Caracterización de la microbiota intestinal de bovinos raza Holstein parasitados por *Fasciola* spp. en Cundinamarca y Boyacá, Colombia.

Angie Lorena Ramírez Hernández

Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Bogotá D.C, Colombia
2021

Caracterización de la microbiota intestinal de bovinos raza Holstein parasitados por *Fasciola* spp. en Cundinamarca y Boyacá, Colombia.

Angie Lorena Ramírez Hernández

Tesis presentada como requisito para obtener el título de:

Bióloga

Director

Juan David Ramírez González (PhD).

Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Universidad del Rosario
Bogotá D.C, Colombia
2021

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE BOVINOS RAZA HOLSTEIN PARASITADOS POR *Fasciola* spp. EN CUNDINAMARCA Y BOYACÁ, COLOMBIA.

Angie L. Ramírez[1], Diego García[2], Martin Pulido[2], Julio Cesar Giraldo[3], Giovanny Herrera[1], Marina Muñoz[1], Lissa Cruz-Saavedra1, Juan David Ramírez[1]

[1] Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología –UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia
[2] Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Bogotá, Colombia.
[3] Universidad INCCA de Colombia, Bogotá, Colombia

RESUMEN

La identificación de alteraciones en la composición de la microbiota intestinal asociada a la presencia de parásitos ha sido un foco de atención de investigaciones por su importancia en procesos fisiológicos y de productividad animal. Dentro del campo de las relaciones hospedero-parásito, muchos estudios han sugerido que los helmintos pueden incidir sobre la composición microbiana debido a su efecto inmunomodulador. La fascioliasis bovina es una helmintiasis ampliamente estudiada en el campo de la inmunología, pero con poca información en el campo de la investigación de interacciones hospedero-helminto, por lo que se desconoce su impacto sobre las comunidades microbianas. Por esta razón, este estudio se dirige a describir la composición de la microbiota intestinal de bovinos Holstein parasitados por *Fasciola* provenientes del altiplano cundiboyacense colombiano, a través de un enfoque de secuenciación de nueva generación de amplicones de los genes ARNr-16S para procariotas y ARNr-18S para eucariotas. Para esto, se recolectaron 65 muestras fecales de bovinos Holstein provenientes de plantas de beneficio animal. Encontramos reducción en la abundancia relativa de Bacteroidetes y Ascomycota en las muestras de bovinos infectadas con el parásito, así como disminución en abundancia relativa de taxones comensales asociados a procesos de fermentación y digestión. Adicionalmente, se encontraron correlaciones positivas entre microorganismos que presentaron reducciones en abundancias relativas en las muestras positivas para *Fasciola*, lo cual se asoció a pérdida de peso consistente con el fenotipo de un bovino infectado por este parásito. Por lo anterior, se concluyó que la infección por *Fasciola* disminuye la capacidad de digerir material vegetal como consecuencia de la reducción en la abundancia de taxones encargados de esta función. Estos hallazgos proveen una base para futuras investigaciones sobre el desarrollo de tratamientos dirigidos a la modulación de estas poblaciones microbianas implicadas en la infección.

PALABRAS CLAVE

Fasciola, microbiota intestinal, bovinos.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal en especies de interés veterinario ha sido foco de atención de investigaciones por estar implicada en procesos fisiológicos tales como la nutrición, salud y productividad animal (Durso *et al*., 2010). En bovinos, los microorganismos presentes a nivel gastrointestinal son responsables de la degradación de celulosa y producción de ácidos grasos volátiles como acetato, butirato y propionato; los cuales contribuyen a más del 70% de energía en el animal (Holman *et al*., 2019; Jami & Mizrahi., 2012). De esta manera, la conservación de poblaciones microbianas comensales es de vital importancia para el mantenimiento de un estado de homeostasis del individuo. No obstante, la estructura microbiana puede verse alterada por factores intrínsecos y extrínsecos. Dentro de estos, la dieta, la genética del hospedero, la edad, el estado de salud e infecciones previas pueden llegar a modular la composición microbiana (Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez., 2019). Adicionalmente, recientes investigaciones sugieren que los helmintos también pueden alterar la composición de la microbiota intestinal por su efecto inmunomodulador (Partida *et al.,* 2017; Cortés *et al.,* 2020a; Jenkins *et al.,* 2018). Por esta razón, la atención de la comunidad científica se ha centrado al entendimiento de los factores que pueden alterar las poblaciones microbianas y en particular, en los mecanismos por los cuales los helmintos interactúan con la microbiota intestinal (Cortés *et al.,* 2020a).

No obstante, la mayoría de estudios se han enfocado en hospederos humanos y modelos murinos, lo cual ha dejado de lado especies de interés veterinario en las que se reporta gran cantidad de helmintiasis. Por ejemplo, pese a la importancia económica de los rumiantes, a la fecha únicamente se tiene conocimiento de cuatro estudios en los cuales se ha evaluado el impacto de helmintos gastrointestinales en la composición de la microbiota (Li *et al*., 2011; Li *et al.,* 2016., El-Ashram *et al*., 2017; Cortés *et al.,* 2020b); cada uno dirigido a diferentes hospederos y parásitos. Esto, sumado a la falta de consenso sobre la fuente de muestra del animal y el tipo de técnica empleada para la evaluación de la microbiota, dificulta la comparación de resultados entre estudios. Asimismo, todas las investigaciones se han centrado en el papel de helmintos intestinales, descuidando el efecto de helmintos extra intestinales que, como parte de un mismo sistema, interactúan afectando el funcionamiento entre ellos (Cortés *et al.,* 2019b; Cortés *et al.,* 2020a).

La fascioliasis bovina es una enfermedad veterinaria responsable de grandes pérdidas económicas por su alta prevalencia a nivel mundial (Palacios *et al.,* 2019). Es causada por helmintos del género *Fasciola*, los cuales viven y se reproducen sexualmente en los conductos biliares de mamíferos, generalmente bovinos (Shaimaa *et al*., 2018; Marcilla *et*

al., 2002). Así, los daños producidos en estos animales corresponden principalmente a lesiones en el parénquima hepático (Cañete *et al.,* 2014) que generan disminución de peso, anemia, fertilidad reducida, deficiencia de hasta el 15% en la producción de leche y menor capacidad de trabajo en los bovinos infectados (Sierra *et al.,* 2018; Mahami *et al.,* 2011). Además, es responsable de altos costos en tratamientos antihelmínticos y pérdidas por decomiso de hígados en plantas de beneficio animal (Molina-Hernández *et al.,* 2015; Molloy *et al.,* 2005; Palacios *et al.,* 2019).

En Colombia se estiman pérdidas anuales por fascioliasis bovina de más de US$ 12.483 en las regiones de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Santander (Pereira et al., 2020; Becerra, 2001; Orrego *et al.,* 2006). Adicionalmente, algunos estudios apuntan a que las regiones ganaderas de clima frío como Boyacá y Cundinamarca son endémicas para la enfermedad por ser lugares que favorecen el ciclo de vida del parásito (Pinilla et al., 2019). De esta manera, Giraldo-Forero y colaboradores (2016) reportan una seroprevalencia de fascioliasis bovina de 39.4% en Cundinamarca, mientras Pereira y colaboradores (2020) apuntan a una frecuencia de infección del 23% en la región de Boyacá; siendo entonces un helminto con altas implicaciones económicas y veterinarias para estos departamentos. Sin embargo, pese a ser un parásito de gran interés, las investigaciones en *Fasciola* se han centrado en su capacidad inmunomoduladora, por lo que se desconocen las implicaciones sobre otros componentes del sistema hospedero-helminto, particularmente la microbiota intestinal. Por esta razón y atendiendo a la necesidad de identificar predictores de los efectos y consecuencias para la salud del hospedero bovino (Ajibola *et al*., 2019), el presente estudio tuvo como objetivo describir la composición de la microbiota intestinal de bovinos Holstein parasitados por *Fasciola* spp. en el altiplano cundiboyacense colombiano a través de un enfoque de secuenciación de amplicones del ARNr-16S y -18S. Así, planteamos la hipótesis que la microbiota intestinal de bovinos puede ser alterada como consecuencia de la infección por *Fasciola*; de esta manera, no solo se producirían afectaciones a nivel de la salud bovina por daño hepático, sino también por perturbaciones en la microbiota intestinal.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras e identificación de Fasciola

Para el presente estudio se emplearon un total de 65 muestras fecales de bovinos de raza Holstein provenientes de plantas de beneficio animal localizadas en el altiplano cundiboyacense colombiano. Inicialmente, se revisó la presencia de adultos o huevos de *Fasciola* en contenido biliar *in situ*. Luego, se tomaron muestras fecales y de suero sanguíneo las cuales fueron transportadas al laboratorio del Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ) de la Universidad Pedagógica y

Tecnológica de Colombia (UPTC) para los respectivos análisis parasitológicos. Dichos análisis consistieron en el diagnóstico microscópico de huevos de *Fasciola* en materia fecal, así como la identificación de otros helmintos y/o protozoarios que pudiesen encontrarse en coinfección con *Fasciola* (Tabla S1). Adicionalmente, con el fin de confirmar la exposición al parásito en las muestras a analizar, se realizó una ELISA *in house* con antígeno propio a partir de las muestras de suero sanguíneo. De esta manera, se consideraron positivas las muestras en las cuales se demostró la presencia de la forma adulta y/o huevos del parásito en contenido biliar, heces o en su defecto, los positivos para IgG en ELISA (Salimi et al., 2005). Así pues, se emplearon 30 muestras positivas y 35 negativas para el análisis por estado de infección (Tabla S1). Finalmente, una vez realizados los análisis parasitológicos y serológicos, las muestras fecales fueron enviadas a las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Universidad del Rosario, donde fueron almacenadas en etanol al 70% a -30°C hasta la extracción de ADN.

