



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
de la Producción y de la Salud Animal

**Patrones de RNAm codificador de citocinas en linfocitos  
asociados a la protección contra la hemoncosis  
experimental ovina**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**  
**ADOLFO SÁNCHEZ PAREDES**

**TUTOR:**  
**DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN**  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**COMITÉ TUTORAL:**  
**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ FES CUAUTITLÁN**  
**DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ ARELLANO INIFAP**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó con el equipo e instalaciones de la  
Unidad Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FES Cuautitlán UNAM

Con financiamiento del proyecto  
Programas de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica  
(PAPIIT) UNAM No. 222316

Adolfo Sánchez Paredes fue becario

CONACYT No. 639375

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por la confianza y el apoyo en todo momento para realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por fungir como mi tutor y brindarme el apoyo para llevar a buen término mis estudios de posgrado y enseñarme la vocación a la investigación gracias doctor.

Al M. en C. Cesar Cuenca Verde por su valioso apoyo y amistad en todo el camino recorrido del posgrado.

Al M. en C. Pablo Martínez Labat por impulsarme a llevar a buen término este trabajo.

A la Dra. María Eugenia López Arellano por abrirme las puertas del laboratorio de helmintos del CENID-PAVET de INIFAP para realizar las pruebas de RT-qPCR, su valiosa asesoría y seguimiento en todo el trabajo, muchas gracias doctora.

Al M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz por ser parte del comité tutor y asesoría para culminar este trabajo.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez por su apoyo técnico en la realización de los cultivos linfocitarios.

A los miembros del jurado evaluador, por el tiempo invertido en la revisión de este documento:

**Presidente:** Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

**Secretario:** Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

**Vocal:** Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo

**Suplente:** M. en. C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz

**Suplente:** Dra. María Eugenia López Arellano

A mis compañeros de servicio social y tesisistas del laboratorio 1 de inmunología y biología molecular de parásitos, gracias por su amistad y sobre todo por el buen ambiente de trabajo.

## DEDICATORIA

*Señor:* Gracias por las bendiciones recibidas, sé que me acompañas en este camino hasta el final, gracias.

**“A mi familia que en todo momento son el motor que me anima a seguir adelante”**

*A Mís Padres*

Maximino Sánchez Pineda y  
María del Refugio Paredes Rodríguez

por ser el ejemplo de vida de que con trabajo, esfuerzo y dedicación son la clave para la superación, gracias por todo, con mi trabajo espero devolver un poco de todo lo recibido.

*A mis hermanos*

Adriana Sanchez Paredes  
Pedro Sánchez Paredes  
Héctor Jonathan Sánchez Paredes

Por apoyarme y darme consejos cuando los necesitaba, además por ser cómplices en nuestras travesuras, gracias hermanos.

*A mis abuelos*

Petra Rodríguez Mendoza  
Timoteo Paredes Rodríguez  
Pedro Sánchez Corrales  
María Pineda Meléndez

*A mis sobrinos:*

Andrea, Paolo, Leah y Ximena nuestro futuro y nuevos integrantes a esta familia.

