2±11.8	53.3±11.6	0.3±0.5	2.3±2.7
9 dpi	40.6±18.2	32.1±5.6*	2.9±2.7	24.3±11.7*
18 dpi	24.1±9.5	25.8±8.9*	0.5±1.1	49.3±14.1*

UC: uninfected control.

* Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

3.2. Apoptosis detected by caspase-3 expression

Immunolabelling with the anti-caspase-3 antibody was detected as a cytoplasmic and nuclear reddish-brownish colour (Fig. 1). The percentage of peritoneal leucocytes expressing caspase-3 is given in Table 2. Cellular pellets from peritoneal leucocytes from the UC group showed occasional caspase-3+ cells (0.4 ± 0.6). At 1 dpi the percentage of peritoneal leucocytes caspase-3+ was 1.2 ± 1.3 without a significant difference from the UC group. However, at 3, 9 and 18 dpi the percentage of caspase-3+ leucocytes was 19.5 ± 5.5 , 19.9 ± 4.0 and 42.6 ± 4.3 , respectively, with statistical increase with respect to the UC group, and also between the 18 dpi group and the 3 and 9 dpi groups (Table 2).

Table 2. Results from immunocytochemistry of peritoneal leucocytes expressed in percentage of caspase 3 positive and negative cells in each day post-infection (dpi). Results expressed as mean ± SD per group.

	UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Caspase 3⁺	0.4±0.6	1.2±1.3	19.5±5.5*	19.9±4.0*	42.6±4.3*§
Caspase 3⁻	99.6±0.6	98.8±1.3	80.5±5.5*	80.0±4.0*	57.4±4.3*§

UC: uninfected control.

* Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

§ Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control, 1, 3 and 9 dpi groups.

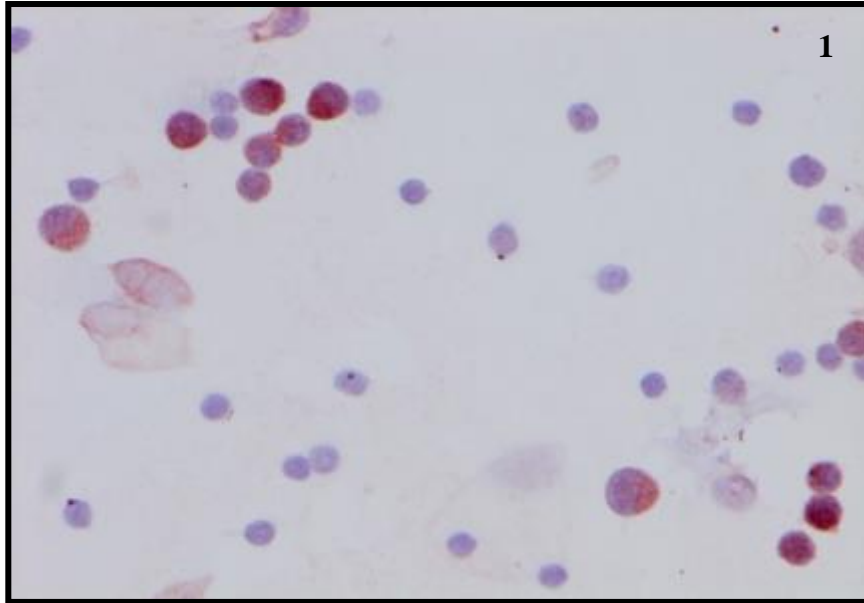


Figure 1. Peritoneal smear, 3 dpi. Caspase 3 expression is observed as brown cytoplasmic and nuclear colour in peritoneal leucocytes (arrow) whereas other are negative (arrowheads). E: epithelial cell. ABC method-haematoxylin counterstain, x400.

3.3. Annexin V flow cytometry assay

The percentages of apoptotic and viable peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes are summarised in Table 3. Peritoneal leucocyte populations (macrophages, lymphocytes and granulocytes) were determined according to their morphological features. The UC group showed a very low percentage of apoptotic macrophages (1.7%), lymphocytes (0.4%) and granulocytes (1.5%). At 1 dpi the percentage of apoptotic leucocytes suffered a dramatic and significant increase compared to the UC group: 37.8%, 28.2% and 30.7% for macrophages, lymphocytes and granulocytes, respectively. At 3, 9 and 18 dpi the percentage of apoptotic peritoneal macrophages and lymphocytes remained significantly higher with respect to the UC group but it decreased at 18 dpi with respect to previous infection stages (Table 3). In contrast, the percentage of apoptotic granulocytes tended to increase at 3 dpi with respect to 1 dpi, suffered a transient decrease at 9 dpi when migrating larvae reached the liver, and again increased up to 80% at 18 dpi (Table 3).

Table 3. Percentage of non-apoptotic and apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes according to the annexin V flow cytometry assay. Results are expressed as mean \pm SD per group.

Cell population	Stage	Time post-infection				
		UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Macrophages	NA	98.5 \pm 0.9	62.2 \pm 11.1*	76.5 \pm 6.7*	75.0 \pm 2.0*	89.7 \pm 2.7*
	A	1.5 \pm 0.9	37.8 \pm 11.1*	23.5 \pm 6.7*	25.0 \pm 2.0	10.3 \pm 2.7*
Lymphocytes	NA	99.6 \pm 0.4	71.8 \pm 11.4*	77.4 \pm 11.4*	82.1 \pm 1.4*	95.3 \pm 1.4*
	A	0.4 \pm 0.4	28.3 \pm 11.4*	22.6 \pm 11.4*	17.8 \pm 1.4*	4.7 \pm 1.4*
Granulocytes	NA	98.5 \pm 1.6	69.3 \pm 6.7*	53.6 \pm 12.0*	81.9 \pm 4.3*	20.0 \pm 6.0*
	A	1.5 \pm 1.6	30.7 \pm 6.7*	46.4 \pm 12.0*	18.1 \pm 4.3*	80.0 \pm 6.0*

UC: Uninfected control; N: Non-apoptotic cells; A: Apoptotic cells.

* Significant difference ($P < .05$) compared to the uninfected control group.

3.4. Apoptosis detected by transmission electron microscopy

The TEM study confirmed apoptosis in peritoneal eosinophils from 18 dpi. The ultrastructural features of eosinophils from the UC group consist of a bilobed nucleus and typical cytoplasmic oval granules ranging from 0.5 to 1 μ m in diameter with a moderately electron dense matrix material and a highly electron-dense crystalloid core. Apoptotic TEM changes consisted of margination-condensation of chromatin (early changes) and cytoplasmic and nuclear fragmentation while maintaining cell membranes and organelles (Fig. 2). Macrophages from the 18 dpi group showed morphological changes typical of phagocytic activation such as large cytoplasmic vacuoles containing membrane debris (secondary lysosomes) and enlarged rough endoplasmic reticulum, but nuclear fragmentation indicative of apoptosis was not observed in this cell type.

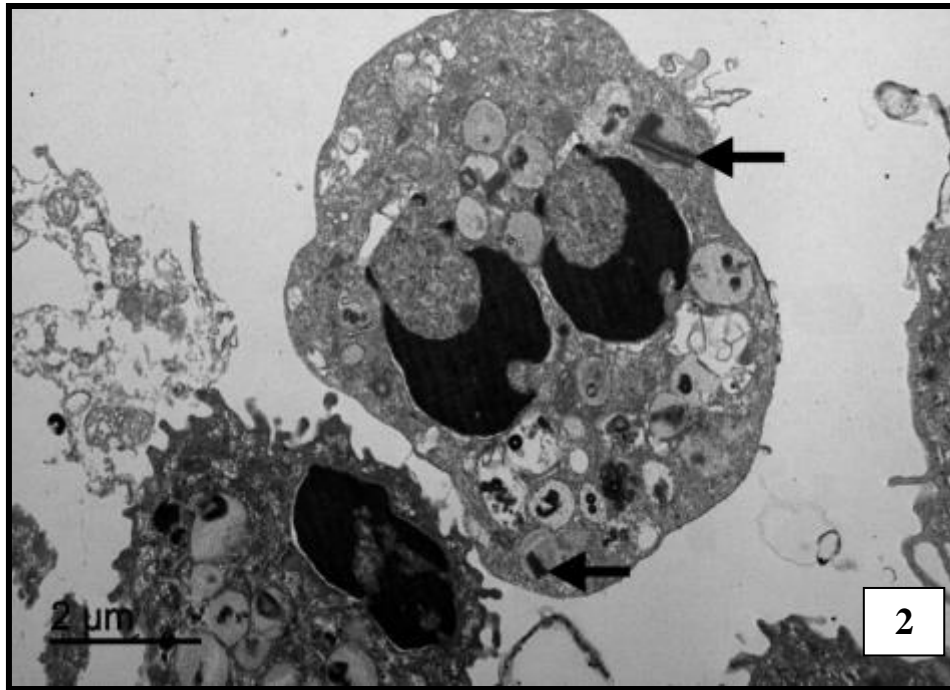


Figure 2. 18 dpi. Apoptotic peritoneal eosinophil showing fragmented and condensed nuclei and typical cytoplasmic granules (arrows). Transmission electron microscopy. Bar = 2 μ m.

4. Discussion

To study apoptosis in peritoneal leucocytes, it is necessary to first evaluate the differential peritoneal leucocyte count during the course of *F. hepatica* infection. In the UC group, the majority of peritoneal leucocytes consisted of macrophages and lymphocytes with only 1.5% eosinophils. These results agree with those from uninfected control goats (Zafra et al., 2013). The relative increase in the percentage of peritoneal eosinophils and the decrease of the percentage of macrophages and lymphocytes found during the course of the infection was also reported in *F. hepatica* infected goats at 7–9 dpi (Zafra et al., 2013).

The results presented in this study show that *F. hepatica* infection induces apoptosis of peritoneal leucocytes in sheep from 1 dpi onwards. The annexin V assay is based on phosphatidylserine (PS) emergence on the outer plasma membrane, an early event in apoptosis, PS binds with high affinity to the anticoagulant annexin V that is visualised by fluorescence microscopy or flow cytometry (Serradell et al., 2009). Activated or cleaved caspase-3 has been used as a marker of apoptosis by immunohistochemistry in

healthy tissues (Resendes et al., 2004) and in helminth infected tissue sections (Chen et al., 2008; Escamilla et al., 2016). In the UC group, caspase-3 expression and the annexin V assay showed similar results with a low percentage (0.4–1.7%) of apoptotic peritoneal leucocytes. However, at the very early stages of infection (1dpi) the annexin V assay detected a higher percentage of apoptosis (37.8%, 28.2% and 30.7% for macrophages, lymphocytes and granulocytes, respectively) whereas caspase-3 expression was found only in 1.2% of peritoneal leucocytes. These results suggest that the annexin V assay can detect apoptosis earlier than caspase-3 expression. When the infection progressed (3, 9 and 18), the percentage of apoptotic peritoneal leucocytes detected by caspase-3 and annexin V was similar. In the present study, TEM studies confirmed apoptosis of eosinophils at 18 dpi by the ultrastructural features: cytoplasmic granules with an electron dense core which were similar to that reported in human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. The condensation and fragmentation of the nucleus with an intact cytoplasmic membrane found in apoptotic eosinophils in this work has also been reported in TEM studies of human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006; Escamilla et al., 2016) eosinophils. Compared to caspase-3 and annexin V, TEM studies were less useful to quantify the percentage of apoptotic leucocytes due to the small amount of sample examined.

It has been reported that excretory secretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to induce apoptosis of rat eosinophils and macrophages in vitro (Serradell et al., 2007, 2009; Guasconi et al., 2012). In vivo studies in sheep infected with *F. hepatica* have also revealed apoptosis of eosinophils in hepatic lesions during early stages of infection (9 dpi) and in chronic hepatic lesions (Escamilla et al., 2016). The evaluation of the percentage of leucocytes suffering apoptosis in areas where the migratory larvae of *F. hepatica* are located is necessary to understand the importance of this phenomenon as a modulatory mechanism to avoid the host response against migrating larvae. In a previous study in the liver, 46.1% and 53.9% of eosinophils located in the periphery of necrotic tracts and foci at 8 and 28 dpi, respectively, were apoptotic (Escamilla et al., 2016). Similarly in the present study, a dramatic increase of apoptotic macrophages, lymphocytes and granulocytes were found at 1 dpi with respect to the UC group. These results suggest that *F. hepatica* migratory larvae are able to induce a rapid apoptosis of peritoneal leucocytes which may allow the larvae to migrate through the peritoneum evading the host response.

In summary, the present work is the first report of apoptosis in peritoneal leucocytes during the peritoneal migratory stages of *F. hepatica* infection in sheep in vivo. The dramatic increase in apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes found at 1 dpi with respect to the UC group suggests that *F. hepatica* migratory larvae are able to induce apoptosis of important percentage of peritoneal effector cells such as macrophages and eosinophils, as well as lymphocytes, allowing the larvae to migrate through the peritoneal cavity evading the host response. The knowledge of apoptotic mechanisms induced by *F. hepatica*, and the parasite molecules involved in apoptosis induction, are important in order to potentially include them in vaccine candidates to improve vaccine efficacy against this parasite.

Acknowledgments

This work was supported by EU grants (H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2015-67023-C2-1-R. The TEM studies were carried out by the Central Research Services (SCAI) of the University of Córdoba.

Appendix A. Supplementary data

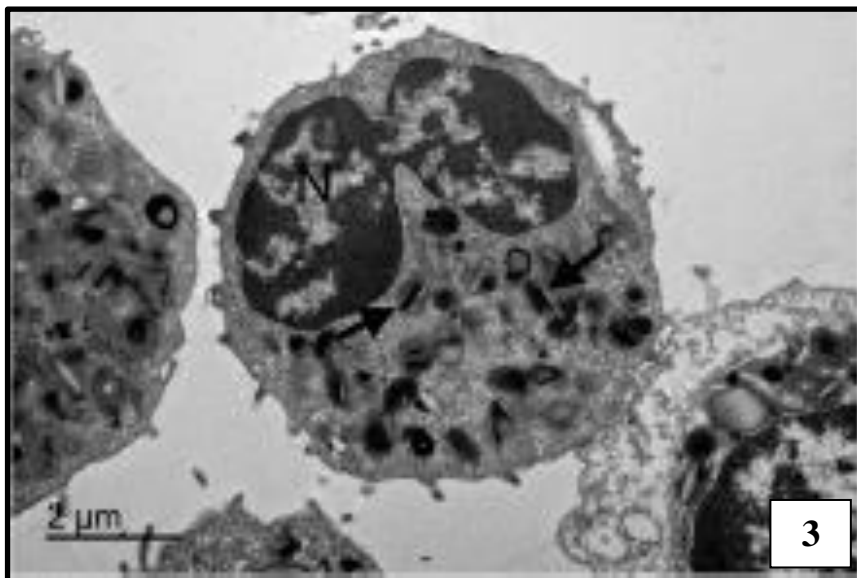


Figure 3. 18 dpi. Apoptotic peritoneal eosinophil showing fragmented and condensed nuclei and typical cytoplasmic granules (arrows). Transmission electron microscopy. Bar = 2 μ m.

References

Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-115.

Chen, K.M., Lee, H.H., Lai, S.C., Hsu, L.S., Wang, C.J., Liu, J.Y., 2008. Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp. Parasitol.* 119, 385-390.

Chen, X., Li, S., He, L., Wang, X., Liang, P., Chen, W., Bian, M., Ren, M., Lin, J., Liang, C., Xu, J., Wu, Z., Li, X., Huang, Y., Yu, X., 2013. Molecular characterization of severin from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products and its potential anti-apoptotic role in hepatocarcinoma PLC cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(12): e2606.

Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A. 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199, 221-228.

Duffin, R., Leitch, A.E., Sheldrake, T.A., Hallett, J.M., Meyer, C., Fox, S., Alessandri, A.L., Martin, M.C., Brady, H.J., Teixeira, M.M., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2009. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. *FEBS Letters* 583, 2540-2546.

Escamilla, A., Bautista, M.J., Zafra, R., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martinez-Cruz, S., Méndez, A., Martinez-Moreno, A., Molina-Hernandez, V., Perez, J., 2016. *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 216, 84-88.

Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359-363.

Resendes, A.R., Majo, N., Segales, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarias M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203-213.

Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., Masih, D.T., 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197-208.

Serradell, M.C., Guasconi, L., Masih, D.T., 2009. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 95-106.

Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martinez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Perez, J. 2013. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 94-602-609.

TERCER TRABAJO

A. Escamilla, R. Zafra, J. Pérez, T.N. McNeilly, I.L. Pacheco, L. Buffoni, F.J. Martínez-Moreno, V. Molina-Hernández, A. Martínez-Moreno. 2016. Vet. Parasitol. 230, 14-19.

Distribution of Foxp3⁺ T cells in the Liver and Hepatic Lymph Nodes of Goats and Sheep Experimentally Infected with *Fasciola hepatica*

Distribution of Foxp3+ T cells in the Liver and Hepatic Lymph Nodes of Goats and Sheep Experimentally Infected with *Fasciola hepatica*

A. Escamilla^a, R. Zafra^a, J. Pérez^a, T.N. McNeilly^b, I.L. Pacheco^a, L. Buffoni^c, F.J. Martínez-Moreno^c, V. Molina-Hernández^d, A. Martínez-Moreno^c

^a Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain.

^b Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik EH26 OPZ, UK.

^c Department of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain.

^d School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK.

Corresponding author:

A. Martínez-Moreno,

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología), Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz, km 396, 14014 Córdoba, Spain

Phone: +34957 218721

Email: amm@uco.es

Abstract

Foxp3 regulatory T cells (Tregs) are now considered to play a key role in modulation of immune responses during parasitic helminth infections. Immunomodulation is a key factor in *Fasciola hepatica* infection; however, the distribution and role of Foxp3⁺ Tregs cells have not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants. The aim of this study was to evaluate the presence of Foxp3⁺ Tregs in the liver and hepatic lymph nodes from experimentally infected sheep and goats during acute and chronic stages of infection. Three groups of goats (n=6) and three groups of sheep (n=6) were used in this study. Goats in groups 1-2 and sheep in groups 4-5 were orally infected with metacercariae of ovine origin. Groups 1 and 4 were killed during the acute stage of the infection, at nine days post infection (dpi); groups 2 and 5 were killed during the chronic stage, at 15 and 19 weeks post infection respectively (wpi). Groups 3 (goats) and 6 (sheep) were left as uninfected controls. Fluke burdens and liver damage were assessed and the avidin–biotin–complex method was used for the immunohistochemical study. At nine dpi in acute hepatic lesions, the number of both Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes increased significantly in goats and sheep. In the chronic stages of infection (15-19 wpi), the number of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes were also significantly increased with respect to control livers, particularly in portal spaces with severely enlarged bile ducts (response to adult flukes) while the increase was lower in granulomas, chronic tracts and smaller portal spaces (response to tissue damage). Foxp3⁺ Tregs were increased in the cortex of hepatic lymph nodes of sheep (chronic infection) and goats (acute and chronic infection). The estimated proportion of T cells which were Foxp3⁺ was significantly increased in the large bile ducts and hepatic lymph node cortex of chronically infected goats but not sheep. This first report of the expansion of Foxp3⁺ Tregs in acute and chronic hepatic lesions in ruminants suggests that these cells may be involved in both parasite survival and modulation of hepatic damage. Future studies should be focused on the investigation of parasite molecules and cytokines involved in this process.

Keywords: *Sheep; goat; Foxp3; immunohistochemistry; Fasciola hepatica*

1. Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* is an economically important disease of ruminants in temperate climates. *Fasciola hepatica* has developed a variety of mechanisms to modulate or suppress the host response making it ineffective, which allows the parasite to survive in the host for years (Dalton et al., 2013) and became a serious obstacle in creating protective vaccines for ruminants (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

Several cell types, such as B cells (Bregs), macrophages and T cells (Tregs) can induce immune suppression in helminth infections; however, Foxp3⁺ Tregs are considered the most prominent immunoregulatory cells during infection (Taylor et al., 2012).

Foxp3⁺ regulatory T cells represent a lymphocyte subset with an important role in the maintenance of immune system homeostasis (Belkaid, 2007). They can suppress the immune response to self-antigens and prevent autoimmune diseases, but they can also control the immune responses to parasites and fungi (Adalid-Peralta, 2011). Therefore, Tregs have a crucial role in immune responses by limiting immunopathology associated with anti-pathogen immune responses, but they can also be beneficial to the pathogen through subversion of the host protective immune response (Belkaid, 2007; Adalid-Peralta, 2011).

A variety of helminths (Finney et al., 2007; McNeilly et al., 2013) induce Foxp3⁺ Treg cell expansion to suppress or modulate immune responses allowing them to survive for long periods in the host. Parasite-induced Foxp3⁺ Tregs cells also play a role in controlling immune pathology; thus, in infections with the trematode *Schistosoma mansoni*, the severity of egg-induced liver pathology was negatively correlated with the number of Foxp3⁺ Tregs in the liver (Watanabe et al., 2009).

To date, the distribution and role of Foxp3⁺ Tregs has not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants, although it has been suggested that they may play a role in immunomodulation caused by *F. hepatica* (Dalton et al, 2013). The aim of this study was to evaluate the presence of Foxp3⁺ Tregs in liver and hepatic lymph nodes (HLN) from experimentally infected sheep and goats during acute and chronic stages of infection.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Eighteen six-month-old male Malagueña goats and 18 six-month-old Merino sheep were used in this study. Animals were obtained from a liver fluke-free farm: they were housed indoors and faecal sedimentation tests were conducted to ensure that animals were free of internal parasites. Before the experiment, an ELISA was carried out to detect antibodies specific for *F. hepatica* cathepsin L1, and the results were negative for all animals. Animals were distributed into treatment groups as shown in Table 1. The experiment was approved by the Bioethical Committee of the University of Cordoba (No. 7119 and No. 1118), and it was carried out taking into account European (86/609/CEE) and Spanish (RD 223/1988) directives for animal experimentation.

2.2. Fluke burdens and histopathology

All animals were necropsied, the duodenum was tied proximally and distally to the bile duct (a length of 8 to 10 cm), the liver was removed and the visceral and diaphragmatic aspects were photographed for gross evaluation. Hepatic lymph nodes (HLN) were weighed and results expressed in $g \pm$ standard deviation (SD) per group. Samples were collected from HLN and affected areas of the liver. Four samples were collected from the left liver lobe and one from the right lobe as the left lobe consistently had more lesions, presumably due to its close proximity to the duodenum. All the samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and routinely processed and embedded in paraffin wax for histopathology. Four micrometre thick tissue sections were stained with haematoxylin and eosin for histopathology. A quantitative estimation of liver damage was carried out: in the acute stages of infection, the total number of gross hepatic lesions was counted in each animal using Image Pro- plus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) and results expressed as mean \pm SD per group. In the chronic stages of infection, the percentage of affected liver surface was calculated as described previously (Zafra et al., 2013).

In groups 1 and 4 (chronic stages of infection) fluke burdens were assessed. The gallbladder and major biliary ducts were opened and flukes were recovered. Then, the bile ducts were opened and flukes were removed with blunt forceps. Finally, the livers were cut into small pieces (1 cm²) and washed in hot water to collect the remaining flukes.

2.3. Immunohistochemistry

The avidin–biotin–complex method described by Zafra et al. (2013) was used for the immunohistochemical study. Four- μ m serial sections were used for CD3 and Foxp3 antibodies. The anti-mouse/rat Foxp3 monoclonal antibody (clone FJK-16s, rat IgG2a, eBioscience Inc. San Diego, CA, USA) diluted 1:100 in PBS containing 10% normal goat serum, and the rabbit anti-human CD3 (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in PBS containing 10% normal goat serum, were applied overnight at 4°C. The Foxp3 mAb has been shown to cross react with Foxp3 in sections of formalin-fixed sheep tissues (McNeilly et al., 2013). Serial sections were used for Foxp3 and CD3 antibodies. A biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin serum (Dako) diluted 1:200 was applied as the secondary antibody for the CD3 slides, whereas a biotinylated goat anti-rat immunoglobulin (Dako) diluted 1:200 in PBS was applied as the secondary antibody for the Foxp3 slides. The avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories) diluted 1:50 was finally applied and after washed, tissue sections were incubated with NovaRED™ substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA), rinsed in tap water, lightly counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted with DPX (Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Specific primary antibodies were substituted with PBS or non-immune isotype-matched sera as the negative control. Lymph node sections from uninfected goats and sheep were used as positive controls.

2.4. Cell counting

Immunoreactive cells were counted using Image Pro-plus 6.0 software (Media Cybernetics). The software was calibrated for labelling intensity and cell size to include all immunolabelled cells. Photomicrographs (0.16 mm² each) from each animal were

used for cell counting. In negative control livers (groups 3 and 6), 10 photomicrographs were selected randomly from portal areas for cell counting. In chronic infection stages (groups 2 and 5), cell counting was carried out to evaluate: (1) response to tissue damage (10 photomicrographs selected randomly from inflammatory infiltrates associated with chronic tracts and granulomas) and (2) response to adult flukes (10 photomicrographs selected randomly from inflammatory infiltrates associated with portal areas with severe bile duct hyperplasia). In early infection stages (groups 1 and 4), 10 photomicrographs randomly selected from damaged areas were used for cell counting. In HLN, 10 photomicrographs randomly selected from cortical areas, and 10 pictures selected from medullary areas, were used for cell counting. CD3⁺ T cells and Foxp3⁺ cells were counted in adjacent areas of serial sections and the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ T cells was estimated from by dividing numbers of Foxp3⁺ cells by the number of CD3⁺ cells in those adjacent serial sections. Results were expressed as mean \pm SD per group.

2.5. *Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out with PRISM 6.0 software (Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was applied to evaluate if data were normally distributed and according to the results, data were analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons tests. Correlations between parasitological, pathological and immunohistochemical data were estimated using the Spearman's rank non-parametric correlation test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *Fluke burdens*

Goats from group 1 (chronic stages of infection) showed 64, 42, 51, 73, 59 and 42 flukes, respectively (55.4 ± 12.2), whereas sheep from group 4 (chronic stages of

infection) showed 57, 40, 54, 58, 41 and 52 flukes, respectively (50.3 ± 7.9). Percentage of implantation (PI) was 27.7 % and 25.1% in goats and sheep, respectively.

3.2. Gross and histopathological study

3.2.1. Liver

In the early stages of infection (9 dpi), all goats (group 2) and sheep (group 5) showed reddish spots and small tortuous whitish tracts mainly involving the diaphragmatic aspect of the left liver lobe. Quantification of those lesions resulted in mean of 113.4 ± 54.6 in goats and 111.8 ± 35.7 in sheep. Microscopic hepatic changes in the early stages post infection consisted of necrotic foci and tracts within the hepatic parenchyma, often associated with focal haemorrhage, mainly involving subcapsular areas. Inflammatory infiltrates associated with these necrotic areas consisted mainly of eosinophils with fewer lymphocytes and macrophages. Adjacent portal spaces showed severe infiltration of lymphocytes, eosinophils and macrophages. These inflammatory cells migrated from portal areas through hepatic sinusoids to necrotic areas of the hepatic parenchyma.

In the late stages of infection, both goats (group 1) and sheep (group 4) demonstrated scars and tortuous white tracts, particularly involving the left liver lobe. Percentage of affected areas in goats was $36.02 \pm 9.4\%$ and $33 \pm 17.6\%$ in sheep. The gallbladder and major biliary ducts were whitish and enlarged, and they contained brownish fluid admixed with adult flukes. Microscopically, hepatic lesions were composed of marked fibrosis in portal spaces containing large bile ducts and severe infiltration of lymphocytes and plasma cells, either in a diffuse or lymphoid follicle pattern (response to adult flukes, observed within enlarged bile ducts which often showed epithelial erosion). Additionally, chronic tracts with macrophages containing abundant hemosiderin pigment, granulomas with necrotic centres, macrophages and giant multinucleate cells and variable infiltrates of lymphocytes, plasma cells and eosinophils were found in the hepatic parenchyma (response to tissue damage).

3.2.2 Hepatic lymph nodes

In goats weight of HLN was $2.2 \text{ gr} \pm 0.9$, $18.2 \text{ gr} \pm 3.4$ and $1.0 \text{ gr} \pm 0.5$ in groups 1, 2 and 3, respectively. In sheep HLN weight was 1.4 ± 0.3 , 6.3 ± 0.8 and 1.0 ± 0.5 in groups 4, 5 and 6, respectively. Significant HLN weight increase ($P < 0.01$) was found in chronic infection (groups 2 and 5) with respect to negative controls and acute infection in goats and sheep. The histological study revealed that the HLN weight increase in chronic infections was due to a marked hyperplasia of lymphoid follicles, interfollicular areas and medullary cords.

3.3. CD3 and Foxp3 expression in the liver

Results of cell counting for CD3 and Foxp3 in livers of goats and sheep during acute and chronic infections and negative controls are shown in Table 1. Uninfected control goats and sheep showed occasional CD3⁺ T lymphocytes mainly located in portal areas. Foxp3⁺ cells were also occasionally noted and also located in portal areas. The percentage of Foxp3/CD3 T cells was 20.3% and 18.8% in goats and sheep, respectively (Table 1).

At 9 dpi (acute infection stage), CD3⁺ and Foxp3⁺ T cells were found at the periphery of necrotic foci and adjacent portal spaces (Fig. 1). The number of both Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes increased significantly in goats and sheep with respect to negative controls (Table 1). However, the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ did not show a significant change in either goats ($P=0.55$) or sheep ($P=0.48$) with respect to negative controls.

In the chronic stages of infection (15-19 wpi), the number of CD3⁺ T lymphocytes and Foxp3⁺ T cells was significantly increased in both goats and sheep with respect to control livers, particularly in portal spaces with severely enlarged bile ducts (Figs. 2 and 3; location B in Table 1), whereas in granulomas, chronic tracts and smaller portal spaces, the number of CD3⁺ and Foxp3⁺ T cells was also increased with respect to negative controls but lower than in the vicinity of enlarged bile ducts (Location A in Table 1).

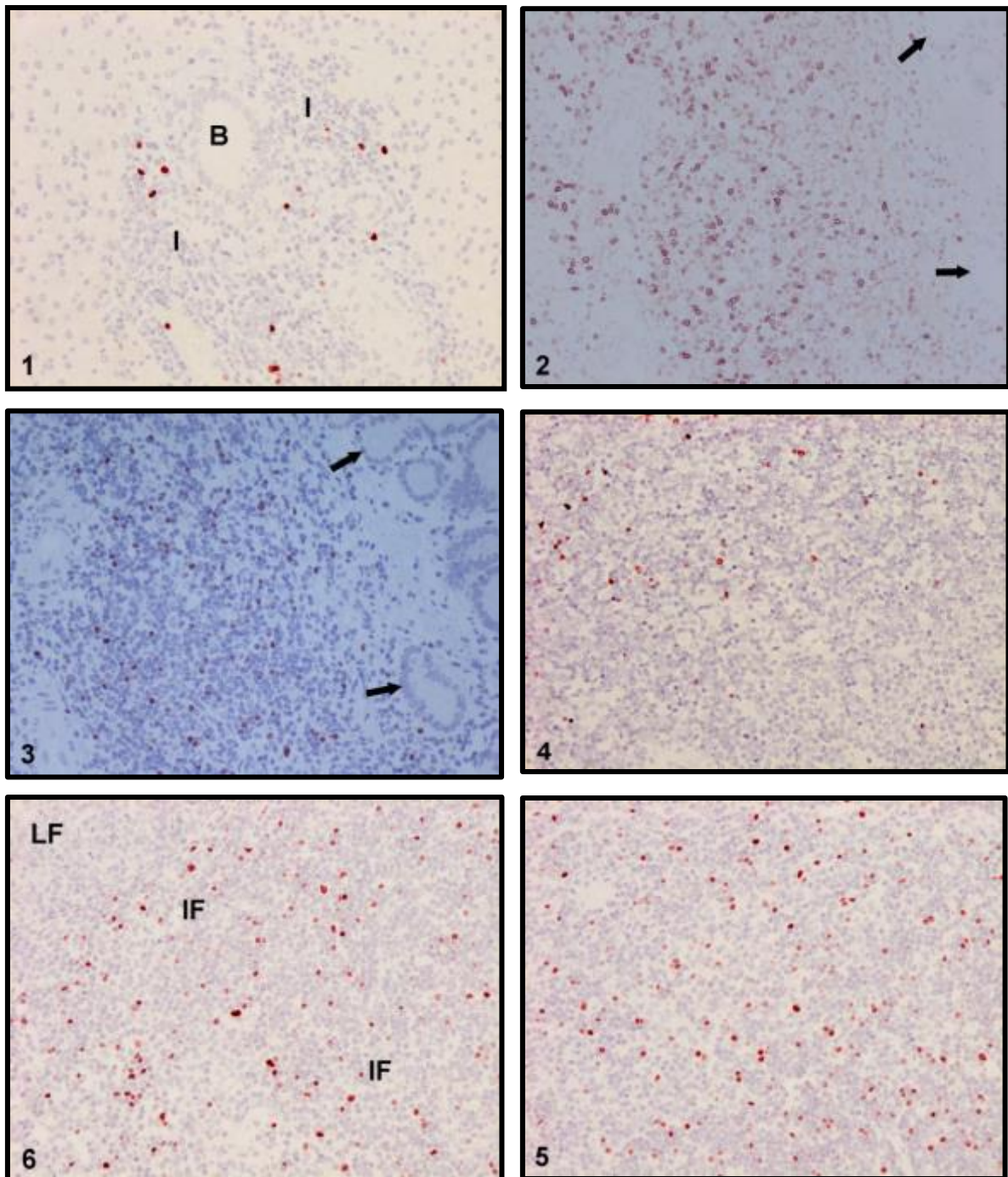


Figure 1. Acute infection sheep liver showing a portal space with a bile duct (B) surrounded by severe inflammatory infiltrate (I) with several Foxp3⁺ T cells (red-brown colour). ABC method, x200. **Figure 2.** Chronic infection sheep liver showing severe inflammatory infiltrate surrounding large bile ducts (arrows) showing numerous CD3⁺ T lymphocytes (brown colour). ABC method, x200. **Figure 3.** Serial section of that shown in Fig. 2, showing numerous Foxp3⁺ T cells in the inflammatory infiltrate surrounding bile ducts (arrows). ABC method, x200. **Figure 4.** Negative control goat hepatic lymph node showing moderate number of Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, x200. **Figure 5.** Acute infection goat hepatic lymph node showing numerous Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, x200. **Figure 6.** Chronic infection goat hepatic lymph node showing a lymphoid follicle (LF) and interfollicular areas (IF) containing numerous Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, x200.

The percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ T cells in areas of tissue damage in goats was significantly reduced with respect to both the negative controls and acute infections, while it did not change significantly in sheep. In areas of response to adult flukes (periphery of enlarged bile ducts), the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ was not significantly modified with respect to uninfected controls.

There was no statistical correlation between number of Foxp3⁺ T cells and fluke burden or gross pathology in any of the studied groups.

Table 1.- Experimental design: groups distribution and infection.