2.2. Extracción de ADN y preparación de las librerías

El ADN genómico fue extraído de las 65 muestras fecales usando el *Stool DNA isolation Kit* (Norgen, Biotek Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN extraído se evaluó haciendo uso del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000; mientras que la calidad e integridad se evaluó a partir de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para las muestras a analizar, se tomaron como parámetros mínimos: concentración de ADN de al menos 30 ng/uL y calidad por radio 260/280 de 1.7-2. Posteriormente, se generaron amplicones de la región hipervariable V4 de los genes del ARNr-16S y -18S usando los primers 515F-806R (Liu *et al.,* 2020) y 528F-706R (Bozorov *et al.,* 2019) para los cuales se generaron fragmentos de 150 pb y 350 pb, respectivamente. Los ciclos de PCR se realizaron con el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 98°C por 1 min seguida de 30 ciclos de denaturación a 98°C por 10s, alineamiento a 50°C por 30s, extensión a 72°C durante 60s y extensión final a 72°C por 5 min. Estos productos de PCR fueron enviados a secuenciación por Illumina MiSeq paired-end hasta alcanzar una profundidad cruda mínima de 30.000 lecturas por muestra.

2.3. *Asignación taxonómica y análisis bioinformático*

Se realizó un control de calidad de la secuenciación obtenida haciendo uso de FASTQC y MULTIQC (Wingett & Andrews., 2018; Ewels *et al.,* 2016). En el mismo sentido, se usaron curvas de rarefacción para corroborar que la profundidad de secuenciación fuese suficiente para abarcar la diversidad microbiana en cada muestra (Fig. S1 y S2). Posteriormente, las lecturas de secuenciación de Illumina demultiplexadas de extremo emparejado se importaron a DADA2 (Callahan *et al.,* 2016) donde se generó una tabla de

variantes de amplicones (ASVs), un término análogo a las unidades taxonómicas operaciones (OTU), donde cada variante de secuencia se considera única incluso si difiere con otra por un solo nucleótido (Callahan *et al.,* 2017). Luego, se hicieron las asignaciones taxonómicas a partir de las ASVs encontradas, haciendo uso de las bases de datos SILVA v136 (Balvočiūtė & Huson., 2017) y Protist Ribosomal Reference database (PR2) v4.12.0 para el análisis de las secuencias del 16S y 18S (Guillou *et al.,* 2012), respectivamente. Adicionalmente, se emplearon bases de datos construidas *in house* a partir de secuencias representativas de cada marcador molecular registrado en GenBank para hacer la asignación taxonómica de secuencias no identificadas por SILVA y PR2. Una vez realizadas las asignaciones taxonómicas, las secuencias se analizaron desde el pipeline de DADA2 en Rstudio (paquetes Phyloseq y Vegan) donde se hicieron los análisis de diversidad alfa y beta (McMurdie & Holmes., 2013). Tras la construcción del objeto Phyloseq en Rstudio, se generó una tabla con las ASVs asignadas a nemátodos por SILVA, PR2 y BLAST con las respectivas abundancias relativas. De esta manera, se consideraron positivas para coinfecciones por nemátodos las muestras en las que se identificó la presencia de ADN del parásito con una abundancia relativa de al menos 10% respecto al total de reads. Finalmente, se generó un análisis de correlaciones entre ASVs correspondientes géneros bacterianos y ASVs pertenecientes a géneros eucariotas de acuerdo al estado de infección.

2.4. Análisis estadístico

Se empleó un análisis no supervisado de coordenadas principales (PCoA) basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis para agrupar las muestras por estado de infección. Adicionalmente, se investigó la asociación entre la composición de la microbiota y el estado de infección mediante un análisis multivariado de la covarianza (MANCOVA) utilizando matrices de distancia (Adonis) en Rstudio. Los análisis de diversidad alfa se evaluaron a partir de los índices de diversidad de Shannon, Simpson y la riqueza observada a partir de las ASVs obtenidas por muestra. Para las comparaciones por abundancias relativas de taxones pertenecientes a la microbiota intestinal entre estados de infección, se empleó la Prueba U de Mann-Whitney. En cuanto al análisis de correlaciones, dado que se realizaron comparaciones múltiples, se empleó una corrección de Benjamini-Hochberg a fin de reducir la tasa de errores de tipo I o falsos positivos. La significancia empleada para todas las pruebas estadísticas fue de 0,05.

3. **RESULTADOS**

3.1. Procesamiento de las lecturas

Se identificó un total de 49.570 ASVs usando secuenciación de última generación sobre el amplicón del gen del ARNr-16S desde el ADN extraído de las muestras fecales de los bovinos estudiados. Estas ASVs fueron asignadas a 382 géneros bacterianos y 4

géneros de Archaeas correspondientes a Methanobrevibacter, Candidatus Methanogranum, Methanocorpusculum, Methanosphaera. En cuanto a las muestras amplificadas para el gen del ARNr-18S, se obtuvieron 4.802 ASVs las cuales se filtraron considerando taxones que carecían de sentido biológico para el estudio (Tabla. S2). De esta manera, se emplearon 3555 ASVs para el análisis en Rstudio. Luego, se generaron curvas de rarefacción para cada marcador molecular, las cuales mostraron que la profundidad de secuenciación fue suficiente para evidenciar la diversidad tanto de comunidades procariotas como eucariotas (Fig. S1 y Fig. S2).

3.2. Abundancias relativas de procariotas por estado de infección.

Los phyla Firmicutes (52.1%), Bacteroidetes (21%) y Actinobacteria (12.9%) fueron los más abundantes en todas las muestras (Fig. 1A), seguidos de Proteobacteria (6.1%), Euryarchaeota (2.68%), Patescibacteria (1.8%) y Cyanobacteria (0.5%). Para cada uno de ellos, se evaluaron diferencias estadísticas por estado de infección, encontrando que sólo el phylum Bacteroidetes presentaba reducciones significativas en las muestras de bovinos infectados por el parásito (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,0266). A un nivel taxonómico inferior, se generó un heatmap con las familias más representativas del phylum Bacteroidetes (Fig. 2A) a fin de determinar dónde se estaban presentando estos cambios. Encontramos que las familias más abundantes dentro de este phylum correspondían a Bacteroidaceae, Rikenellaceae, Muribaculaceae y Prevotellaceae; sin embargo, en los bovinos infectados por *Fasciola,* se encontró menor proporción de Bacteroidaceae (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,04716) y Rikenellaceae (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,03639) comparado con los bovinos no infectados por *Fasciola*. Asimismo, evaluamos cambios a nivel de abundancias relativas para el phylum Firmicutes. En este, comparamos las ASVs correspondientes a las familias más abundantes entre estados de infección. Encontramos que Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae y Carnobacteriaceae eran las familias con las abundancias relativas más altas para ambos grupos de infección (Fig. S3); sin embargo, solo en estas dos últimas se encontraron diferencias estadísticamente significativas con reducción en el caso de Carnobacteriaceae (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value = 0,04138) y aumento para el caso de Peptostreptococcaceae (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value = 0,009438) en el grupo de bovinos infectados. Finalmente, llamó la atención un incremento en la abundancia relativa de las ASVs pertenecientes al phylum Proteobacteria de algunas muestras del grupo de bovinos colonizados por *Fasciola* (Fig. 1A) que, respecto a los bovinos no infectados, no era estadísticamente significativo (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,1817). Además, este patrón no se presentaba en todas las muestras positivas, por lo cual realizamos un boxplot contrastando el método de identificación empleado (Fig. S4). Encontramos diferencias estadísticamente significativas en la

abundancia de Proteobacteria entre muestras positivas en las que se pudo evidenciar la presencia del parásito por observación (estadio adulto y/o huevos) y ELISA (*p*-value: 0,00561).