## ÍNDICE

Introducción.....	1
Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> . ....	2
Epidemiología .....	3
Patogenia .....	5
Control y prevención de la hemoncosis ovina .....	6
Raza columbia como modelo de susceptibilidad a la hemoncosis ovina .....	8
Respuesta inmune .....	9
Inmunidad innata contra <i>H. contortus</i> .....	10
Inmunidad adaptativa contra <i>H. contortus</i> .....	10
Citocinas relacionadas a la respuesta inmune contra <i>H. contortus</i> .....	14
Inmunomodulación de la respuesta a la hemoncosis ovina .....	15
<b>Justificación</b> .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivos</b> .....	19
Material y métodos .....	20
Diseño experimental.....	21
Técnicas parasitológicas .....	23
Conteo de eosinófilos sanguíneos .....	23
Obtención del concentrado vesicular de <i>Taenia hydatigena</i> (CVTh).....	23
Obtención de extractos somáticos de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	24
Cultivos de células abomasales .....	23
Extracción de RNA y transcripción reversa .....	26
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) .....	26
Análisis estadístico .....	28
<b>Resultados</b> .....	29
<b>Discusión</b> .....	40
<b>Conclusiones</b> .....	48
Referencias .....	49
Anexo 1. Análisis de expresión relativa ( <i>Fold change</i> ) de los diferentes grupos experimentales.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> .....	3
Figura 2.- Diagrama de flujo del diseño experimental. ....	27
Figura 3. Promedio ( $\pm$ EE) de la cantidad de huevos de <i>H. contortus</i> eliminados en materia fecal de corderos Columbia infectados (grupo 2 y grupo 3) .....	30
Figura 4. Promedios ( $\pm$ EE) del número de eosinófilos sanguíneos en corderos (Grupo 1), (Grupo 2), (Grupo 3) y corderos solo inoculados con CVTh.. .....	31
Figura 5. Promedios ( $\pm$ EE) de los niveles de citocinas del perfil Th1 en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con <i>H. contortus</i> .....	34
Figura 6. Promedios ( $\pm$ EE) de los niveles de citocinas del perfil Th2 en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con <i>H. contortus</i> .....	35
Figura 7. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en la región fúndica abomasal (RFA), de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con <i>H. contortus</i> . ....	36
Figura 8. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en la región pilórica abomasal (RPA), de corderos con y sin protección inducida a la hemoncosis.....	37
Figura 9. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en linfonodo abomasal (LNA), de corderos con y sin protección inducida a la hemoncosis .....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Función de algunas citocinas asociadas a la respuesta inmune contra <i>H. contortus</i> .....	12
Cuadro 2.- Grupos experimentales y tratamientos .....	22
Cuadro 3.- Correlaciones más importantes encontradas entre la eliminación de huevos de <i>H. contortus</i> (HGH) y diferentes variables estudiadas en corderos con y sin protección inducida por un CVTh e infectados con <i>H. contortus</i> . .....	39
Cuadro 4.- Expresión relativa de RNAm codificador de diferentes interleucinas en tres regiones abomasales de corderos con y sin protección inducida con un concentrado vesicular de <i>Taenia hydatigena</i> (CVTh) contra <i>H. contortus</i> . .....	40

## ABREVIATURAS

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>EE</b>	Error estándar
<b>ES</b>	Eosinófilos sanguíneos
<b>CVTh</b>	Concentrado Vesicular de <i>Taenia hydatigena</i>
<b>D.O</b>	Densidad óptica
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>HGH</b>	Huevos por gramo de heces
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gama
<b>FC<math>\epsilon</math>R1</b>	Receptor de inmunoglobulina E
<b>TGFB1</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutasa 1
<b>PRDX6</b>	Peroxirredoxina 6
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>i.v</b>	Intravenosa
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>LNA</b>	Linfonodo abomasal
<b>RFA</b>	Región fúndica abomasal
<b>RPA</b>	Región pilórica abomasal

L <sub>1</sub>	Larva de primer estadio
L <sub>2</sub>	Larva de segundo estadio
L <sub>3</sub>	Larvas de tercer estadio