Group	Hosts	n	Infection	Killing	
1	Goat	6	100 mtc	9 dpi	Acute stage
2	Goat	6	200 mtc	15 wpi	Chronic stage
3	Goat	6	-	9 dpi/15 wpi	Uninfected controls
4	Sheep	6	150 mtc	9 dpi	Acute stage
5	Sheep	6	200 mtc	19 wpi	Chronic stage
6	Sheep	6	-	9 dpi/19 wpi	Uninfected controls

All infected animals were infected orally with metacercariae of ovine origin (Ridgeway Research Ltd.), administered in gelatine capsules with a dosing gun. All animals were killed by intravenous injection of T61 (Intervet International GMBH, Unterschleissheim, Germany).

3.4. Hepatic lymph nodes

Results of cell counting for CD3⁺ and Foxp3⁺ in HLN of goats and sheep during acute and chronic stages of infection and in negative controls are shown in Table 2. Uninfected control goats and sheep showed abundant infiltrates of CD3⁺ T lymphocytes and Foxp3⁺ T cells in the cortex, particularly in interfollicular areas (Fig. 4), whereas the number of both cell populations was lower in the medulla (medullary cords and medullary sinuses).

During acute infections, CD3⁺ T lymphocytes were significantly increased with respect to negative controls in sheep and goats (cortex) and sheep (medulla) (Table 2). Foxp3⁺ T cells were mainly found in interfollicular areas of the cortex (Fig. 5). The number of

Foxp3⁺ T cells and ratio Foxp3⁺/CD3⁺ increased significantly only in the cortex of acutely infected goats with respect to negative controls (Table 2). The number of Foxp3⁺ Tregs and the ratio of Foxp3⁺/CD3⁺ in the medulla were very similar in negative controls and acutely infected goats and sheep (Table 2).

During chronic infections, the number of CD3⁺ T cells was significantly increased in the cortex and medulla of goats and sheep with respect to negative controls (Table 2). Foxp3⁺ were mainly found in interfollicular areas of cortex (Fig. 6), where a significant increase was found in chronically infected goats and sheep with respect to uninfected controls. The percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ did not change significantly with respect to the uninfected controls in the cortex and medulla of either goats or sheep (Table 2).

Table 2.- Number and percentage of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes in livers of acute and chronic stage of infection, and in uninfected controls. Results expressed as mean \pm SD of cells per 0.2 mm² per group.

Group (Species-stage of infection)	Location A			Location B		
	Foxp3	CD3	%Foxp3/ CD3 ^a	Foxp3	CD3	%Foxp3/ CD3 ^a
1 (goats-AI)	5.5 \pm 2.2*	25.4 \pm 3.6*	21.8 \pm 9.2			
2 (goats-CI)	6.1 \pm 2.0*	60.9 \pm 11.6*	10.5 \pm 3.9*	31.0 \pm 5.1**§	123.7 \pm 21.1**§	25.1 \pm 1.3
3 (goats-UC)	0.7 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	20.3 \pm 10.0			
4 (sheep-AI)	6.2 \pm 2.9*	30.2 \pm 4.4*	19.9 \pm 7.4			
5 (sheep-CI)	6.8 \pm 2.8*	52.9 \pm 15.1*	12.8 \pm 3.9	30.8 \pm 6.0**§	129.2 \pm 19.3**§	24.1 \pm 4.6
6 (sheep-UC)	0.6 \pm 0.3	3.2 \pm 0.5	18.8 \pm 8.1			

Location A: Uninfected control (UC): randomly selected portal areas. Acute infection (AI): portal areas, necrotic foci. Chronic infection (CI): portal areas, granulomas and chronic tracts.

Location B: Chronic infection: Periphery of enlarged bile ducts. This location is studied only in the chronic stage of the infection, when adult liver flukes are in the bile ducts and marked histopathological alterations occurred in the surrounding tissue.

^a Estimated percentage of CD3⁺ T cells which are Foxp3⁺

* Significant difference (P < .05) compared to the uninfected control group.

§ Significant difference (P < .05) respect to the acute infection stages.

Table 3.- Number and percentage of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes in hepatic lymph nodes of acute and chronic stage of infection and negative controls goats and sheep. Results expressed as mean \pm SD per group.

Group (Species-stage of infection)	Cortex			Medulla		
	Foxp3	CD3	%Foxp3/ CD3	Foxp3	CD3	%Foxp3/ CD3
1 (goats-AI)	46.0 \pm 5.3*	299.0 \pm 15.8§	15.4 \pm 1.8*	7.6 \pm 1.5	107.0 \pm 6.1	7.1 \pm 1.1
2 (goats-CI)	45.4 \pm 16.3*	389.8 \pm 18.2*	11.7 \pm 5.9	8.0 \pm 2.1	117.1 \pm 4.6*	6.8 \pm 1.0
3 (goats-UC)	22.2 \pm 4.3	287.6 \pm 3.3	9.5 \pm 2.3	7.3 \pm 0.9	94.2 \pm 3.7	7.7 \pm 1.2
4 (sheep-AI)	22.6 \pm 3.0	303.7 \pm 37.8*	7.4 \pm 1.4	8.4 \pm 3.3	122.2 \pm 16.8*	6.9 \pm 2.3
5 (sheep-CI)	36.3 \pm 6.9*§	392.9 \pm 6.3*§	9.2 \pm 2.6	9.7 \pm 3.1	115.2 \pm 6.7*	8.4 \pm 2.1
6 (sheep-UC)	21.0 \pm 6.6	246.0 \pm 18.4	8.9 \pm 4.1	7.6 \pm 1.5	82.8 \pm 6.5	9.2 \pm 1.5

AI: acute infection (9 days post-infection, dpi); CI: chronic infection (15 -19 weeks post-infection, wpi); UC: uninfected controls.

* Significant difference ($P < .05$) compared to the uninfected control group.

§ Significant difference ($P < .05$) respect to the chronic infection stage.

4. Discussion

Chronic parasitic infections are facilitated by the modulation and/or suppression of the host immune response caused by these parasites, and Foxp3⁺ T cells are the main cell population mediating such modulation of the host immune response (Adalid-Peralta et al., 2011; Taylor et al., 2012). While *F. hepatica* has shown a potent capacity to modulate the host immune response (Dalton et al., 2013), the distribution of Foxp3⁺ T cells has not been investigated in *F. hepatica* infected cattle or sheep.

In the present study, we have found a significant increase of Foxp3⁺ T cells in the hepatic lesions of both goats and sheep, in the acute and the chronic stages of the

infection. This increase of Foxp3⁺ T cells was generally correlated to an increase in the number of CD3⁺ T cells, so the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ cells did not change. The increase in the total number of Foxp3⁺ T cells without modification of the Foxp3⁺/CD3⁺ percentage has been described in different parasitic infections in sheep, as in *Psoroptes ovis* infection (McNeilly et al., 2010) and *Teladorsagia circumcincta* infection (McNeilly et al., 2013). In our work, it is noteworthy the differences between the total number of Foxp3⁺ cells in different stages and locations of the infection, with the higher number of cells found in correlation with the presence of adult flukes in the bile ducts (chronic stage).

The rapid expansion of Foxp3⁺ T cells in the acute phase of the infection (9 dpi) seems to be related to the larval migration in the hepatic parenchyma, since most of those cells were found around necrotic foci and tracts and in the adjacent portal spaces. However, no correlation was found between number of Foxp3⁺ T cells and the number of necrotic lesions. The early presence of Foxp3⁺ T cells in the initial stages of parasitic infections has been shown in gastrointestinal nematode mouse model (Finney et al., 2007) and it has been explained as an immunomodulatory mechanisms facilitating the survival of the parasite. In sheep, McNeilly et al. (2013) described an increase of Foxp3⁺ T cells at 10 dpi in the abomasal mucosa of sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*, that may reflect a homeostatic regulatory mechanism within the abomasal cellular immune response to minimize immune-mediated abomasal pathology. Our data suggest Foxp3⁺ T cells may play a role in modulating the initial host immune response, contributing to the survival of *F. hepatica* during the migratory stage. However, further studies are required to clarify the relationship between the initial Foxp3⁺ T cells expansion and the inability of the immune effector mechanisms to kill the newly excysted juveniles of *F. hepatica* in the early peritoneal and hepatic migration, as occurred in the protective responses observed in the *F. gigantica* sheep model (Piedrafita et al., 2007).

In the chronic hepatic lesions, the increase of Foxp3⁺ T cells was more pronounced in the inflammatory infiltrates adjacent to large bile ducts than in the periphery of granulomas, chronic tracts and small portal areas. Since the adult parasites in these stages are located within the bile ducts and gallbladder, it seems that Foxp3⁺ T cells are specifically recruited to the vicinity of *F. hepatica* adults or are actively induced by the adult parasites and this may be related to the chronicity of the infection and the long survival of the parasite in the host (Escamilla et al., 2016).

A dual role has been described for Foxp3⁺ T cells in hepatic helminth infections: minimising tissue pathology and modulating the host immune response to facilitate parasite survival, as reported in the case of *Schistosoma japonicum* infection in mice (Zhu et al., 2015). In the present study, the different proportion of Foxp3⁺ T cells in the periphery of granulomas and chronic tracts compared to those of large bile ducts and the lack of correlation between Foxp3⁺ T cells and fluke burden or gross pathology may also suggest this dual role for these cells in *F. hepatica* infections. The evaluation of cytokines such as IL-10 and TGF- β produced by Foxp3⁺ T cells in each of these hepatic lesions is of foremost interest to elucidate this point.

The number of Foxp3⁺ T cells was also significantly increased in the cortex of the HLN, as well as the number of CD3⁺ T lymphocytes in both the cortex and the medulla. This data agrees with the increase of Foxp3⁺ T cells in mesenteric lymph nodes found in helminth infected mice (Smith et al., 2016). Some differences were observed between sheep and goats, since goats showed higher number of Foxp3⁺ cells in both the acute and the chronic stages, with a significant elevation of the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ in the acute phase of the infection. However, we found no correlation between this higher number of Foxp3⁺ T cells in HLN in goats and any other parasitological or pathological data. Sheep and goats seems to have a different immune mechanism in response to gastrointestinal nematodes (Hoste et al., 2010), but no such difference seems to appear in the case of *F. hepatica* infection.

In conclusion, this is the first report describing the distribution of Foxp3⁺ T cells in acute and chronic hepatic lesions and HLN of *F. hepatica* infected goats and sheep. The expansion of Tregs in acute and chronic hepatic lesions may be involved in parasite survival as well as in minimising tissue pathology. Future studies should focus on the investigation of parasite molecules, particularly from newly excysted juveniles, involved in the expansion of Foxp3 T cells, as well as the cytokines produced by this cell type in the different hepatic lesions to elucidate their roles in *F. hepatica* infection.

Acknowledgments

This work was supported by EU grants (H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2015-67023-C2-1-R. TM receives funding from the Scottish Government.

References

Adalid-Peralta, L. Fragoso, G., Fleury, A., Sciutto, E., 2011. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1412-1426.

Belkaid, Y., 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews.* 7, 875-888.

Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272-285.

Escamilla, A., Bautista, M.J., Zafra, R., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martinez-Cruz, S., Méndez, A., Martinez-Moreno, A., Molina-Hernandez, V., Perez, J., 2016. *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 216, 84-88.

Finney, C.A., Taylor, M.D., Wilson, M.S., Maizels, R.M., 2007. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37, 1874-1886.

Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol.* 26(8):376-381.

McNeilly, T.N., Rocchi, M., Bartley, Y., Brown, J.K., Frew, D., Longhi, C., McLean, L., McIntyre, J., Nisbet, A.J., Wattedegera, S., Huntley, J.F., Matthews, J.B. 2013. Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Vet. Res.* 44, 70

Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111.

Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N., Spithill, T.W. 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.*, 75, 1954-1963.

Smith, K.A., Filbey, K.J., Reynolds, L.A., Hewitson, J.P., Harcus, Y., Boon, L., Sparwasser, T., Hämmerling, G, Maizels, R.M. 2016. Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunol.* 9, 428-443.

Taylor, M.D., van der Werf, N., Maizels, R.M., 2012. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181-189.

Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-927.

Watanabe, K., Carter, J.M., Neely-Burnam, M., Colley, D.G., 2009. Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunol.* 31, 440-446.

Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martinez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Perez, J., 2013. Early and late peritoneal and hepatic

changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. J. Comp. Pathol.148, 373-384.

Zhou, S., X. Jin, X. Chen, J. Zhu, Z. Xu, X. Wang, F. Liu, W. Hu, L. Zhou and C. Su, 2015. Heat Shock Protein 60 in eggs specifically induces Tregs and reduces liver immunopathology in mice with schistosomiasis japonica. Plos One 10 (9) e0139133.

DISCUSIÓN

La fasciolosis es una enfermedad causada por el parásito *Fasciola hepatica* que, gracias a su capacidad de evasión del sistema inmunitario del hospedador, llega a establecerse crónicamente en los conductos biliares del hígado de forma crónica produciendo importantes pérdidas económicas en el ganado y, además, al considerarse una zoonosis, pone en riesgo la vida de hasta 180 millones de personas en el mundo. *F. hepatica* se caracteriza por establecer en el hospedador una respuesta inmunitaria adaptativa de tipo Th2. Sin embargo, la respuesta inmunitaria innata mediada por la acción de eosinófilos y macrófagos contra los parásitos también juega un papel crítico en la lucha contra *F. hepatica*.

Para comprender la importancia del estudio de la modulación del sistema inmunitario del hospedador ejercida por los parásitos helmintos tales como *F. hepatica*, debemos conocer la importancia de esta enfermedad en la actualidad. En los últimos años se ha producido un aumento significativo de las resistencias a los antihelmínticos, fundamentalmente al triclabendazol (TCBZ), que es hasta la fecha el antiparasitario más efectivo frente a las formas agudas y las crónicas de la infección. Este aumento de la resistencia a los fármacos supone un serio problema para el control de la enfermedad, lo que produce un aumento de la presencia de “fallos en el tratamiento” como se ha recogido en diversas revisiones realizadas por el autor Fairweather (2011b). Dada la magnitud de las pérdidas económicas cifradas en la producción de aquellas ganaderías donde la prevalencia de *F. hepatica* es elevada, así como la creciente zoonosis en la que se ha convertido en determinadas zonas del mundo, en las últimas décadas se vienen desarrollando numerosos ensayos experimentales focalizados en la búsqueda de candidatos vacunales eficaces que, por un lado, solvante los problemas de la resistencia a antihelmínticos y mejore la prevención y control de la enfermedad, y por otro, limite los residuos químicos en la producción. Sin embargo, *F. hepatica*, al igual que otros helmintos, ha desarrollado una gran variedad de mecanismos de evasión del sistema inmunitario del hospedador cuyo objetivo es suprimir o modular la respuesta inmunitaria, hasta el punto de hacerla inefectiva. Este hecho supone un gran inconveniente para el desarrollo de vacunas eficaces (Molina-Hernández y cols., 2015). Por ello, es crucial el conocimiento de la bases moleculares de esas diferentes estrategias inmunomoduladoras que permiten la supervivencia del parásito en el hospedador.

La tinción de Hansel fue desarrollada originalmente para identificar eosinófilos a nivel de secreciones nasales, bronquiales y oculares mediante la observación de los gránulos específicos rojo-rosáceos brillantes (Nolan y cols., 1986). También de igual forma ha sido usada para identificar y cuantificar eosinófilos en gran variedad de fluidos como en el sedimento urinario (Brito y cols., 2014) o en tejidos (Nguyen y cols., 2012). En las secciones de tejido hepático examinadas en el Primer Trabajo de Tesis, los eosinófilos se identificaron con mayor facilidad que con las tinciones convencionales de hematoxilina-eosina. Se hicieron pruebas, usando la Tinción de Hansel como contratinción de las técnicas inmunohistoquímicas de marcadores anti-caspasa-3 así como de la técnica TUNEL, pero el color marrón oscuro de la inmunotinción enmascaraba el color rojo intenso de los gránulos citoplasmáticos de los eosinófilos impidiendo la identificación del tipo celular, por este motivo finalmente se usaron cortes seriadas. Es importante indicar que en el primer trabajo publicado y presentado en la presente Tesis Doctoral, no se incluyeron resultados de la técnica TUNEL por petición por parte de la revista indexada *Veterinary Parasitology* de adaptar la publicación a un formato reducido "short communication". Estos resultados pueden consultarse en el ANEXO IV.

La apoptosis de células innatas efectoras como eosinófilos, monocitos y macrófagos ha sido evidenciada en numerosas ocasiones como un mecanismo de inmunosupresión local durante las infecciones parasitarias (Shin y cols., 2000; Semnani y cols., 2008; Yan y cols., 2008; Zepeda y cols., 2010; Das Mohapatra y cols., 2014), describiéndose en gran cantidad de infecciones por helmintos como *Schistosoma japonicum* (Xu y cols., 2010; Han y cols., 2013) *S. Mansoni* (Rumbley y cols., 2001), *Necator americanus* (Chow y cols., 2000) y *Taenia crassiceps* (Zepeda y cols., 2010), causando una inmunomodulación de la respuesta inmunitaria del hospedador que permitiría la supervivencia del parásito durante periodos prolongados. Como *F. hepatica* induce una potente inmunosupresión, hasta el punto de impedir la generación de una respuesta Th1 efectiva permitiendo la presencia de infecciones secundarias (Dalton y cols., 2013), el papel de la apoptosis como un mecanismo ésta debería ser investigado particularmente durante los estados migratorios cuando el parásito es más vulnerable a la respuesta inmunitaria del hospedador.

Por todo lo anteriormente expuesto, en el Primer Trabajo de esta Tesis, nos centramos en evaluar la presencia y el número de eosinófilos que presentan apoptosis en los

infiltrados inflamatorios en el hígado de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* durante las fases migratoria (8 y 28 dpi) y biliar (17 semanas pi) de la infección mediante la inmunoreactividad de la caspasa-3 activada en el tejido hepático y mediante los cambios ultraestructurales de los eosinófilos en apoptosis.

La caspasa-3 es una importante caspasa efectora que juega un papel crucial durante la apoptosis, activando directamente a las enzimas responsables de la fragmentación del ADN. La caspasa-3 activada ha sido usada como marcador de apoptosis en tejidos sanos (Resendes y cols., 2004) y en secciones de tejidos infectados (Chen y cols., 2008; Mkupasi y cols., 2013). En los hígados procedentes del grupo control no infectado no se evidenció la presencia de apoptosis. Esta ausencia de células inflamatorias apoptóticas en los controles negativos en el estudio contrasta con la presencia de apoptosis en tejidos linfoides procedentes de cerdos sanos y podría deberse al escaso número de células inflamatorias presentes en el hígado sano de ovejas comparado con esos órganos linfoides (Resendes y cols., 2004).

Los resultados del primer trabajo presentado en esta Tesis Doctoral, arrojan un potencial papel inductor de la apoptosis de los eosinófilos en el infiltrado del parénquima hepático de ovejas por parte de *F. hepatica*. Los resultados describen una distribución de los eosinófilos en apoptosis particularmente característica. En este sentido, en las fases tempranas de la infección correspondiente a la fase migratoria de la larva (8 y 28 dpi), cuando la larva juvenil migrante es más susceptible al ataque del sistema inmunitario del hospedador, se hallaron eosinófilos apoptóticos, fundamentalmente en la periferia de los focos de necrosis que la larva deja tras de sí durante su migración a través del hígado. Esas áreas de necrosis aguda, se encontraban detrás de larvas migrantes, de acuerdo con trabajos publicados en la bibliografía con anterioridad sobre oveja (Meeusen y cols., 1995; Zafra y cols., 2013a, b).

A los 8 y a los 28 dpi se hallaron tanto células como cuerpos apoptóticos positivos a TUNEL y Caspasa-3, en el infiltrado inflamatorio asociado a focos de necrosis aguda y a trayectos necróticos, y en menor medida en torno a los focos de necrosis más organizados en el caso de los animales sacrificados a los 28 dpi. Debido a que el fenómeno de la apoptosis ha sido fundamentalmente detectado en lesiones producidas por la larva migrante en el parénquima hepático, principalmente focos agudos de necrosis, es razonable suponer que las larvas de *F. hepatica* son capaces de inducir la

apoptosis de las células inflamatorias durante los estados migratorios de la infección. En este sentido, se ha evidenciado que los productos de excreción y secreción de *F. hepatica* (FhESP) son capaces de inducir la apoptosis de eosinófilos y macrófagos procedentes de ratas *in vivo* (Serradell y cols., 2007; 2009; Guasconi y cols., 2012). Además, se han detectado niveles elevados de anticuerpos IgG específicos frente a FhESP desde las 4 semanas post-infección en adelante en cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica* (Martinez-Moreno y cols., 1999). En el presente estudio, se encontraron numerosas células inflamatorias en estado de apoptosis mediante la técnica TUNEL y la expresión de caspasa-3 en la periferia de los focos de necrosis aguda, mientras que sólo de manera ocasional se hallaron células inflamatorias apoptóticas en infiltrados inflamatorios no asociados a focos de necrosis. Este hecho, apoyado con lo descrito en la literatura (Serradell y cols., 2007; 2009; Guasconi y cols., 2012), sugieren que la larva migratoria de *F. hepatica* podría inducir la apoptosis de las células inflamatorias mediante la liberación de sus productos de excreción y secreción.

Sin embargo, en fases crónicas de la infección (17 semanas pi), esta distribución se concentró alrededor de los grandes conductos biliares donde se alojaba el parásito adulto. Esto sugiere que determinados productos liberados por la larva migrante o bien el propio adulto, podrían estar, por un lado, atrayendo la presencia de un mayor infiltrado de eosinófilos y, por otro, provocando la apoptosis de los mismos. La presencia de numerosas células inflamatorias TUNEL⁺ y caspasa-3⁺ en los infiltrados asociados a los grandes canalículos biliares hiperplásicos, donde se han encontrado frecuentemente parásitos adultos en su interior, así como la presencia ocasional de células inflamatorias en apoptosis en los infiltrados inflamatorios asociados a granulomas y pequeños canalículos biliares, sugieren que los FhESP liberados por el adulto, podrían causar la apoptosis de las células inflamatorias. La presencia de apoptosis de las células inflamatorias del infiltrado inflamatorio que rodea a los canalículos biliares (Pérez y cols., 1999) sugiere que la apoptosis de células efectoras, principalmente eosinófilos, podrían jugar un importante papel en la inmunosupresión/modulación durante los estadios crónicos de la infección, facilitando así la supervivencia del parásito durante largos periodos de tiempo.

En este estudio, los eosinófilos apoptóticos se identificaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en las muestras de tejido hepático procedentes de ovejas a los 8 y 28 dpi. Ultraestructuralmente, los eosinófilos presentaban los típicos

gránulos citoplasmáticos con un nucleoide electrodenso en consonancia con las características descritas en eosinófilos de humano (Duffin y cols., 2009) y de ovino (Balic y cols., 2006). La condensación y fragmentación de la clomatina con una membrana nuclear intacta, se observó en los eosinófilos apoptóticos en este trabajo y, asimismo, ha sido descrita mediante estudios de TEM en eosinófilos de humano (Duffin y cols., 2009) y de ovino (Balic y cols., 2006). En el estudio llevado a cabo en *Haemonchus contortus*, los eosinófilos que se encontraron en apoptosis a nivel gástrico estaban degranulados (Balic y cols., 2006). Sin embargo, en nuestro trabajo, los eosinófilos apoptóticos contenían los típicos gránulos eosinófilos intactos. Estos hallazgos sugieren que durante la fase migratoria de *F. hepatica* la apoptosis no puede ser debida a la degranulación de los eosinófilos. De igual forma en los estadios crónicos, también se evidenció el fenómeno de la apoptosis de las células efectoras en el infiltrado inflamatorio que rodea a los grandes conductos hiperplásicos donde habitualmente se alojan los parásitos adultos.

En cuanto a la reactividad de células no pertenecientes al sistema inmunitario, nuestro estudio reveló la presencia de apoptosis de células con características morfológicas de hepatocitos localizados en la periferia de focos de necrosis agudos, un hecho confirmado mediante la expresión de TUNEL+, caspasa-3+ y el estudio ultraestructural. (ANEXO IIIa.- Imágenes Primer trabajo). Sin embargo, la apoptosis de los hepatocitos no ha sido descrita con anterioridad en las infecciones por *F. hepatica* ni en estudios *in vitro*. Por otro lado, hay estudios de la inducción de la apoptosis de los colangiocitos humanos *in vitro* por el trematodo hepático *Opisthorchis viverrini* (Jasakul y cols., 2012). Pero nuestros resultados (ANEXO IV.- Técnica TUNEL) muestran sólo ocasionalmente colangiocitos apoptóticos en canalículos biliares aislados no hiperplásicos, que podría estar asociado a un proceso fisiológico de renovación celular, en lugar de a un fenómeno apoptótico inducido por *F. hepatica*. La erosión epitelial observada en los principales conductos biliares hiperplásicos que contienen a los parásitos adultos de *F. hepatica*, estaría producido por un daño mecánico ocasionado por las propias espículas del parásito o bien por un daño químico producido por los FhESP. No obstante, nuestros resultados no pueden confirmar que esa apoptosis sea inducida por *F. hepatica*.

El Segundo Trabajo de la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la apoptosis de los leucocitos localizados en el peritoneo para entender la importancia de este

fenómeno como un mecanismo modulador del parásito que le permite evadir la respuesta inmunitaria en fases tempranas de la infección (1, 3, 9 y 18 dpi). La migración de las formas juveniles recién desenquistadas de *F. hepatica* que atraviesan la pared intestinal hasta alcanzar el parénquima hepático, pasando por el peritoneo, hace que esta localización sea crítica para el desarrollo de vacunas dirigidas a eliminar las larvas antes de que se produzca el daño hepático.

De este modo, el estudio de las poblaciones celulares presentes en el líquido peritoneal a los 18 dpi, reveló una disminución en el porcentaje de macrófagos ($25.8 \pm 8.9\%$) en comparación con los animales control no infectados ($60.0 \pm 14.7\%$), mientras que encontramos un considerable aumento del porcentaje de eosinófilos ($49.3 \pm 14.1\%$), respecto a los controles ($2.7 \pm 1.1\%$). El incremento relativo en el porcentaje de eosinófilos peritoneales y el descenso de los macrófagos y linfocitos ($24.1 \pm 9.5\%$) durante el transcurso de la infección coincide con los resultados publicados por nuestro grupo en cabras en fases tempranas de la infección con *F. hepatica* (Zafra y cols., 2013b). Los resultados presentados en este Segundo Trabajo muestran que la infección por *F. hepatica* induce la apoptosis de los leucocitos peritoneales en ovejas desde el 1 dpi en adelante. La determinación de los leucocitos apoptóticos se basa en el ensayo de la anexina V. Este ensayo está basado en expresión de fosfatidilserina (PS) en la superficie externa de la membrana plasmática, durante las etapas iniciales de la apoptosis. PS se une con una elevada afinidad al anticoagulante anexina V que es visualizado mediante citometría de flujo, la cual ha sido usado con anterioridad en gran variedad de patologías incluidas aquéllas asociadas con las infecciones por helmintos (Serradell y cols., 2009).

Cuando comparamos el ensayo de la anexina V con la expresión de la caspasa-3, el grupo control no infectado presentaba resultados similares con ambas técnicas, obteniéndose un escaso porcentaje de leucocitos apoptóticos (1.7 ± 0.66 y $0.4 \pm 0.6\%$ respectivamente). Sin embargo, en los estadios muy iniciales de la infección (1 dpi), el ensayo con anexina V detecta un mayor porcentaje de apoptosis para macrófagos ($37.8 \pm 11.1\%$), linfocitos ($28.3 \pm 11.4\%$) y granulocitos ($30.7 \pm 6.7\%$), mientras la caspasa-3 sólo se expresó en el $1,2 \pm 1.3\%$ de los leucocitos peritoneales mediante inmunocitoquímica. Estos resultados sugieren que el ensayo con anexina V puede detectar apoptosis en períodos más iniciales del proceso en comparación con la expresión de caspasa-3 activada mediante inmunocitoquímica. Adicionalmente, la

apoptosis de eosinófilos presentes en el líquido peritoneal a los 18 dpi se confirmó mediante el estudio de los cambios ultraestructurales, ya citados con anterioridad en la presente discusión, por TEM. En este caso, el empleo de TEM fue menos útil para cuantificar el porcentaje de leucocitos apoptóticos debido a la pequeña cantidad de muestra examinada en comparación con la expresión de caspasa-3 y el ensayo de anexina V.

El elevado incremento de macrófagos, linfocitos y granulocitos apoptóticos encontrados en el peritoneo desde el 1 dpi nos sugiere que la larva de *F. hepatica* en su estadio inicial de migración, desde el intestino hasta alcanzar el hígado, es capaz de inducir una rápida apoptosis de los leucocitos peritoneales, lo cual permitiría el avance de la larva migrante a través de la cavidad peritoneal, evadiendo la respuesta inmunitaria desarrollada en esta localización en el hospedador.

Por otro lado, a los 18 dpi, el porcentaje de macrófagos y linfocitos en apoptosis descende ($10. \pm 2.7$ y 4.7 ± 1.4 , respectivamente) con respecto a lo hallado a 1 y 3 dpi. En contraste, el porcentaje de granulocitos apoptóticos aumenta ($80 \pm 6\%$). De acuerdo con el estudio diferencial de las poblaciones celulares, la mayoría de los granulocitos peritoneales a los 18 dpi eran eosinófilos. Debido al incremento del número de focos y trayectos necróticos (ANEXO II.- Anatomía Patológica Hepática) causados por la larva migrante en la superficie hepática a los 9 dpi, y particularmente, a los 18 dpi, es posible que los productos liberados, desde las áreas necrosadas en la superficie hepática hacia el peritoneo, puedan inducir el reclutamiento y apoptosis de los leucocitos peritoneales, particularmente eosinófilos, en este estadio de la infección.

En resumen, a pesar de la gran cantidad de evidencias previas a cerca del potencial mecanismo de evasión que supone la apoptosis en las infecciones por helmintos, nunca se había estudiado la apoptosis en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* durante los diferentes estadios de la infección aguda y crónica. Los resultados recogidos en el Primer (Escamilla y cols., 2016) y Segundo Trabajo (Escamilla y cols., 2017) de la presente Tesis Doctoral, junto con los resultados recogidos en el ANEXO IV confirman que *F. hepatica* induce la apoptosis de eosinófilos fundamentalmente y otras células del infiltrado inflamatorio en trayectos hepáticos necróticos agudos, así como en la periferia de los grandes canalículos biliares hiperplásicos donde habita *F. hepatica* adulta en los estadios crónicos de la infección. De igual manera, se evidencia la inducción de la

apoptosis en las células leucocitarias efectoras, fundamentalmente eosinófilos, presentes en el líquido peritoneal durante los estadios tempranos de la infección. Estos resultados, con respecto a la forma de inmunomodular la respuesta inmunitaria del hospedador durante todo su avance en la fase migratoria, tanto peritoneal como parenquimatosa, suponen un importante avance para dilucidar cómo funciona este proceso de modulación en el hospedador de destino de la tan buscada inmunoterapia. En definitiva, estos resultados sugieren la necesidad de realizar futuros estudios encaminados a evaluar el verdadero papel de la apoptosis como un mecanismo de evasión local y sistémica del sistema inmunitario durante las fases migratorias de la infección cuando las larvas del trematodo son más vulnerables a la respuesta inmunitaria del hospedador. Además, sería interesante dilucidar el posible papel inductor de las moléculas de excreción y secreción en este proceso.

Otro de los posibles mecanismos implicados en la modulación/supresión de la respuesta inmunitaria del hospedador causada por *F. hepatica* es el papel de las células T reguladoras FoxP3 (Tregs Foxp3⁺), permitiendo la cronicidad de la infección que les caracteriza (Adalid-Peralta y cols., 2011; Taylor y cols., 2012). Esta distribución de células Tregs Foxp3⁺ no había sido investigada en ovejas infectadas con *F. hepatica* previamente. Es por ello que, en el Tercer Trabajo de la presente Tesis Doctoral, nos planteamos describir la presencia y distribución de esta población Tregs Foxp3⁺ en tejido hepático y nódulos linfáticos de ovejas y cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica* en estadios agudos y crónicos de la infección.

Nuestros resultados muestran un incremento significativo de células Tregs Foxp3⁺ en las lesiones hepáticas en ovejas y cabras, tanto en estadios tempranos como crónicos de la infección. Por lo general, este incremento de las células Tregs Foxp3⁺ estuvo correlacionado con un incremento en el número de linfocitos T CD3⁺, por lo tanto, el ratio FoxP3⁺/CD3⁺ no cambió. El incremento en el número total de células T FoxP3⁺ sin modificación de la relación Tregs FoxP3⁺/CD3⁺ ha sido descrito en diferentes infecciones por distintos parásitos en ovejas, como *Psoroptes ovis* (McNeilly y cols., 2010) y *Teladorsagia circumcincta* (McNeilly y cols., 2013)

Por un lado, en las lesiones hepáticas agudas (9 dpi), el número de células T CD3⁺ y de células Tregs Foxp3⁺ fue significativamente mayor tanto en cabras como en ovejas, comparado con los controles no infectados. Esta expansión parece estar correlacionada

con la fase de migración larvaria en el parénquima hepático, puesto que la mayoría de estas células fueron encontradas alrededor de los focos y trayectos de necrosis agudos, así como en los espacios portas adyacentes. Sin embargo, no se encontró correlación entre el número de células Tregs Foxp3⁺ y el número de lesiones necróticas.

La rápida expansión de las células Tregs Foxp3⁺ ha sido descrita en infecciones en modelos murinos por nematodos gastrointestinales y filariosis, facilitando la supervivencia del parásito desde estadios tempranos (3-7 dpi) de la infección (Finney y cols., 2007). Los resultados de este estudio también coinciden con otros estudios que muestran un incremento de células Tregs Foxp3⁺ a nivel de las placas de Peyer en ratones infectados con *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Mosconi y cols., 2015) y con los incrementos en la mucosa abomasal de ovejas infectadas con *Teladorsagia circumcincta* a los 10 dpi, explicándose como un mecanismo inmunomodulador que facilitaría la supervivencia del parásito. Esto se ha relacionado con un mecanismo regulador homeostático que logra minimizar la patología provocado por la respuesta inmunitaria celular abomasal (McNeilly y cols., 2013). De esta forma, nuestros resultados indicarían que las células Tregs Foxp3⁺ juegan un papel en la modulación de la respuesta inmunitaria local desde estadios tempranos de la migración larvaria. Así, esta inmunomodulación unida a mecanismos ya citados como la apoptosis de células efectoras inducida por *F. hepatica*, contribuiría al incremento de la supervivencia del trematodo hepático durante la fase migratoria hepática de la infección, que es cuando más expuesto se encuentra a la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, se requieren futuros estudios con el fin de clarificar la relación entre la expansión de células Tregs FoxP3⁺ y la incapacidad de la respuesta inmunitaria efectora de eliminar las formas juveniles recién desenquistadas de *F. hepatica* en el líquido peritoneal de fases tempranas de la infección y en la fase hepática, como se evidenció en la respuesta protectora observada en ovejas infectadas con *F. gigantica* (Piedrafita y cols., 2007)

Por otro lado, en las lesiones hepáticas crónicas a las 15 y 19 spi, el incremento de las células Tregs FoxP3⁺ fue mucho más pronunciado en los infiltrados inflamatorios adyacentes a los conductos biliares hiperplásicos que en la periferia de los granulomas, trayectos crónicos y pequeñas áreas portales. Los parásitos adultos de *F. hepatica* están localizados en el interior de estos conductos biliares principales, así como, en la vesícula biliar. La distribución de las células Tregs FoxP3⁺ en el hígado indica que son específicamente reclutadas en las áreas cercanas al lugar donde se localizan los adultos

de *F. hepatica* o, bien, son activadas por los parásitos adultos y esto podría tener relación con la cronicidad de la infección y con la prolongada supervivencia del parásito en el hospedador.