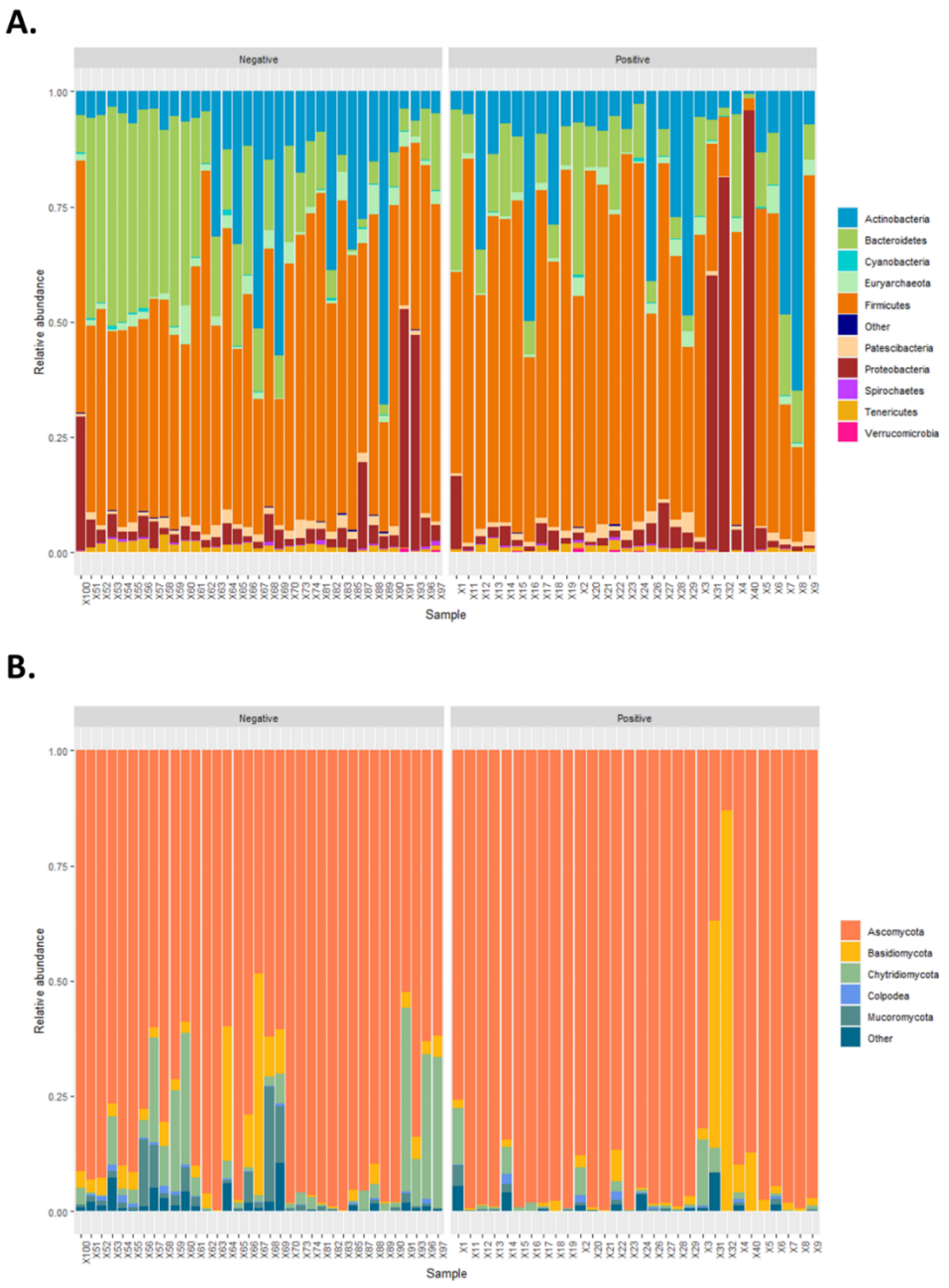

Fig. 1. Abundancias relativas de los phyla procariotas (A) y las clases de eucariotas (B) más representativos de la microbiota intestinal de bovinos sanos e infectados por *Fasciola*. Para el 16S, la categoría "otros" contuvo los phyla Acidobacteriota, Campilobacteriota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcota, Dependentiae, Desulfobacteroidota, Elusimicrobiota, Fibrocateriota, Fusobacteriota, Gemmatimonadota, Halabacterota, Myxococcota, Nitrospirota, Synergistota, Thermoplasmatota; mientras para el caso del 18S se incluyeron las clases Apusomonadidae, Bicoecaea,

Bastocladiomycota, Breviatea, Chlorophyta, Choanoflagellatea, Coccidiomorphea, Colpodea, Colpodellidea, Colponemea, Cryptomycota, Dictyochophyceae, Euglenozoa, Filosa, Gregarinomorphea, Heterolobosea, Hyphochytriomyceta, Ichthyosporea, Jakobida, Labyrinthulomycetes, Litostomatea, Lobosa, Mucoromycota, Mycetozoa, Nassophorea, Nemátoda, Oligohymenophorea, Oomycota, Opalinata, Palmophyllophyceae, Plathelmintes, Spirotrichea, Syndiniales, Tubulinea, Variosea y Zoopagomycota.

Posteriormente, comparamos las muestras por estado de infección en términos de diversidad a partir de la riqueza observada y los índices de Shannon y Simpson (Fig. 2B). El análisis identificó reducciones estadísticamente significativas en riqueza (índice de Shannon *p*-value: 0,00014) y dominancia (índice de Simpson *p*-value: 0,00085) de microorganismos procariotas pertenecientes al grupo de bovinos infectados por *Fasciola.* Este patrón posiblemente asociado a la disminución encontrada a nivel de miembros microbianos pertenecientes a los phyla Bacteroidetes y Firmicutes.

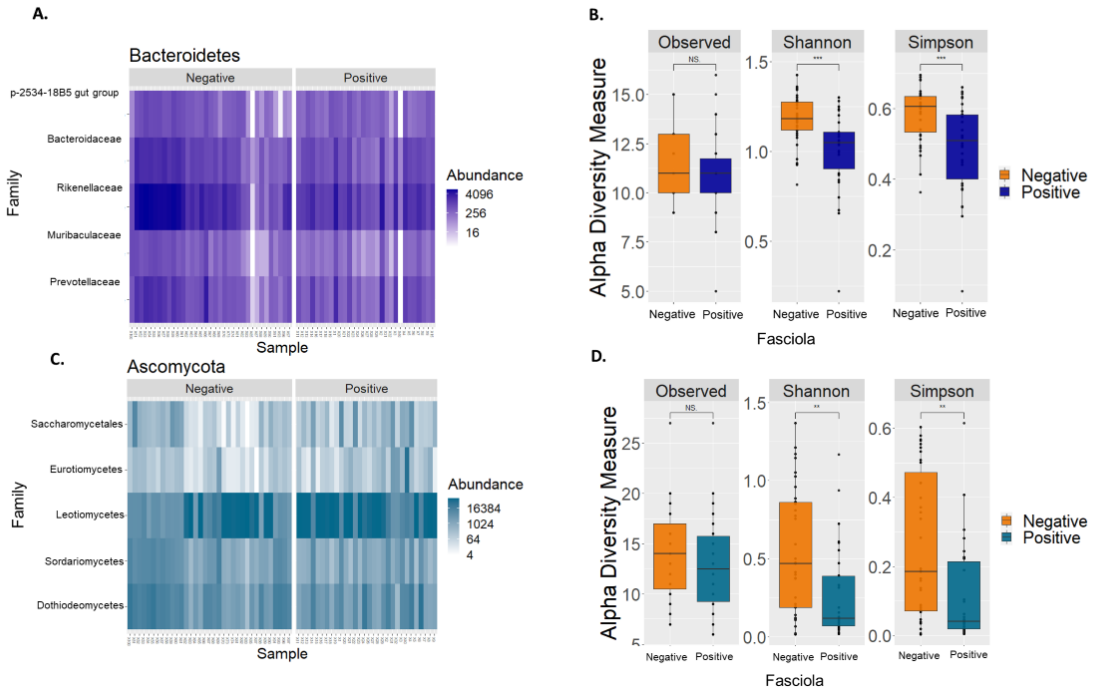

Fig. 2. Heatmap de abundancias relativas a nivel de Familia para el phylum Bacteroidetes (A) y para la clase Ascomycota (C) entre bovinos infectados por *Fasciola* y bovinos sanos y (B) diagrama de caja para índices de diversidad de Shannon, Simpson y Observada para procariotas (B) y eucariotas (D) que distinguen entre bovinos sanos e infectados por *Fasciola*.

3.3. Abundancias relativas de eucariotas por estado de infección.

El análisis de abundancias relativas mostró que la mayor proporción detectada correspondía a la división Ascomycota (25.9%) seguida de Basidiomycota (10.3%), Chytridiomycota (2-8%), Colpodea (2.1%) y Mucoromycota (1.4%) (Fig. 1B). Sin embargo, sólo en Ascomycota se observó cambios estadísticamente significativos, con reducción en el grupo de bovinos parasitados por *Fasciola* (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,01007). Por esta razón, comparamos las abundancias entre estados de infección para las cinco familias más representativas de esta clase. Dichas familias correspondieron a Leotiomycetes, Dothideomycetes, Sordariomycetes, Saccharomycetes y Eurotiomycetes (Fig. 2C), donde en todas ellas se estaba dando una reducción estadísticamente significativa a excepción de Leotiomycetes, donde se observó incremento en el estado infectado (Fig. 2C). Posteriormente realizamos comparaciones en abundancias relativas para grupos taxonómicos que se encontraban en menor proporción entre grupos de infección. De esta manera, se identificaron 28 ASVs correspondientes a las clases protozoarias Acantharea, Choanoflagellatea, Coccidiomorphea, Colponemea, Euglenozoa y Lobosa. Asimismo, se recuperaron 4 ASVs asignadas a *Ostertagia ostertagi, Diplogasteroides sp, Monhystera paludícola* y *Punctodora ratzeburgensis* (Tabla S1). Finalmente, en términos de diversidad, se observó que el grupo de bovinos infectados por *Fasciola* presentaba reducción en riqueza y dominancia de miembros microbianos eucariotas (Fig. 2D) tomando como referencia los índices de diversidad de Shannon (test de Mann-Whitney-Wilcoxon*, p*-value = 0,001548) y Simpson (test de Mann-Whitney-Wilcoxon*, p*-value = 0,002852).