## RESUMEN

Estudios previos demostraron la capacidad de un concentrado vesicular de *Taenia hydatigena* (CVTh) para inducir protección parcial contra la hemoncosis ovina. Esta protección se asoció a la presencia de citocinas abomasales *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10* e *IFN $\gamma$* , sin embargo, no se cuantificó su expresión genética. El objetivo del estudio fue cuantificar la producción y la expresión genética de las citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, TGB1 e *IFN $\gamma$* , el receptor de inmunoglobulina E FC $\epsilon$ R1A y dos factores de estrés SOD1 y PRDX6 en el abomaso de corderos con y sin protección inducida por el CVTh. Cuatro grupos de corderos Columbia tuvieron los siguientes tratamientos: grupo 1 (n=5), testigos; grupo 2 (n=15), infección con 5,000 L3 de *H. contortus*; Grupo 3 (n=15), inoculación con CVTh (600  $\mu$ g I.M., 600  $\mu$ g I.P.) e infección con 5,000 L3 de *H. contortus* y Grupo 4 (n=15), sólo inoculación con CVTh. Semanalmente se contó la cantidad de huevos por gramo de heces (HGH) y de eosinófilos sanguíneos (ES) en todos los corderos. En la semana 1, 4 y 7 p.i. se sacrificaron cinco corderos de los grupos 2, 3 y 4, en la semana 7 se sacrificaron los cinco corderos del grupo 1 (testigo). En todos los corderos se determinó la cantidad de *IFN $\gamma$* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* producidas por cultivos celulares de linfonodo abomasal (LNA) estimulados con antígenos de L<sub>3</sub> *H. contortus*. En los corderos sacrificados en la semana 7 (incluyendo los testigos), se cuantificó por RT-qPCR la expresión de diferentes citocinas en región fúndica abomasal (RFA), región pilórica abomasal (RPA) y LNA. Los resultados mostraron que los corderos a los que se les administró el CVTh previo a la infección (grupo 3) eliminaron menor ( $p < 0.07$ ) cantidad de HGH que los corderos que sólo fueron infectados (grupo 2) lo que significó una reducción del 44% en la eliminación de HGH en relación con los del grupo 2. Los corderos de los grupos 3 y 4 tuvieron mayor número ( $p < 0.05$ ) de ES que los corderos del grupo 1 y del grupo 2 en el momento de la infección. Los corderos que sólo fueron infectados con *H. contortus* (grupo 2), sobreexpresaron *IFN $\gamma$*  (Th1), *IL-4* e *IL-6* (Th2) en la RFA además de *IL-2* (Th1), *IL-4*, *IL-5* e *IL-6* (Th2) en la RPA. Adicionalmente, sus cultivos linfocitarios produjeron citocinas de ambos

perfiles: Th1 (*IL-2*) y Th2 (*IL-4*, *IL-5* e *IL-6*). En los corderos del grupo 3, la administración del CVTh previo a la infección, promovió la sobreexpresión de *IL-10* (Th2) en la RFA y de *IL-8* (pro-inflamación) en la RPA al mismo tiempo que promovió una menor expresión de *IFN $\gamma$*  (Th1) en la RFA y de *IL-2* (Th1) en la RPA. Lo anterior sugiere que el CVTh tiene un efecto promotor de citocinas del tipo Th2 y pro-inflamatoria en la mucosa abomasal. Estos resultados, sugieren que la dicotomía Th1/Th2 en la respuesta a la hemoncosis no está estrictamente polarizada y que la administración del CVTh en corderos promueve más la expresión genética de citocinas Th2 y una menor expresión de citocinas del perfil Th1 en ciertas regiones del abomaso.

## INTRODUCCIÓN

La nematodosis gastroentérica (NGE) de los ovinos es una de las parasitosis más comunes en México que compromete sus parámetros productivos y reproductivos (Cuellar, 1986). Genera pérdidas económicas en la producción ovina de países tropicales, subtropicales y templados en todo el mundo (Quiroz, 2003; Koop y Kyriazakis, 2001).

Esta enfermedad es causada por nematodos de diferentes géneros que interaccionan en el tracto digestivo, los más frecuentes en México, son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.* y *Trichuris ovis*. (Quiroz, 2011). Debido a su patogenia y distribución geográfica se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante en los ovinos a nivel mundial incluyendo México (Cuéllar, 1986; Quiroz, 2011).

Los parásitos del género *Haemonchus* probablemente se originaron en África teniendo una diversificación inicial en antílopes y posteriormente en otros rumiantes salvajes. Más tarde la migración humana permitió la dispersión de los parásitos de este género entre rumiantes salvajes y domésticos de otros continentes (Achi *et al.*, 2003; Hober *et al.*, 2004; Lichtenfels *et al.*, 1994).

*H. contortus* es conocido como gran “gusano del estómago”, “gusano del cuajar” y “gusano en poste de barbero” (Lapage, 1976; Soulsby, 1987). En la parte anterior presenta una cavidad pobremente desarrollada y un diente fino o lanceta que se origina en el lado dorsal para perforar la mucosa gástrica y succionar sangre. La ingesta de sangre le brinda una coloración rojiza, el macho tiene un color rojizo uniforme, mientras que, en la hembra los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo, le da un aspecto rallado.