En las infecciones hepáticas por helmintos, se ha descrito un doble papel de los linfocitos Tregs FoxP3⁺. Uno, es un papel crucial en la minimización de la patología y, otro, la modulación de la respuesta inmunitaria inducida en el hospedador con el fin de facilitar la supervivencia del parásito, tal y como ha sido descrito previamente en el caso de la infección por *Schistosoma japonicum* en ratones (Zhou y cols., 2015) o en *S. mansoni* (Layland y cols., 2007). En nuestro trabajo, el hecho de encontrar una proporción diferente de células Tregs FoxP3⁺ en la periferia de los granulomas y en los trayectos crónicos, comparada con la hallada en torno a los grandes conductos biliares hiperplásicos, unido a la falta de correlación que existe entre las células Tregs FoxP3⁺ y la carga parasitaria y entre las células Tregs FoxP3⁺ y la macropatología, también apunta a ese doble papel que juegan estas células en las infecciones por *F. hepatica*. La evaluación de citoquinas, como IL-10 y TGF-β, producidas por las células Tregs FoxP3⁺ asociadas a las lesiones hepáticas, es de gran interés para conseguir dilucidar este hecho.

En cuanto a la respuesta desarrollada en los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) tanto en la fase hepática migratoria como crónica de la infección, el número de células Tregs FoxP3⁺ aumentó significativamente en la corteza, al igual que el número de linfocitos T CD3⁺ en la corteza y en la médula. Este dato concuerda con el incremento de células Tregs FoxP3⁺ en los nódulos linfáticos mesentéricos encontrado en infecciones por helmintos gastrointestinales realizadas en ratones (Smith y cols., 2016). Sin embargo, nosotros observamos algunas diferencias entre ovejas y cabras. Así, las cabras mostraron un mayor número de células Tregs FoxP3⁺, tanto en estadios agudos como crónicos de la infección, con un importante aumento del ratio FoxP3⁺/CD3⁺ en las fases agudas de la infección. Sin embargo, no se halló correlación entre este incremento células Tregs FoxP3⁺ en los NLH de cabras y cualquier otro dato parasitológico o patológico.

Según Hoste y cols. 2010, tanto las ovejas como las cabras parecen tener diferentes mecanismos inmunitarios en respuesta a nematodos gastrointestinales, pero no parece haber diferencias en el caso de la infección con *F. hepatica*.

En conclusión, este Tercer Trabajo de la Tesis Doctoral corresponde a la primera descripción publicada de la distribución de células Tregs FoxP3⁺ en lesiones hepáticas agudas y crónicas y en NLH de ovejas y cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Así, la expansión de las células Tregs FoxP3⁺ durante las fases hepática y biliar estarían involucradas, además de en la supervivencia del parásito, en la minimización de la patología local.

Basándonos en estos resultados, sería interesante realizar futuros estudios enfocados en la investigación de las moléculas parasitarias, particularmente de las producidas por las larvas juveniles recién desenquistadas, involucradas en la expansión de las células Tregs FoxP3⁺, así como en el estudio de las citoquinas producidas por este tipo celular en las distintas lesiones causadas por *F. hepatica* en el hígado de rumiantes y, de esta forma, profundizar en el conocimiento del papel de las células Tregs FoxP3⁺ en la inmunomodulación y supervivencia de *F. hepatica* en su hospedador.

CONCLUSIONES

1^a.- En las fases migratorias de la infección (8 y 28 dpi), el número de eosinófilos caspasa-3⁺ incrementó fundamentalmente en torno a los focos de necrosis de reciente formación y, en menor medida, alrededor de los granulomas con respecto a los controles negativos (**Primer Trabajo**).

2^a.- Durante las fases crónicas de la infección (17 spi), el número de eosinófilos caspasa-3⁺ incrementó en torno a los conductos biliares que alojaban al parásito adulto y, en menor medida, en eosinófilos hallados en zonas del parénquima alejadas de ellos (**Primer Trabajo**).

3^a.- Dado que los eosinófilos tienen un papel fundamental en la respuesta inata frente a helmintos, la inducción a la apoptosis de éstos por parte de *F. hepatica* podría ser una estrategia fundamental de inmunomodulación tanto durante la fase migratoria como biliar (**Primer Trabajo**).

4^a.- Mediante el uso de citometría de flujo con el kit Anexina V se detectó apoptosis en leucocitos peritoneales en mayor porcentaje en fases más tempranas que mediante caspasa 3 e inmunohistoquímica (**Segundo Trabajo**).

5^a.- El significativo incremento de leucocitos peritoneales en apoptosis detectados desde el 1 dpi mediante Anexina V y desde 9 dpi mediante caspasa 3, sugieren que *F. hepatica* es capaz de inducir apoptosis de linfocitos, macrófagos y granulocitos peritoneales como estrategia para evadir la respuesta del hospedador (**Segundo Trabajo**).

6^a.- El significativo incremento de los linfocitos CD3⁺ y FoxP3⁺ a partir de los 9 dpi en el infiltrado inflamatorio hepático en oveja y cabra, sugiere que las células T reguladoras juegan un importante papel en la modulación local de la respuesta inmune desde las fases migratorias tempranas (***Tercer Trabajo***).

7^a.- En las lesiones hepáticas crónicas a las 15-19 spi, se produce un aumento del número de células T reguladoras FoxP3⁺ en ambas especies. Siendo este incremento mucho más acusado en la periferia de grandes vasos biliares donde se alojan los adultos de *F. hepatica* y granulomas, lo que sugiere que podría ser un proceso inducido por el parásito para facilitar su propia supervivencia y para limitar el daño hepático (***Tercer Trabajo***).

CONCLUSIONS

1st.- In the migratory stages of the infection (8 and 28 dpi), the number of eosinophils caspase-3⁺ increased mainly in the periphery of necrotic foci and in a less amount around the granulomas, compared to negative controls (*First Work*).

2nd.- During chronic stages of infection (17 wpi), the number of eosinophils caspase-3⁺ increased mainly in the periphery of enlarged biliary ducts containing adult flukes, and in a lesser amount in hepatic lesions not related with enlarged bile ducts (*First Work*).

3rd.- Since eosinophils have a very important role in the innate response against helminths, the apoptosis of this effector cell during the migratory and chronic stages of *F. hepatica* infection, may be an important modulation mechanism to avoid the host immune response (*First Work*).

4th.- Apoptosis of peritoneal leucocytes was detected in a higher percentage and in earlier stages, using an Annexin V assay with flow cytometry, than by caspase-3 antibody and immunohistochemistry (*Second Work*).

5th.- The dramatic increase of apoptosis in the peritoneal macrophages, eosinophils and lymphocytes detected from 1 dpi onwards using the Annexin V assay and from 9 dpi using casase-3 antibody, suggest that *F. hepatica* may be able to induce apoptosis of peritoneal leucocytes as mechanism to avoid the host immune response (*Second Work*).

6th.- The rapid expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in the acute phase of the infection suggest that the regulatory T cells play an important role in the local immunomodulation of host immune response during the early migratory stages in sheep and goats (*Third Work*).

7th.- The increase of Foxp3⁺ regulatory T cells in chronic hepatic lesions was more pronounced in the inflammatory infiltrates adjacent to enlarged bile ducts than in the periphery of granulomas. This suggest that Foxp3⁺ regulatory T cells are specifically recruited to the vicinity of *F. hepatica* adult flukes, and this may be and important mechanism of modulate the host local response to facilitate parasite survival for years (*Third Work*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383, 787–793.
- Ackerman, S.J., Kephart, G.M., Francis, H., Awadzi, K., Gleich, G.J., Ottesen, E.A., 1990. Eosinophil degranulation: an immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *J. Immunol.* 144, 3961-3969.
- Adalid-Peralta, L. Fragoso, G., Fleury, A., Sciutto, E., 2011. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1412-1426.
- Aldridge, A., O'Neill, S.M., 2016. '*Fasciola hepatica* tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner', *Eur J Immunol.* 46: 1180-1192.
- Allen, J.E., Maizels, R.M., 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today* 18, 387-392.
- Al-Megrin, W.A.I y Al-Qahtani, W.S., 2016. Apoptotic gene expression in sheep hepatocytes during *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis). *Br. Biotechnol. J.* 12(4), 1-11.
- Almeida, M.S., Torloni, H., Lee-Ho, P., Vilar, M.M., Thaumaturgo, N., Simpson, A.J., Tendler, M., 2003. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunol.* 25, 135-137.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvensen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell.* 87, 171.
- Alvarez-Rojas, C.A., Ansell, B.R., Hall, R.S., Gasser, R.B., Young, N.D., Jex A.R., Scheerlinck, J.P., 2015. Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasit Vectors.* 8, 124.
- Andrews, S.J., 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing. Cambridge UK, pp 1-29.
- Arias, M.S., Piñeiro, P., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Hillyer, G.V., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A., Morrondo, P., 2013. Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic area. *Res Vet Sci.* 95(3):1031-1035.

- Babu, S., Blauvelt, C.P., Kumaraswami, V., Nutman, T.B., 2006. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. *J Immunol.* 176, 3248-3256.
- Baeza, E., Poitou, I., Villejoubert, C., Boulard, C., 1994. Complement depletion in rats infected with *F. hepatica*: in vivo and in vitro studies. *Vet. Parasitol.* 51, 219-230.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N., 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv.Parasitol.* 45, 181- 241.
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-115.
- Behm, C.A. y Sangster, N.C., 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspect. En: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*. CABI Publishing, Cambridge UK, pp 185-224.
- Beiting, D.P., Gagliardo, L.F., Hesse, M., Bliss, S.K., Meskill, D., Appleton, J.A., 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β . *J. Immunol.* 178, 1039–1047.
- Belkaid, Y., 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews.* 7, 875-888.
- Belkaid, Y., and Tarbell, K., 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 551–589.
- Bennet, C.E., 1975. Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 61, 886-891.
- Bernard, A., Boumsell, L., 1984. Human leukocyte differentiation antigens. *Presse Medica.* 13(38), 2311-6.
- Bluestone J.A., y Abbas A.K., 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 253–257.
- Boch J., Supperer, R., 1986. *Parasitología veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.
- Boray J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7, 95-209.
- Boray, J.C., Crowfoot, P.D., Strong, M.B., Allison, J.R., Schellenbaum, M., Von Orelli, M. Sarasin, G., 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113, 315-317.

- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonneux, J.F., Losson, B., 2000a. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 87, 103-123.
- Bossaert, K., Jacquinet E., Saunders, J., Farnir, F., Losson., B., 2000b. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*, *Vet. Parasitol.*, 88: 17-34.
- Brady, M.T., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Mills, K.H., 1999. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* 67, 5372-5378.
- Brito, T.N., Vilar, M.J., Almeida, J.B., Faria, A.L., Medeiros, S.D., Medeiros, M.C., Silva, E.M., Silva, V.M., Souza, L.B., Arruda, L.K., Costa, T.X., Junior, G.B., Oliveira, A.G., Sales, V.S., 2014. Measuring eosinophiluria, urinary eosinophil cationic protein and urinary interleukin-5 in patients with lupus nephritis. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 10, 61.
- Butterworth, A.E., Wassom, D.L., Gleich, G.J, Loegering, D.A., David, J.R., 1979. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 122, 221-229.
- Butterworth, A.E., David, J.R., 1981. Eosinophil function. *N. Engl. J. Med.* 304(3), 154-6.
- BVA'S Technical Development Commite, 1974. Hepatic vascular pathology in ovine fascioliasis. *Vet. Rec.* 95, 572-573.
- Cadman, E.T., Thyse, K.A., Bearder, S., Cheung, A.Y.N., Johnston, A.C., Lee, J.J., Lawrence, R.A., 2014. Eosinophils Are Important for Protection, Immunoregulation and Pathology during Infection with Nematode Microfilariae. *PLOS Pathogens.* 10, e1003988
- Canbay, A, Friedman, S, Gores, G., 2004. Apoptosis: The nexus of liver injury and Fibrosis, *Hepatology.* 39, 273-278.
- Cantarini, L., Volpi, N., Carbotti, P., Greco, G., Aglianò, M., Bellisai F, Giannini, F., Alessandrini, C., Grasso, G., Galeazzi, M., 2009. Eosinophilia-associated muscle disorders: an immunohistological study with tissue localisation of major basic protein in distinct clinicopathological forms. *J. Clin. Pathol.* 62(5), 442-447

- Caro, M.R., Gallego, M.C., Buendía, A.J., Navarro, E., Navarro, J.A., 1998. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. *Res.Vet. Sc.* 65(2), 145-148.
- Carranza, F., Falcon, C.R., Nunez, N., Knubel, C., Correa, S.G., Bianco, I., Maccioni, M., Fretes, R., Triquell, M.F., Motran, C.C., Cervi, L., 2012. Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells, *PLoS One*, 7: e40356.
- Cervi, L., Rubinstein, H., Masih, D.T., 1996. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Vet. Parasitol.* 61, 97–111
- Charlier, J., Soenen, K., De Roeck, E., Hantson, W., Ducheyne, E., Van Coillie, F., Vercruysse, J., 2014a. Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. *Parasit. Vectors.* 7, 528.
- Charlier J., Vercruysse J., Morgan E., Van Dijk J., Williams D.J., 2014b. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitol.* 141 (3), 326–335,
- Chauvin A., Bouvet G., Boulard C., 1995. Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* 25, 1227-1241.
- Chauvin A., Boulard C., 1996. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite.* 3, 209-215.
- Chauvin, A., Moreau, E., Boulard, C., 2001. Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels, *Vet Res*, 32: 87-92.
- Chen, K.M., Lee, H.H., Lai, S.C., Hsu, L.S., Wang, C.J., Liu, J.Y. , 2008. Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp.Parasitol.* 119, 385-390.
- Chen, L., Rao K.V., He Y.X., Ramaswamy K. 2002. Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. *J. Biol. Chem.* 277, 34329-34335.
- Chen, M.G., Mott, K.E., 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop. Dis. Bulletin* 87, R1-R38.

- Chow S.C., Brown A., Pritchard D., 2000. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol.* 22, 21-29.
- Chung, J.Y., Bae, Y.A., Yun, D.H., Yang, H.J., Kong, Y., 2012. Experimental murine fascioliasis derives early immune suppression with increased levels of TGF-beta and IL-4, *Korean J Parasitol.* 50: 301-308.
- Claridge, J., Diggle, P., McCann, C.M., Mulcahy, G., Flynn, R., McNair, J., Strain, S., Welsh, M., Baylis, M., Williams D.J.L., 2012. *Fasciola hepatica* is associated with failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications*, 22; 3:853.
- Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 62, 71–82.
- Clery D.G., Mulcahy, G., 1998. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet. Sci.* 65, 169-171.
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Losonsky, G., Sandoval, C., Espinel, I., Sridhara, R., Aguilar, M., Guevara, A., Guderian, R.H., Levine, M.M., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2000. Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J. Infect. Dis.* 182, 1199–1206.
- Cooper, P.J., Chico, M., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Levine, M.M., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2001. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect. Immun.* 69, 1574–1580.
- Couper, K. N., Blount, D. G., Riley, E. M., 2008. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180, 5771–5777.
- Dalton, J.P., Brindley, P.J., 1997. Proteases of trematodes. En: Fried B and Craczyk TK (eds.). *Advances in trematode biology.* CRC Press, Baton Raton y Nueva York, pp 265-308.
- Dalton, JP. y Mulcahy, G., 2001. Parasite vaccines--a reality? *Vet. Parasitol.* 98, 149-167.
- Dalton, J.P., Brindley, P.J., Knox, D.P., Brady, C.P., Hotez, P.J., Donnelly, S., O'Neill S.M., Mulcahy, G., Loukas, A., 2003a. Helminth vaccines: from mining

genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int. J. Parasitol.* 33, 621-640.

- Dalton, J.P., O'Neill, S.M., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moire, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, AG., Donnelly, SM., 2003b. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* 30, 1173-1181.
- Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272-285.
- Das Mohapatra, A., Panda, S.K., Pradhan, A.K., Prusty, B.K., Satapathy, A.K., Ravindran B., 2014 Filarial antigens mediate apoptosis of human monocytes through toll-like receptor 4. *J. Infect. Dis.* 210(7), 1133-1144.
- Davis, W.C., Machugh, N.D., Park, Y.H., Hamilton, M.J., Wyatt, C.R., 1993. Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3). *Vet. Immunol. Immunopathol* 39(1-3), 85-91.
- Davis, W.C., Naessens, J., Brown, W.C., Ellis, J.A., Hamilton, M.J., Cantor, G.H., Barbosa, J.I., Ferens, W., Bohach, G.A., 1996. Analysis of monoclonal antibodies reactive with molecules upregulated or expressed only on activated lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52(4), 301-311.
- Dawes, B., 1961. On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of a experimental host, the mouse: a histological picture. *J. Helminthol. R.T. Leiper supplement*, 41-52.
- Dawes, B., 1963a. Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitol.* 53, 123-133.
- Dawes, B., 1963b. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in the mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitol.* 53, 109-122.
- Dawes, B., Hughes, D.L., 1964. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Adv. Parasitol.* 8, 97-168.
- Devitt, A. and Marshall, L. J. (2011). The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J. Leukocyte Biol.* 90, 447-457.

- Dixon, K.E., 1966. The physiology of excystment of the metacercarias of *Fasciola hepatica*. L. Parasitol. 56, 431-456.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J.P., 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. Infect. Immun. 73, 166–173.
- Donnelly, S., Stack, C.M., O'Neill, S.M., Sayed, A.A., Williams, D.L., Dalton, J.P., 2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. FASEB J. 22, 4022–4032.
- Dow, C., Ross, J.G., Tood, J.R., 1968. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. Parasitol. 58, 120-135.
- Dowling, D.J., Hamilton, C.M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P.M., Dalton, J.P., O'Neil, S.M., 2010. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses, Infect. Immun., 78: 793-801.
- Doy, T.G., Hughes, D.L., Harness, E., 1981. Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. Res. Vet. Sci. 30, 360-363.
- Doy, T.G., Hughes, D.L., 1982. In vitro cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. Res. Vet. Sci. 32(1), 118-120.
- Duffin, R., Leitch, A.E., Sheldrake, T.A., Hallet, J.M., Meyer, C., Fox, S., Alessandri, A.L., Martin, M.C., Brady, H.J., Teixeira, M.M., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2009. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. FEBS Letters. 583, 2540-2546.
- Duffus, W.P.H., Franks, D., 1980a. *In vitro* effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. Clin. Exp. Immunol. 41, 430–440
- Duffus, W.P.H., Thorne, K., Oliver, R., 1980b. Killing of juvenile *Fasciola hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. Clin. Exp. Immunol. 40, 336–344
- Escamilla, A., Bautista, M.J., Zafra, R., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martínez-Cruz, S., Méndez, A., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernandez, V., Perez, J., 2016. *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. Vet. Parasitol. 216, 84-88.

- Fairweather, I., 2009. Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? *J. Helminthol.* 83(2), 139-50. Review.
- Fairweather, I., 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.* 180, 133-143.
- Falcon, C., Carranza, F., Martinez, F.F., Knubel, C.P., Masih, D.T., Motran, C.C., Cervi, L., 2010. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells, *Vet Immunol Immunopathol.* 137: 36-46.
- Falcon, C. R., Masih, D., Gatti, G., Sanchez, M.C., Motran, C.C., Cervi, L., 2014. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses, *PLoS One*, 9: e114505.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-54.
- Ferrick, D.A., King, D.P., Jackson, K.A., Braun, R.K., Tam, S., Hyde, D.M., Y Beaman, B.L., 2000. Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers. *Springer Seminars in Immunopathology* 22(3), 283-296.
- Finkelman, F.D., Svetic, A., Gresser, I., Snapper, C., Holmes, J., Trotta, P.P., Katona, I.M., Gause, W.C., 1991. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J. Exp. Med.* 174(5), 1179-1188.
- Finney, C.A., Taylor, M.D., Wilson, M.S., Maizels, R.M., 2007. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur J Immunol.* 37, 1874-1886.
- Flynn, R.J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O., Mulcahy, G., 2007. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovinetuberculosis. *Infect. Immun.* 75(3), 1373-1381.
- Flynn, R.J., Mulcahy, G., 2008. The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection, *Int J Parasitol.* 38: 1673-80.
- Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheikha. H.M., 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control, *Vet Parasitol.* 169: 235-40.

- Fox, N.J., White, P.C., Mcclean, C.J., Marion, G., Evans, A., Hutchings, M.R., 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. PLoS One. 6(1):e16126.
- Galioto, A.M., Hess, J.A., Nolan, T.J., Schad, G.A., Lee, J.J., Abraham, D., 2006. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. Infect. Immun. 74, 5730–5738.
- Garcia-Campos, A., Ravida, A., Nguyen, D.L., Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Hokke, C.H., O'Neill, S., Mulcahy, G., 2016. 'Tegument glycoproteins and cathepsins of newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* carry mannosidic and paucimannosidic N-glycans', PLoS Negl Trop Dis. 10: e0004688.
- Garza-Cuartero, L., O'Sullivan, J., Blanco, A., McNair, J., Welsh, M., Flynn, R.J., Williams, D., Diggle, P., Cassidy, J., Mulcahy, G., 2016. *Fasciola hepatica* infection reduces *Mycobacterium bovis* burden and mycobacterial uptake and suppresses the pro-inflammatory response. Parasite Immunol. 38(7):387-402.
- Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A., Rudensky, A.Y., 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. Nature; 445, 936–940.
- Genicot, B., Mouligneau, F., Lekeux, P., 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-musled fattening cattle. Journal of Vet. Med., Series B 38, 203-208.
- Girardi, M., Lewis, J.M., Filler, R.B., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., 2006. Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gamma delta T cells. Journal of Investigative Dermatology. 126(4), 808-814.
- Glauert, A.M., Lammas, D.A., Duffus, W.P., 1985. Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*, Parasitol. 91 (Pt 3): 459-470.
- Gleich, G.J., Loegering, D.A., 1984. Immunobiology of eosinophils. Annual Reviews of Immunology. 2, 429-459.
- Golden, O., Flynn, R.J., Read, C., Sekiya, M., Donnelly, S.M., Stack, C., Dalton, J.P., Mulcahy, G. 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). Vaccine 28, 5551–5557.

- Gómez-Muñoz, M.T., Canals-Caballero, A., Almeida, S., Pasquali, P., Zarlenga, D.S., Gasbarre, L.C., 2004. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of stomach worm *Ostertagia ostertagi*. *Vet parasitol.* 120, 199-214.
- Gonzalez, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province. Peru. *Acta Trop.* 120 (1–2), 119–129.
- González-Lanza, C., Manga-González, Y., Del Pozo Carnero, Hidalgo-Arguello, R., 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda Digenea) in the faeces of cattle in the Porma basin, Spain. *Vet. Parasitol.* 34, 35-43.
- Graczyk, T.K., Fried, B., 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis* CABI Publishing, Cambridge UK, pp 31-46.
- Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., McSorley, H.J., Harcus, Y., Filbey, K.J., Finney, CA, Greenwood, EJ, Knox, DP, Wilson, MS, Belkaid, Y, Rudensky, AY, Maizels, R.M., 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J. Exp. Med.* 207, 2331-2341.
- Greene, B.M., Gbakima, A.A., Albiuz, E.J., Taylor, H.R., 1985. Humoral and cellular immune responses to *Onchocerca volvulus* in humans. *Rev. Infect. Dis.* 7, 789–795.
- Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T. 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359-363.
- Gurish, M.F., Bryce P.J., Tao, H., Kisselgof, A.B., Thornton, E.M., Miller, H.R., Friend, D.S., Oettgen, H.C. 2004. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol* 172(2),1139-1145.
- Hamilton, C.M., Dowling, D.J., Loscher, C.E., Mophew, R.M., Brophy, P.M., O'Neill, S.M., 2009. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect Immun*, 77: 2488-2498.
- Han, H., Peng, J., Gobert, G.N., Hong, Y., Zhang, M., Han, Y., Fu, Z., Shi, Y., Xu, J., Lin J., Tao, J., 2013. Apoptosis phenomenon in the schistosomulum and adult worm life cycle stages of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Int.* 62, 100-108.

- Hanna, R.E.B., 1980a. *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.* 50, 103–114.
- Hanna, R.E.B., 1980b. *Fasciola hepatica*: glycocalix replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.* 50, 103–114.
- Hanna, R.E.B., 1980c. *Fasciola hepatica*: autoradiography of protein synthesis, transport and secretion by the tegument. *Exp. Parasitol.* 50, 297–304.
- Heffernan, M., Smith, A., Curtain, D., McDonnell, S., Ryan, J., Dalton, J.P., 1991. Characterization of a cathepsin-B proteinase released by *Fasciola hepatica* (liver fluke). *Biochem. Soc. Trans.* 19, 27S.
- Hein, W.R., Mackay, C.R., 1991. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12(1), 30–34.
- Helmbj, H., and Grecis, R.K., 2003. Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. *Eur. J. Immunol.* 33, 2382–2390.
- Herbert, D.R., Lee, J.J., Lee, N.A., Nolan, T.J., Schad, G.A., Abraham D., 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J. Immunol.* 165, 4544–4551.
- Hillyer, G.V., Soler de Galanes, M., Battisti, G., 1992. *Fasciola hepatica*: host responders and non-responders to parasite glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 75, 176–186.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., Wynn, T.A., 2000. IL-10 and the dangers of immune polarization: Excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J. Immunol.* 164, 6406–6416.
- Hope-Cawdery, M.J., Gettinby, G., Grainger, J.N.R., 1978. Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. En: *Weather and Parasitic Animal Disease*. World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, pp 21–38.
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY, Jackson F, Beveridge I, 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol.* 26(8):376–381.

- Hughes, D.L., Hanna R.E.B., Symonds, H.W., 1981. *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp. Parasitol.* 52, 271- 279.
- Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.R., 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6(4), 371-390.
- Jackson, J.A., Friberg, I.M., Little, S., Bradley, J.E., 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis:immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunol.* 126, 18-27.
- Janeway, C.A.J.R., Jones, B., Hayday, A., 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol. Today* 9, 73-76.
- Jedlina, L., Kozak-Ljunggren, M., Wedrychowicz, H., 2011. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp. Parasitol.*128, 291–297
- Jefferies, J.R., Barrett, J., Turner, R.J., 1996. Immunomodulation of sheep and human lymphocytes by *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Int. J. Parasit.* 26, 1119–1121.
- Jusakul, A., Loilome, W., Namwat, N., Haigh, W.G., Kuver, R., Dechakhamphu, S., Sukontawarin, P., Pinlaor, S., Lee, S.P., Yongvanit, P., 2012 Liver fluke-induced hepatic oxysterols stimulate DNA damage and apoptosis in cultured human cholangiocytes. *Mutat. Res.* 731, 48-57.
- Khallaayoune, K.H., Stromberg, B.E., Dakkak, A., Malone, J.B., 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *Inter. J. of Parasit.* 21, 307-314.
- Kelley, J.M., Elliott, T.P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T.W., 2016. Current threat of Triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 32, 458-469.
- Kelly, W.R., 1993. The liver and biliary system. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. y Palmer N. (eds.). *Pathology of domestic animals.* pp. 319-407.
- Kendall, S.B., PARFILL, J.W., 1962. The chemotherapy of fascioliasis. *Br. Vet. J.* 118, 1-10.

- Kennedy, N.J., Spithill, T.W., Tennent, J., Wood, P.R., Piedrafita, D., 2006. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine*. 24(7), 970-979.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8, 191–197.
- Klion, A.D., Nutman, T B., 2004. The role of eosinophils in host defense against helminths parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 30–37.
- Kofta, W., Mieszczanek, J., Plucienniczak, G., Wedrychowicz, H., 2000. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine*. 18, 2985-2990.
- Konno A., Hashimoto Y., Kon Y., Okada K., Davis W.C., Sugimura, M., 1995. Expression of gamma delta T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopath.* 48(1-2), 105-112.
- Konopka, B., 1993. Ocurrance of parasites in slaughter animals in Kielce regioin (centraPoland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* 49, 373-374.
- LaCourse, E.J., Perally, S., Morphew, R.M., Moxon, J.V., Prescott, M., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Klipar, A., Hetzel, U., Hoey, E., Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Arévalo, J., Brophy, P.M., 2012. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (5): e1666.
- Layland, L.E., Rad, R., Wagner, H., da Costa, C.U., 2007. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur. J. Immunol.* 37, 2174–2184.
- Lenton, L.M., Bygrave, F.L., Behm C.A., 1996. *Fasciola hepatica* infection in sheep: changes in liver metabolism. *Res. Vet. Sci.* 61, 152-156.
- Lizarbe, M.A., 2007. Apoptosis y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 101, 2.
- Loo, D.T., 2011. In situ detection of apoptosis by the tunel assay: An overview of techniques. *Methods Mol. Bio.* 682, 3-13.
- Maizels, R.M., Bundy, D.A., Selkirk, M.E., Smith, D.F., Anderson, R.M., 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human population. *Nature*. 365, 797-805.
- Maizels, R.M., Holland, M.J., 1998. Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths. *Curr. Biol.* 8(20), R711-4.

- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89- 116.
- Manga, Y., González-Lanza, C., Del Pozo, P., Hidalgo, R., 1990. Kinectis of *Fasciola hepatica* egg pasaje in the faeces of sheep in the Porna basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica* 35, 149-157.
- Maqbool, A., Hashmi, H.A., Shafique, M., Akhtar, T., Ahmad, M., Mahmood, F., 2000. Epidemiology and chemotherapy of fascioliasis in goats. *Indian J. Anim. Res.* 34(1), 33-36.
- Martínez-Moreno, A., Martínez-Cruz, M.S., Martínez, F.J., Gutiérrez, P.N., Hernández, S., 1996. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 62, 247-252.
- Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I., Gutierrez, P.N., Hernández, S., 1997. Humoral and cellular immune response to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol. Res.* 83, 680-686.
- Martínez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Moreno, T., Redonde, E.S.H., Martín De Las Mulas, J., Pérez, J., 1999. Liver pathology and immuneresponse in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet.Parasitol.* 82, 19-33.
- Martinez-Moreno, A., Jimenez-Luque, V., Camara, S., Martinez-Moreno, F.J., Acosta, I., Hernandez. S., 2000. Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secundarily *Fasciola hepatica* infected goats, *Int J Parasitol*, 30: 1013-1017.
- Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez, C., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., González-Lanza, C., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F.A., 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit. Vectors.* 6, 282.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 1997. Human liver flukes: a review. *Res. Rev. Parasitol.* 57, 145–218.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Esteban, J.G., 1999. Human fasciolosis. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., Fuentes, M.V., 2003. Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from

below sea level up to the very high altitude. In: Combes C., Jourdan J. (eds) Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites, vol 2. Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan.

- Mas-Coma, S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* 79, 207–216.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D., 2009. Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69, 41–146.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2014. Fascioliasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 766, 77-114.
- Mackay, C.R., Beya, M.F., Matzinger, P., 1989. Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *Eu. J. Immunol.* 19(8), 1477-1483.
- McKee, A.S. and Pearce, E.J., 2004. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol.* 173, 1224-1231.
- Mcmanus, D.P. and Dalton, J.P., 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitol.* 133, Suppl: S43-61.
- McNeilly, T.N., McIntyre, J., Frew, D., Griffiths, D.J., Wattedegera, S.R., van den Broek, A., Huntley, J.F., 2010. Infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite, results in recruitment of Foxp3(+) T cells into the dermis. *Parasite Immunol.* 32(5), 361-369
- McNeilly, T.N., Rocchi, M., Bartley, Y., Brown, J.K., Frew, D., Longhi, C., McLean, L., McIntyre, J., Nisbet, A.J., Wattedegera, S., Huntley, J.F., Matthews, J.B. 2013. Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Vet. Res.* 44, 70
- McCole, D.F., Doherty, M.L., Torgerson, P.R., Baird, A.W., 1998. Local immune responses in colon from cattle infected with *Fasciola hepatica*, *Int J Parasitol.* 28: 1733-7.
- McSorley, H.J., Hewitson, J.P., Maizels, R.M., 2013. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301-310.

- Meeusen, E., Brandon, M.R., 1994. The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune response during infection. *E. J. Immunol.* 24, 469-474.
- Meeusen, E., Lee, C.S., Rickard, M.D., Brandon, M.R., 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17, 37-45.
- Mitchell, M., 1995. The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zealand. *Surveillance* 22, 22-26.
- Mills, K.H., 2004. Regulatory T Cells: Friend or Foe in Immunity to Infection? *Nat Rev Immunol.* 4, 841-855.
- Molina, E.C., Skerratt, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*, *Vet Parasitol*, 131: 157-163.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A, Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111.
- Montgomery, T.D., Leid, R.W., Westcott, R.B., 1986. Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 19, 55-65.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765.
- Morphew, R.M., Hamilton, C.M., Wright, H.A., Dowling, D.J., O'Neill, S.M, Brophy, P.M., 2013. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. *Vet. Parasitol.* 191(3-4), 379-385.
- Mosconi, I., Dubey, L.K., Volpe, B., Esser-von Bieren, J., Zaiss, M.M., Lebon, L., Massacand, J.C., Harris, N.L., 2015. Parasite proximity drives the expansion of regulatory T cells in Peyer's patches following intestinal helminth infection. *Infect Immun.* 83(9), 3657-3665.
- Mkupasi, E.M., Sikasunge, C.S., Ngowi, H.A., Leifsson, P.S., Johansen, M.V., 2013. Detection of cysteine protease in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Vet. Parasitol.* 197, 360-363.
- Mulcahy, G., 1999. Immunology of *Fasciola hepatica* Infection. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 341-376.

- Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D., Hogan, S.F., Dowd, A.J., Andrews, S.J., Dalton J.P., 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. Res. Vet. Sci. 67, 27-33.
- Narain, K., Biswas, D., Rajguru, SK., Mahanta, J., 1997. Human distomatosis due to *Fasciola hepatica* infection in Assam, India. J. Commun. Dis. 29(2), 161-165.
- Navarro, J.A., Caro, M.R., Seva, J., Rosillo, M.C., Gomez, M.A., Gallego, MC., 1996. Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 51(1-2), 147-456.
- Nguyen, K.H., Suzuki, H., Wakasugi, T., Hohchi, N., Hashida, K., Kitamura, T., Shibata, M., 2012. Expression of epidermal growth factors, erbBs, in the nasal mucosa of patients with chronic hypertrophic rhinitis. ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 74, 57-63.
- Nizet, V., Rothenberg, M.E., 2008. Mitochondrial missile defense. Nat. Med. 14(9), 910-912.
- Nolan, C.R., Anger, M.S. Kelleher, S.P., 1986. Eosinophiluria--a new method of detection and definition of the clinical spectrum. N. Engl. J. Med. 315, 1516-1519.
- Nono, J.K., Pletinckx, K., Lutz, M.B., Brehm, K., 2012. Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. PLoS Negl. Trop. Dis. 6(2), e1516.
- Nutman, T.B., 2013. Immune responses in helminth infections. In: Lee JJ, Rosenberg, HF (eds) Eosinophils in health and disease. Academic Press, Waltham, pp 312-320.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H., Dalton J.P., 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. Parasite Immunol. 22(3), 147-155.
- Paz Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suarez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Diaz Baños, P., Morrondo, P., 2003. Prevalence of natural ovine fascioliasis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. Parasitol. Res. 91(4), 328-331.
- Pearce, E.J., Sher, A., 1991. Functional dichotomy in the CD4+ T-cell response to *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 73, 110-116.