3.4. Análisis de diversidad beta por estados de infección

Se obtuvieron perfiles de la microbiota fecal de bovinos, los cuales fueron agrupados por estado de infección haciendo uso de un PCoA en el que no se observaron agrupaciones claras para el caso de microorganismos identificados por el ARNr-16S (MANCOVA *p-value*: 0,796., Fig. 3A). No obstante, para el caso del ARNr-18S se obtuvo una agrupación estadísticamente significativa (MANCOVA *p*-value: 0,021., Fig. 3B) denotando clasificación de los individuos por estado de infección para el caso de eucariotas.

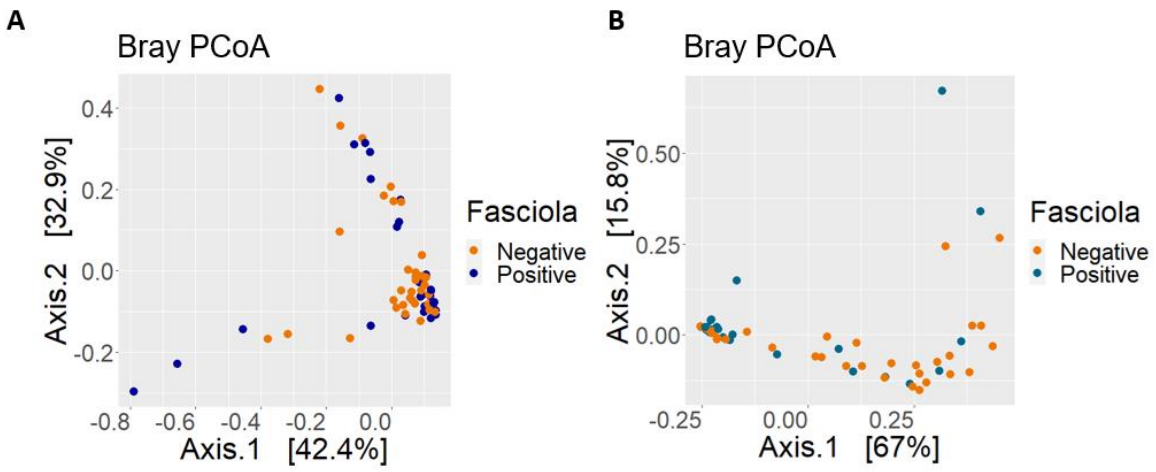

Fig. 3 Análisis de coordenadas principales por distancia de Bray-Curtis de las comunidades microbianas de bovinos sanos e infectados por *Fasciola*. PCoA para análisis de comunidades microbianas procariotas (A). PCoA para análisis de comunidades microbianas eucariotas (B).

3.5. Análisis de correlaciones

Se observaron asociaciones positivas y negativas tanto en las muestras de bovinos negativos como positivos para *Fasciola*; sin embargo, se obtuvo un mayor número de asociaciones bajo la presencia del parásito. En estos últimos, se relacionaron de forma positiva *Aquamonas* y *Coriochaeta, Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* y *Sakaguchia*, Lachnospiraceae y *Aureobasidium*, Lachnospiraceae y *Sakaguchia*. Asimismo, se encontraron correlaciones negativas entre *Eubacterium* y *Talaromyces*, *Ruminococcus* y *Aspergillus* y *Paeniclostridium* y *Debaryomyces* (Fig. 4A). Por otra parte, para las muestras de bovinos no infectados por *Fasciola*, se observó una correlación negativa entre *Mogibacterium* y *Apiospora*, *Ascochyta, Leptosphaeria, Pichia, Plectosphaerella, Sarocladium* y *Talaromyces*; mientras una correlación de tipo positiva entre *Veillonella* y *Ceuthospora* (Fig. 4B).

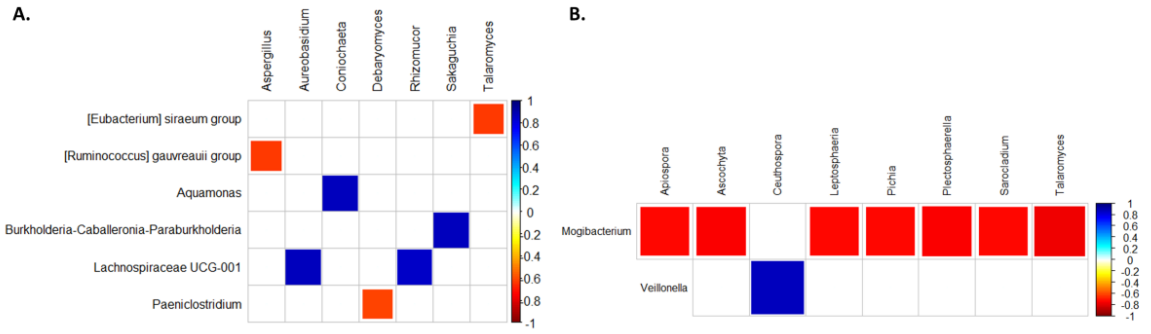

Fig. 4. Análisis de correlaciones entre miembros procariotas y eucariotas de la microbiota intestinal bovina por estados de infección. Bovinos infectados por *Fasciola* (A), bovinos sanos (B).

4. DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa el efecto de un helminto hepático sobre la diversidad y abundancia microbiana intestinal bovina. Esto es importante considerando las implicaciones económicas y veterinarias que tienen enfermedades helmínticas como la fascioliasis (Sierra *et al.,* 2018; Palacio *et al.,* 2019). Además, la identificación de las comunidades microbianas que pueden ser moduladas como consecuencia de la infección por *Fasciola* puede ampliar el panorama en el conocimiento sobre el rol de estos microorganismos sobre el sistema inmune del hospedero, siendo así un paso en el desarrollo de estrategias frente a esta helmintiasis (Cortés *et al*., 2020a; Cortés *et al.,* 2019a). Para ello, este estudio se dirigió a caracterizar la microbiota intestinal de bovinos Holstein parasitados por *Fasciola* spp. y buscar potenciales correlaciones entre microorganismos, a fin de dilucidar interacciones entre ellos bajo diferentes estados de infección. Los resultados revelaron cambios a nivel de abundancias relativas de grupos microbianos comensales en las muestras de bovinos infectados con *Fasciola,* los cuales fueron consistentes con investigaciones realizadas en escenarios de infección por helmintos tanto en humanos como en rumiantes (Houlden *et al.,* 2015; El-Ashram *et al.,* 2017). De esta forma, aunque para estos últimos se ha evaluado la microbiota de compartimientos específicos en el tracto gastrointestinal; los cambios composicionales son concordantes con lo observado en el presente estudio (Li *et al*., 2011; Li *et al.,* 2016).

Inicialmente, llamó la atención un incremento en la abundancia relativa del phylum Proteobacteria de algunas muestras bovinas positivas para *Fasciola* (Fig. 1A y Fig. 1B). Tras el análisis por método de identificación, nuestros resultados sugieren que el estadio de infección por *Fasciola* podría llegar a tener implicaciones sobre estos grupos microbianos (Fig. S4). Sin embargo, se revisó si otros factores podrían llegar a incidir sobre estas observaciones. La presencia de coinfecciones, especialmente por parásitos intestinales, ha demostrado ser responsable de cambios en la composición microbiana a nivel intestinal (Cortés *et al.,* 2020a). No obstante, los cambios a nivel de abundancias relativas no fueron consistentes con las muestras en las que se encontró ADN correspondiente a otros nemátodos (Fig. 1A y Tabla S1), lo cual sugiere que esta variable no explica directamente la reducción o incremento de ciertos taxones microbianos. Sin embargo, considerando que los métodos de detección para otros nemátodos se enfocaron en la identificación de huevos por análisis coprológico y/o por secuenciación del ADN del parásito por Illumina, es posible que no se tratara de infecciones activas. Por lo tanto, futuras investigaciones deberían considerar la detección de infecciones activas a partir de diversos métodos de identificación y considerando la complejidad del ciclo de vida de cada parásito para determinar si estas alteraciones son concordantes con los hallazgos acá reportados.