- Pearce, E.J., Caspar, P., Grych, J.M., Lewis, F.A., Sher, A., 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.
- Pérez, J., Martín De Las Mulas, J., Chacón-M DE LARA, F., Gutierrez-Palomino, P.N., Becerra-Martel, C., Martínez Moreno, A., 1998. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Vet. Immunol. Immunopath.* 64, 337-348.
- Pérez, J., Martín de las Mulas, J., Carrasco, L., Gutierrez, P.N., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, A., 1999. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 120, 199-210.
- Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sández, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J.Comp. Path.* 127, 30-36.
- Pérez, J., García, P.M., Hernández, S., Mozos, E., Cámara, S., Martínez Moreno, A., 2003. Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Vet. Parasitol.* 111(4), 333-342.
- Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N., Spithill, T.W. 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.*, 75, 1954-1963.
- Piedrafita, D., Spithill, T.W., Smith, R.E., Raadsma, H.W., 2010. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol.* 32(8), 572–581.
- Pinheiro, R.O., Pinto, E.F., Benedito, A.B., Lopes, U.G., Rossi-Bergmann, B., 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 76(3), 519-527.
- Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen E., Piedrafita, D., 2011b. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response', *Parasite Immunol.* 33: 495-505.

- Pleasance, J., Raadsma, H.W., Estuningsih, S.E., Meeusen, E., Piedrafita, D., 2011a. Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *F. hepatica* infection. *Vet. Parasitol.* 178, 264–272.
- Poitou, I., Baeza, E., Boulard, C., 1993. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*, *Vet Parasitol*, 49: 179-90.
- Poglayen, G., Capelli, G., Martini, M., Zampiccoli, R., 1995. Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autonoma di Trento. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 27, 483-489.
- Pritchard, D.I., Hewitt, C., Moqbel, R., 1997. The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitol.* 115, 33-44.
- Prussin C., Metcalfe D.D., 2003. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 111(2 Suppl):S486-94.
- Ramalingam, T., Ganley-Leal, L., Porte, P., Rajan, T.V., 2003. Impaired clearance of primary but not secondary *Brugia* infections in IL-5 deficient mice. *Exp. Parasitol.* 105, 131–139.
- Ravin, K.A., Loy, M., 2016. The eosinophil in infection. *C. Rev Allergy Immunol.* 50:214–227
- Reddington, J.J., Leid, R.W., Wescott R.B., 1986. The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet. Parasitol.* 19, 145-150
- Reimert, C.M., Fitzsimmons, C.M., Joseph, S., Mwatha, J.K., Jones, F.M., Kimani, G., Hoffmann, K.F., Booth, M., Kabatereine, N.B., Dunne, D.W., Vennervald, B.J., 2006. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre- and posttreatment with praziquantel. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 584–593.
- Resendes, A.R., Majo, N., Segales, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarias M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by tunel and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203-213.

- Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P., Ranganathan, S., 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol.Cell. Proteom.* 8, 1891-1907.
- Robinson, M.W., Donnelly, S.M., Hutchinson, A.T., To, J., Taylor, N.L., Norton, R.S., Perugini, M.A., Dalton, J.P., 2011. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry host antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 7, e1002042.
- Rodríguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao, M.L., Brossard, N., Chiale, C., Carmona, C., Giacomini, C., Freire, T., 2015. Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-Induced maturation of dendritic cells. *Plos Neglect. Trop. Dis.* 9(12): e0004234.
- Roitt, I., 2001. *Essential Immunology* 10th ed. Blackwell Science Inc., USA.
- Rojo-Vázquez, F.A., Ferre Pérez, I., 1999. Parasitosis hepáticas. En "Parasitología Veterinaria". McGraw-Hill-Interamericana. pp. 260-282.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 189, 15-38.
- Rosenberg, S.H., 2011. Mammalian apoptosis in a parasitic worm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6695-6696.
- Ross, J.G., Dow, C., Todd, J.R., 1967. A study of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Rec.* 18, 543-546.
- Rowcliffe, S.A., Ollerenshaw, C.B., 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 54, 172-181.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., Rudensky, A.Y., 2010. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329, 1667-1671.
- Rumbley, C.A., Sugaya, H., Zekavat, S.A., El Refaei, M., Perrin, P.J., Phillips, S.M., 1999. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J. Immunol.* 162, 1003-1009.
- Rumbley, C.A., Sugaya, H., Zekavat, S.A., Perrin, P.J., Phillips, S.M., 2001. Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by Fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 442-449.

- Rushton, B., 1977. Ovine fascioliasis following reinfection. *Res. Vet. Sci.* 22, 133-134.
- Rushton, B., Murray, M., 1977. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J. Comp. Pathol.* 87, 459-470.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sandeman, R.M., Howell, M.J., 1981. Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 30, 294-297.
- Satoguina, J., Mempel, M., Larbi, J., Badusche, M., Loliger, C., Adjei, O., Gachelin, G., Fleischer, B., Hoerauf, A., 2002. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). 13, 1291-1300.
- Sawant, D.V., Gravano, D.M., Vogel, P., Giacomini, P., Artis, D., Vignali, D.A., 2014. Regulatory T cells limit induction of protective immunity and promote immune pathology following intestinal helminth infection. *J Immunol.* 192(6):2904-2912.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Torgerson, P.R., 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 157(7), 188-193.
- Semnani, R.T., Venugopal, P.G., Mahapatra, L., Skinner, J.A., Meylan, F., Chien, D., Dorward, D.W., Chaussabel, D., Siegel, R.M., Nutman, T.B., 2008. Induction of TRAIL- and TNF-alpha-dependent apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells by microfilariae of *Brugia malayi*. *J. Immunol.* 181, 7081-7089.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., Masih, D.T., 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197-208.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Masih, D.T., 2009. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 95-106.
- Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343(1), 57–83
- Shin, M.H., 2000. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *Korean J. Parasitol.* 38 (1),17-23.

- Shinoni, M.I. y Paraná, R., 2006. Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 36, 211-217.
- Sibille, P., Tliba, O., Boulard, C., 2004. Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. *Vet. Res.* 35, 573-584.
- Simons, J.E., Rothenberg, M.E., Lawrence, R.A., 2005. Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *E. J. Immunol.* 35, 189-197.
- Sinclair, K.B., 1962. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *Br. Vet. J.* 118, 37-53.
- Sinclair, K.B., 1967. Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. *Helminthol. Abst.* 3, 115-134.
- Sinclair, K.B., 1968. The effect of corticosteroid on the plasma protein of lamb infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 9, 181-183.
- Sinclair, K.B., 1970. The Pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *Br. Vet. J.* 127, 125-136.
- Sinclair, K.B., 1975. The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. *Res. Vet. Sci.* 19, 296-303.
- Smith, M.A., Clegg, J.A., 1981. Improved culture of *Fasciola hepatica* in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 66, 9-15.
- Smith, K.A., Filbey, K.J., Reynolds, L.A., Hewitson, J.P., Harcus, Y., Boon, L., Sparwasser, T., Hämmerling, G, Maizels, R.M., 2016. Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunol.* 9, 428-443.
- Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., Medzhitov, R., 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses, *Nat Immunol*, 9: 310-8.
- Sorribes, J, Aubary, MJ, Bargues, MD et al, 1990. Revisión de los casos humanos de Fascioliasis en España entre los años 1970 y 1989. Paper presented at the Congreso de Zoonosis, 1º Interautonómico, Reunión de la International Zoonoses Association (IZA), Valencia, Spain.
- Soulsby, E.J.L., 1965. *Textbook of the Veterinary Clinical Parasitology, Volume 1 Helminths.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 529-576.

- Spithill, T.W., Smooker P.M., Copeman D.B., 1999. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton J.P., editor. Fasciolosis. CABI Publishing; pp. 465–525.
- Stankiewicz, M., Jonas, W.E., Douch, P.C., Rabel, B., Bisset S., Cabaj, W., 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J. Parasitol.* 79(6), 940-945
- Sukhdeo, M.V.K., Mettrick, D.F., 1986. The behaviour of juvenile *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 72, 492-497.
- Sukhdeo, M.V.K., Mettrick, D.F., 1987. Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Adv. Parasitol.* 26, 73-144.
- Swartz, J.M., Dyer K.D., Cheever A.W., Ramalingam T., Pesnicak, L., Domachowske J.B., Lee J.J., Lee N.A., Foster P.S., Wynn T.A., Rosenberg H.F., 2006. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*; 108: 2420–2427.
- Tang, C.L., Lei, J.H., Wang, T., Lu, S.J., Guan, F., Liu, W.Q., Li, Y.L., 2011. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T cells on the immune evasion of *Schistosoma japonicum*. 108, 477-480.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 231-241.
- Taylor, M.D., van der Werf, N., Maizels, R.M., 2012. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181-189.
- Tizard, I. *Veterinary Immunology*, 2012. Editorial: Saunders, 9º Ed.
- Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-927.
- Tsuyuki, S., Bertrand, C., Erard, F., Trifilieff, A., Tsuyuki, J., Wesp, M., Anderson G.P., Coyle A.J., 1995. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J. Clin. Invest.* 96, 2924-2931.
- Turrientes, MC, de Sta S, M.A., Ceballos, E., Díaz, M., Bareno, M., Muro, A., Pardo, J., López-Vélez, R. 2004. Fasciolosis importada y autóctona. *Enf. Emerg.* 6,188
- Urquhart, G.M., 1956. The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *J. Pathol.Bacteriol.* 71(2), 301-310.

- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P., Bokhout, B.A., 1998. Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites, *Parasite Immunol.* 20: 285-292.
- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Bokhout, B.A., 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21(5):243-251.
- Van Riet, E., Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M., 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology.* 212, 475-490.
- Vicente, B., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., Pérez del Villar, L., Hillyer G.V., Martínez-Fernández, A.R., Muro, A., 2014. A *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein induces protection against schistosomiasis caused by *Schistosoma bovis* using the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system. *Exp. Parasitol.* 145, 145-151.
- Vukman, K.V., Adams, P.N., Dowling, D., Metz, M., Maurer, M., O'Neill, S.M., 2013. The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function, *Int J Parasitol.* 43: 531-539.
- Walsh, G.M., 2001. Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 28–33.
- Wardlaw, A.J., Moqbel, R., Kay, A.B., 1995. Eosinophils: Biology and role in disease. *Adv. Immunol.* 60, 151-266.
- Watanabe, K., Mwinzi, P.N., Black, C.L., Muok, E.M., Karanja, D.M., Secor, W.E., Colley, D.G., 2007. T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 676–682.
- Wedrychowicz, H., Wisniewski, M., 2003. Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and ruminants. *Acta Parasitolog. Polonica.* 48(4), 239-245.
- Wedrychowicz, H., Kesik, M., Kaliniak, M., Kozak-Cieszczyk, M., Jedlina-Panasiuk, L., Jaros, S., Plucienniczak, A., 2007. Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke', *Vet. Parasitol.* 147: 77-88.

- Weller, P.F., 1994. Eosinophils: Structure and functions. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 85-90.
- Weller, P.F., Bubley, G.J., 1994. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*; 83, 2759-2779.
- Wicki, P., Schwalbach, B., Charbon, J.L., Steiner, A., Lang, M., Laup, F., Pfister, K., 1991. Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 133, 429-437.
- Wyatt, C.R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M.J., Goff, W., Davis, W.C., 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40(3), 187-199.
- Xu, X., Wen, X., Chi, Y., He, L., Zhou, S., Wang, X., Zhao, J., Liu, F., Su C., 2010. Activation-induced T helper cell death contributes to Th1/Th2 polarization following murine *Schistosoma japonicum* infection. *J. Biomed. Biotechnol.* 202397.
- Yan, H.L., Xue, G., Mei, Q., Ding, F.X., Wang, Y.Z., Sun, S.H., 2008 Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: a novel strategy to prevent host immune response. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:2151-2163.
- Yoon, J.H., Gores, G. 2002. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J. Hepatol.* 37,400-410.
- Yoshimoto T., Nakanishi K., 2006. Roles of IL-18 in basophils and mast cells. *Allergol. Int.* 55(2), 105-113.
- Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Pérez-Écija, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez J., 2008. A study of the liver of goats immunized with a synthetic peptide of the Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 139(4):169-176.
- Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Mendes, R.E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Moreno, F.J., Galisteo, M.E., Perez, J., 2010. Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*, *J Comp Pathol*, 143: 110-119.
- Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Pacheco, I.L., Martínez-Moreno, A., LaCourse, E.J., Perally, S., Brophy, P.M., Pérez, J., 2013a Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione

transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. Res. Vet. Sci. 94,602-609.

- Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013b. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. J. Comp. Pathol. 148, 373-384.
- Zakeri, A., 2017. Helminth-induced apoptosis: a silent strategy for immunosupresion. Parasitol. 1-14.
- Zepeda, N., Solano, S., Copitin, N., Fernández, A.M., Hernández, L., Tato, P., Molinari, J.L., 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. Parasitol. Res. 107, 1129-1135.
- Zhang, W.Y., Moreau, E., Hope, J.C., Howard, C.J., Huang, W.Y., Chauvin, A., 2005. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep, Exp. Parasitol. 111: 154-159.
- Zhou, S., X. Jin, X. Chen, J. Zhu, Z. Xu, X. Wang, F. Liu, W. Hu, L. Zhou and C. Su, 2015. Heat Shock Protein 60 in eggs specifically induces Tregs and reduces liver immunopathology in mice with schistosomiasis japonica. Plos One 10 (9) e0139133.
- Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. Immunology 87(3), 500-12.

ANEXO I

MATERIALES Y MÉTODOS

OBJETO:

Mediante este ANEXO I se completará toda la información referente a los Materiales y Métodos empleados en los tres Trabajos de Tesis Doctoral de forma detallada y con la intención de ampliar lo aportado en los artículos indexados.

1. Carga Parasitaria (Primer y Tercer Trabajo)

Durante el examen *postmortem* de los animales sacrificados en los estadios crónicos de la infección, incluidos en el primer y tercer trabajo de la presente Tesis Doctoral, el duodeno se ligó distalmente y proximalmente al conducto biliar (8–10 cm), con objeto de mantener los parásitos adultos en dicho tramo del intestino, el cual fue retirado en conjunto con el hígado. Posteriormente, la vesícula biliar se abrió cuidadosamente y los parásitos adultos se retiraron con pinzas de punta roma para su posterior cuantificación. Finalmente, el hígado se cortó en pequeñas piezas (1 cm³) y se lavó con agua caliente para recoger los adultos restantes, que quedaban alojados en los colédocos hepáticos. De este modo calculamos el porcentaje de implantación, el cual se consigue calculando el porcentaje sobre cien, de adultos recuperados con respecto al total de metacercarias usadas como dosis infectante.

2. Población de leucocitos peritoneales (Segundo Trabajo)

El lavado peritoneal, realizado en el segundo trabajo presentado de la esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo inmediatamente después de la eutanasia de los animales en los estadios tempranos post-infección para obtener los leucocitos peritoneales. En primer lugar, se rasuró la cara ventral del abdomen de las ovejas y se desinfectó usando polivinilpirrolidona yodada al 10% (AGB, Madrid, España). A continuación, se realizó una incisión de 2 cm en la piel sobre la línea media y se diseccionó el tejido subcutáneo. La línea alba y el peritoneo se seccionaron intentando evitar las hemorragias. Seguidamente, se conectó una cánula de 40 cm de largo a una jeringa, que se insertó dentro de la cavidad abdominal, y se inyectaron 60 ml de PBS estéril con 6mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (precalentado a 37°C). Tras realizar un masaje en la cavidad abdominal durante 1 min, se recogieron 40 ml de líquido peritoneal. El líquido peritoneal se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y el sobrenadante se descartó. Los pellets celulares se resuspendieron en el tampón mencionado más arriba y un tampón específico para eritrolisis (155 mM Cloruro de amonio, 10 mM Bicarbonato potásico, 0,1 mM EDTA). Posteriormente, se llevó a cabo una segunda centrifugación (5000 rpm

durante 5 min) para eliminar los restos de la eritrolisis y el nuevo pellet se resuspendió en 1 ml de medio. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción de azul tripán en una cámara de Neubauer. Por último, se realizaron cincuenta frotis de cada animal en portaobjetos previamente tratados con Vectabond (Vector Laboratories), de los cuales:

a) los dos primeros se tiñeron con Diff-Quick y se usaron para realizar el conteo de las diferentes poblaciones celulares atendiendo a características morfológicas, nucleares y citoplasmáticas. De esta manera, se contaron un total de 600 células por animal y, de ellas, se obtuvo el porcentaje de eosinófilos, linfocitos y macrófagos. Las células epiteliales descamadas del mesotelio no se incluyeron en el recuento.

b) el resto de extensiones del líquido peritoneal, tras el secado al aire, se fijaron en acetona durante 5 min y, posteriormente, se almacenaron a -80°C para su posterior uso en los estudios de inmunocitoquímica.

3. Estudio de la anatomía patológica del hígado (Primer y Tercer Trabajo)

En el examen realizado durante la necropsia, se fotografiaron la cara visceral y diafragmática del hígado, así como el peritoneo parietal y duodenal. Se tomaron ocho muestras del lóbulo izquierdo y cuatro del lóbulo derecho del hígado, las cuales se fijaron en formol tamponado al 10% durante 24 h. Posteriormente, se procesaron de forma rutinaria hasta ser incluidas en parafina para su estudio histopatológico. Se realizaron cortes de $4\ \mu\text{m}$ de grosor los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E).

En el transcurso de las infecciones experimentales estudiadas en la presente Tesis Doctoral, la anatomía patológica de los hígados presentó diferente gravedad, según el tiempo de sacrificio. Así, se ha valorado la patología un total de 6 tiempos de sacrificio distintos dentro de la fase inicial/temprana de la infección (1, 3, 8, 9, 18 y 28 días post-infección), y, además, se ha estudiado la fase crónica de la enfermedad a las 17 semanas post-infección -ANEXO II-.

Durante los diferentes **estadios tempranos** estudiados, a nivel macroscópico, se realizó un recuento, a partir de las fotografías realizadas y mediante el software informático Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA), del número total de puntos hemorrágicos y de trayectos blanquecinos-tortuosos tanto de la cara diafragmática como de la cara visceral. A nivel microscópico, se realizaron diez

fotografías de 0,08 mm² por animal de forma aleatoria y se analizaron los siguientes parámetros:

- ✓ Focos de necrosis agudos.
- ✓ Focos de necrosis organizados (granulomas).
- ✓ Infiltrado de eosinófilos.
- ✓ Infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.
- ✓ Recuento de larvas en el parénquima hepático.

Durante los diferentes **estadios tardíos** estudiados, a nivel macroscópico, se realizó un análisis, a partir de las fotografías realizadas y usando el mismo software anterior, de la superficie dañada (fibrosada y con hiperplasia de los principales conductos biliares) en relación a la superficie total del hígado en la cara diafragmática y en la visceral, respectivamente. Este porcentaje de daño fue expresado como la media \pm desviación estándar (SD). A nivel microscópico, se realizó el mismo procedimiento explicado con anterioridad y se evaluaron los siguientes parámetros:

- ✓ Perihepatitis fibrosa.
- ✓ Trayectos crónicos (trayectos formados por macrófagos cargados de hemosiderina).
- ✓ Fibrosis periportal.
- ✓ Leucocitos globulares.
- ✓ Hiperplasia de los canalículos biliares.
- ✓ Infiltrado de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas.
- ✓ Infiltrado de eosinófilos.
- ✓ Lagunas hemáticas.
- ✓ Presencia de adultos de *Fasciola hepatica* en el parénquima o en el interior de los conductos biliares.
- ✓ Presencia de huevos en parénquima o en el interior de los conductos biliares.

4. Inmunohistoquímica (IHQ, Primer y Tercer Trabajo) e inmunocitoquímica (ICQ, Segundo Trabajo)

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado tres anticuerpos diferentes detallados en la Tabla 1 al final de este ANEXO I:

- I. **Inmunohistoquímica**: Los tejidos utilizados en la presente Tesis Doctoral **fueron fijados en** formol y incluidos en parafina. Los cortes histológicos de 3 μm de grosor cortados con el microtomo (Microm HM 325) se fijaron en portaobjetos previamente tratados con Vectabond. Posteriormente, el tejido se desparafinó con xilol mediante dos pases de 10 min de duración cada uno y se hidrató realizando pases en una escala descendente de alcoholes: dos pases de 5 min en alcohol 100°, un pase de 5 min en alcohol 96°, un pase de 5 min en alcohol de 70° para acabar en agua otros 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena de los tejidos se bloqueó mediante una incubación durante 30 min- con 0,05% de peróxido de hidrógeno en metanol. Posteriormente, se llevó a cabo un pretratamiento o desenmascaramiento antigénico. Dependiendo del antígeno que estuviéramos buscando, el desenmascaramiento varió. En el caso de los antígenos estudiados en los trabajos presentados, tanto caspasa-3 como el marcador de superficie de los linfocitos CD3, se llevaron a cabo mediante la incubación de los cortes en un tampón citrato (0,01 M, pH 6) seguido de un calentamiento en microondas durante 7 min. En el caso del marcador de linfocitos T reguladores (Tregs), FoxP3, fue necesario un pretratamiento un poco más agresivo, consistiendo en una incubación durante 20 min de las secciones histológicas en el tampón citrato (0,01 M, pH 6) en un autoclave a una temperatura de 135°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno en PBS (pH 7,6) y se incubaron con suero normal de cabra diluido en PBS al 10% durante otros 30 min (MP Biomedicals). Transcurrido este tiempo, se incubaron los respectivos anticuerpos primarios diluidos tal y como se cita en la Tabla 1, durante 18 h a 4°C.

Transcurrido ese período de tiempo, se realizaron tres lavados de 10 min en PBS, y se incubaron de nuevo durante 30 min en anticuerpo secundario anti-rata (1:50, monoclonal, para FoxP3) o anti-conejo (1:200, policlonal, para Caspasa3 y CD3) diluido en suero normal de cabra al 10% en PBS. Tras dos lavados de 5 min en PBS, utilizamos un complejo amplificador de señal avidina-biotina, ABC (Vector Laboratories) diluido 1:50 en PBS durante 1 h. Las secciones histológicas se lavaron de nuevo tres veces en un tampón salino Tris (TBS, pH 7,2) y se incubaron entre 1 y 2 min

en el substrato cromógeno NovaRED™ (Vector Laboratories). Finalmente, la contratinción de los núcleos se hizo con hematoxilina de Mayer, y se deshidrataron y montaron con el medio de montaje Eukitt®. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos con TBS o bien isotipos no inmunes, como control negativo.

II. **Inmunocitoquímica**: El procedimiento es muy similar al empleado en la técnica inmunohistoquímica, a diferencia de los pasos siguientes:

- Las extensiones de líquido peritoneal previamente fijadas en alcohol y almacenadas a -80°C son de nuevo fijadas 5 min en acetona al inicio de la técnica.
- Para el bloqueo de la peroxidasa endógena no se utilizó metanol sino PBS con 0,05% de peróxido de hidrógeno, durante 30 min.
- En este caso, no fue necesario realizar pretratamiento pues no existe una fijación previa en formol y parafina que pueda enmascarar a los antígenos.
- La incubación del anticuerpo secundario se realizó durante 45 min y a 37°C en una estufa.
- Finalmente, el medio de montaje es un medio acuoso puesto que no es necesario deshidratar previamente.

5. **Tinción de Hansel (Primer Trabajo)**

El objetivo de esta tinción es la identificación rápida y sencilla de los eosinófilos, tanto en extensiones citológicas procedentes de exudados o líquidos orgánicos como de cortes histológicos. El proceso que se siguió fue muy sencillo y se describe a continuación:

- A. Desparafinado de los cortes histológicos mediante dos incubaciones en xilol durante 10 min.
- B. Hidratación de las muestras mediante incubaciones de 5 min en una escala descendente de alcoholes (2 x 100°, 1 x 95°, 1 x 70°).
- C. Incubación 5 min en agua.
- D. Tinción de la muestra con 1 ml eosina e incubación 1 min.
- E. Sin eliminar la eosina, se lava la muestra con 1 ml de agua destilada 1 min.
- F. Eliminación de la eosina y el agua y lavado con 1 ml de agua destilada.

- G. Tinción de la muestra con 1 ml de azul de metileno e incubación durante 1 min.
- H. Sin eliminar el colorante, lavado de la muestra con 1 ml de agua destilada e incubación de 2 min.
- I. Lavado de la preparación histológica hasta que desaparezca por completo el colorante.
- J. Deshidratación de la muestra con etanol durante 1 min y secado al aire.

Las imágenes complementarias de la tinción de Hansel relativas al Primer trabajo de esta Tesis Doctoral, pueden observarse en el ANEXO IIIa.- Fig. 7, 9, 11 y 13.

La proteína básica mayor (MBP-1) ha sido identificada en la bibliografía consultada como un marcador muy útil de eosinófilos procedentes de muestras de tejido humano mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas (Cantarini y cols., 2009). Al no existir anticuerpos comerciales anti-MBP-1 para ovejas, en el estudio recogido en esta parte de la Tesis Doctoral, se testó un anticuerpo anti-MBP-1 anti-humano que presentaba reacciones cruzadas con rata y con cerdos de raza guinea, pero observamos una muy baja reactividad cruzada en los tejidos ovinos. Es por ello que finalmente realizamos la identificación de eosinófilos mediante el empleo de la tinción de Hansel

6. Microscopía electrónica de transmisión (Primer y Segundo Trabajo)

El tamaño de las muestras procedentes de tejido hepático utilizadas en el primer trabajo presentado en esta Tesis Doctoral y el de las procedentes del pellet de leucocitos peritoneales de los animales sacrificados a los 18 días post-infección del segundo trabajo fue de 1 mm³ fijándose en glutaraldehído al 2,5%. Tras 24 h de fijación, las muestras fueron refijadas en tetróxido de osmio durante 2 h. A continuación, se realizaron n cuatro lavados de 15 min de duración cada uno en agua bidestilada. Las muestras se deshidrataron con una escala ascendente de acetonas y se incluyeron en epoxirresinas "EPO 812". A partir de este paso se realizaron cortes de 50 nm de grosor que se contrastaron con acetato de uracilo y con citrato de plomo. Finalmente, realizamos un estudio de las muestras y electronografías de las mismas mediante el microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem 1400 ubicado en el Servicio Centralizado de Investigación (SCAI) del Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba. El protocolo de inclusión en epoxirresinas se expone a continuación:

Se utiliza un eppendorf por muestra con 7 cortes de 1 mm³

Procedimiento Operativo: INCLUSIÓN EN EPON

1^{er} DÍA

1. Prefijación en glutaraldehído 2,5%, de 2 h a 3 meses a 0-4°C.
2. Tallado de las muestras en fragmentos de 1-2 mm³ y mantenimiento en la misma solución fijadora, 45 min a 0-4°C.
3. Lavado en agua destilada, 3 pases de 15 min.
4. Fijación en tetróxido de osmio 1% durante 2 h en oscuridad a 0-4°C.
5. Lavado en agua destilada, 4 pases de 10 min a 0-4°C.
6. Inmersión en acetato de uranilo 3% en agua 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Deshidratación en acetonas de grados ascendentes a 0-4°C.
Acetona 30%, 15 min.
Acetona 50%, 30 min.
Acetona 70%, durante toda la noche.

2° DÍA

8. Acetona 90%, 30 min.
Acetona 100%, 2 pases de 30 min.
9. Óxido de propileno 2 pases de 10 min.
10. Inmersión en una mezcla de 2 partes de óxido de propileno con 1 parte de la mezcla EPON durante 60 min.
11. Inmersión en una mezcla de 1 parte de óxido de propileno con 1 parte de la mezcla EPON durante 30 min.
12. Inmersión en una mezcla de 1 parte de óxido de propileno con 2 partes de la mezcla EPON durante 30 min.
13. Inmersión en EPON durante 1 h.
14. Introducción de la muestra en los moldes identificados, relleno de mezcla EPON y maduración en la estufa 45° C mínimo 24 h.

3^{er} DÍA: Extracción del bloque de la cápsula o molde.

4° DÍA: Maduración durante 24 h a temperatura ambiente antes de proceder al desbastado.

7. Citometría de flujo con kit Anexina V/PI (Segundo Trabajo)

La determinación de la proporción de células viables y apoptóticas en el líquido peritoneal de las ovejas analizadas en el tercer trabajo de la presente Tesis Doctoral mediante citometría de flujo se empleó el kit de Anexina V (ANNEX100F, AbD Serotec-Bio-Rad Company- UK). Para su desarrollo, se siguieron las directrices dadas por el fabricante. Debe ajustarse la concentración de células a $2-5 \times 10^5$ células/ml. Primeramente, el buffer de unión ("*binding buffer*") debe diluirse a una proporción 1:4 en agua destilada. A continuación, se diluyeron 200 μ l del líquido peritoneal en 200 μ l de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, y el pellet se resuspendió en 200 μ l del *binding buffer*. Posteriormente, volvieron a centrifugarse a 1500rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante.

A partir de este paso, el pellet se resuspendió en 195 μ l de buffer junto con 5 μ l de anexina-V, se homogenizó y se incubó durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y el pellet se resuspendió de nuevo en 200 μ l de *binding buffer*, y volvieron a ser centrifugados a 1500 rpm durante 5 min. Seguidamente, se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en este caso con 190 μ l de *binding buffer* y se añadieron 10 μ l de la solución de yoduro de propidio. Finalmente, la muestra quedó lista para ser analizada por citometría de flujo.

Para los controles positivos, se mezclaron 200 μ l líquido peritoneal con 200 μ l de formaldehído al 3% y se incubaron durante 30 min en hielo. Tras este tiempo, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en el *binding buffer* a temperatura de 4°C a la concentración detallada y se continuó con el mismo protocolo descrito para el resto de muestras.

El análisis citométrico se realizó con un citómetro CyFlow Cub 6® (Sysmex Partec, Alemania), mediante un protocolo basado en las características morfológicas de las células (FSC para tamaño/SSC para la complejidad) para determinar las diferentes poblaciones de leucocitos en líquido peritoneal. Mediante el presente protocolo se pudieron describir tres tipos de poblaciones: viables, apoptóticas y necróticas.

- La población de células apoptóticas se identificaron por la reactividad de los fluorocromos: canal FL1 para anexina V (FITC, verde) y canal FL3 para el yoduro de propidio (rojo).
- Los leucocitos viables se diferenciaron como poblaciones negativas a ambos fluorocromos (anexina V negativo y yoduro de propidio negativo).

- Las células apoptóticas mostraron un patrón anexina V positivas y yoduro de propidio negativas. Esto es debido a que el yoduro de propidio se une a fragmentos de ADN nuclear, y éstos sólo son accesibles en el caso de las células hayan perdido la integridad en sus membranas, por tanto, siendo células necróticas.

El grado de apoptosis se expresó de acuerdo al porcentaje de cada población que fuese apoptótica o viable.

El reanálisis de los resultados citométricos se hizo con Flowing Software (University of Turku, Finlandia). Para ello, se tomó un número de 10.000 eventos adquiridos y se cuantificó el número total de células apoptóticas frente al de células viables, expresándose como porcentaje del total de leucocitos del líquido peritoneal adquiridos.

El fundamento de la técnica radica en que las células viables presentan la fosfatidilserina de la membrana plasmática localizada en el interior de la bicapa lipídica (hacia el citoplasma celular). Sin embargo, en las células apoptóticas se transloca y se expone al ambiente celular externo. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} , que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, de manera que la anexina V marcada con un fluorocromo puede identificar a las células apoptóticas por unión a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de la membrana celular.

Tabla 1.- Detalles de los anticuerpos empleados en las inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas de la presente Tesis Doctoral.

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	DILUCIÓN	DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO	CASA COMERCIAL	USO	LOCALIZACIÓN CELULAR	TRABAJO EN EL QUE SE EMPLEÓ
Caspasa-3 (Asp 175. Policlonal)	Ovino	1:500 (IHQ) 1:100 (ICQ)	En tampón citrato (0,01M, pH 6) con calentamiento en microondas (IHQ). Ninguno para ICQ.	Diagnostic BioSystems	Apoptosis	Citoplasmático y nuclear	1º, 2º
CD3 (Policlonal)	Humano, ratón	1:200	En tampón citrato (0,01M, pH 6) con calentamiento en microondas.	Dako	Linfocitos CD3+ (T)	Citoplasmático	3º
Fox P3 (Monoclonal)	Bovino, perro, gato, ratón, cerdo, rata	1:100	En tampón citrato (0,01M, pH 6) con calentamiento en autoclave 135°C	Ebioscience	Linfocitos FoxP3+ (T)	Citoplasmático y nuclear	3º

ANEXO II

ANATOMÍA PATOLÓGICA HEPÁTICA

OBJETO: Con el presente anexo pretendemos mostrar los resultados que obtuvimos en la anatomía patológica de los hígados en los diferentes estadios post-infección estudiados a lo largo de esta Tesis Doctoral, con el objetivo de completar la información aportada en cada uno de los Trabajos de Tesis.

ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HÍGADO EN FASES TEMPRANAS DE LA INFECCIÓN

- A. 1 y 3 días post-infección: Macroscópicamente, de forma muy ocasional, se observó alguna petequia. A nivel microscópico, los cambios hepáticos no eran relevantes en este punto de la infección debido a que la gran mayoría de las larvas se encuentran aún migrando por el peritoneo.
- B. 8 y 9 días post-infección (ANEXO IIIa.- Fig. 1 y 3): Macroscópicamente, los cambios consistieron en un punteado hemorrágico con trayectos de entre 0,3 y 1 cm de longitud, tortuosos y blanquecinos en la superficie hepática, principalmente localizados en la cara diafragmática del lóbulo izquierdo. Los cambios microscópicos consistieron en focos de necrosis así como trayectos agudos dentro del parénquima hepático. En numerosas ocasiones aparecen asociadas hemorragias focales, principalmente en las áreas subcapsulares. El infiltrado inflamatorio asociado a esas áreas de necrosis consistía fundamentalmente en eosinófilos con una baja cantidad de linfocitos y macrófagos. En torno a los espacios porta, se observaba un intenso infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, eosinófilos y macrófagos. Esas células inflamatorias migran desde estas áreas portales, a través de los sinusoides hepáticos, hasta las áreas de necrosis del parénquima hepático. En ocasiones, se hallaron larvas migrantes las cuales no tenían asociado ningún infiltrado inflamatorio o siendo éste muy escaso. Pero en ningún caso, se asoció a hemorragia o necrosis.
- C. 18 días post-infección: Macroscópicamente, los cambios anatomopatológicos en la superficie hepática fueron similares a los observados en el estadio previamente estudiado, pero en mayor número y siendo los trayectos

blanquecinos y tortuosos de un tamaño comprendido entre 1 y 3 cm. Microscópicamente, en este grupo estudiado se evidenciaron focos agudos de necrosis así como trayectos agudos con eosinófilos, similares a los hallados en el grupo previamente estudiado. En este caso, la mayoría de los focos estaban más organizados, constituyendo granulomas. Las larvas migrantes halladas en el parénquima no mostraron infiltrado inflamatorio asociado a ellas, sin embargo, se evidenciaron unos trayectos de 0,5 a 2 mm de longitud detrás de las larvas.