Al igual que otras investigaciones encontramos que los grupos taxonómicos más representativos de la microbiota intestinal bovina fueron Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria (Fig. 1A) (Jami *et al.,* 2012; Durso *et al.,* 2010). Del primer phylum, los taxones dominantes fueron Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae y Carnobacteriaceae (Fig. S3) los cuales desempeñan un papel importante en la fermentación ruminal, así como en otros procesos asociados a la digestión. Sin embargo, estos presentaron reducciones en las muestras con la infección por *Fasciola* lo cual sugiere una pérdida en la capacidad de fermentación ruminal asociada a la función de estos microorganismos (Uchiyama *et al.,* 2020; Cortés *et al.,* 2019a). Posteriormente, se evaluó el phylum Bacteroidetes, dentro del cual gran cantidad de miembros están asociados a actividad amilolítica, crítica en los procesos de degradación de material vegetal (Li *et al.,* 2011). En este, encontramos reducciones en la abundancia relativa de las muestras de bovinos infectados por el parásito (Fig. 2A); patrón que había sido reportado previamente en infecciones helmínticas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Xu y colaboradores (2018), el grupo de individuos infectados por *Clonorchis sinensis* presentaba disminución en la abundancia relativa de grupos bacterianos como Bacteroidetes y Tenericutes los cuales fueron asociados a alteraciones en la segregación de ácidos biliares como consecuencia de la presencia de este parásito hepático.

Posteriormente, se identificaron las familias con mayor abundancia pertenecientes al phylum Bacteroidetes (Fig. 2A). En estas, observamos reducciones estadísticamente significativas en la abundancia relativa de Rikenellaceae (*p*-value: 0.03639) y Bacteroidaceae (*p*-value: 0.04716) en el grupo de bovinos infectados por *Fasciola*. Lo anterior sugiere que estos bovinos presentan una menor capacidad de producir ácidos grasos volátiles, así como menor aptitud para degradar mucinas; funciones comensales asociadas a Bacteroidaceae y Rikenellaceae, respectivamente (Koh *et al.,* 2016; Fan *et al.,* 2020). Lo anterior es relevante considerando que esta reducción en bacterias degradadoras de mucinas favorece el incremento en las concentraciones de estas proteinas en el intestino, lo cual es un mecanismo que favorece la expulsión del parásito al impedir su adhesión al epitelio intestinal (Jenkins *et al.,* 2018 Theodoropoulos *et al.,* 2001; *Cancela et al.,* 2015). De hecho, ya ha sido reportado previamente en ratones infectados con *Echinostoma trivolvis*, donde la alta producción de mucinas jugó un papel clave en el mantenimiento de la función intestinal al impedir la persistencia del parásito en el hospedero (Frujino *et al.,* 1998). Esto sugiere que, pese a no ser un helminto intestinal, *Fasciola* también activa una respuesta a nivel intestinal en el hospedero para la protección de la monocapa de los enterocitos.

Respecto a otros grupos taxonómicos, llamó la atención que Euryarchaeota se encontraba como uno de los phylum con abundancias relativas más altas (Fig. 1B).

Algunos miembros de este grupo se han relacionado a la producción de CH4 en el rumen a partir de sustratos derivados de la fermentación de materia orgánica (Martínez-Álvaro *et al.,* 2020). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre estados de infección. En contraste, un estudio realizado por Li y colaboradores (2016) reportó disminución en la abundancia de Euryarchaeota bajo la infección por *Haemonchus contortus* en cabras; mientras que en humanos poliparasitados se reporta incrementos en este phylum (Gordon *et al.,* 2020), por lo cual es posible que los cambios observados en esencia sean dependientes del hospedero y de la especie de parásito que infecta (Martínez-Álvaro *et al.,* 2020).

Debido a que una gran cantidad de factores tanto intrínsecos como extrínsecos al animal pueden llegar a impactar la composición y estructura de su microbiota intestinal, evaluamos cambios a nivel de abundancia relativa de procariotas y eucariotas asociados a variables sociodemográficas (departamento, municipio, fuente de agua). En general, no se observó ningún patrón que indicara que alguna de estas variables estuviesen generando un cambio composicional o de abundancias relativas en la microbiota intestinal bovina (Tabla S1 y Fig. 1A-1B). Lo anterior, posiblemente asociado a que el muestreo se realizó en bovinos con condiciones geográficas así como con fin zootécnico similar. Sin embargo, cabe mencionar que en las muestras positivas se observó mayor frecuencia de coinfecciones, identificadas por análisis coprológicos, que en las muestras negativas (Tabla. S1), lo cual podría sugerir que los bovinos infectados por *Fasciola* presentan mayor susceptibilidad a la colonización por otros parásitos y uno de los mecanismos por el cual esto podría producirse es a través de la interrupción en el equilibrio microbiano a nivel intestinal (Reynolds *et al.,* 2015; Partida *et al.,* 2017). Sin embargo, esto debe ser corroborado en investigaciones a futuro por diversos métodos de detección.

Posteriormente calculamos la riqueza observada y los índices de Shannon y Simpson a fin de determinar si se estaban generando cambios en la diversidad bacteriana entre las muestras evaluadas (Fig. 2B). A nivel de composición de la microbiota intestinal bovina, encontramos diferencias significativas en términos de índice de Shannon (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,0001471) y Simpson (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, *p*-value: 0,0008523). Estos hallazgos van en concordancia con la investigación realizada por Houlden y colaboradores en 2015, donde se produjo una reducción en la abundancia de varios géneros pertenecientes al phylum Bacteroidetes como resultado de una infección por *Trichuris muris*, lo cual da como resultado una disminución general de la diversidad microbiana en el tracto gastrointestinal de ratones infectados. En este mismo sentido, en este estudio también encontramos disminución en la abundancia relativa de Bacteroidetes, un phylum con alta prevalencia a nivel intestinal, que comprende miles de especies con diferencias funcionales que les permiten ocupar diversos nichos a nivel

gastrointestinal (Johnson *et al.,* 2017). Sin embargo, debido a que se están produciendo reducciones bajo el estado de infección por *Fasciola*, es posible que se esté perdiendo gran cantidad de comunidades microbianas que incrementan la diversidad y favorecen la producción energética del animal en un estado sano.

Las poblaciones de hongos a nivel intestinal destacan por su alta capacidad para degradar material vegetal por ser excretores de enzimas con actividad celulolítica, hemicelulolítica, glucolítica y proteolítica (Li *et al.,* 2011). Atendiendo a su importancia, revisamos posibles cambios en abundancias relativas como consecuencia de la infección por *Fasciola*. En general, el análisis a nivel de división mostró que la mayor proporción detectada correspondía a poblaciones de hongos donde Ascomycota, Basidiomycota y Chytridiomycota fueron las más representativas (Fig.1B). Sin embargo, bajo el estado de infección por *Fasciola*, sólo en Ascomycota (*p*-value: 0,01007) se observó una disminución estadísticamente significativa. Dentro de esta, las cinco familias más abundantes presentaban reducciones estadísticamente significativas (Fig. 2C) a excepción de Leotiomycetes, donde se observó incremento en el estado infectado. Para este último grupo se desconoce el mecanismo que explique su presencia a nivel gastrointestinal. Sin embargo, es una familia de hongos saprófitos y endófitos de plantas y suelo razón por la cual es posible que sean parte de microorganismos transitorios que fueron ingeridos por estos animales como parte de su dieta (Zhang & Wang., 2015).

Al igual que para el análisis del ARNr-16S, calculamos la riqueza observada y los índices de Shannon y Simpson para las comunidades de eucariotas a fin de determinar si se estaban generando alteraciones a nivel microbiano entre las muestras evaluadas (Fig. 2D). Observamos una reducción estadísticamente significativa en la diversidad microbiana evaluada desde el índice de Shannon (*p*-value: 0,001548) y Simpson (*p*-value: 0,002852) posiblemente asociada a una disminución general en miembros microbianos pertenecientes a Ascomycota, lo cual genera pérdidas en diversidad en los bovinos infectados por *Fasciola*. Sin embargo, dado que hay pocos estudios que consideren la diversidad de eucariotas, este resultado debería ser evaluado en investigaciones futuras. En cuanto a la composición de las comunidades microbianas entre estados de infección (diversidad beta); encontramos agrupaciones que, pese a no ser observables, se presentaban como significativas desde el análisis estadístico con MANCOVA. Lo anterior sugiere que el estado de infección por *Fasciola* explica las agrupaciones para microorganismos eucariotas (*p*-value: 0,021) pero no para procariotas (*p*-value: 0,796). Esto posiblemente asociado a que las comunidades procariotas son más abundantes y estables en la microbiota intestinal, mientras los eucariotas están en menor proporción. En este sentido, cambios en la estructura microbiana eucariota impactan en mayor magnitud respecto a un estado sano. Teniendo en cuenta que la mayoría de lecturas aquí

encontradas para los eucariotas correspondían a la clase Ascomycota, la cual presentó reducciones estadísticamente significativas en un estado infectado; hipotetizamos que esta pérdida de grupos microbianos podría estar permitiendo el incremento en abundancia o incluso el establecimiento de otras comunidades microbianas que se diferencian en estructura microbiana de un estado sano.