- D. 28 días post-infección (ANEXO IIIa.- Fig. 2 y 4):** Macroscópicamente, la mayoría de las lesiones halladas correspondían con trayectos tortuosos y blanquecinos, siendo mucho menos numerosos los focos hemorrágicos, aunque manteniéndose éstos presentes en cierto número. Microscópicamente, destacamos el incremento del número de focos de necrosis organizados como granulomas e intercalados ocasionalmente por focos necróticos más recientes.

ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HÍGADO EN FASES CRÓNICAS DE LA INFECCIÓN

- E. 15, 17 y 19 semanas post infección (ANEXO IIIa.- Fig. 5-6):** Macroscópicamente, los hígados presentaban unas vesículas biliares y unos conductos biliares principales aumentados de tamaño que contenían un fluido marronáceo y numerosos parásitos adultos en su interior. En la superficie hepática, se encontraron numerosas cicatrices fibróticas y grisáceo-blanquecina localizadas fundamentalmente en el lóbulo izquierdo. Cabe destacar que, en determinadas ocasiones, se establecían adherencias fibróticas entre la superficie hepática y el diafragma o las estructuras orgánicas colindantes.

Microscópicamente, se evidenció una intensa hiperplasia ductal, con fibrosis portal, trayectos crónicos fibrosos, granulomas con un centro necrótico rodeado de un infiltrado formado por macrófagos y células gigantes multinucleadas, así como un intenso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas localizadas fundamentalmente en torno a las áreas portales y, en menor número, alrededor de los granulomas. El infiltrado de eosinófilos es muy variable, tanto en el

espacio porta como en el parénquima, y, de forma habitual, se asocian al contacto directo con el parásito adulto o, bien, con los huevos que el mismo ha depositado en el espesor del parénquima hepático. Las larvas adultas se hallaron dentro de los grandes conductos biliares hiperplásicos originando una severa erosión epitelial, así como una fibrosis portal extensa y una cantidad variable de infiltrado inflamatorio compuesto fundamentalmente por linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos.

ANEXO III

IMÁGENES COMPLEMENTARIAS

ANEXO IIIa

IMÁGENES PRIMER TRABAJO



Fig 1.- Hígado a los 8 dpi. Superficie diafragmática con numerosos trayectos blanco-grisáceos tortuosos y numerosos focos hemorrágicos. La mayoría de las lesiones concentradas en el lóbulo hepático izquierdo.



Fig 2.- Hígado a los 28 dpi. Superficie diafragmática con numerosos trayectos blancos y tortuosos disminuyendo la cantidad de los focos hemorrágicos en relación a los 8 dpi.



Fig. 3 y 4.- Superficies viscerales de hígados a los 8 y 28 dpi, respectivamente. Se observa el considerable aumento de lesiones, fundamentalmente trayectos blanquecinos tortuosos, en el hígado a los 28 dpi con respecto a los 8 dpi. Lesiones localizadas fundamentalmente en el lóbulo hepático izquierdo.

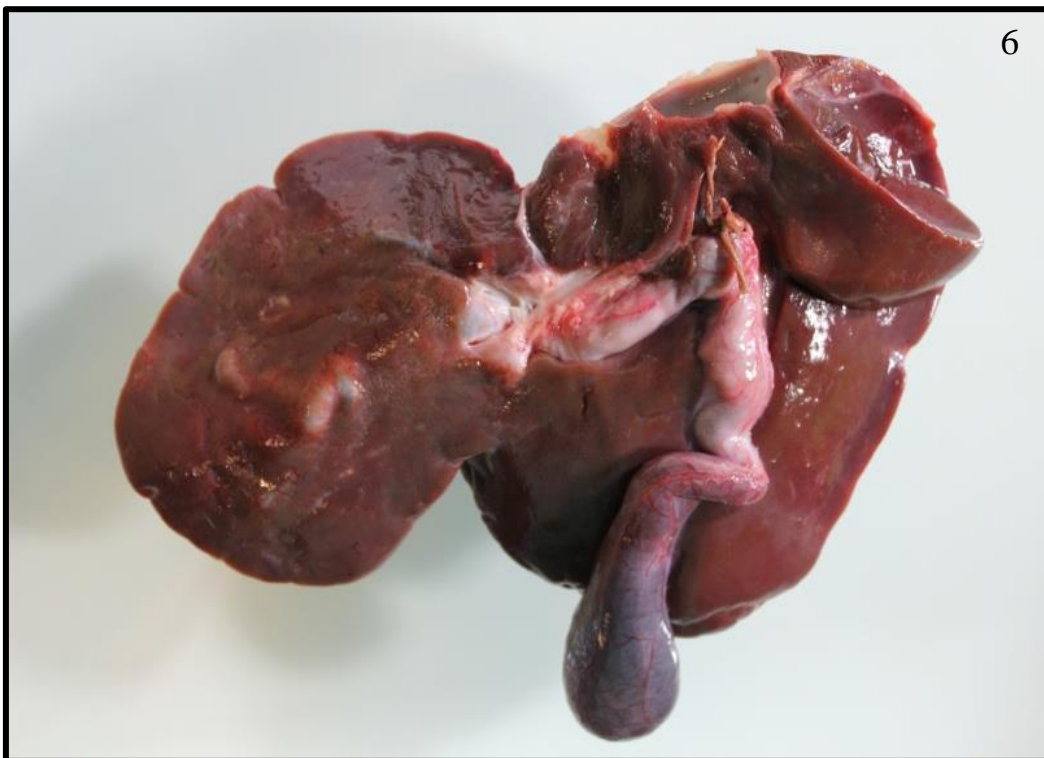
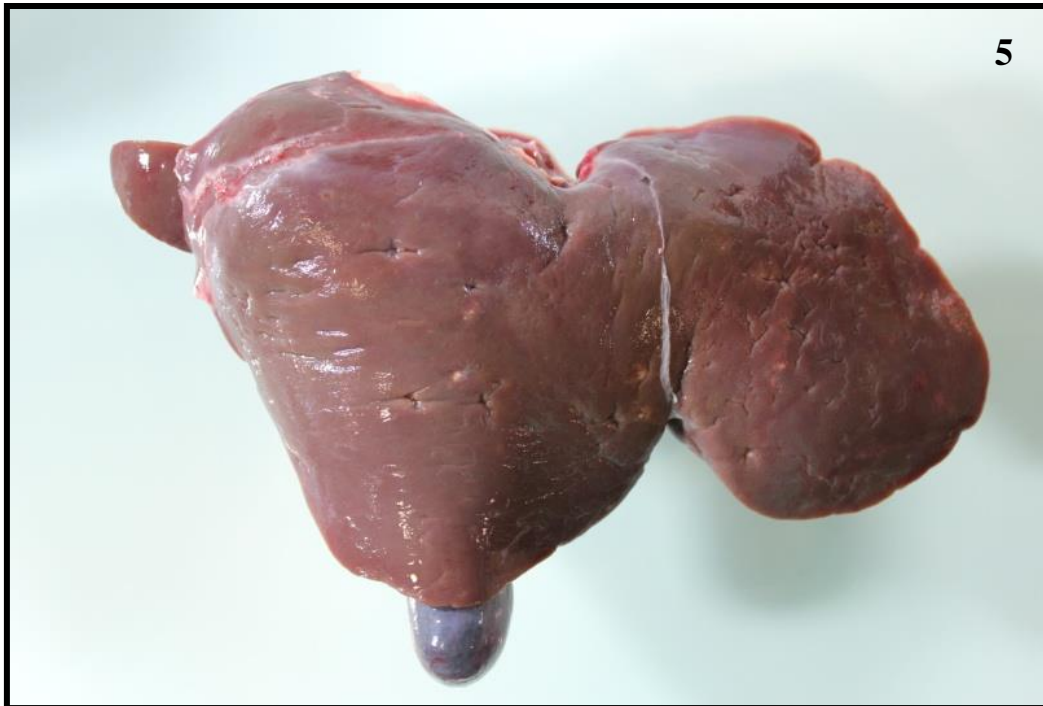
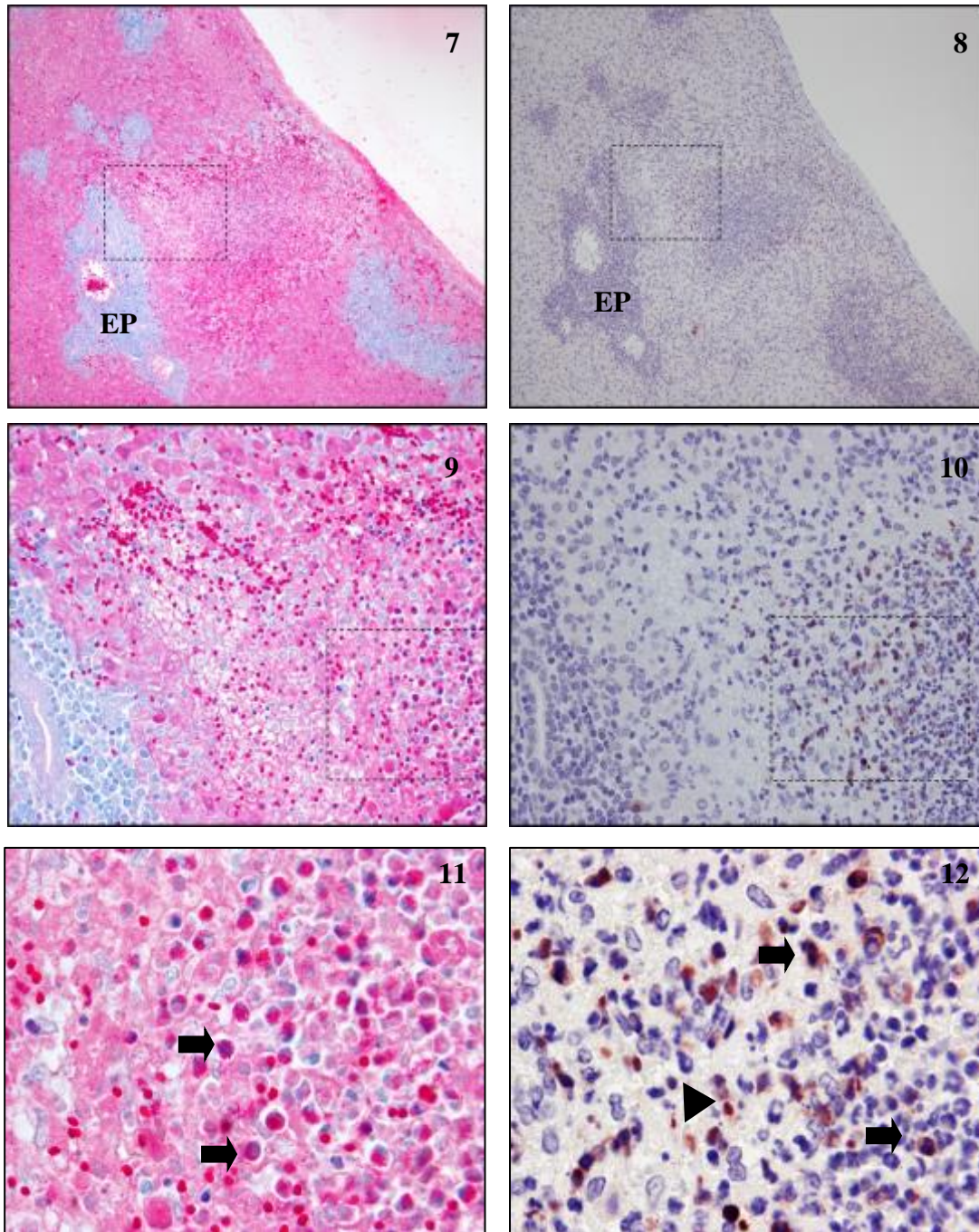
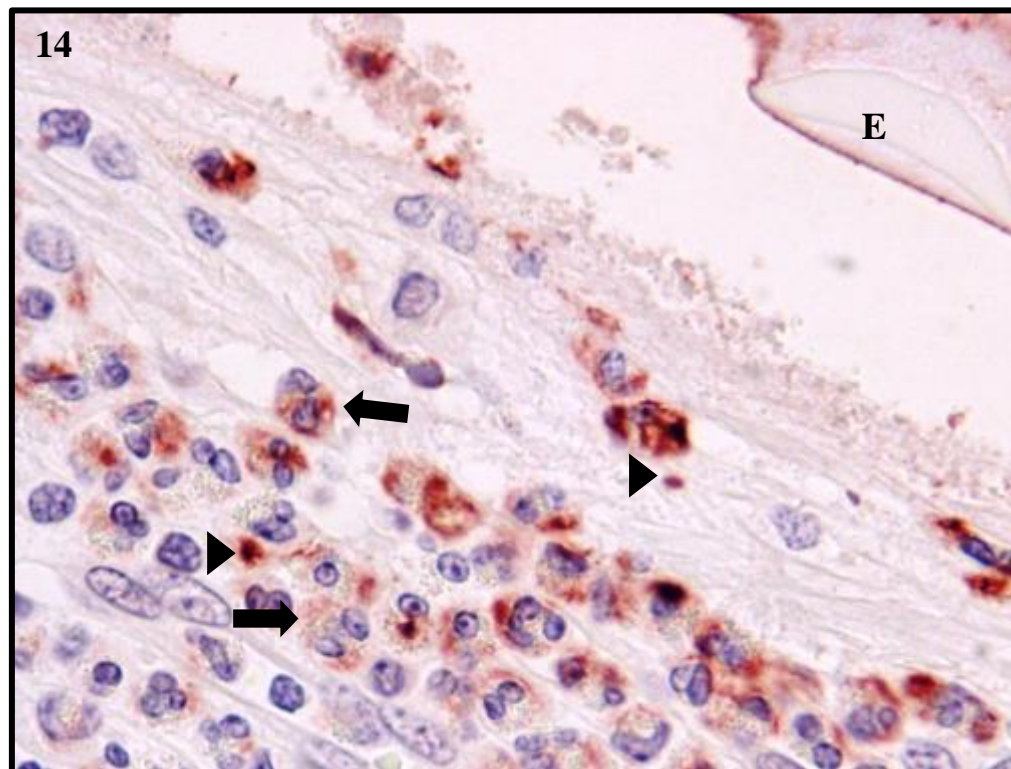
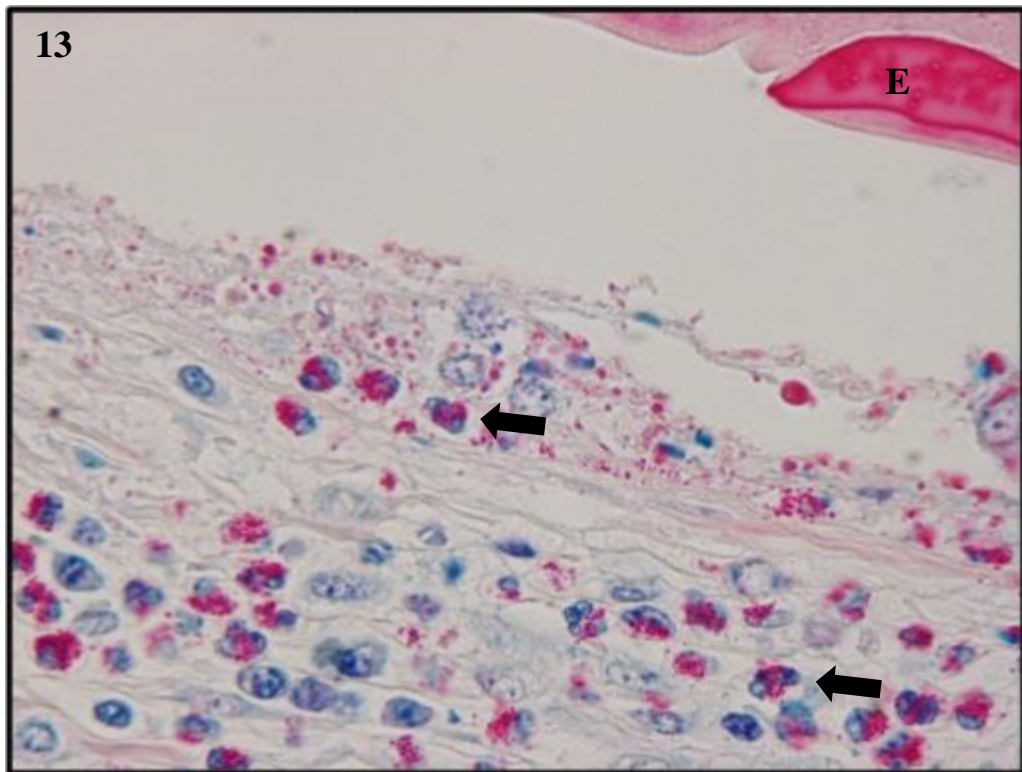


Fig. 5 y 6. Superficies diafragmática y visceral, respectivamente, de hígados a los 17 spi. En la **fig. 5** podemos observar fundamentalmente gran cantidad de cicatrices en la superficie hepática. En la **fig. 6** se observa la intensa hiperplasia y dilatación de los principales conductos biliares.



Figs. 7-12. Cortes seriados 3 μ m de grosor de hígados a los 8 dpi. **Tinción de Hansel:** Fig. 7, 9 y 11.- x20, x40, x100 respectivamente. observan Muestran en detalle de un foco de necrosis agudo (**F**) en un animal perteneciente al grupo 8dpi. Espacio porta (**EP**) como estructura de referencia.. **IHQ Anti-caspasa-3:** Fig 8, 10 y 12, Detalle de las mismas zonas que la Tinción de Hansel mostrando eosinófilos caspasa-3+ (**flecha**) y numerosos cuerpos apoptóticos (**cabeza de flecha**) en la periferia del foco de necrosis.



Figs. 13-14. Cortes seriados 3 μ m de grosor de hígados a las 17 spi. **Fig. 13.- Tinción de Hansel:** x100 Infiltrado de eosinófilos (flecha) rodeando un canalículo biliar cuyo epitelio ha sido descamado (conlagitis erosiva) por el parásito adulto del cual vemos su espícula (E). **Fig. 14.- IHQ Anti-caspasa-3:** x 100. La mayoría de los eosinófilos presentes en esa zona, son caspasa-3, ⁺ (flecha) se muestran además cuerpos apoptóticos caspasa-3⁺ (cabeza de flecha)

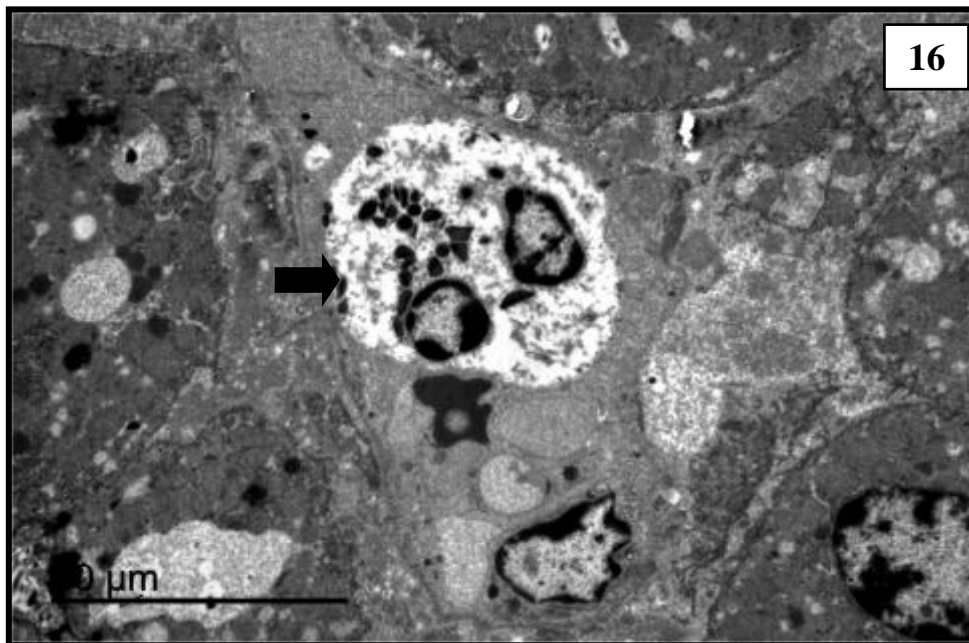
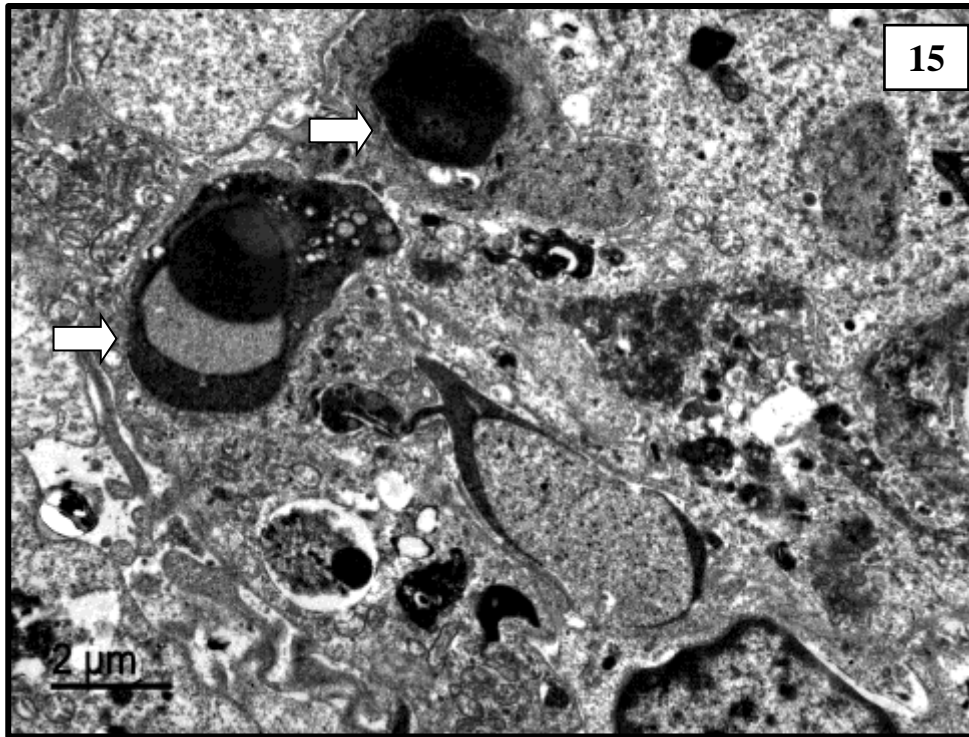


Fig. 15 y 16. Hígado, 8 dpi. Fig 15.-Se observan varios cuerpos apoptóticos (flecha blanca) en el parénquima hepático. **Fig 16.-** Eosinófilo (flecha negra) con típicos gránulos eosinofílicos y mostrando cambios morfológicos típicos de apoptosis como la cromatina densa condensada en la periferia del núcleo. Microscopía electrónica de transmisión. Barra:2μm.

ANEXO IIIb

IMÁGENES SEGUNDO TRABAJO

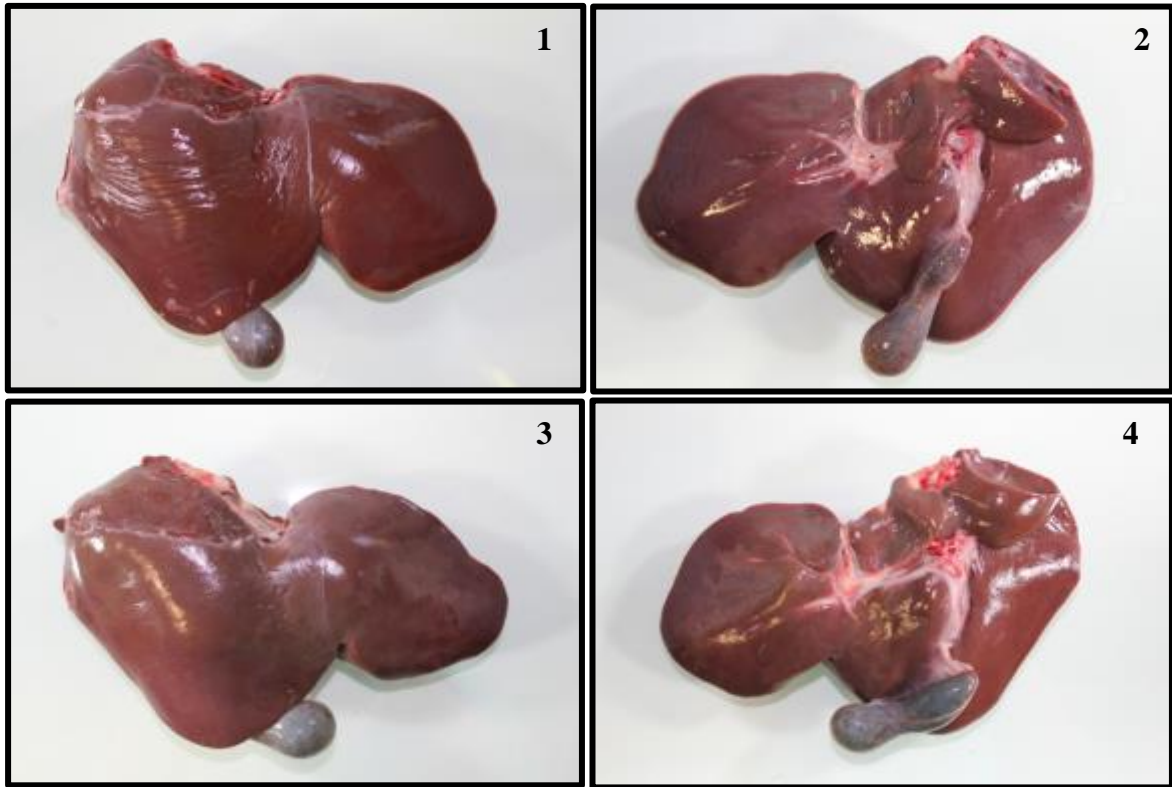


Fig 1-2.- Superficie diafragmática y visceral, respectivamente, de hígados a 1 día post-infección (dpi). **Fig 3-4.-** Superficie diafragmática y visceral de hígados a los 3 dpi. En las cuatro imágenes se observa como en estos estadíos tan iniciales no existen lesiones evidentes en el parénquima hepático. Este hecho es debido a que la mayoría de las larvas de *F. hepatica* aún están migrando por el peritoneo y no han alcanzado el hígado.

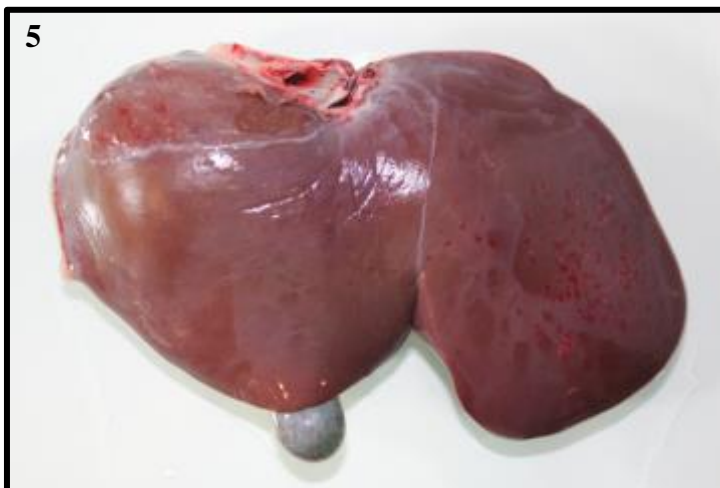


Fig. 5.- Superficie diafragmática de un hígado a los 9 dpi. En el lóbulo hepático izquierdo, se observa focos petequiales y algunos trayectos blanquecinos tortuosos. La superficie visceral de este hígado mostró lesiones similares en número y severidad.



Fig. 6.- Superficie diafragmática de un hígado a los 18 dpi. Se observa el notable incremento de los trayectos necróticos blanquecinos en la superficie hepática, en ambos lóbulos.



Fig. 7.- Superficie visceral del mismo hígado anterior, a los 18 dpi. Se observa el notable incremento de los trayectos necróticos blanquecinos en la superficie hepática, en ambos lóbulos.

Fig. 8.- Inmunocitoquímica (ICQ) de leucocitos peritoneales de oveja sacrificada a 1 dpi. Se observa que dentro del escaso número de células peritoneales, el porcentaje de leucocitos caspasa-3⁺ (flecha negra) es reducido con respecto a las células caspasa-3⁻ (cabeza de flecha). X200

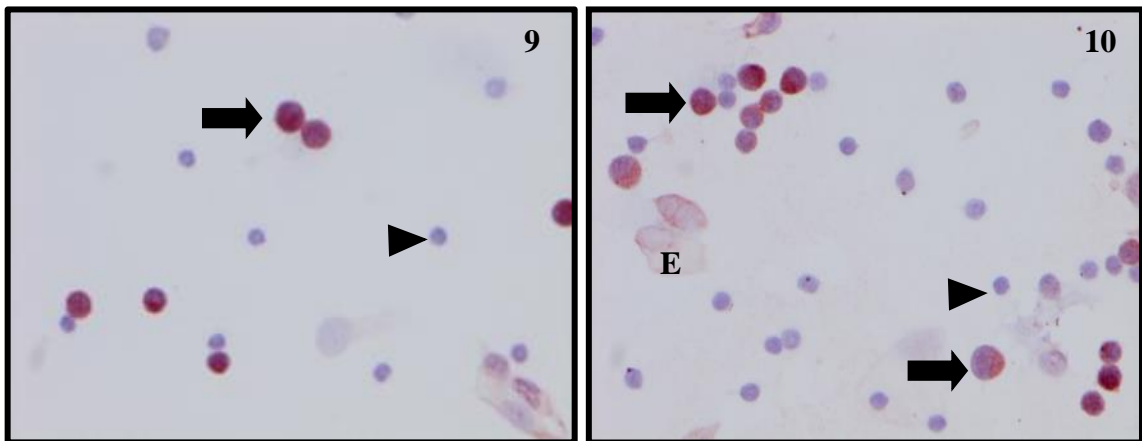
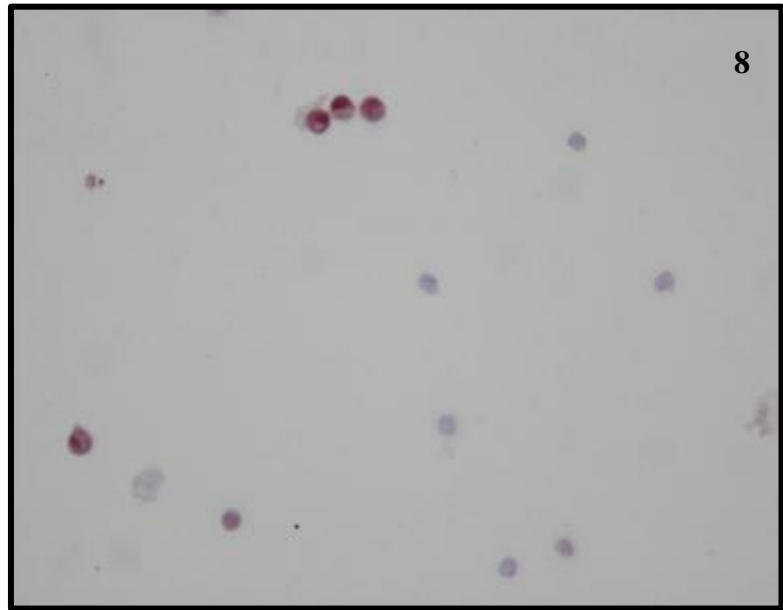


Fig. 9-10.- Leucocitos peritoneales procedentes de ovejas sacrificadas a los 9 y 18 dpi, respectivamente. El patrón de inmunomarcaje de las células caspasa-3⁺ (flecha negra) es fundamentalmente marronáceo de tipo citoplasmático y ocasionalmente nuclear. Células caspasa-3⁻ indicadas con cabeza de flecha. Las células epiteliales (E) halladas no fueron contabilizadas. x400.

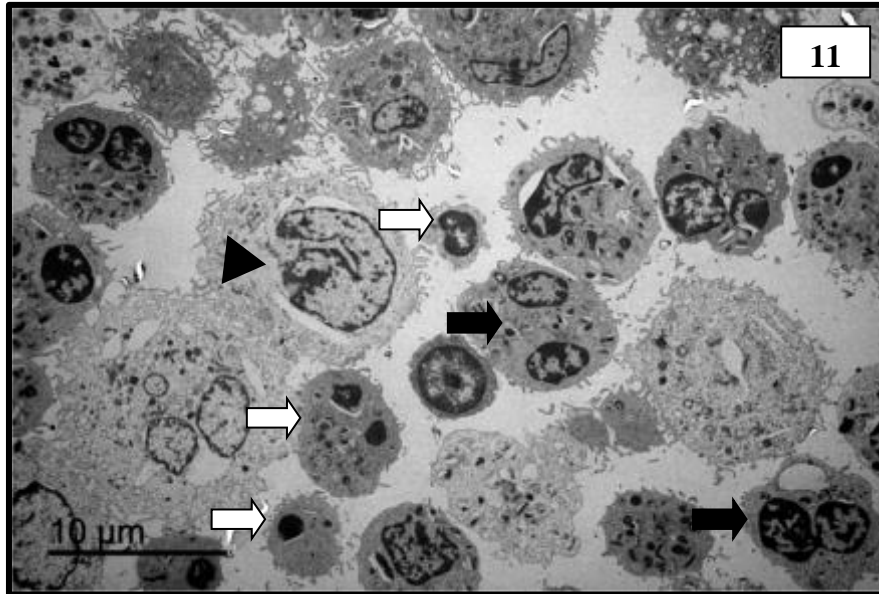


Fig. 11.- Microscopía electrónica de transmisión de leucocitos peritoneales a los 18 dpi. Se observa cambios morfológicos como la marginación periférica de la cromatina y la fragmentación del núcleo en ocasionales macrófagos (cabeza de flecha) y numerosos eosinófilos (flecha negra). Se observan numerosos cuerpos apoptóticos (flecha blanca). Barra= 10 μ m



Fig. 12.- Microscopía electrónica de transmisión. Detalle de un eosinófilo apoptótico del líquido peritoneal a los 18 dpi, reconocible por la presencia aun de gránulos eosinofílicos específicos (flecha blanca). Barra = 2 μ

ANEXO IIIc

IMÁGENES TERCER TRABAJO

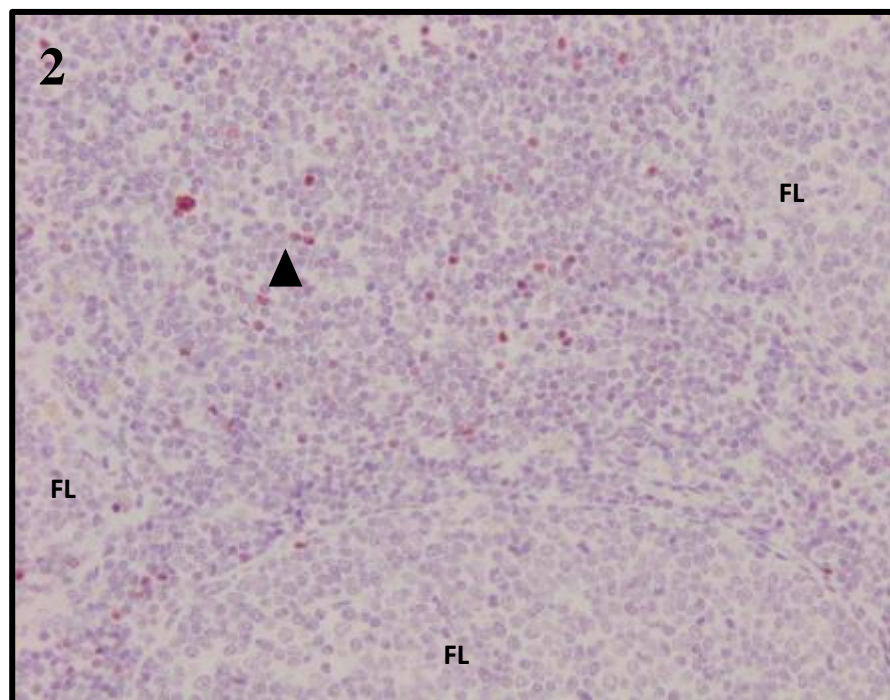
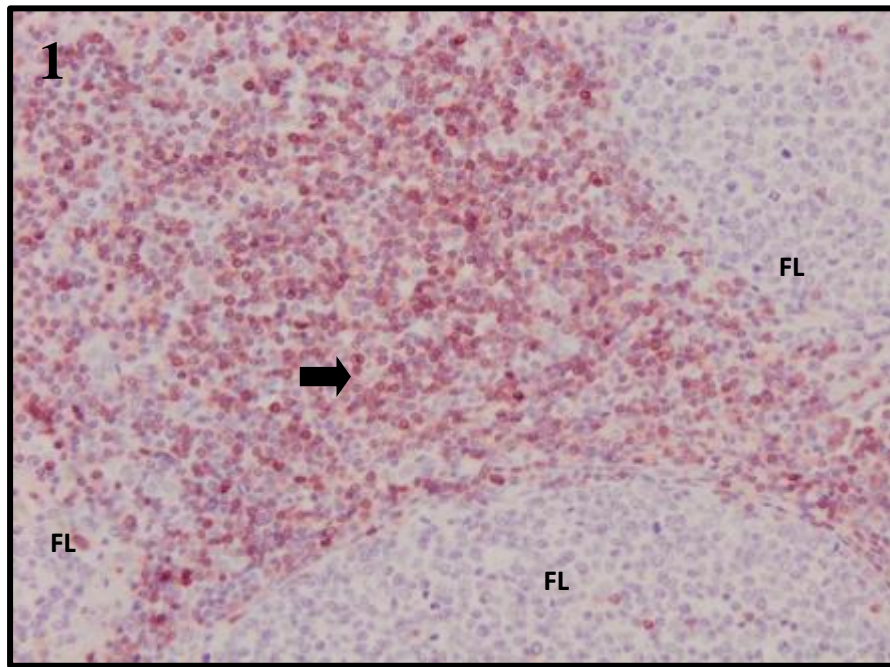


Fig 1-2.- Inmunohistoquímica sobre cortes seriados, 3 μm de separación, de la corteza de nódulos linfáticos hepáticos de una oveja a los 9 dpi con *F. hepatica*. **Fig.1.-** Linfocitos CD3⁺ (flecha negra) en zona peri e interfolicular. x400. **Fig 2.-** Linfocitos Tregs. FoxP3⁺ (cabeza de flecha) en la misma zona. Tres folículos linfoides (FL) como referencia. x400.

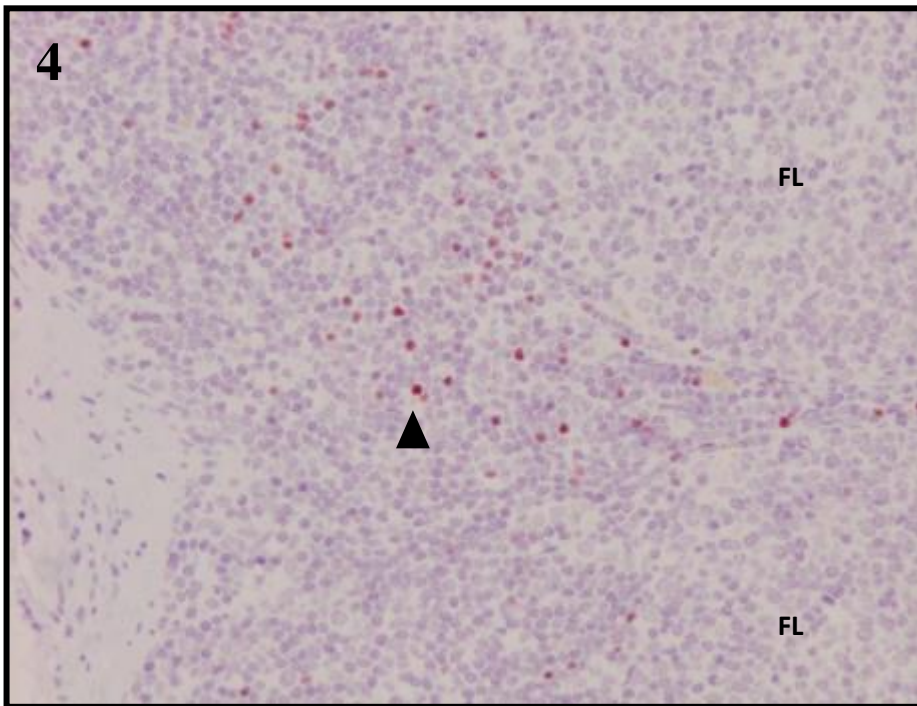
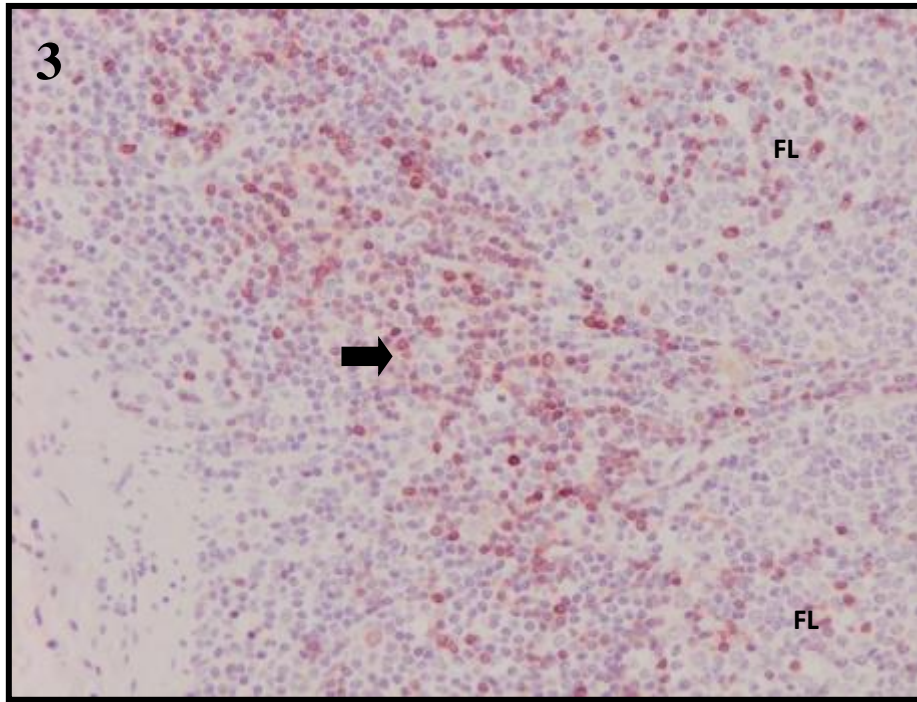


Fig 3-4.- Inmunohistoquímica sobre cortes seriados, 3 μm de separación, de la corteza de nódulos linfáticos hepáticos de una cabra a las 15 semanas post-infección con *F. hepatica*. **Fig.3.-** Linfocitos CD3^+ en zona peri e interfolicular. x400. **Fig 4.-** Linfocitos Tregs. FoxP3^+ (cabeza de flecha) en la misma zona. Dos folículos linfoides (FL) como referencia. x400.

ANEXO IV

TÉCNICA TUNEL.

**METODOLOGÍA Y RESULTADOS
COMPLEMENTARIOS AL PRIMER TRABAJO**

OBJETO:

La finalidad de este ANEXO IV es completar los resultados aportados en el Primer Trabajo de la presente Tesis Doctoral. Estos resultados tuvieron que ser retirados del trabajo original como consecuencia de su adaptación a "Short communication" a petición de la revista indexada de acortar el artículo. Dada la relevancia de los resultados, consideramos importante su incorporación como suplemento del primer trabajo aquí presentado.

Materiales y Métodos*Técnica de TUNEL*

Para detectar la apoptosis mediante la técnica TUNEL (Loo y cols., 2011) se usaron las muestras de tejidos fijadas en formol y embebidas en parafina. En concreto, fue usado un kit comercial (In situ Cell Death Detection, POD, Roche, Mannheim, Germany) sobre cortes histológicos seriados de 4 μm de grosor, habiéndose tratado previamente los porta-objetos con Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA).

El proceso se inició con el desparafinado de los cortes histológicos mediante dos pases de 10 min cada uno en xilol, seguidos de una rehidratación en una escala decreciente de alcoholes, incubando las muestras 2 x 10 min en alcohol de 100°, 1 x 5 min en alcohol de 96 °, 1 x 5 min en alcohol de 70° y finalmente un lavado en agua durante 5 min. A continuación, las muestras histológicas fueron incubadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de pronasa (P-5459 5-G, SIGMA, USA) durante 15 min a 37°C en una cámara húmeda. La peroxidasa endógena se bloqueó con 2% de H_2O_2 en metanol durante 30 min y en agitación.

La mezcla de marcaje fue añadida a los cortes histológicos e incubadas a 37°C durante 1 h en cámara húmeda. Tras parar la reacción enzimática, las muestras fueron lavadas en PBS, y cubiertas con un anticuerpo anti-fluoresceína ("Coverter-POD") e incubadas de nuevo durante 30 min a 37°C. Finalmente, el marcaje positivo fue visualizado mediante el revelado con el kit substrato NovaRED™ (Vector Laboratories). Finalmente, la contraindicación de los núcleos se hizo con hematoxilina de Mayer, y fueron deshidratadas y montadas con el medio de montaje Eukitt®.

Resultados*Apoptosis detectada mediante la técnica de TUNEL.*

Los hígados procedentes del grupo 4, de animales no infectados, no mostraron ningún eosinófilo positivo. A los 8 dpi, los trayectos necróticos descritos en el parénquima hepático mostraron numerosas células y restos celulares TUNEL⁺, particularmente en la periferia y en el interior de los focos de necrosis (Fig. 1). Sin embargo, en áreas de infiltrado inflamatorio, no asociado directamente a focos de necrosis, mostraron ocasionales células TUNEL⁺.

El inmunomarcaje con la técnica TUNEL fue difusa y nuclear y fue observada incluso en núcleos intactos (Fig. 2), en células que mostraban marginación periférica de la cromatina y núcleos picnóticos (cuerpos apoptóticos). En la periferia de los focos de necrosis, el número de células TUNEL⁺ fue mucho más elevado que el de células TUNEL⁻ (Tabla 1). A los 28 dpi, el número de células TUNEL⁺ fue más elevado que el número de células TUNEL⁻ en la periferia de los focos de necrosis recientes, agudos, (Tabla 1), pero en la periferia de los granulomas o focos más organizados el número de células TUNEL⁺ fue muy bajo (Tabla 1). A las 17 spi, las células TUNEL⁺ fueron encontrados focalmente en la periferia de los grandes conductos biliares, algunos de los cuales contenían parásitos adultos, sin embargo, tanto en el infiltrado inflamatorio de los espacios porta, como en los granulomas y en el parénquima hepático, las células TUNEL⁺ fueron muy ocasionales. Se evidenció la presencia de ocasionales colangiocitos TUNEL⁺ que podemos suponer no se relaciona con la infección si no con un mecanismo de recambio fisiológico por encontrarse de forma aislada en espacios porta normales (Fig. 3)

Tabla 1. Número de eosinófilos y cuerpos apoptóticos (CA) TUNEL⁺ en ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 8 días post-infección (dpi), 28 dpi y a las 17 semanas post-infección (spi) y en las ovejas controles negativo. Los resultados fueron expresados como media±SD por campo de 0.08 mm².

	8 dpi		28 dpi		17 Spi	controles
	FN	FN	Granulomas			
Células TUNEL ⁺	15.4±6.5	16.2±5.1	2.4±1.6	25.5±12.4	0	
Células TUNEL ⁻	7.3±3.2	10.3±3.7	18.2±7.5	28.6±10.3	0	
Eosinófilos % TUNEL ⁺	67.8	61.1	11.7	47.1	0	
CA TUNEL ⁺	28.9±7.5	42.4±12.5	9.6±4.2	16.3±4.9	0	

FN: focos de necrosis

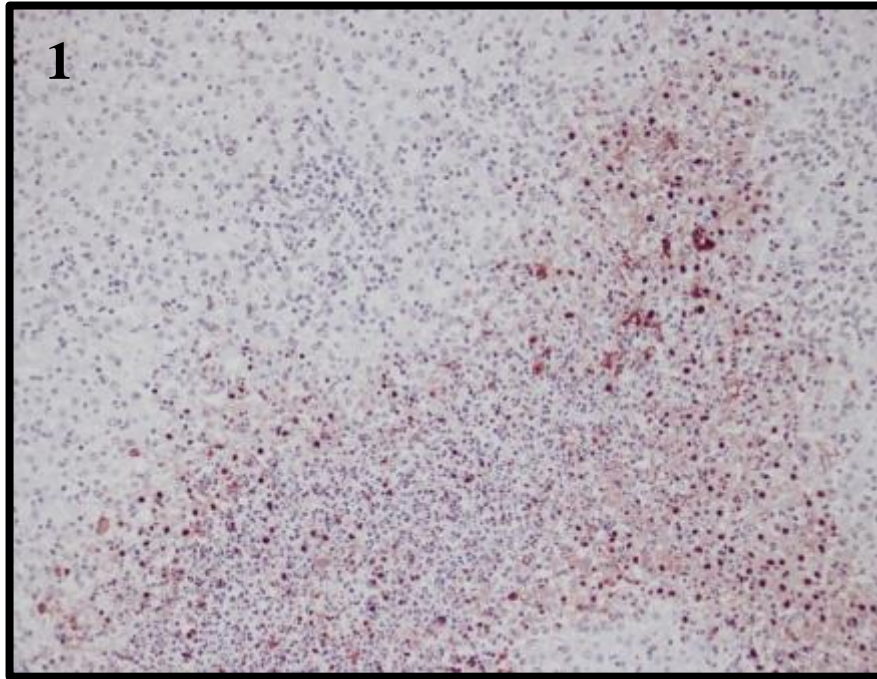


Fig. 1.- A los 8 dpi, foco de necrosis agudo con numerosas células y cuerpos apoptóticos TUNEL⁺ principalmente asociadas en la periferia de los focos de necrosis (N), mientras que el infiltrado (I) del resto del parénquima hepático se muestra TUNEL⁻. x100

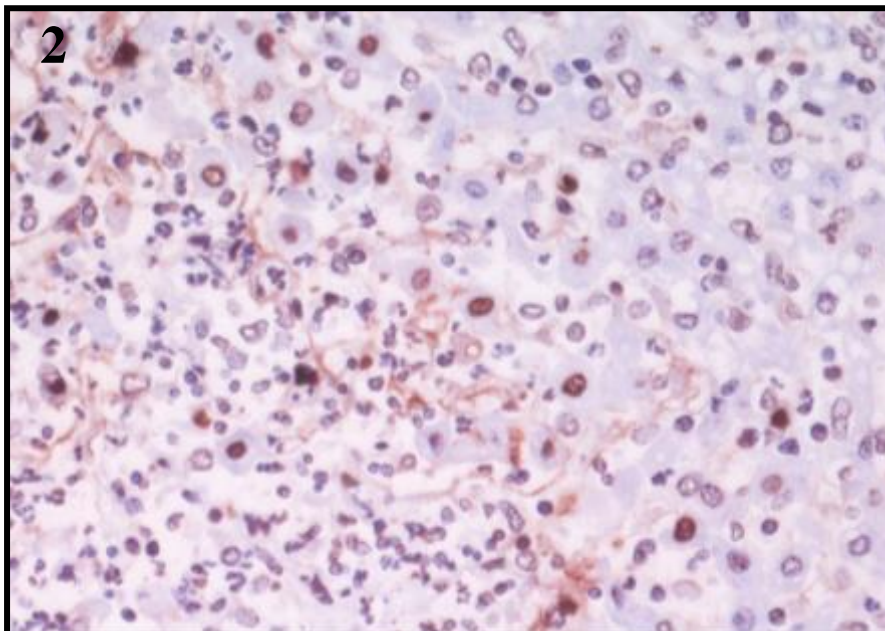


Fig. 2.- A los 8 dpi, se muestran numerosos núcleos y cuerpos apoptóticos TUNEL⁺, mostrando un patrón fundamentalmente nuclear y difuso. x400.

ANEXO V

**COMUNICACIONES A CONGRESOS
DERIVADAS DE LA TESIS**

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Año 2017

1. **Título:** Apoptosis de leucocitos peritoneales durante la fase temprana de infección experimental por *Fasciola hepatica* en ovejas.
 - **Tipo:** Póster.
 - **Congreso:** XXIX Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria (SEAPV). Junio 2017. Cáceres

Año 2016

2. **Título:** Estudio de la inmunomodulación y de la respuesta inmune desarrollada en pequeños rumiantes y en animales de laboratorio frente a la infección con *Fasciola hepatica*.
 - **Tipo:** Comunicación oral.
 - **Congreso:** V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba.
3. **Título:** Distribución de linfocitos FoxP3 reguladores en hígados y nódulos linfáticos de ovejas y cabras infectadas con *F.hepática*.
 - **Tipo:** Comunicación oral.
 - **Congreso:** XXVIII Reunión de la SEAPV. Córdoba.
4. **Título:** Estudio histopatológico en Ovejas inmunizadas con catepsina B recombinante e infectadas experimentalmente con *Fasciola hepatica*.
 - **Tipo:** Póster.
 - **Congreso:** I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. FAVE (UCO). Córdoba.

Año 2015

5. **Título:** Estudio de la apoptosis inducida por *Fasciola hepática* en células peritoneales de ovinos durante la primera fase de la infección
 - **Tipo:** Comunicación oral.
 - **Congreso:** XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología y II Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal. País Vasco.

6. **Título:** Lesiones hepáticas en fases tempranas de ovejas vacunadas con CL1 y no vacunadas e infectadas con *Fasciola hepática*.
 - **Tipo:** Comunicación oral.
 - **Congreso:** XXVII Reunión de la SEAPV. Barcelona.

7. **Título:** Evaluación de la apoptosis de eosinófilos en lesiones hepáticas ovinas en diferentes fases de la infección con *Fasciola hepática*.
 - **Tipo:** Póster.
 - **Congreso:** XXVII Reunión de la SEAPV. Barcelona.

Año 2014

8. **Título:** Apoptosis at 8, 28 and 119 days post-infection of sheep challenged with *Fasciola hepatica*.
 - **Tipo:** Póster.
 - **Congreso:** 2nd Joint European Congress of the ESVP, ECVP, ESTP. Berlin (Alemania).

Año 2013

9. **Título:** Apoptosis in early and late post-infection stages of sheep challenged with *Fasciola hepática*.
 - **Tipo:** Póster.
 - **Congreso:** 31st Meeting of the European Society and College of Veterinary Pathologists. Londres (Reino Unido).

10. **Título:** Apoptosis inducida por *Fasciola hepática* en fases tempranas y tardías de la infección en ovejas.

- **Tipo:** Póster.
- **Congreso:** XXV Reunión de la SEAVP. Toledo.

11. **Título:** Lesiones hepáticas tempranas en ovejas vacunadas con catepsina recombinante L1 e infectadas con *Fasciola hepática*.

- **Tipo:** Póster.
- **Congreso:** XXV Reunión de la SEAVP. Toledo.

12. **Título:** Evaluación de las lesiones hepáticas y células peritoneales en ovejas vacunadas con catepsina B2 e infectadas con *Fasciola hepática*.

- **Tipo:** Comunicación Oral.
- **Congreso:** II Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación de la eidA3. Córdoba.

13. **Título:** Péptidos sintéticos con epítomos T formulados en sistema ADAD de vacunación protegen frente a la fasciolosis en ratas

- **Tipo:** Póster.
- **Congreso:** VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia

PREMIO:

- Año 2015.- **Premio a la Mejor Comunicación Oral de la XXVII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria.** Otorgado por la SEAPV. Comunicación: "Lesiones hepáticas en fases tempranas de ovejas vacunadas con CL1 y no vacunadas e infectadas con *Fasciola hepática*".

ANEXO VI

PUBLICACIONES



Short communication

Fasciola hepatica induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep



A. Escamilla^a, M.J. Bautista^a, R. Zafra^a, I.L. Pacheco^a, M.T. Ruiz^a, S. Martínez-Cruz^b,
A. Méndez^a, A. Martínez-Moreno^b, V. Molina-Hernández^c, J. Pérez^{a,*}

^a Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^b Department of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^c School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2015

Received in revised form 2 December 2015

Accepted 14 December 2015

Keywords:

apoptosis

caspase-3

eosinophil

Fasciola hepatica

sheep

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the number of apoptotic eosinophils in the livers of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* during the migratory and biliary stages of infection. Four groups ($n = 5$) of sheep were used; groups 1–3 were orally infected with 200 metacercariae (mc) and sacrificed at 8 and 28 days post-infection (dpi), and 17 weeks post-infection (wpi), respectively. Group 4 was used as an uninfected control. Apoptosis was detected using immunohistochemistry with a polyclonal antibody against anti-active caspase-3, and transmission electron microscopy (TEM). Eosinophils were identified using the Hansel stain in serial sections for caspase-3, and by ultrastructural features using TEM. At 8 and 28 dpi, numerous caspase-3⁺ eosinophils were mainly found at the periphery of acute hepatic necrotic foci. The percentage of caspase-3⁺ apoptotic eosinophils in the periphery of necrotic foci was high (46.1–53.9) at 8 and 28 dpi, respectively, and decreased in granulomas found at 28 dpi (6%). Transmission electron microscopy confirmed the presence of apoptotic eosinophils in hepatic lesions at 8 and 28 dpi. At 17 wpi, apoptotic eosinophils were detected in the infiltrate surrounding some enlarged bile ducts containing adult flukes. This is the first report of apoptosis induced by *F. hepatica* in sheep and the first study reporting apoptosis in eosinophils in hepatic inflammatory infiltrates *in vivo*. The high number of apoptotic eosinophils in acute necrotic tracts during the migratory and biliary stages of infection suggests that eosinophil apoptosis may play a role in *F. hepatica* survival during different stages of infection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciola hepatica causes liver fluke disease in temperate climates and is responsible for major economic losses in animal production (Spithill et al., 1999). This disease is also considered a serious public health problem in humans (McManus and Dalton, 2006). *F. hepatica* often causes chronic infection, which implies the development of strategies by the parasite to modulate/suppress the host immune response (Dalton et al., 2013; Morphew et al., 2013). The parasite modulation of the host immune response is a serious obstacle to obtaining protective vaccines against *F. hepatica* in ruminants (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

In helminth infections, eosinophils play important roles either in developing tissue pathology (Cadman et al., 2014) and in the host effector response by releasing cytotoxic granule proteins and various lipid mediators (Klion and Nutman, 2004; Cadman et al., 2014). An effective response in rats infected with *F. hepatica* has been associated with a significant increase in eosinophil infiltration of the gut lamina propria in early post-infection stages (Van Milligen et al., 1998, 1999). In *F. hepatica* infected rats, peritoneal eosinophils producing very high levels of nitric oxide (NO) have been reported (Jedlina et al., 2011). In sheep, peritoneal eosinophils and macrophages, as well as mammary gland eosinophils from *Fasciola gigantica* resistant Indonesian thin-tail (ITT) sheep were able to kill juvenile *F. gigantica* *in vitro* by antibody-dependent cytotoxicity, but they did not kill larvae of *F. hepatica*, suggesting that eosinophils are important effector cells involved in the resistance of sheep to *F. gigantica* (Piedrafito et al., 2007). Previous studies have reported that bovine eosinophils incubated with bovine serum were unable to damage juvenile *F. hepatica*, but major basic protein

* Corresponding author at: Dep. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14014 Córdoba, Spain. Fax: +34 957218682.

E-mail address: an1pearj@uco.es (J. Pérez).

(MBP) obtained from bovine eosinophils was able to kill juvenile *F. hepatica* at very low concentration (Duffus et al., 1980).

Apoptosis of effector cells such as eosinophils has been reported as a mechanism of immunosuppression during helminth infections (Shin, 2000; Yan et al., 2008; Zepeda et al., 2010). It has been reported that *F. hepatica* induces eosinophil apoptosis in the hepatic inflammatory infiltrate in rats *in vivo* (Serradell et al., 2007). *In vitro* studies in the rat model have demonstrated that secreted excretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to induce apoptosis in eosinophils and peritoneal macrophages, suggesting that apoptosis in effector cells may play a role in the host immune evasion/suppression induced by *F. hepatica* infection (Serradell et al., 2007; Guasconi et al., 2012). Although the mechanisms of immune modulation/suppression induced by *F. hepatica* are a serious obstacle to developing protective vaccines in ruminants (Molina-Hernández et al., 2015), to date, apoptosis has not been investigated in ruminants infected with *F. hepatica*.

Several markers of apoptosis in tissue sections have been investigated, among them activated caspase-3 immunohistochemistry is considered an easy, sensitive, and reliable method for detecting and quantifying apoptosis in histological sections (Duan et al., 2003; Resendes et al., 2004). Transmission electron microscopy is also a useful technique to detect apoptotic cells and to identify eosinophils based on the morphological features of their cytoplasmic granules (Duffin et al., 2009) and it allow to evaluate ultrastructure of apoptotic eosinophils (Balic et al., 2006).

The aim of the present work was to evaluate the presence and number of eosinophils undergoing apoptosis in hepatic inflammatory infiltrates from sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the migratory (8 and 28 days post-infection—dpi) and biliary stages of infection (17 weeks post-infection—wpi). Activated caspase-3 immunohistochemistry was used for quantifying eosinophil apoptosis and transmission electron microscopy was used to evaluate ultrastructure of apoptotic eosinophils.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Twenty 7-month-old female Merino-breed sheep were used for this study. All animals were obtained from a liver fluke-free farm. Animals were purchased at 1 month of age and housed indoors in the experimental farm of the University of Córdoba until they reached the appropriate age for challenge. All animals were tested monthly for parasite eggs by fecal sedimentation; the results were negative. In addition, all animals were tested for serum IgG specific for *F. hepatica* cathepsin L1 by ELISA prior to challenge and all of them were negative. The sheep were allocated into four groups of five animals each: groups 1, 2 and 3 were orally infected with one dose of 200 metacercariae (Ridgeway Research Ltd., Gloucestershire, UK); group 4 was used as the uninfected negative control. Animals were sacrificed by intravenous injection of thiobarbital at different stages of infection. Groups 1 and 2 were sacrificed at 8 and 28 days post-infection (dpi) and the animals of group 3 were sacrificed at 17 weeks post-infection (wpi). The experiment was approved by the Bioethics Committee of the University of Córdoba (No. 1118) and was performed taking into account European (2010/63/UE) and Spanish (RD 1201/2005) directives on animal experimentation.

2.2. Histopathology and fluke burdens

At necropsy, the duodenum was ligated proximally and distally to the ductus choledochus (8–10 cm) and the liver was photographed on the visceral and diaphragmatic aspects for gross evaluation. Liver tissue samples showing hepatic lesions were

collected and fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h, then routinely processed and embedded in paraffin wax. Four micron-thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathology. Fluke burden was conducted in animals from group 3 as follows: gallbladders were opened and flukes were recovered, then the bile ducts were carefully opened and flukes were removed with blunt forceps. Finally, the livers were cut into small pieces (1 cm³) and washed in hot water to collect the remaining flukes.

Hansel's stain was used in liver tissue sections to identify the presence of eosinophils. Two 4 μm-thick tissue serial sections were obtained. All these tissue sections were deparaffinized and dehydrated through a graded ethanol series. The first section was stained with Hansel's stain, the second by immunohistochemistry for active caspase-3. For Hansel's stain, tissue sections were incubated for 1 min with eosin, washed in distilled water and incubated for 1 min in methylene blue, then washed in distilled water, dehydrated and mounted.

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

Formalin-fixed, paraffin-embedded sections and the avidin-biotin-peroxidase method (Zafra et al., 2013b) were used for the IHC study. A polyclonal (pAb) rabbit anti-human caspase-3 antibody (RP096, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) was used as a marker for apoptosis. The primary antibody reacts with cleaved activated caspase-3 but does not recognize full-length caspase-3 or other cleaved caspases; according to the manufacturer, this antibody cross-reacts with activated ovine caspase-3. Liver tissue sections from 8 dpi in which apoptosis had been detected by transmission electron microscopy were used as positive controls.

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

For the ultrastructural study, fresh liver samples from groups 1, 2 and 4 were used. In groups 1 and 2, samples were collected from whitish tortuous tracts, cut into 1-mm cubes, fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. Thin sections (50 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined and photographed using a Jeol Jem 1400 transmission electron microscope.

2.5. Gross lesions evaluation and cell counting

Gross pictures of livers were used to evaluate gross damage (hemorrhages and necrotic tracts at 8 and 28 dpi, and fibrosis and scars at 17 wpi) as reported Zafra et al. (2008) using the Image Pro 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). The perimeter of the diaphragmatic and visceral aspects of the liver was delineated and the total area obtained, then, the perimeter of the damaged areas was delineated and the area obtained. The percentage of damaged area was then expressed as mean value ± SD per group.

Cell counting was carried out in 10 fields of 0.08 mm² per animal randomly selected at the periphery of necrotic foci (8 dpi), necrotic foci and granulomas (28 dpi) and inflammatory infiltrate surrounding large bile ducts with erosive cholangitis (17 wpi). Cell counting was carried out in tissue sections stained with Hansel's technique (eosinophils), and IHC (caspase-3⁺ eosinophils and apoptotic bodies). Results are given as mean ± SD per group.

2.6. Statistical analyses

The Kolmogorov–Smirnov test was applied to decide whether distributions were parametric. Comparison between pairs of

groups was made with the Mann–Whitney *U* test. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Gross pathology and fluke burdens

All control livers from group 4 showed no gross changes on either the diaphragmatic or visceral surface. Livers from group 1 showed numerous white spots with reddish spots and occasional whitish tortuous tracts ranging from 0.3 to 1 cm in length located on the liver surface, mainly on the diaphragmatic aspect of the left lobe. Livers from group 2 showed numerous whitish tortuous tracts ranging from 0.5 to 3 cm in length, whitish-grey patches ranging up to $1 \times 1 \times 2.5$ cm and occasional reddish spots, mainly involving the left lobe. Livers from group 3 showed enlarged, whitish gall bladders and bile ducts, which contained brown fluid and numerous adult flukes. Numerous tortuous greyish scars were found on the liver surface, mainly involving the left lobe. The percentage of damaged hepatic surface was 3.5 ± 1.2 at 8 dpi, 8.7 ± 2.3 at 28 dpi and 23.4 ± 6.7 at 17 wpi. The number of flukes in the five animals from group 4 was 54, 40, 41, 34 and 58 (mean 45.4 ± 10.14).

3.2. Histopathological study

Livers from group 4 showed no histopathological changes. Portal spaces showed occasional lymphocytes, but eosinophils were not found in negative control livers. All animals from group 1 presented necrotic foci and focal hemorrhages mainly involving subcapsular areas. Necrotic foci showed abundant cell debris and mild to moderate infiltrates of eosinophils, often with pyknotic nuclei. Necrotic tracts started 0.5–1.5 mm behind migrating larvae.

Livers from group 2 presented similar acute necrotic foci and tracts with eosinophil infiltration. In addition, the majority of necrotic foci were surrounded by a core of large activate macrophages and an outer layer of lymphocytes, plasma cells and eosinophils, conforming to the definition of a granuloma.

Histopathological changes in the livers from group 3 were typical of chronic fasciolosis. Adult flukes were present within severely enlarged bile ducts often showing epithelial erosion, portal fibrosis and a variable amount of inflammatory infiltration, mainly composed of eosinophils, lymphocytes and plasma cells.

3.3. Apoptosis detected by caspase-3 expression

Livers from negative control sheep (group 3) did not show caspase-3⁺ inflammatory cells. At 8 dpi, numerous inflammatory cells located at the periphery of necrotic foci, as well as cell debris (apoptotic bodies), expressed caspase-3, whereas the inflammatory infiltrate not associated with necrotic areas showed only occasional caspase-3⁺ inflammatory cells. The pattern of immunostaining was both cytoplasmic and nuclear. Serial sections stained with Hansel's technique allowed us to identify eosinophils (Figs. 1 and 2). The percentage of caspase-3⁺ eosinophils with respect to caspase-3⁻ eosinophils at the periphery of necrotic foci was 46.1% and 53.9% at 8 and 28 dpi, respectively (Table 1), whereas at the periphery of granulomas, the percentage of caspase-3⁺ eosinophils was only 6% (Table 1). At 17 wpi, eosinophils located the inflammatory infiltrate surrounding some hyperplastic bile ducts, often containing adult flukes, showed numerous caspase-3⁺ cells (Fig. 3), whereas the inflammatory infiltrate not associated with enlarged bile ducts only showed occasional caspase-3⁺ cells.

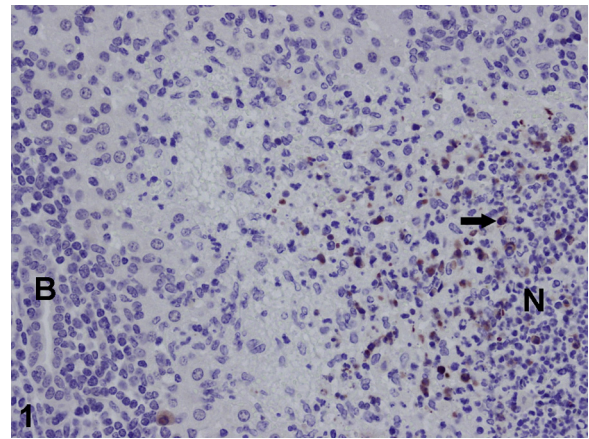


Fig. 1. Liver, 8 days post-infection. Caspase-3. Necrotic focus (N) showing cell debris and numerous inflammatory cells, many of them expressing caspase-3 (brown, arrow). Note a bile duct (B) with severe inflammatory infiltrate in the portal space negative for caspase-3 except for one cell (brown). ABC method, $\times 400$.