Las comunidades microbianas procariotas del tracto gastrointestinal bovino han sido estudiadas ampliamente como parte fundamental para la salud animal. Ahora bien, como parte de un mismo sistema fisiológico, las interacciones entre microorganismos son necesarias para el mantenimiento homeostático en el huésped, de manera que la modulación de uno puede impactar en la estructura y composición del otro (Mao *et al.,* 2015). En el presente estudio encontramos cambios en la diversidad y abundancia microbiana como consecuencia de la infección por *Fasciola*. Por esta razón, evaluamos correlaciones entre microorganismos eucariotas y procariotas en las muestras de acuerdo al estado de infección. Inicialmente, se observó mayor número de interacciones entre microorganismos de la microbiota de bovinos infectados por *Fasciola* (Fig. 4A) que aquellas observadas en muestras de bovinos sanos (Fig. 4B). Dentro del grupo de bovinos no infectados, la gran cantidad de correlaciones con hongos reportados previamente como comensales sugiere características asociadas a mejor capacidad de digestibilidad de fibras vegetales en estos bovinos (Nagpal *et al.,* 2011). No obstante, en algunos casos, no es claro el rol de ciertos microorganismos a nivel intestinal. Por ejemplo, el género *Mogibacterium* es considerado comensal por algunos autores por estar involucrado en procesos de asimilación de amoniaco y su posterior transformación en fenilacetato, un precursor de la fenilalanina (McGovern *et al.,* 2020). Sin embargo, otros estudios han encontrado correlaciones negativas entre la abundancia de miembros de este grupo y el índice de masa corporal en humanos (Oki *et al.,* 2016); por lo cual no es clara su función. Teniendo en cuenta lo anterior y considerando los hallazgos de este estudio, es posible que el aumento en abundancia de *Mogibacterium* no esté relacionado a un rol comensal sino más bien podría tener un efecto deletéreo. Sin embargo, para comprender mejor el papel de estos microorganismos a nivel intestinal se hacen necesarias más investigaciones. Por su parte, hasta nuestro conocimiento, actualmente no hay un consenso sobre el rol y en algunos casos, la presencia de *Apiospora*, *Ascochyta, Leptosphaeria, Pichia, Plectosphaerella*, *Sarocladium* en la microbiota intestinal bovina. Sin embargo, la mayoría de ellos han sido reportados como fitopatógenos (Li *et al.,* 2017; Nameth *et al.,* 1990; Zhang *et al.,* 2019) por lo que se necesitan investigaciones que confirmen su papel a nivel gastrointestinal. Finalmente, *Veillonella* es un género procariota relacionado a la fermentación de lactato, siendo muy importante para la producción de ácidos grasos volátiles que serán empleados en los procesos energéticos del animal (Nagaraja & Titgemeyer., 2007); mientras que, hasta nuestro conocimiento,

este es el primer estudio que reporta la presencia de *Ceuthospora* y la correlación con un género bacteriano, razón por la cual aún no se sabe su función a nivel gastrointestinal. Sin embargo, por el tipo de correlación acá encontrada con un género comensal, hipotetizamos que este también debería estar involucrado en procesos que favorecen el procesamiento de material vegetal.

Por otra parte, las correlaciones encontradas en el grupo de bovinos infectados (Fig. 4A) dan cuenta principalmente de géneros comensales y algunos productores de micotoxinas. También presentan características propias de menor capacidad para digerir fibra vegetal y pérdida de peso consistente con el fenotipo de un bovino infectado por *Fasciola*. Dentro de las correlaciones entre comunidades eucariotas y procariotas, destacaron dos géneros: *Ruminococcus*, género de bacterias gram positivas consideradas importantes en procesos de degradación de almidón y producción de acetato formiato y succinato a partir de celulosa en el rumen (Flint *et al.,* 2008; Tao *et al.,* 2017; Chassard *et al.,* 2012; Liu *et al.,* 2015). Por su parte, *Aspergillus* es un género de hongos en el que se ha identificado la capacidad de producir micotoxinas necesarias para inmunosuprimir a su hospedero y de esta manera, mejorar su infectividad degenerando en enfermedades como la aspergilosis bovina (Seyedmousavi *et al.,* 2015; Niyo *et al.,* 1988). Así pues, la correlación negativa encontrada entre *Ruminococcus* y *Aspergillus* en el presente estudio es congruente con lo reportado en investigaciones previas donde posiblemente las ASVs asignadas a *Aspergillus* presentan propiedades patogénicas.

También llamó la atención la correlación positiva entre *Aureobasidium* y Lachnospiraceae (Fig. 4A) puesto que ambos han sido relacionados a procesos de digestión ruminal y producción de ácidos grasos volátiles, respectivamente. Por ejemplo, según un estudio realizado por Freitas y colaboradores (2020), *Aureobasidium* podría estar directamente relacionado al incremento de peso en bovinos por estar involucrado en la producción de sustancias que mejoran la digestión. Por su parte, Lachnospiraceae es un constituyente normal de la microbiota intestinal bovina, involucrado en procesos antiinflamatorios y producción de ácidos grasos volátiles a partir de polisacáridos que, como consecuencia de una infección helmíntica puede alterar su abundancia relativa (Uchiyama *et al.,* 2020; Kim *et al*., 2019). Este es el caso del presente estudio, en el que encontramos reducción significativa de miembros de este género como consecuencia de la infección por *Fasciola* (Fig. 4A) lo que sugiere que, por el tipo de correlación positiva que tiene con *Aureobasidium* (un potencial probiótico), la disminución de miembros con estas funciones podría ser una de las razones por las cuales se observa reducción de peso en los bovinos con fascioliasis.

CONCLUSIONES

Hasta donde sabemos este es el primer estudio que evalúa el efecto de un helminto no intestinal sobre la composición y abundancia microbiana en bovinos. Nuestro análisis mostró que en las muestras de bovinos infectados por *Fasciola* se produjo una reducción en la diversidad de microorganismos tanto procariotas como eucariotas. Asimismo, observamos una disminución en taxones comensales asociados a procesos de fermentación y digestión, lo cual es consistente con el fenotipo de pérdida de peso observado en individuos con fascioliasis. No obstante, las correlaciones no evidencian necesariamente causa-efecto, de manera que investigaciones a futuro pueden aclarar el rol de ciertos microorganismos a nivel gastrointestinal como potenciales biomarcadores de estado en el hospedero. Sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que la fascioliasis bovina no solo afecta la salud de su hospedero por daño hepático, sino también por alteraciones a nivel de la microbiota intestinal que no habían sido consideradas previamente. No obstante, este es un estudio descriptivo del microbioma intestinal de bovinos infectados por lo cual es posible que el ADN identificado no necesariamente esté activo a nivel intestinal. Adicionalmente, es posible que estos cambios puedan estar sujetos a factores externos aquí no evaluados, lo cual resalta la necesidad de replicabilidad. Además, las implicaciones de infecciones parasitarias no intestinales sobre especies de interés veterinario es un campo poco explorado por lo que es posible que los hallazgos encontrados en *Fasciola* sean dependientes de cada sistema hospedero-helminto, razón por la cual se destaca la necesidad de generar más estudios que corroboren estas observaciones. Sin embargo, la exploración en la composición de la microbiota y su rol en la biología de parásitos no intestinales como *Fasciola* es de gran importancia en el desarrollo de nuevas estrategias de intervención frente a las helmintiasis. Dichas estrategias principalmente basadas en la modulación de microorganismos involucrados en el establecimiento del parásito o en la respuesta inmune del hospedero. Por esta razón, este estudio es un primer paso en el desarrollo de investigaciones sobre las implicaciones de la fascioliasis bovina a nivel de otros órganos en el hospedero.

REFERENCIAS

Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT—how do these taxonomies compare?. *BMC genomics*, *18*(2), 1-8.

Bozorov, T. A., Rasulov, B. A., & Zhang, D. (2019). Characterization of the gut microbiota of invasive Agrilus mali Matsumara (Coleoptera: Buprestidae) using high-

throughput sequencing: uncovering plant cell-wall degrading bacteria. *Scientific reports*, *9*(1), 1-12.

Cancela, M., Santos, G. B., Carmona, C., Ferreira, H. B., TORT, J. F., & Zaha, A. (2015). Fasciola hepatica mucin-encoding gene: expression, variability and its potential relevance in host–parasite relationship. *Parasitology*, *142*(14), 1673-1681.

Castillo-Lopez, E., & Domínguez-Ordóñez, M. G. (2019). Factors affecting the ruminal microbial composition and methods to determine microbial protein yield. Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 10(1)

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, *13*(7), 581-583.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, *11*(12), 2639-2643.

Chassard C., Delmas E., Robert C., Lawson P. A., Bernalier-Donadille A. (2012). *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 138–143. 10.1099/ijs.0.027375-0

Cortés, A., Peachey, L. E., Jenkins, T. P., Scotti, R., & Cantacessi, C. (2019a). *Helminths and microbes within the vertebrate gut – not all studies are created equal. Parasitology, 1–25.* doi:10.1017/s003118201900088x

Cortés, A., Peachey, L., Scotti, R., Jenkins, T. P., & Cantacessi, C. (2019b). Helminth-microbiota cross-talk – a journey through the vertebrate digestive system. Molecular and Biochemical Parasitology, 111222. doi:10.1016/j.molbiopara.2019.111222

Cortés, A., Rooney, J., Bartley, D. J., Nisbet, A. J., & Cantacessi, C. (2020a). Helminths, hosts, and their microbiota: new avenues for managing gastrointestinal helminthiases in ruminants. *Expert Review of Anti-infective Therapy*.