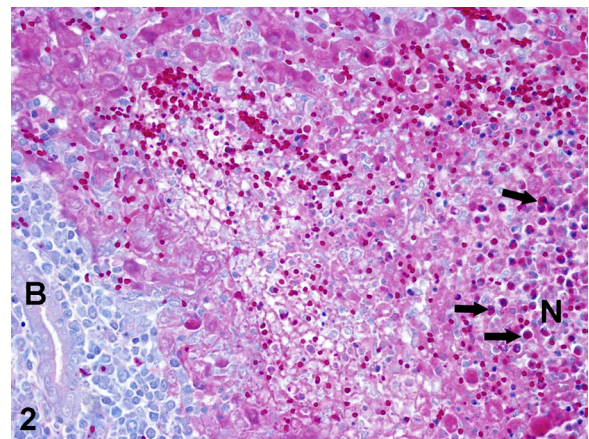


Fig. 2. Liver, 8 days post-infection. Serial section of same area observed in Fig. 1. Note the bile duct (B) surrounded by a severe inflammatory infiltrate and a necrotic focus (N) with abundant cellular debris and moderate inflammatory infiltrate, the majority of cells with a red cytoplasm are eosinophils. Hansel staining, $\times 400$.

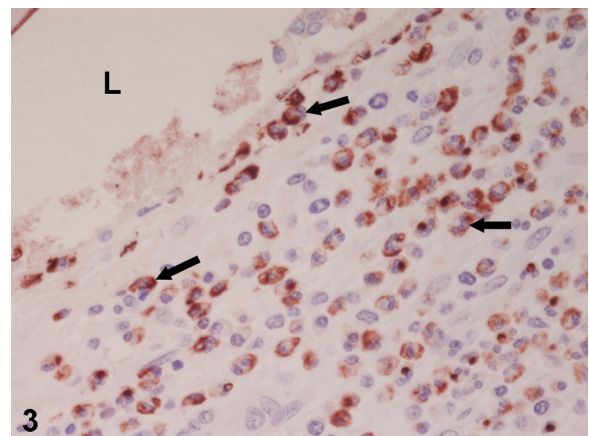


Fig. 3. Liver, 17 weeks post-infection. Detail of a bile duct showing the lumen (L) with a lack of epithelium (erosive cholangitis) and numerous caspase-3⁺ cells in the associated inflammatory infiltrate. ABC method, $\times 400$.

3.4. Apoptosis detected by transmission electron microscopy

The TEM study confirmed apoptosis in eosinophils in livers from groups 1 and 2. The ultrastructural features of eosinophils consist

Table 1

Number of caspase-3⁺ eosinophils and apoptotic bodies in *F. hepatica* infected sheep at 8 days post-infection (dpi), 28 dpi and 17 weeks post-infection (wpi) and in negative control sheep. Results are expressed as mean \pm SD per field of 0.08 mm².

	8 dpi	28 dpi	17 wpi		controls
	NF	NF	Granulomas		
Caspase-3 ⁺ eosinophils	10.6 \pm 1.8	13.7 \pm 5.7	1.3 \pm 1.0	17.3 \pm 7.8	0
Caspase-3 ⁻ eosinophils	12.4 \pm 1.9	11.7 \pm 3.7	20.3 \pm 8.2	29.3 \pm 12.8	0
% Caspase-3 ⁺ eosinophils	46.1	53.9	6.0	37.1	0
Caspase-3 ⁺ A.B.	18.5 \pm 0.9	32.6 [†] \pm 2.2	6.7 [†] \pm 3.5	11.3 \pm 5.7	0

NF: necrotic foci; AB: apoptotic bodies.

^{*} Significant differences ($P < 0.05$) respect to 8 dpi.

[†] Significant differences ($P < 0.05$) respect to NF at 8 and 28 dpi.

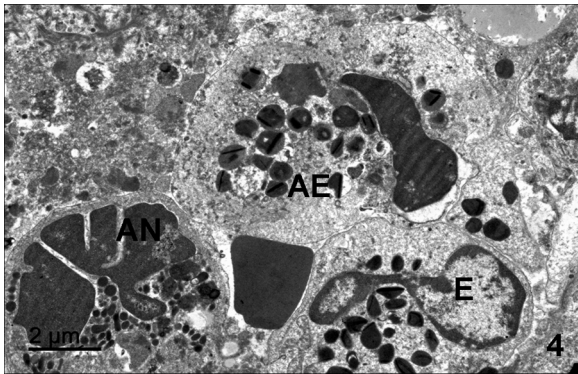


Fig. 4. Liver, 8 days post-infection. Eosinophils showing normal ultrastructural features (E) and apoptotic eosinophils (AE) showing condensed, electron dense nuclei and typical granules with electron dense structures. An apoptotic neutrophil (AN) with a multilobed electron dense nucleus and typical round to oval electron dense cytoplasmic granules is also observed. Transmission electron microscopy. Bar = 2 μ m.

of a bilobed nucleus and typical cytoplasmic oval granules ranging from 0.5 to 1 μ m in diameter with moderately electron dense matrix material and a highly electron-dense crystalloid core (Fig. 4). Apoptotic TEM changes consisted of margination-condensation of chromatin (early changes) and cytoplasmic and nuclear fragmentation while maintaining cell membranes and organelles (Fig. 4).

4. Discussion

Hansel's stain has been used to identifying and quantifying eosinophils in tissues (Nguyen et al., 2012). In the liver tissue sections examined in the present study, eosinophils were identified more easily using Hansel's stain than H&E staining. We used Hansel's stain as a counterstain for caspase-3 immunohistochemistry, but the dark brown color of the immunostaining masked the bright red cytoplasmic granules of eosinophils and did not allow for the identification of this cell type, this is why we used serial sections.

Caspase-3 is an effector caspase that plays a crucial role during apoptosis, since it directly activates enzymes that are responsible for DNA fragmentation. Activated or cleaved caspase-3 has been used as a marker of apoptosis via immunohistochemistry in healthy tissues and in helminth-infected tissue sections (Resendes et al., 2004; Chen et al., 2008; Mkupasi et al., 2013). The absence of apoptotic inflammatory cells in non-infected control livers in the present study contrasts with the presence of apoptosis in healthy pig lymphoid tissues, and may be due to the small number of inflammatory cells present in the healthy sheep liver compared with those in lymphoid organs (Resendes et al., 2004).

In the present study, apoptotic eosinophils were also identified by TEM in liver samples at 8 and 28 dpi. Ultrastructurally, eosinophils were identified by the typical cytoplasmic granules

with an electron dense core according to the features reported in human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. The condensation and fragmentation of the nucleus with an intact cytoplasmic membrane was found in apoptotic eosinophils in this work and has also been reported in TEM studies of human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. Apoptotic eosinophils attached to *Haemonchus contortus* in the gastric tip of sheep were degranulated (Balic et al., 2006); by contrast, in the present study, apoptotic eosinophils found in the liver during the migratory stage of *F. hepatica* contained typical granules. This finding suggests that during the migratory stage of *F. hepatica*, degranulation of eosinophils is not the cause of apoptosis.

During the migratory stage (8 and 28 dpi), acute necrotic foci and tracts were found behind migrating larvae, suggesting they induced hepatic necrotic tracts, in agreement with previous reports in sheep (Meeusen et al., 1995; Zafra et al., 2013a,b). The majority of apoptotic eosinophils were found in the periphery of these acute necrotic foci and tracts, while they were occasional in portal infiltrates and granulomas and inflammatory infiltrates not associated with necrotic foci or tracts. Moreover, in the chronic stage of infection (17 wpi), the majority of apoptotic eosinophils were found in the vicinity of large bile ducts, often containing adult flukes inside, and occasionally in inflammatory infiltrates associated with granulomas, fibrotic chronic tracts or portal spaces with smaller bile ducts. This distribution of apoptotic eosinophils suggests that products released by migrating or adult *F. hepatica* may induce the local recruitment of eosinophils. It is possible that products released by *F. hepatica* induces eosinophil apoptosis, which is supported by *in vitro* studies reporting that the excretory products (ESP) of *F. hepatica* are able to induce apoptosis in rat eosinophils and macrophages (Serradell et al., 2007, 2009; Guasconi et al., 2012) and ESP from the trematode *Paragonimus westermani* are able to induce eosinophil apoptosis (Min et al., 2004). Alternatively, enzymes released by eosinophils may cause lytic necrosis and apoptosis, which is supported by the crucial role of eosinophil in mediating tissue damage and granuloma formation in *Schistosoma mansoni* (Silveira-Lemos et al., 2008). Further studies immunolocalizing ESP antigens from *F. hepatica* in hepatic tissue sections from infected sheep are required to confirm if *F. hepatica* ESP are able to induce apoptosis in sheep inflammatory cells.

Apoptosis of effector cells of the innate response such as eosinophils has been reported as a mechanism of local immunosuppression during helminth infections such as *P. westermani* (Shin, 2000; Min et al., 2004) and the cestode *Taenia solium* (Yan et al., 2008) and *Taenia crassica* (Zepeda et al., 2010). In fasciolosis, eosinophils appear to play a crucial role in the effector host response; thus, an effective response in rats infected with *F. hepatica* has been associated with a significant increase in eosinophil infiltration of the gut lamina propria during early post-infection stages (Van Milligen et al., 1998, 1999). In *F. gigantica* resistant Indonesian thin-tail (ITT) sheep, peritoneal eosinophils and macrophages are able to kill juvenile *F. gigantica in vitro* by an

antibody-dependent cytotoxicity mechanism dependent on NO production, but they do not kill the larvae of *F. hepatica*, suggesting that eosinophils are important effector cells involved in the resistance of sheep to *F. gigantica* (Piedrafita et al., 2007). The results of the present work revealed a high number of apoptotic eosinophils in acute necrotic foci at 8 and 28 dpi, while the number of apoptotic eosinophils decreased significantly in necrotic granulomas at 28 dpi. Since acute necrotic foci occur behind migrating larvae, and eosinophils are crucial effector of the effective host innate response, apoptosis of this effector cell may be an important mechanism used by *F. hepatica* larvae to evade the host innate response during the hepatic migratory stage in which the parasites are more exposed to the host immune response than when they reach the biliary system.

In summary, the present work is the first report of eosinophil apoptosis during the migratory and biliary stages of *F. hepatica* infection in sheep. Eosinophil apoptosis was detected by active caspase-3 tissue expression and transmission electron microscopy, and it was found in a high number of eosinophils mainly located at the periphery of acute necrotic tracts during the migratory stage of infection, suggesting that this may be a mechanism by which the parasite evades the host response. Further studies are required to investigate the presence of apoptosis in other inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes as well as the presence of apoptosis in peritoneal inflammatory cells.

Acknowledgments

This work was supported by EU grants (FPVII-265862-PARAVAC, H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2009-08726. TEM studies were carried out by the Central Services for Research of the University of Córdoba (SCAI).

References

- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107–115.
- Cadman, E.T., Thyse, K.A., Bearder, S., Cheung, A.Y., Johnston, A.C., Lee, J.J., Lawrence, R.A., 2014. Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microflariae. *PLoS Pathog.* 10 (3), e1003988, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003988>.
- Chen, K.M., Lee, H.H., Lai, S.C., Hsu, L.S., Wang, C.J., Liu, J.Y., 2008. Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp. Parasitol.* 119, 385–390.
- Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272–285.
- Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A., 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199, 221–228.
- Duffin, R., Leitch, A.E., Sheldrake, T.A., Hallett, J.M., Meyer, C., Fox, S., Alessandri, A.L., Martin, M.C., Brady, H.J., Teixeira, M.M., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2009. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. *FEBS Lett.* 583, 2540–2546.
- Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359–363.
- Jedlina, L., Kozak-Lunggren, M., Wedrychowicz, H., 2011. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp. Parasitol.* 128, 291–297.
- Klion, A.D., Nutman, T.B., 2004. The role of eosinophils in host defense against the helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 30–37.
- McManus, D.P., Dalton, J.P., 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 (Suppl), S43–S61.
- Meeusen, E., Lee, C.S., Rickard, M.D., Brandon, M.R., 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17, 37–45.
- Min, D.Y., Lee, Y.A., Ryu, J.S., Ahn, M.H., Chung, Y.B., Sim, S., Shin, M.H., 2004. Caspase-3-mediated apoptosis of human eosinophils by the tissue-invasive helminth *Paragonimus westermani*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 133, 357–364.
- Mkupasi, E.M., Sikasunge, C.S., Ngowi, H.A., Leifsson, P.S., Johansen, M.V., 2013. Detection of cysteine protease in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Vet. Parasitol.* 197, 360–363.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101–111.
- Morphew, R.M., Hamilton, C.M., Wright, H.A., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Brophy, P.M., 2013. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by nonidet p40. *Vet. Parasitol.* 191, 379–385.
- Nguyen, K.H., Suzuki, H., Wakasugi, T., Hohchi, N., Hashida, K., Kitamura, T., Shibata, M., 2012. Expression of epidermal growth factors, erbBs, in the nasal mucosa of patients with chronic hypertrophic rhinitis. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 74, 57–63.
- Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N., Spithill, T.W., 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity *in vitro* against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* 75, 1954–1963.
- Resendes, A.R., Majo, N., Segales, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarias, M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by tunel and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203–213.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiappello, L.S., Masih, D.T., 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197–208.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Masih, D.T., 2009. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 95–106.
- Shin, M.H., 2000. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *Korean J. Parasitol.* 31, 17–23.
- Silveira-Lemos, D., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Alves Oliveira, L.F., Costa-Silva, M.F., Matoso, L.F., de Souza, L.J., Gazzinelli, A., Corrêa-Oliveira, R., 2008. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop.* 108, 150–159.
- Spithill, T.W., Smooker, P.M., Sexton, J.L., Bozas, E., Morrison, C.A., Creaney, J., Parsons, J.C., 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International Wallingford, UK, pp. 377–401.
- Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915–927.
- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P., Bokhout, B.A., 1998. Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol.* 20, 285–292.
- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Bokhout, B.A., 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21, 243–251.
- Yan, H.L., Xue, G., Mei, Q., Ding, F.X., Wang, Y.Z., Sun, S.H., 2008. Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacystodes annexin b1 on human eosinophils: a novel strategy to prevent host immune response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2151–2163.
- Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Pérez-Ecija, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez, J., 2008. A study of the liver of goats immunized with a synthetic peptide of the Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 139, 169–176.
- Zafra, R., Pérez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013a. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 148, 373–384.
- Zafra, R., Pérez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Pacheco, I.L., Martínez-Moreno, A., LaCourse, E.J., Perally, S., Brophy, P.M., Pérez, J., 2013b. Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 94, 602–609.
- Zepeda, N., Solano, S., Copitin, N., Fernandez, A.M., Hernandez, L., Tato, P., Molinari, J.L., 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+) CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitol. Res.* 107, 1129–1135.



Short communication

Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep



A. Escamilla^a, R. Pérez-Caballero^b, R. Zafra^b, M.J. Bautista^a, I.L. Pacheco^a, M.T. Ruiz^a,
M.S. Martínez-Cruz^a, A. Martínez-Moreno^b, V. Molina-Hernández^c, J. Pérez^{a,*}

^a Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^b Department of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^c School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2016

Received in revised form 7 March 2017

Accepted 16 March 2017

Keywords:

Apoptosis

Caspase-3

Annexin-V

Peritoneal leucocytes

Fasciola hepatica

Sheep

ABSTRACT

Several immunomodulatory properties have been described in *Fasciola hepatica* infections. Apoptosis has been shown to be an effective mechanism to avoid the immune response in helminth infections. The aim of the present work was to study apoptosis in peritoneal leucocytes of sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the early stages of infection. Five groups (n=5) of sheep were used. Groups 2–5 were orally infected with 200 metacercariae (mc) and sacrificed at 1, 3, 9 and 18 days post-infection (dpi), respectively. Group 1 was used as the uninfected control (UC). Apoptosis was detected using three different methods 1) immunocytochemistry (ICC) with a polyclonal antibody anti-active caspase-3; 2) an annexin V flow cytometry assay using the Annexin V-FITC/propidium iodide (PI); and 3) transmission electron microscopy (TEM). The differential leucocyte count revealed that the majority of peritoneal granulocytes were eosinophils, which increased significantly at 9 and 18 dpi with respect to the uninfected controls. The ICC study revealed that the percentage of caspase-3⁺ apoptotic peritoneal leucocytes increased significantly from 3 dpi onwards with respect to the uninfected controls. The flow cytometry annexin V assay detected a very significant (P < 0.001) increase of apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes, which remained higher than in the UC until 18 dpi. Transmission electron microscopy studies also confirmed the presence of apoptosis in peritoneal eosinophils at 18 dpi. This is the first report of apoptosis induced by *F. hepatica* in the peritoneal leucocytes of sheep *in vivo*. The results of this work suggest the importance of apoptosis induction for the survival of the juvenile parasites in the peritoneal migratory stages of infection.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the migration of juvenile *Fasciola hepatica* through the peritoneal cavity, until their penetration into the hepatic parenchyma, the parasites secrete different molecules which interact with peritoneal leucocytes in different ways. Since it has been reported that the protective response against *F. hepatica* occurs during the early stages of infection, it would be of interest to study mechanisms of immunomodulation in target species at the peritoneal and early hepatic migratory stages. *In vitro* studies in the rat model demonstrated that secreted excretory products of *F. hepatica*

(FhESP) are able to induce apoptosis in eosinophils and peritoneal macrophages, suggesting that apoptosis of effector cells may play a role in the host immune evasion/suppression induced by *F. hepatica* infection (Serradell et al., 2007; Guasconi et al., 2012). *In vivo* studies in sheep have also revealed apoptosis of eosinophils in hepatic lesions both during acute and chronic stages of infection (Escamilla et al., 2016). To date, apoptosis of peritoneal inflammatory cells from sheep infected with *F. hepatica in vivo* has not been reported. Several markers of apoptosis in tissue sections have been investigated, among them activated caspase-3 immunohistochemistry is considered an easy, sensitive and reliable method for detecting and quantifying apoptosis in histological sections (Duan et al., 2003; Resendes et al., 2004). The annexin V/PI assay has also been used by several authors to evaluate the apoptosis phenomenon (Serradell et al., 2007; Chen et al., 2013).

The aim of the present work was to evaluate the presence and number of inflammatory peritoneal cells undergoing apoptosis in

* Corresponding author at : Dep. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid–Cádiz km 396 14014 Córdoba, Spain.

E-mail address: an1pearj@uco.es (J. Pérez).

peritoneal fluid from sheep experimentally infected with *F. hepatica* during the earlier peritoneal migratory stages (0, 1, 3, 9 and 18 days post-infection, dpi). Annexin V/PI flow cytometry and activated caspase-3 immunocytochemistry were used to quantify peritoneal inflammatory cell apoptosis, and transmission electron microscopy was used to evaluate the ultrastructure of apoptotic inflammatory cells.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Forty-five 7-month-old female Merino sheep were used for this study. All animals were obtained from a liver fluke-free farm, and they were tested for *Fasciola* eggs by faecal sedimentation with negative results. They were allocated into five groups of five animals each: group 1 was used as an uninfected control (UC) group and groups 2–5 were orally infected with one dose of 200 *F. hepatica* metacercariae (Ridgeway Research Ltd., UK) administered in gelatine capsules with a dosing gun. Sheep in groups 2–5 were sacrificed by an intravenous injection of thiobarbital at 1, 3, 9, and 18 days post-infection (dpi), respectively. The experiment was approved by the Bioethical Committee of the University of Córdoba (No. 1118) and was performed taking into account European (2010/63/UE) and Spanish (RD 1201/2005) directives on animal experimentation.

2.2. Peritoneal cell populations

Peritoneal washing was conducted immediately after the animals were euthanised following the methodology described by Zafra et al. (2013). Briefly, the abdominal cavity was washed with 60 ml sterile phosphate buffer saline (PBS) with 6 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pre-heated to 37 °C. After a softly massaging for 1 min, 40 ml peritoneal fluid were recovered and centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the supernatant was eliminated. Subsequently, cellular pellets were resuspended using the aforementioned medium. Diff-Quick stained smears were used for differential cell count. A total of 600 cells per animal were counted and the percentage of eosinophils, lymphocytes, macrophages and neutrophils was obtained. Epithelial cells were not included in the cell counting. Extensions were manually performed in Vectabond-treated slides. After air drying, these extensions were fixed using acetone for 5 min and stored at –80 °C for immunocytochemical studies.

2.3. Immunocytochemistry

A polyclonal rabbit anti-human caspase-3 antibody, (cat. No. RP096, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) was used. The primary antibody reacts with cleaved activated caspase-3 but does not recognise full-length caspase-3 or other cleaved caspases. According to the manufacturer, this antibody cross-reacts with activated ovine caspase-3. The avidin-biotin-peroxidase method (Zafra et al., 2013) was used for the immunocytochemical study. Briefly, defrosted peritoneal fluid smears were fixed in acetone for 10 min, and the endogenous peroxidase activity was quenched in H₂O₂ in methanol for 15 min, with agitation at room temperature (RT). Smears were washed for 10 min in PBS, and then they were incubated in PBS with 5% normal goat serum for 30 min at RT. Anti-caspase-3 antibody 1:100 was applied overnight at 4 °C. After three 10 min rinses in PBS-T (PBS buffer with 0.1% Tween-20 detergent), a goat anti-rabbit immunoglobulin serum (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 was applied for 30 min as a secondary antibody. As the third reagent, an avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) was applied for one hour. Labelling was visualised by application of the NovaRED™ substrate kit (Vector Laboratories).

Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin, dehydrated and mounted. In negative control slides, specific primary antibody was substituted with non-immune rabbit serum.

2.4. Cell counting from immunocytochemistry

Immunoreactive cells were counted using the Image Pro-plus software 6.0 (Media Cybernetics). Caspase-3⁺ and caspase-3[–] peritoneal leucocytes were counted in 10 fields of 0.08 mm² per animal randomly selected from the smears. In animals with small numbers of peritoneal leucocytes, at least 300 cells per animal were counted. Results are given as mean ± SD per group.

2.5. Annexin V flow cytometry assay

Cell density of peritoneal fluid pellets was adjusted to 2–5 × 10⁵ cells/ml. Annexin V Kit (ANNEX100F, AbD Serotec-Bio-Rad Company- UK) for flow cytometry was used. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were suspended in 200 µl of binding buffer. Then, 5 µl of Annexin V-FITC was added to 195 µl of the cell suspension mentioned before. This suspension was mixed and incubated for 10 min in darkness at RT. Subsequently, the suspension was washed in 200 µl of pre-diluted (at 1:4) binding buffer. Next, the cells were resuspended again in 190 µl of pre-diluted binding buffer. Finally, 10 µl of propidium iodide solution was added to this suspension, and the samples were ready to analyse by flow cytometry. For a positive control, the cells were incubated with 3% formaldehyde in buffer for 30 min on ice. Then the formaldehyde was washed away, and the cells were resuspended in cold binding buffer and processed as a normal sample. A CyFlow Cube 6 cytometer (Sysmex Partec, Germany) and specific protocol based on morphological features (forward scatter/side scatter) were used to determine the leucocyte populations in the peritoneal fluid. The apoptotic cells were identified because of the reactivity of fluorochrome (FL1 for Annex V and FL3 for propidium iodide). Peritoneal leucocytes were differentiated as viable (annexin V-negative and PI-negative) and apoptotic (annexin V-positive, PI-negative). The extent of apoptosis was expressed according to the percentage of each cell population that was apoptotic or viable. The results were analysed using the Flowing Software (University of Turkey, Finland). Ten thousand events were acquired, and the total number of apoptotic cells versus viable cells were counted and expressed as percentages of the total number of peritoneal leucocytes acquired.

2.6. Transmission electron microscopy

For the ultrastructural study, fresh peritoneal cellular pellet samples from UC and 18 dpi groups were used. The remaining groups were not included in the TEM study because the pellet samples were too small for the ICC, flow cytometry and TEM studies. Peritoneal cell pellets were centrifuged at 1500 rpm for 10 min (4 °C), cut into 1–3 mm cubes, fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. Thin sections (50 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined and photographed using a Jeol Jem 1400 transmission electron microscope at the Central Research Services (SCAI) of the University of Córdoba.

2.7. Statistical analysis

For the statistical analysis, the GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) was used. For each timepoint of the experiment the expression of caspase-3 and Annexin V positive cells was compared using the one-way ANOVA

Table 1

Percentage of peritoneal leucocytes (mean \pm SD) in uninfected control and *Fasciola hepatica* infected sheep during early stages of infection.

Percentage of peritoneal leucocytes (%)				
Group	Lymphocytes	Macrophages	Neutrophils	Eosinophils
UC	36.4 \pm 14.0	60.0 \pm 14.7	1.1 \pm 2.0	2.7 \pm 1.1
1 dpi	35.4 \pm 15.8	61.4 \pm 28.0	1.9 \pm 2.7	1.4 \pm 2.2
3 dpi	44.2 \pm 11.8	53.3 \pm 11.6	0.3 \pm 0.5	2.3 \pm 2.7
9 dpi	40.6 \pm 18.2	32.1 \pm 5.6*	2.9 \pm 2.7	24.3 \pm 11.7*
18 dpi	24.1 \pm 9.5	25.8 \pm 8.9*	0.5 \pm 1.1	49.3 \pm 14.1*

UC: uninfected control.

* Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

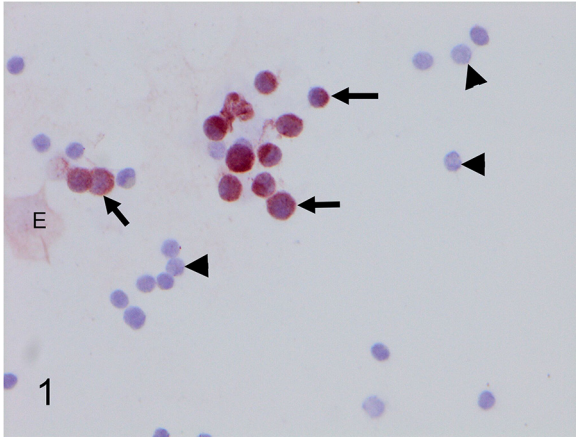


Fig. 1. Peritoneal smear, 3 dpi. Caspase 3 expression is observed as brown cytoplasmic and nuclear colour in peritoneal leucocytes (arrow) whereas other are negative (arrowheads). E: epithelial cell. ABC method-haematoxylin counterstain, $\times 400$.

test followed by the Tukey post hoc test for multiple comparisons of means. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Peritoneal leucocyte populations

The differential cell count for peritoneal leucocyte populations is given in Table 1. In the UC group and at 1 and 3 dpi, macrophages followed by lymphocytes were the two more abundant peritoneal leucocytes, with occasional neutrophils and eosinophils. At 9 dpi, a significant increase in eosinophils and a significant decrease in macrophages with respect to the UC group were observed, while the percentage of lymphocytes did not change significantly. At 18 dpi, the increase in the percentage of eosinophils and decrease in the percentage of macrophages with respect to the UC group was even more pronounced than at 9 dpi. The percentage of lymphocytes tended to decrease at 18 dpi with respect to the UC group, but the differences were not significant. Neutrophils were occasionally present in all groups and did not change significantly with respect to the UC group.

3.2. Apoptosis detected by caspase-3 expression

Immunolabelling with the anti-caspase-3 antibody was detected as a cytoplasmic and nuclear reddish-brownish colour (Fig. 1). The percentage of peritoneal leucocytes expressing caspase-3 is given in Table 2. Cellular pellets from peritoneal leucocytes from the UC group showed occasional caspase-3⁺ cells (0.4 \pm 0.6). At 1 dpi the percentage of peritoneal leucocytes caspase-3⁺ was 1.2 \pm 1.3 without a significant difference from the UC group. However, at 3, 9 and 18 dpi the percentage of caspase-3⁺



Fig. 2. 18 dpi. Apoptotic peritoneal eosinophil showing fragmented and condensed nuclei and typical cytoplasmic granules (arrows). Transmission electron microscopy. Bar = 2 μ m.

leucocytes was 19.5 \pm 5.5, 19.9 \pm 4.0 and 42.6 \pm 4.3, respectively, with statistical increase with respect to the UC group, and also between the 18 dpi group and the 3 and 9 dpi groups (Table 2).

3.3. Annexin V flow cytometry assay

The percentages of apoptotic and viable peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes are summarised in Table 3. Peritoneal leucocyte populations (macrophages, lymphocytes and granulocytes) were determined according to their morphological features. The UC group showed a very low percentage of apoptotic macrophages (1.7%), lymphocytes (0.4%) and granulocytes (1.5%). At 1 dpi the percentage of apoptotic leucocytes suffered a dramatic and significant increase compared to the UC group: 37.8%, 28.2% and 30.7% for macrophages, lymphocytes and granulocytes, respectively. At 3, 9 and 18 dpi the percentage of apoptotic peritoneal macrophages and lymphocytes remained significantly higher with respect to the UC group but it decreased at 18 dpi with respect to previous infection stages (Table 3). In contrast, the percentage of apoptotic granulocytes tended to increase at 3 dpi with respect to 1 dpi, suffered a transient decrease at 9 dpi when migrating larvae reached the liver, and again increased up to 80% at 18 dpi (Table 3).

3.4. Apoptosis detected by transmission electron microscopy

The TEM study confirmed apoptosis in peritoneal eosinophils from 18 dpi. The ultrastructural features of eosinophils from the UC group consist of a bilobed nucleus and typical cytoplasmic oval granules ranging from 0.5 to 1 μ m in diameter with a moderately electron dense matrix material and a highly electron-dense crystalloid core. Apoptotic TEM changes consisted of margination-condensation of chromatin (early changes) and cytoplasmic and nuclear fragmentation while maintaining cell membranes and organelles (Fig. 2). Macrophages from the 18 dpi group showed morphological changes typical of phagocytic activation such as large cytoplasmic vacuoles containing membrane debris (secondary lysosomes) and enlarged rough endoplasmic reticulum, but nuclear fragmentation indicative of apoptosis was not observed in this cell type.

4. Discussion

To study apoptosis in peritoneal leucocytes, it is necessary to first evaluate the differential peritoneal leucocyte count during the course of *F. hepatica* infection. In the UC group, the majority of peritoneal leucocytes consisted of macrophages and lymphocytes with only 1.5% eosinophils. These results agree with those from unin-

Table 2
Results from immunocytochemistry of peritoneal leucocytes expressed in percentage of caspase 3 positive and negative cells in each day post-infection (dpi). Results expressed as mean \pm SD per group.

	UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Caspase 3 ⁺	0.4 \pm 0.6	1.2 \pm 1.3	19.5 \pm 5.5 [*]	19.9 \pm 4.0 [*]	42.6 \pm 4.3 ^{**}
Caspase 3 ⁻	99.6 \pm 0.6	98.8 \pm 1.3	80.5 \pm 5.5 [*]	80.0 \pm 4.0 [*]	57.4 \pm 4.3 ^{**}

UC: uninfected control.

^{*} Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

^{**} Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control, 1, 3 and 9 dpi groups.

Table 3
Percentage of non-apoptotic and apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes according to the annexin V flow cytometry assay. Results are expressed as mean \pm SD per group.

Cell population	Stage	Time post-infection				
		UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Macrophages	NA	98.5 \pm 0.9	62.2 \pm 11.1 [*]	76.5 \pm 6.7 [*]	75.0 \pm 2.0 [*]	89.7 \pm 2.7 [*]
	A	1.5 \pm 0.9	37.8 \pm 11.1 [*]	23.5 \pm 6.7 [*]	25.0 \pm 2.0	10.3 \pm 2.7 [*]
Lymphocytes	NA	99.6 \pm 0.4	71.8 \pm 11.4 [*]	77.4 \pm 11.4 [*]	82.1 \pm 1.4 [*]	95.3 \pm 1.4 [*]
	A	0.4 \pm 0.4	28.3 \pm 11.4 [*]	22.6 \pm 11.4 [*]	17.8 \pm 1.4 [*]	4.7 \pm 1.4 [*]
Granulocytes	NA	98.5 \pm 1.6	69.3 \pm 6.7 [*]	53.6 \pm 12.0 [*]	81.9 \pm 4.3 [*]	20.0 \pm 6.0 [*]
	A	1.5 \pm 1.6	30.7 \pm 6.7 [*]	46.4 \pm 12.0 [*]	18.1 \pm 4.3 [*]	80.0 \pm 6.0 [*]

UC: Uninfected control; N: Non-apoptotic cells; A: Apoptotic cells.

^{*} Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

ected control goats (Zafra et al., 2013). The relative increase in the percentage of peritoneal eosinophils and the decrease of the percentage of macrophages and lymphocytes found during the course of the infection was also reported in *F. hepatica* infected goats at 7–9 dpi (Zafra et al., 2013).

The results presented in this study show that *F. hepatica* infection induces apoptosis of peritoneal leucocytes in sheep from 1 dpi onwards. The annexin V assay is based on phosphatidylserine (PS) emergence on the outer plasma membrane, an early event in apoptosis, PS binds with high affinity to the anticoagulant annexin V that is visualised by fluorescence microscopy or flow cytometry (Serradell et al., 2009). Activated or cleaved caspase-3 has been used as a marker of apoptosis by immunohistochemistry in healthy tissues (Resendes et al., 2004) and in helminth infected tissue sections (Chen et al., 2008; Escamilla et al., 2016). In the UC group, caspase-3 expression and the annexin V assay showed similar results with a low percentage (0.4–1.7%) of apoptotic peritoneal leucocytes. However, at the very early stages of infection (1 dpi) the annexin V assay detected a higher percentage of apoptosis (37.8%, 28.2% and 30.7% for macrophages, lymphocytes and granulocytes, respectively) whereas caspase-3 expression was found only in 1.2% of peritoneal leucocytes. These results suggest that the annexin V assay can detect apoptosis earlier than caspase-3 expression. When the infection progressed (3, 9 and 18), the percentage of apoptotic peritoneal leucocytes detected by caspase-3 and annexin V was similar. In the present study, TEM studies confirmed apoptosis of eosinophils at 18 dpi by the ultrastructural features: cytoplasmic granules with an electron dense core which were similar to that reported in human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006) eosinophils. The condensation and fragmentation of the nucleus with an intact cytoplasmic membrane found in apoptotic eosinophils in this work has also been reported in TEM studies of human (Duffin et al., 2009) and ovine (Balic et al., 2006; Escamilla et al., 2016) eosinophils. Compared to caspase-3 and annexin V, TEM studies were less useful to quantify the percentage of apoptotic leucocytes due to the small amount of sample examined.

It has been reported that excretory secretory products of *F. hepatica* (FhESP) are able to induce apoptosis of rat eosinophils and macrophages *in vitro* (Serradell et al., 2007, 2009; Guasconi et al.,

2012). *In vivo* studies in sheep infected with *F. hepatica* have also revealed apoptosis of eosinophils in hepatic lesions during early stages of infection (9 dpi) and in chronic hepatic lesions (Escamilla et al., 2016). The evaluation of the percentage of leucocytes suffering apoptosis in areas where the migratory larvae of *F. hepatica* are located is necessary to understand the importance of this phenomenon as a modulatory mechanism to avoid the host response against migrating larvae. In a previous study in the liver, 46.1% and 53.9% of eosinophils located in the periphery of necrotic tracts and foci at 8 and 28 dpi, respectively, were apoptotic (Escamilla et al., 2016). Similarly in the present study, a dramatic increase of apoptotic macrophages, lymphocytes and granulocytes were found at 1 dpi with respect to the UC group. These results suggest that *F. hepatica* migratory larvae are able to induce a rapid apoptosis of peritoneal leucocytes which may allow the larvae to migrate through the peritoneum evading the host response.