Cortés, A., Wills, J., Su, X., Hewitt, R. E., Robertson, J., Scotti, R., ... & Powell, J. J. (2020b). Infection with the sheep gastrointestinal nematode Teladorsagia circumcincta increases luminal pathobionts. Microbiome, 8, 1-15.

Durso, L. M., Harhay, G. P., Smith, T. P., Bono, J. L., DeSantis, T. Z., Harhay, D. M., ... & Clawson, M. L. (2010). Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and environmental microbiology*, *76*(14), 4858-4862.

El-Ashram, S., Al Nasr, I., Abouhajer, F., El-Kemary, M., Huang, G., Dinçel, G., ... & Suo, X. (2017). Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of Haemonchus contortus infection. Veterinary research communications, 41(4), 263-277.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single repor| 11111111vcc t. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047-3048.

Fan, P., Bian, B., Teng, L., Nelson, C. D., Driver, J., Elzo, M. A., & Jeong, K. C. (2020). Host genetic effects upon the early gut microbiota in a bovine model with graduated spectrum of genetic variation. The ISME journal, 14(1), 302-317.

Freitas, A., David, D., Takagaki, B., & Roesch, L. F. W. (2020). Microbial Patterns in Rumen Are Associated with Gain of Weight in Beef Cattle.

Gordon, C. A., Krause, L., McManus, D. P., Morrison, M., Weerakoon, K. G., Connor, M. C., ... & Gobert, G. N. (2020). Helminths, polyparasitism, and the gut microbiome in the Philippines. *International Journal for Parasitology*.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., ... & Christen, R. (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D597-D604.

Houlden, A., Hayes, K. S., Bancroft, A. J., Worthington, J. J., Wang, P., Grencis, R. K., & Roberts, I. S. (2015). Chronic Trichuris muris infection in C57BL/6 mice causes significant changes in host microbiota and metabolome: effects reversed by pathogen clearance. *PloS one*, *10*(5), e0125945.

Holman, D. B., & Gzyl, K. E. (2019). A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. *FEMS microbiology ecology*, *95*(6), fiz072.

Jami, E., & Mizrahi, I. (2012). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. PLoS ONE, 7(3), e33306. doi:10.1371/journal.pone.0033306

Jenkins, T. P., Peachey, L. E., Ajami, N. J., MacDonald, A. S., Hsieh, M. H., Brindley, P. J., ... & Rinaldi, G. (2018). Schistosoma mansoni infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. Scientific reports, 8(1), 1-10.

Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A., & Ley, R. E. (2017). Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, *95*(1), 1-8.

Kim, J. Y., Kim, E. M., Yi, M. H., Lee, J., Lee, S., Hwang, Y., ... & Yong, T. S. (2019). Chinese liver fluke Clonorchis sinensis infection changes the gut microbiome and increases probiotic Lactobacillus in mice. *Parasitology research*, *118*(2), 693-699.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. Cell, 165(6), 1332–1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041

Li, R. W., Wu, S., Li, W., Huang, Y., & Gasbarre, L. C. (2011). Metagenome plasticity of the bovine abomasal microbiota in immune animals in response to Ostertagia ostertagi infection. PloS one, 6(9), e24417.

Li, R. W., Li, W., Sun, J., Yu, P., Baldwin, R. L., & Urban, J. F. (2016). The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. Scientific reports, 6(1), 1-10.

Li, Y., Ruperao, P., Batley, J., Edwards, D., Davidson, J., Hobson, K., & Sutton, T. (2017). Genome analysis identified novel candidate genes for ascochyta blight resistance in chickpea using whole genome re-sequencing data. *Frontiers in plant science*, *8*, 359.

Liu, J. H., Bian, G. R., Zhu, W. Y., & Mao, S. Y. (2015). High-grain feeding causes strong shifts in ruminal epithelial bacterial community and expression of Toll-like receptor genes in goats. *Frontiers in microbiology*, *6*, 167.

Liu, P. Y., Wu, W. K., Chen, C. C., Panyod, S., Sheen, L. Y., & Wu, M. S. (2020). Evaluation of Compatibility of 16S rRNA V3V4 and V4 Amplicon Libraries for Clinical Microbiome Profiling. *bioRxiv*.

Martínez-Álvaro, M., Auffret, M. D., Stewart, R. D., Dewhurst, R. J., Duthie, C. A., Rooke, J. A., ... & Roehe, R. (2020). Identification of complex rumen microbiome interaction within diverse functional niches as mechanisms affecting the variation of methane emissions in bovine. *Frontiers in microbiology*, *11*, 659

Mahami-Oskouei, M., Dalimi, A., Forouzandeh-Moghadam, M., y Rokni, M. (2011). Identificación molecular y diferenciación de aislados de *Fasciola* mediante el método PCR-RFLP basado en el espaciador transcrito interno (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2). Revista iraní de parasitología, 6 (3), 35–42.

Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O'Neill, S. M., ... & Cwiklinski, K. (2015). Fasciola hepatica vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary parasitology*, *208*(1-2), 101-111.

Molloy, J. B., Anderson, G. R., Fletcher, T. I., Landmann, J., & Knight, B. C. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Fasciola hepatica and Fasciola gigantica in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary parasitology*, *130*(3-4), 207-212.

McGovern, E., McGee, M., Byrne, C. J., Kenny, D. A., Kelly, A. K., & Waters, S. M. (2020). Investigation into the effect of divergent feed efficiency phenotype on the bovine rumen microbiota across diet and breed. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-11.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, *8*(4), e61217.

Nagaraja, T. G., & Titgemeyer, E. C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of dairy science*, *90*, E17-E38.

Nagpal, R., Puniya, A. K., Sehgal, J. P., & Singh, K. (2011). *In vitro fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. Mycoscience, 52(1), 31–38.* doi:10.1007/s10267-010-0071-6

Nameth, S. T., Shane, W. W., & Stier, J. C. (1990). Development of a monoclonal antibody for detection of Leptosphaeria korrae, the causal agent of necrotic ringspot disease of turfgrass. *Phytopathology*, *80*(11), 1208-1211.

Niyo, K. A., Richard, J. L., Niyo, Y., & Tiffany, L. H. (1988). Effects of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of Aspergillus fumigatus conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic, serum biochemical, and pathologic changes in rabbits. *American journal of veterinary research*, *49*(10), 1766-1773.

Oki, K., Toyama, M., Banno, T., Chonan, O., Benno, Y., & Watanabe, K. (2016). Comprehensive analysis of the fecal microbiota of healthy Japanese adults reveals a new bacterial lineage associated with a phenotype characterized by a high frequency of bowel movements and a lean body type. *BMC microbiology*, *16*(1), 284.

Orrego, V. E. E., Gómez, M. G., & Trujillo, L. E. V. (2006). La higiene del ganado y la fasciolosis bovina, Medellín y Rionegro, 1914-1970. Iatreia, 19(4), 393-407.

Palacios, D., Bertot, J. A., Beltrao, M., Vázquez, Á., Ortíz, R. C., & Varona, M. (2019). Economic losses induced by Fasciola hepatica in cattle slaughtered in Chacuba slaughterhouse, Camagüey, Cuba. Cuban Journal of Agricultural Science, 53(1), 1–5.

Salimi-Bejestani, M. R., McGarry, J. W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A., & Williams, D. J. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for Fasciola hepatica and its evaluation against a commercially available test. *Research in veterinary science*, *78*(2), 177-181.

Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., De Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J., & Verweij, P. E. (2015). Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*, *53*(8), 765-797

Sierra, C., Portillo, J., Tafur, G., Martínez, L (2018).Ovine and caprine fasciolosis incidence in the north of Cesar and south of The Guajira. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/328554691

Tao, S., Tian, P., Luo, Y., Tian, J., Hua, C., Geng, Y., ... & Zhao, R. (2017). Microbiome-metabolome responses to a high-grain diet associated with the hind-gut health of goats. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1764

Theodoropoulos, G., Hicks, S. J., Corfield, A. P., Miller, B. G., & Carrington, S. D. (2001). The role of mucins in host–parasite interactions: Part II–helminth parasites. *Trends in parasitology*, *17*(3), 130-135.

Uchiyama, J., Murakami, H., Sato, R., Mizukami, K., Suzuki, T., Shima, A., ... & Sakaguchi, M. (2020). Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus. Veterinary Microbiology, 240, 108547.

Reynolds, L. A., Finlay, B. B., & Maizels, R. M. (2015). Cohabitation in the intestine: interactions among helminth parasites, bacterial microbiota, and host immunity. The Journal of Immunology, 195(9), 4059-4066.

Wang, K., Yin, X., Mao, H., Chu, C., & Tian, Y. (2018). Changes in structure and function of fungal community in cow manure composting. *Bioresource technology*, *255*, 123-130.

Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, *7*.

Xu, M., Jiang, Z., Huang, W., Yin, J., Ou, S., Jiang, Y., ... & Shen, Y. (2018). Altered gut microbiota composition in subjects infected with Clonorchis sinensis. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2292

Zhang, Z. Y., Chen, W. H., Zou, X., Han, Y. F., Huang, J. Z., Liang, Z. Q., & Deshmukh, S. K. (2019). Phylogeny and taxonomy of two new Plectosphaerella (Plectosphaerellaceae, Glomerellales) species from China. *MycoKeys*, *57*, 47.

Zhang, N., & Wang, Z. (2015). 3 Pezizomycotina: Sordariomycetes and Leotiomycetes. In *Systematics and Evolution* (pp. 57-88). Springer, Berlin, Heidelberg.

SUPLEMENTARIOS

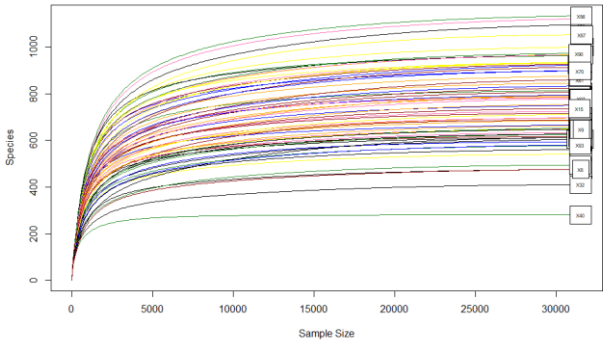

Fig. S1. Curva de rarefacción para muestras correspondientes al análisis del 16S.

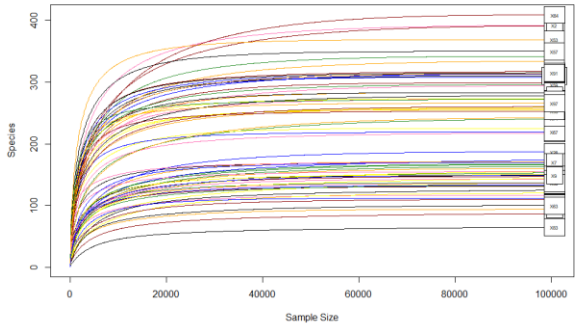

Fig. S2. Curva de rarefacción para muestras correspondientes al análisis del 18S.

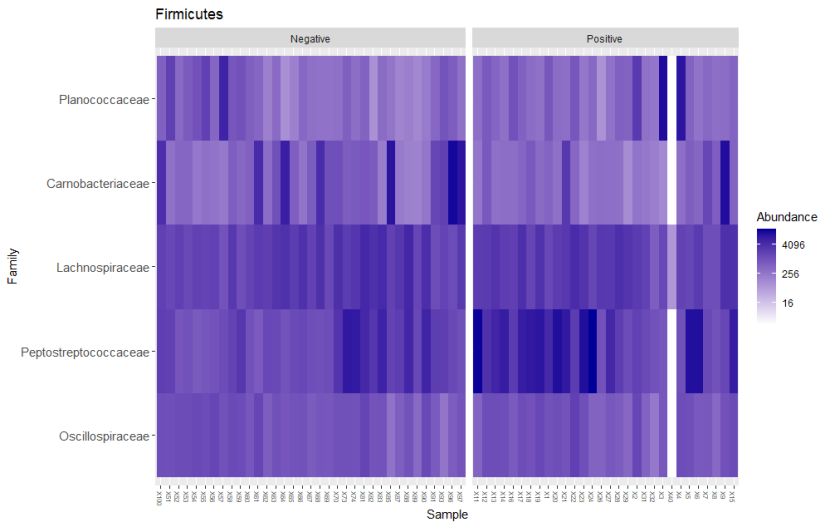

Fig. S3. Abundancia relativa de las familias más representativas del phylum Firmicutes.

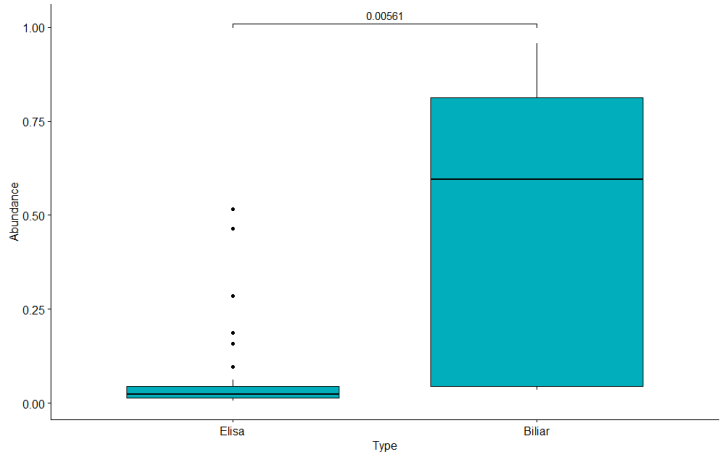

Fig. S4. Boxplot de abundancia relativa de Proteobacteria según el método de identificación del parásito.

Tabla S1. Variables sociodemográficas, coinfecciones y método de identificación de *Fasciola* en las muestras analizadas.

MUESTRA	COINFECCIONES		MUNICIPIO	DEPARTAMENTO	FIN ZOOTECNICO	FUENTE DE AGUA	EDAD	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DEL PARASITO				*FASCIOLA*
	ARNr 18S	análisis parasitológico						MATERIA FECAL	CONTENIDO BILIAR	ADULTO EN CONTENIDO BILIAR	ELISA	
1		*Toxocara, Eimeria spp spp,Trichostrongylus*	Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	2				+	POSITIVO
2			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				+	POSITIVO
3			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	11				+	POSITIVO
4	*Ostertagia ostertagi*		Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	10				+	POSITIVO
5			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	5				+	POSITIVO
6		*Eimeria spp spp,Trichostrongylus*	Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	8				+	POSITIVO
7			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	7				+	POSITIVO
8			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	11				+	POSITIVO
9		*Eimeria spp spp,Cooperia*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	6				+	POSITIVO
11		*Eimeria spp spp,Ostertagia, Cooperia*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	2				+	POSITIVO
12		*Cooperia*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	13				+	POSITIVO
13			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				+	POSITIVO
14		*Eimeria spp spp,Dictyocaulus*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				+	POSITIVO
15			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	7				+	POSITIVO
16			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	3				+	POSITIVO
17	*Ostertagia ostertagi*		Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	8				+	POSITIVO
18			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	2				+	POSITIVO
19		*Eimeria spp spp,Cooperia*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	6				+	POSITIVO
20			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	9				+	POSITIVO
21			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	6				+	POSITIVO
22			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	3				+	POSITIVO
23			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	3				+	POSITIVO
24			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	9	+			+	POSITIVO
26			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				+	POSITIVO
27		*Eimeria spp spp,Trichostrongylus*	Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				+	POSITIVO
28			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5	+			+	POSITIVO
29			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				+	POSITIVO
31		*Eimeria spp sp*	Fósca	Cundinamarca	Leche	NA	3			+	+	POSITIVO
32		*Eimeria spp sp, Buxtonella sp*	Une	Cundinamarca	Leche	NA	6		+		+	POSITIVO
40		*Eimeria spp sp , Balantidium coli, Buxtonella sp*	Fómeque	Cundinamarca	Leche	NA	4		+		+	POSITIVO
51		*Eimeria spp,Trichostrongylus*	Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				-	NEGATIVO
52			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				-	NEGATIVO
53			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	5				-	NEGATIVO
54			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	7				-	NEGATIVO
55			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	7				-	NEGATIVO
56			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				-	NEGATIVO
57			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	3				-	NEGATIVO
58			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				-	NEGATIVO
59			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	4				-	NEGATIVO
60			Nemocon	Cundinamarca	Leche	ALJIBE	6				-	NEGATIVO
61			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	2				-	NEGATIVO
62			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	5				-	NEGATIVO
63			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	9				-	NEGATIVO
64	*Punctodora ratzeburgensis, Monhystera paludicola*		Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	8				-	NEGATIVO
65			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	3				-	NEGATIVO
66			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	6				-	NEGATIVO
67			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	6				-	NEGATIVO
68			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	5				-	NEGATIVO
69			Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	7				-	NEGATIVO
70		*Eimeria spp,Cooperia*	Combita	Boyaca	Leche	ACUEDUCTO	3				-	NEGATIVO
73		*Eimeria spp,Ostertagia*	Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	7				-	NEGATIVO
74			Mosquera	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
81		*Ostertagia*	Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
82			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	6				-	NEGATIVO
83			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				-	NEGATIVO
85	*Diplogasteroides sp.*		Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
87			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
88			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
89			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				-	NEGATIVO
90			Sopo	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	4				-	NEGATIVO
91			Chocontá	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	5				-	NEGATIVO
93			Chocontá	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	10				-	NEGATIVO
96			Chocontá	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	10				-	NEGATIVO
97			Chocontá	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	10				-	NEGATIVO
100			Chocontá	Cundinamarca	Leche	ACUEDUCTO	N/R				-	NEGATIVO