In summary, the present work is the first report of apoptosis in peritoneal leucocytes during the peritoneal migratory stages of *F. hepatica* infection in sheep *in vivo*. The dramatic increase in apoptotic peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes found at 1 dpi with respect to the UC group suggests that *F. hepatica* migratory larvae are able to induce apoptosis of important percentage of peritoneal effector cells such as macrophages and eosinophils, as well as lymphocytes, allowing the larvae to migrate through the peritoneal cavity evading the host response. The knowledge of apoptotic mechanisms induced by *F. hepatica*, and the parasite molecules involved in apoptosis induction, are important in order to potentially include them in vaccine candidates to improve vaccine efficacy against this parasite.

Acknowledgments

This work was supported by EU grants (H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2015-67023-C2-1-R. The TEM studies were carried out by the Central Research Services (SCAI) of the University of Córdoba.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.015>.

References

- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107–115.
- Chen, K.M., Lee, H.H., Lai, S.C., Hsu, L.S., Wang, C.J., Liu, J.Y., 2008. Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp. Parasitol.* 119, 385–390.
- Chen, X., Li, S., He, L., Wang, X., Liang, P., Chen, W., Bian, M., Ren, M., Lin, J., Liang, C., Xu, J., Wu, Z., Li, X., Huang, Y., Yu, X., 2013. Molecular characterization of severin from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products and its potential anti-apoptotic role in hepatocarcinoma PLC cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (12), e2606.
- Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A., 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199, 221–228.
- Duffin, R., Leitch, A.E., Sheldrake, T.A., Hallett, J.M., Meyer, C., Fox, S., Alessandri, A.L., Martin, M.C., Brady, H.J., Teixeira, M.M., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2009. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. *FEBS Lett.* 583, 2540–2546.
- Escamilla, A., Bautista, M.J., Zafra, R., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martínez-Cruz, S., Méndez, A., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández, V., Pérez, J., 2016. *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 216, 84–88.
- Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359–363.
- Resendes, A.R., Majo, N., Segales, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarias, M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by tunel and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203–213.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., Masih, D.T., 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197–208.
- Serradell, M.C., Guasconi, L., Masih, D.T., 2009. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 95–106.
- Zafra, R., Perez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 94, 602–609.



Short communication

Distribution of Foxp3⁺ T cells in the liver and hepatic lymph nodes of goats and sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*



A. Escamilla^a, R. Zafra^a, J. Pérez^a, T.N. McNeilly^b, I.L. Pacheco^a, L. Buffoni^c,
F.J. Martínez-Moreno^c, V. Molina-Hernández^d, A. Martínez-Moreno^{c,*}

^a Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^b Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik EH26 OPZ, UK

^c Department of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^d School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2016

Received in revised form 20 October 2016

Accepted 22 October 2016

Keywords:

Sheep

Goat

Foxp3

Immunohistochemistry

Fasciola hepatica

ABSTRACT

Foxp3 regulatory T cells (Tregs) are now considered to play a key role in modulation of immune responses during parasitic helminth infections. Immunomodulation is a key factor in *Fasciola hepatica* infection; however, the distribution and role of Foxp3⁺ Tregs cells have not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants. The aim of this study was to evaluate the presence of Foxp3⁺ Tregs in the liver and hepatic lymph nodes from experimentally infected sheep and goats during acute and chronic stages of infection. Three groups of goats (n = 6) and three groups of sheep (n = 6) were used in this study. Goats in groups 1–2 and sheep in groups 4–5 were orally infected with metacercariae of ovine origin. Groups 1 and 4 were killed during the acute stage of the infection, at nine days post infection (dpi); groups 2 and 5 were killed during the chronic stage, at 15 and 19 weeks post infection respectively (wpi). Groups 3 (goats) and 6 (sheep) were left as uninfected controls. Fluke burdens and liver damage were assessed and the avidin–biotin–complex method was used for the immunohistochemical study. At nine dpi in acute hepatic lesions, the number of both Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes increased significantly in goats and sheep. In the chronic stages of infection (15–19 wpi), the number of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes were also significantly increased with respect to control livers, particularly in portal spaces with severely enlarged bile ducts (response to adult flukes) while the increase was lower in granulomas, chronic tracts and smaller portal spaces (response to tissue damage). Foxp3⁺ Tregs were increased in the cortex of hepatic lymph nodes of sheep (chronic infection) and goats (acute and chronic infection). The estimated proportion of T cells which were Foxp3⁺ was significantly increased in the large bile ducts and hepatic lymph node cortex of chronically infected goats but not sheep. This first report of the expansion of Foxp3⁺ Tregs in acute and chronic hepatic lesions in ruminants suggests that these cells may be involved in both parasite survival and modulation of hepatic damage. Future studies should be focused on the investigation of parasite molecules and cytokines involved in this process.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* is an economically important disease of ruminants in temperate climates. *Fasciola hepatica* has developed a variety of mechanisms to modulate or suppress the host response making it ineffective, which allows the parasite to survive in the host for years (Dalton et al., 2013) and became a

serious obstacle in creating protective vaccines for ruminants (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

Several cell types, such as B cells (Bregs), macrophages and T cells (Tregs) can induce immune suppression in helminth infections; however, Foxp3⁺ Tregs are considered the most prominent immunoregulatory cells during infection (Taylor et al., 2012).

Foxp3⁺ regulatory T cells represent a lymphocyte subset with an important role in the maintenance of immune system homeostasis (Belkaid, 2007). They can suppress the immune response to self-antigens and prevent autoimmune diseases, but they can also control the immune responses to parasites and fungi (Adalid-Peralta et al., 2011). Therefore, Tregs have a crucial role in immune responses by limiting immunopathology associated with anti-

* Corresponding author at: Departamento de Sanidad Animal (Parasitología), Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz, km 396, 14014 Córdoba, Spain.

E-mail address: amm@uco.es (A. Martínez-Moreno).

Table 1
Experimental design: groups distribution and infection.

Group	Hosts	n	Infection	Killing	
1	Goat	6	100 mtc	9 dpi	Acute stage
2	Goat	6	200 mtc	15 wpi	Chronic stage
3	Goat	6	–	9 dpi/15 wpi	Uninfected controls
4	Sheep	6	150 mtc	9 dpi	Acute stage
5	Sheep	6	200 mtc	19 wpi	Chronic stage
6	Sheep	6	–	9 dpi/19 wpi	Uninfected controls

All infected animals were infected orally with metacercariae of ovine origin (Ridge-way Research Ltd.), administered in gelatine capsules with a dosing gun. All animals were killed by intravenous injection of T61 (Intervet International GMBH, Unterschleissheim, Germany).

pathogen immune responses, but they can also be beneficial to the pathogen through subversion of the host protective immune response (Belkaid, 2007; Adalid-Peralta et al., 2011).

A variety of helminths (Finney et al., 2007; McNeilly et al., 2013) induce Foxp3⁺ Treg cell expansion to suppress or modulate immune responses allowing them to survive for long periods in the host. Parasite-induced Foxp3⁺ Tregs cells also play a role in controlling immune pathology; thus, in infections with the trematode *Schistosoma mansoni*, the severity of egg-induced liver pathology was negatively correlated with the number of Foxp3⁺ Tregs in the liver (Watanabe et al., 2009).

To date, the distribution and role of Foxp3⁺ Tregs has not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants, although it has been suggested that they may play a role in immunomodulation caused by *F. hepatica* (Dalton et al., 2013). The aim of this study was to evaluate the presence of Foxp3⁺ Tregs in liver and hepatic lymph nodes (HLN) from experimentally infected sheep and goats during acute and chronic stages of infection.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Eighteen six-month-old male Malagueña goats and 18 six-month-old Merino sheep were used in this study. Animals were obtained from a liver fluke-free farm: they were housed indoors and faecal sedimentation tests were conducted to ensure that animals were free of internal parasites. Before the experiment, an ELISA was carried out to detect antibodies specific for *F. hepatica* cathepsin L1, and the results were negative for all animals. Animals were distributed into treatment groups as shown in Table 1. The experiment was approved by the Bioethical Committee of the University of Cordoba (No. 7119 and No. 1118), and it was carried out taking into account European (86/609/CEE) and Spanish (RD 223/1988) directives for animal experimentation.

2.2. Fluke burdens and histopathology

All animals were necropsied, the duodenum was tied proximally and distally to the bile duct (a length of 8–10 cm), the liver was removed and the visceral and diaphragmatic aspects were photographed for gross evaluation. Hepatic lymph nodes (HLN) were weighed and results expressed in g ± standard deviation (SD) per group. Samples were collected from HLN and affected areas of the liver. Four samples were collected from the left liver lobe and one from the right lobe as the left lobe consistently had more lesions, presumably due to its close proximity to the duodenum. All the samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 h and routinely processed and embedded in paraffin wax for histopathology. Four micrometre thick tissue sections were stained with haematoxylin and eosin for histopathology. A quantitative estimation of liver damage was carried out: in the acute stages of infection, the

total number of gross hepatic lesions was counted in each animal using Image Pro- plus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) and results expressed as mean ± SD per group. In the chronic stages of infection, the percentage of affected liver surface was calculated as described previously (Zafra et al., 2013).

In groups 1 and 4 (chronic stages of infection) fluke burdens were assessed. The gallbladder and major biliary ducts were opened and flukes were recovered. Then, the bile ducts were opened and flukes were removed with blunt forceps. Finally, the livers were cut into small pieces (1 cm²) and washed in hot water to collect the remaining flukes.

2.3. Immunohistochemistry

The avidin–biotin–complex method described by Zafra et al. (2013) was used for the immunohistochemical study. Four-µm serial sections were used for CD3 and Foxp3 antibodies. The anti-mouse/rat Foxp3 monoclonal antibody (clone FJK-16s, rat IgG2a, eBioscience Inc. San Diego, CA, USA) diluted 1:100 in PBS containing 10% normal goat serum, and the rabbit anti-human CD3 (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in PBS containing 10% normal goat serum, were applied overnight at 4 °C. The Foxp3 mAb has been shown to cross react with Foxp3 in sections of formalin-fixed sheep tissues (McNeilly et al., 2013). Serial sections were used for Foxp3 and CD3 antibodies. A biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin serum (Dako) diluted 1:200 was applied as the secondary antibody for the CD3 slides, whereas a biotinylated goat anti-rat immunoglobulin (Dako) diluted 1:200 in PBS was applied as the secondary antibody for the Foxp3 slides. The avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories) diluted 1:50 was finally applied and after washed, tissue sections were incubated with NovaREDTM substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA), rinsed in tap water, lightly counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted with DPX (Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Specific primary antibodies were substituted with PBS or non-immune isotype-matched sera as the negative control. Lymph node sections from uninfected goats and sheep were used as positive controls.

2.4. Cell counting

Immunoreactive cells were counted using Image Pro-plus 6.0 software (Media Cybernetics). The software was calibrated for labelling intensity and cell size to include all immunolabelled cells. Photomicrographs (0.16 mm² each) from each animal were used for cell counting. In negative control livers (groups 3 and 6), 10 photomicrographs were selected randomly from portal areas for cell counting. In chronic infection stages (groups 2 and 5), cell counting was carried out to evaluate: (1) response to tissue damage (10 photomicrographs selected randomly from inflammatory infiltrates associated with chronic tracts and granulomas) and (2) response to adult flukes (10 photomicrographs selected randomly from inflammatory infiltrates associated with portal areas with severe bile duct hyperplasia). In early infection stages (groups 1 and 4), 10 photomicrographs randomly selected from damaged areas were used for cell counting. In HLN, 10 photomicrographs randomly selected from cortical areas, and 10 pictures selected from medullary areas, were used for cell counting. CD3⁺ T cells and Foxp3⁺ cells were counted in adjacent areas of serial sections and the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ T cells was estimated from by dividing numbers of Foxp3⁺ cells by the number of CD3⁺ cells in those adjacent serial sections. Results were expressed as mean ± SD per group.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with PRISM 6.0 software (Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was applied to evaluate if data were normally distributed and according to the results, data were analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons tests. Correlations between parasitological, pathological and immunohistochemical data were estimated using the Spearman's rank non-parametric correlation test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Fluke burdens

Goats from group 1 (chronic stages of infection) showed 64, 42, 51, 73, 59 and 42 flukes, respectively (55.4 ± 12.2), whereas sheep from group 4 (chronic stages of infection) showed 57, 40, 54, 58, 41 and 52 flukes, respectively (50.3 ± 7.9). Percentage of implantation was 27.7% and 25.1% in goats and sheep, respectively.

3.2. Gross and histopathological study

3.2.1. Liver

In the early stages of infection (9 dpi), all goats (group 2) and sheep (group 5) showed reddish spots and small tortuous whitish tracts mainly involving the diaphragmatic aspect of the left liver lobe. Quantification of those lesions resulted in mean of 113.4 ± 54.6 in goats and 111.8 ± 35.7 in sheep. Microscopic hepatic changes in the early stages post infection consisted of necrotic foci and tracts within the hepatic parenchyma, often associated with focal haemorrhage, mainly involving subcapsular areas. Inflammatory infiltrates associated with these necrotic areas consisted mainly of eosinophils with fewer lymphocytes and macrophages. Adjacent portal spaces showed severe infiltration of lymphocytes, eosinophils and macrophages. These inflammatory cells migrated from portal areas through hepatic sinusoids to necrotic areas of the hepatic parenchyma.

In the late stages of infection, both goats (group 1) and sheep (group 4) demonstrated scars and tortuous white tracts, particularly involving the left liver lobe. Percentage of affected areas in goats was $36.02 \pm 9.4\%$ and $33 \pm 17.6\%$ in sheep. The gallbladder and major biliary ducts were whitish and enlarged, and they contained brownish fluid admixed with adult flukes. Microscopically, hepatic lesions were composed of marked fibrosis in portal spaces containing large bile ducts and severe infiltration of lymphocytes and plasma cells, either in a diffuse or lymphoid follicle pattern (response to adult flukes, observed within enlarged bile ducts which often showed epithelial erosion). Additionally, chronic tracts with macrophages containing abundant hemosiderin pigment, granulomas with necrotic centres, macrophages and giant multinucleate cells and variable infiltrates of lymphocytes, plasma cells and eosinophils were found in the hepatic parenchyma (response to tissue damage).

3.2.2. Hepatic lymph nodes

In goats weight of HLN was $2.2 \text{ gr} \pm 0.9$, $18.2 \text{ gr} \pm 3.4$ and $1.0 \text{ gr} \pm 0.5$ in groups 1, 2 and 3, respectively. In sheep HLN weight was 1.4 ± 0.3 , 6.3 ± 0.8 and 1.0 ± 0.5 in groups 4, 5 and 6, respectively. Significant HLN weight increase ($P < 0.01$) was found in chronic infection (groups 2 and 5) with respect to negative controls and acute infection in goats and sheep. The histological study revealed that the HLN weight increase in chronic infections was

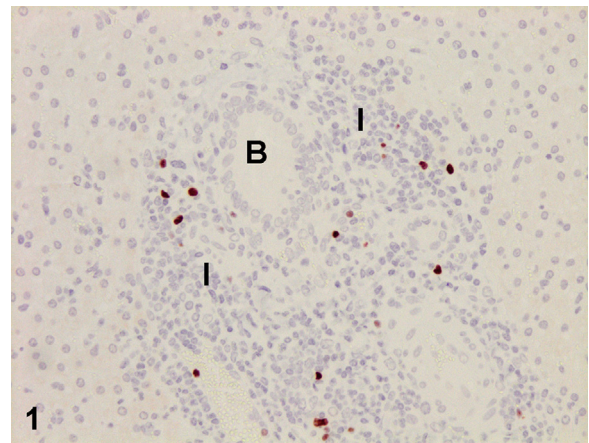


Fig. 1. Acute infection sheep liver showing a portal space with a bile duct (B) surrounded by severe inflammatory infiltrate (I) with several Foxp3⁺ T cells (red-brown colour). ABC method, $\times 200$.

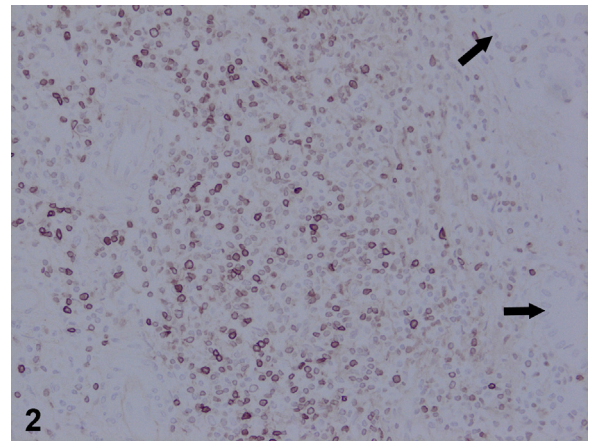


Fig. 2. Chronic infection sheep liver showing severe inflammatory infiltrate surrounding large bile ducts (arrows) showing numerous CD3⁺ T lymphocytes (brown colour). ABC method, $\times 200$.

due to a marked hyperplasia of lymphoid follicles, interfollicular areas and medullary cords.

3.3. CD3 and Foxp3 expression in the liver

Results of cell counting for CD3 and Foxp3 in livers of goats and sheep during acute and chronic infections and negative controls are shown in Table 2. Uninfected control goats and sheep showed occasional CD3⁺ T lymphocytes mainly located in portal areas. Foxp3⁺ cells were also occasionally noted and also located in portal areas. The percentage of Foxp3/CD3⁺ T cells was 20.3% and 18.8% in goats and sheep, respectively (Table 2).

At 9 dpi (acute infection stage), CD3⁺ and Foxp3⁺ T cells were found at the periphery of necrotic foci and adjacent portal spaces (Fig. 1). The number of both Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes increased significantly in goats and sheep with respect to negative controls (Table 2). However, the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ did not show a significant change in either goats ($P = 0.55$) or sheep ($P = 0.48$) with respect to negative controls.

In the chronic stages of infection (15–19 wpi), the number of CD3⁺ T lymphocytes and Foxp3⁺ T cells was significantly increased in both goats and sheep with respect to control livers, particularly in portal spaces with severely enlarged bile ducts (Figs. 2 and 3; location B in Table 2), whereas in granulomas, chronic tracts and smaller portal spaces, the number of CD3⁺ and Foxp3⁺ T cells was

Table 2

Number and percentage of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes in livers of acute and chronic stage of infection, and in uninfected controls. Results expressed as mean ± SD of cells per 0.2 mm² per group.

Group (Species-stage of infection)	Location A			Location B		
	Foxp3	CD3	%Foxp3/CD3 ^a	Foxp3	CD3	%Foxp3/CD3 ^a
1 (goats-AI)	5.5 ± 2.2 ^b	25.4 ± 3.6 ^b	21.8 ± 9.2			
2 (goats-CI)	6.1 ± 2.0 ^b	60.9 ± 11.6 ^b	10.5 ± 3.9 ^b	31.0 ± 5.1 ^{b,c}	123.7 ± 21.1 ^{b,c}	25.1 ± 1.3
3 (goats-UC)	0.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2	20.3 ± 10.0			
4 (sheep-AI)	6.2 ± 2.9 ^b	30.2 ± 4.4 ^b	19.9 ± 7.4			
5 (sheep-CI)	6.8 ± 2.8 ^b	52.9 ± 15.1 ^b	12.8 ± 3.9	30.8 ± 6.0 ^{b,c}	129.2 ± 19.3 ^{b,c}	24.1 ± 4.6
6 (sheep-UC)	0.6 ± 0.3	3.2 ± 0.5	18.8 ± 8.1			

Location A: Uninfected control (UC): randomly selected portal areas. Acute infection (AI): portal areas, necrotic foci. Chronic infection (CI): portal areas, granulomas and chronic tracts.

Location B: Chronic infection: Periphery of enlarged bile ducts. This location is studied only in the chronic stage of the infection, when adult liver flukes are in the bile ducts and marked histopathological alterations occurred in the surrounding tissue.

^a Estimated percentage of CD3⁺T cells which are Foxp3.

^b Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

^c Significant difference ($P < 0.05$) respect to the acute infection stages.

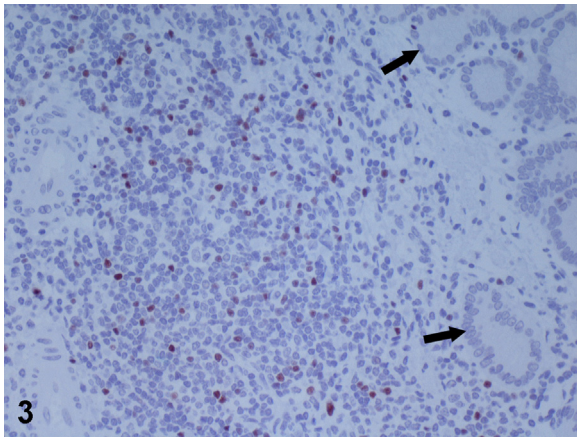


Fig. 3. Serial section of that shown in Fig. 3, showing numerous Foxp3⁺ T cells in the inflammatory infiltrate surrounding bile ducts (arrows). ABC method, ×200.

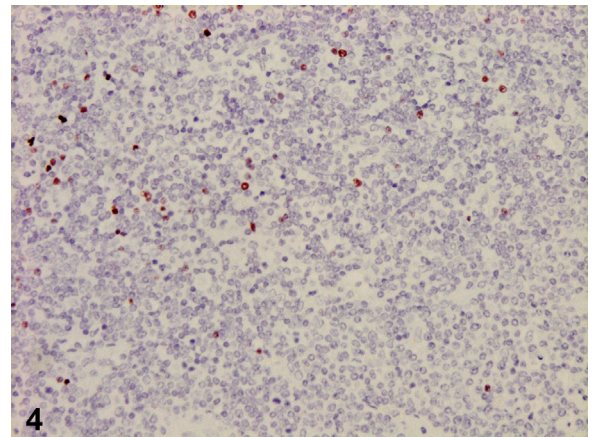


Fig. 4. Negative control goat hepatic lymph node showing moderate number of Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, ×200.

also increased with respect to negative controls but lower than in the vicinity of enlarged bile ducts (Location A in Table 2). The percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ T cells in areas of tissue damage in goats was significantly reduced with respect to both the negative controls and acute infections, while it did not change significantly in sheep. In areas of response to adult flukes (periphery of enlarged bile ducts), the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ was not significantly modified with respect to uninfected controls.

There was no statistical correlation between number of Foxp3⁺ T cells and fluke burden or gross pathology in any of the studied groups.

3.3.1. Hepatic lymph nodes

Results of cell counting for CD3⁺ and Foxp3⁺ in HLN of goats and sheep during acute and chronic stages of infection and in negative controls are shown in Table 3. Uninfected control goats and sheep showed abundant infiltrates of CD3⁺ T lymphocytes and Foxp3⁺ T cells in the cortex, particularly in interfollicular areas (Fig. 4), whereas the number of both cell populations was lower in the medulla (medullary cords and medullary sinuses).

During acute infections, CD3⁺ T lymphocytes were significantly increased with respect to negative controls in sheep and goats (cortex) and sheep (medulla) (Table 3). Foxp3⁺ T cells were mainly found in interfollicular areas of the cortex (Fig. 5). The number of Foxp3⁺ T cells and ratio Foxp3⁺/CD3⁺ increased significantly only in the cortex of acutely infected goats with respect to negative controls (Table 3). The number of Foxp3⁺ Tregs and the ratio of

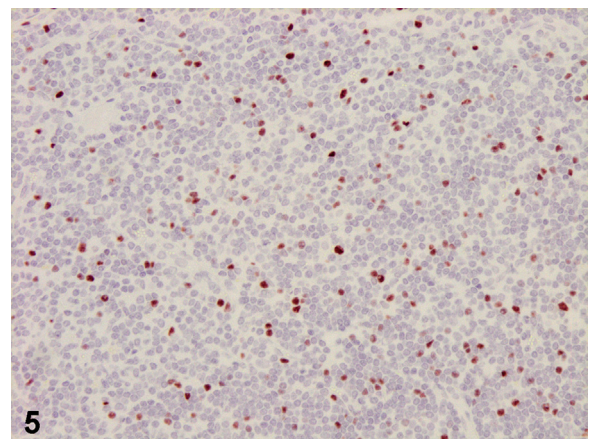


Fig. 5. Acute infection goat hepatic lymph node showing numerous Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, ×200.

Foxp3⁺/CD3⁺ in the medulla were very similar in negative controls and acutely infected goats and sheep (Table 3).

During chronic infections, the number of CD3⁺ T cells was significantly increased in the cortex and medulla of goats and sheep with respect to negative controls (Table 3). Foxp3⁺ were mainly found in interfollicular areas of cortex (Fig. 6), where a significant increase was found in chronically infected goats and sheep with respect to uninfected controls. The percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ did not change

Table 3
Number and percentage of Foxp3⁺ and CD3⁺ T lymphocytes in hepatic lymph nodes of acute and chronic stage of infection and negative controls goats and sheep. Results expressed as mean ± SD per group.

Group (Species-stage of infection)	Cortex			Medulla		
	Foxp3	CD3	%Foxp3/CD3	Foxp3	CD3	%Foxp3/CD3
1 (goats-AI)	46.0 ± 5.3 ^a	299.0 ± 15.8 ^b	15.4 ± 1.8 ^a	7.6 ± 1.5	107.0 ± 6.1	7.1 ± 1.1
2 (goats-CI)	45.4 ± 16.3 ^a	389.8 ± 18.2 ^a	11.7 ± 5.9	8.0 ± 2.1	117.1 ± 4.6 ^a	6.8 ± 1.0
3 (goats-UC)	22.2 ± 4.3	287.6 ± 3.3	9.5 ± 2.3	7.3 ± 0.9	94.2 ± 3.7	7.7 ± 1.2
4 (sheep-AI)	22.6 ± 3.0	303.7 ± 37.8 ^a	7.4 ± 1.4	8.4 ± 3.3	122.2 ± 16.8 ^a	6.9 ± 2.3
5 (sheep-CI)	36.3 ± 6.9 ^{a,b}	392.9 ± 6.3 ^{a,b}	9.2 ± 2.6	9.7 ± 3.1	115.2 ± 6.7 ^a	8.4 ± 2.1
6 (sheep-UC)	21.0 ± 6.6	246.0 ± 18.4	8.9 ± 4.1	7.6 ± 1.5	82.8 ± 6.5	9.2 ± 1.5

AI: acute infection (9 days post-infection, dpi); CI: chronic infection (15–19 weeks post-infection, wpi); UC: uninfected controls.

^a Significant difference ($P < 0.05$) compared to the uninfected control group.

^b Significant difference ($P < 0.05$) respect to the chronic infection stage.

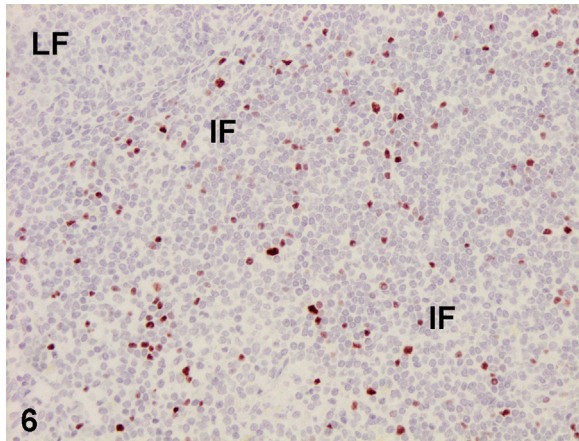


Fig. 6. Chronic infection goat hepatic lymph node showing a lymphoid follicle (LF) and interfollicular areas (IF) containing numerous Foxp3⁺ T cells (brown-red colour) in interfollicular (IF) areas. ABC method, ×200.

significantly with respect to the uninfected controls in the cortex and medulla of either goats or sheep (Table 3).

4. Discussion

Chronic parasitic infections are facilitated by the modulation and/or suppression of the host immune response caused by these parasites, and Foxp3⁺ T cells are the main cell population mediating such modulation of the host immune response (Adalid-Peralta et al., 2011; Taylor et al., 2012). While *F. hepatica* has shown a potent capacity to modulate the host immune response (Dalton et al., 2013), the distribution of Foxp3⁺ T cells has not been investigated in *F. hepatica* infected cattle or sheep.

In the present study, we have found a significant increase of Foxp3⁺ T cells in the hepatic lesions of both goats and sheep, in the acute and the chronic stages of the infection. This increase of Foxp3⁺ T cells was generally correlated to an increase in the number of CD3⁺ T cells, so the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ cells did not change. The increase in the total number of Foxp3⁺ T cells without modification of the Foxp3⁺/CD3⁺ percentage has been described in different parasitic infections in sheep, as in *Psoroptes ovis* infection (McNeilly et al., 2010) and *Teladorsagia circumcincta* infection (McNeilly et al., 2013). In our work, it is noteworthy the differences between the total number of Foxp3⁺ cells in different stages and locations of the infection, with the higher number of cells found in correlation with the presence of adult flukes in the bile ducts (chronic stage).

The rapid expansion of Foxp3⁺ T cells in the acute phase of the infection (9 dpi) seems to be related to the larval migration in the hepatic parenchyma, since most of those cells were found around

necrotic foci and tracts and in the adjacent portal spaces. However, no correlation was found between number of Foxp3⁺ T cells and the number of necrotic lesions. The early presence of Foxp3⁺ T cells in the initial stages of parasitic infections has been shown in gastrointestinal nematode mouse model (Finney et al., 2007) and it has been explained as an immunomodulatory mechanisms facilitating the survival of the parasite. In sheep, McNeilly et al. (2013) described an increase of Foxp3⁺ T cells at 10 dpi in the abomasal mucosa of sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*, that may reflect a homeostatic regulatory mechanism within the abomasal cellular immune response to minimize immune-mediated abomasal pathology. Our data suggest Foxp3⁺ T cells may play a role in modulating the initial host immune response, contributing to the survival of *F. hepatica* during the migratory stage. However, further studies are required to clarify the relationship between the initial Foxp3⁺ T cells expansion and the inability of the immune effector mechanisms to kill the newly excysted juveniles of *F. hepatica* in the early peritoneal and hepatic migration, as occurred in the protective responses observed in the *F. gigantica* sheep model (Piedrafita et al., 2007).

In the chronic hepatic lesions, the increase of Foxp3⁺ T cells was more pronounced in the inflammatory infiltrates adjacent to large bile ducts than in the periphery of granulomas, chronic tracts and small portal areas. Since the adult parasites in these stage are located within the bile ducts and gallbladder, it seems that Foxp3⁺ T cells are specifically recruited to the vicinity of *F. hepatica* adults or are actively induced by the adult parasites and this may be related to the chronicity of the infection and the long survival of the parasite in the host (Escamilla et al., 2016).

A dual role has been described for Foxp3⁺ T cells in hepatic helminth infections: minimising tissue pathology and modulating the host immune response to facilitate parasite survival, as reported in the case of *Schistosoma japonicum* infection in mice (Zhou et al., 2015). In the present study, the different proportion of Foxp3⁺ T cells in the periphery of granulomas and chronic tracts compared to those of large bile ducts and the lack of correlation between Foxp3⁺ T cells and fluke burden or gross pathology may also suggest this dual role for these cells in *F. hepatica* infections. The evaluation of cytokines such as IL-10 and TGF-β produced by Foxp3⁺ T cells in each of these hepatic lesions is of foremost interest to elucidate this point.

The number of Foxp3⁺ T cells was also significantly increased in the cortex of the HLN, as well as the number of CD3⁺ T lymphocytes in both the cortex and the medulla. This data agrees with the increase of Foxp3⁺ T cells in mesenteric lymph nodes found in helminth infected mice (Smith et al., 2016). Some differences were observed between sheep and goats, since goats showed higher number of Foxp3⁺ cells in both the acute and the chronic stages, with a significant elevation of the percentage of Foxp3⁺/CD3⁺ in the acute phase of the infection. However, we found no correlation between this higher number of Foxp3⁺ T cells in HLN in goats and any other parasitological or pathological data. Sheep and goats

seems to have a different immune mechanism in response to gastrointestinal nematodes (Hoste et al., 2010), but no such difference seems to appear in the case of *F. hepatica* infection.

In conclusion, this is the first report describing the distribution of Foxp3⁺ T cells in acute and chronic hepatic lesions and HLN of *F. hepatica* infected goats and sheep. The expansion of Tregs in acute and chronic hepatic lesions may be involved in parasite survival as well as in minimising tissue pathology. Future studies should focus on the investigation of parasite molecules, particularly from newly excysted juveniles, involved in the expansion of Foxp3⁺ T cells, as well as the cytokines produced by this cell type in the different hepatic lesions to elucidate their roles in *F. hepatica* infection.

Acknowledgments

This work was supported by EU grant (H2020-635408-PARAGONE) and the Spanish Ministry of Science grant AGL2015-67023-C2-1-R. TM receives funding from the Scottish Government.

References

- Adalid-Peralta, L., Fragoso, G., Fleury, A., Scitutto, E., 2011. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1412–1426.
- Belkaid, Y., 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev.* 7, 875–888.
- Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272–285.
- Escamilla, A., Bautista, M.J., Zafra, R., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martínez-Cruz, S., Méndez, A., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández, V., Pérez, J., 2016. *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 216, 84–88.
- Finney, C.A., Taylor, M.D., Wilson, M.S., Maizels, R.M., 2007. Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37, 1874–1886.
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol.* 26 (8), 376–381.
- McNeilly, T.N., McIntyre, J., Frew, D., Griffiths, D.J., Wattedegera, S.R., van den Broek, A., Huntley, J.F., 2010. Infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite, results in recruitment of Foxp3⁺ T cells into the dermis. *Parasite Immunol.* 32, 361–369.
- McNeilly, T.N., Rocchi, M., Bartley, Y., Brown, J.K., Frew, D., Longhi, C., McLean, L., McIntyre, J., Nisbet, A.J., Wattedegera, S., Huntley, J.F., Matthews, J.B., 2013. Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Vet. Res.* 44, 70.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101–111.
- Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N., Spithill, T.W., 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* 75, 1954–1963.
- Smith, K.A., Filbey, K.J., Reynolds, L.A., Hewitson, J.P., Harcus, Y., Boon, L., Sparwasser, T., Hämmerling, G., Maizels, R.M., 2016. Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunol.* 9, 428–443.
- Taylor, M.D., van der Werf, N., Maizels, R.M., 2012. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181–189.
- Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915–927.
- Watanabe, K., Carter, J.M., Neely-Burnam, M., Colley, D.G., 2009. Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunol.* 31, 440–446.
- Zafra, R., Pérez-Ecija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 148, 373–384.
- Zhou, S., Jin, X., Chen, X., Zhu, J., Xu, Z., Wang, X., Liu, F., Hu, W., Zhou, L., Su, C., 2015. Heat Shock Protein 60 in eggs specifically induces Tregs and reduces liver immunopathology in mice with *Schistosomiasis japonica*. *PLoS One* 10 (9), e0139133.