Los machos tienen bolsa copuladora prominente con dos rayos laterales grandes y uno dorsal pequeño asimétrico en forma de “Y” invertida; las papilas son

relativamente cortas, hay papilas prebursales y poseen un gobernáculo; las 2espículas miden de 0.46 a 0.56 mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo (Soulsby, 1987; Sangster, 1995). Los machos miden de 10 a 20 mm.

La hembra posee vulva en la parte posterior del cuerpo y está cubierta por una protuberancia llamada solapa o bolsa vulvar, las hembras son extremadamente prolíficas alcanzando a producir hasta 5,000 huevos por día (Le Jambre, 1995). Las hembras llegan a medir entre 18 y 30 mm (Lapage, 1976; Soulsby, 1987 y Quiroz, 2003).

### **CICLO BIOLÓGICO DE *H. contortus*.**

En la figura 1 se ilustra el ciclo biológico de *H. contortus*. El parásito, tiene un ciclo de vida directo con dos etapas la parasita y la de vida libre en donde se desarrolla la fase infectante. La fase de vida libre inicia con la eliminación de huevos inmaduros en la materia fecal. Bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, se desarrolla dentro del huevo una larva 1 (L<sub>1</sub>) que emerge del mismo en uno o dos días (Quiroz, 2003). La L<sub>1</sub> se alimenta y se desarrolla para posteriormente realizar la primera muda de la fase pre-parasita, en la cual la cutícula se desprende y es seguida de la aparición del siguiente estadio evolutivo, larva 2 (L<sub>2</sub>). Pasados dos o tres días la L<sub>2</sub> lleva a cabo una segunda muda sin embargo la cutícula no se desecha y permanece como una envoltura alrededor de la L<sub>3</sub> que la separa del ambiente, por lo tanto, esta larva no puede alimentarse. La L<sub>3</sub> se mantiene de las reservas lipídicas que han sido almacenadas dentro de las células que recubren el intestino, larva 3 (L<sub>3</sub>) es la fase infectante (Lapage, 1976).

La fase parásita inicia cuando los ovinos adquieren la infección por la ingesta de L<sub>3</sub> en el pasto, la larva pierde la cutícula que conservaba de la muda anterior, esto se da por estímulos del hospedador pH en el rumen. Las larvas ya liberadas penetran la mucosa por las fosas de las glándulas gástricas en donde se alimentan, crece y muda a larva 4 (L<sub>4</sub>) en un periodo de 2 a 3 días, esta se alimenta de sangre, sale de la mucosa y muda a larva 5 (L<sub>5</sub>) o preadulto en un

lapso de 18 días. La L<sub>5</sub> se desarrolla directamente ya sin mudar hasta transformarse en adulto, después de la copula la hembra comienza a producir huevos cerrando el ciclo (Lapage, 1976; Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999).

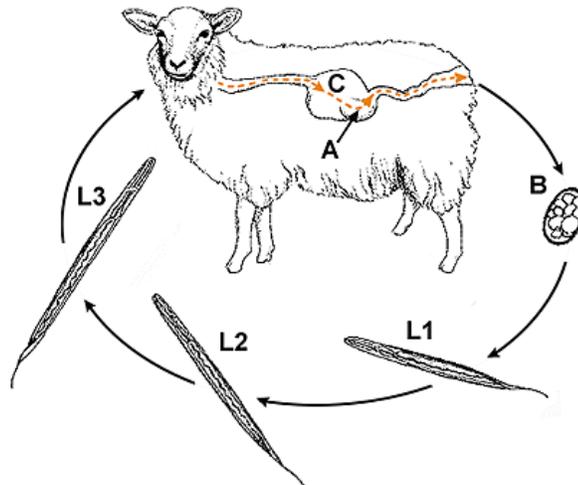


Figura 1.- Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*. A) Adultos en la mucosa abomasal. B) Huevo eliminado en heces. L1) Larva libre en el suelo. L2) Larva 2. L3) Larva 3 (fase infectante), C) Rumen (Tomado de Johnstone, 1998).

## EPIDEMIOLOGÍA

La infección por *H. contortus* es conocida como hemoncosis. La enfermedad afecta primordialmente a corderos en pastoreo, aunque borregos adultos pueden llegar a padecer la enfermedad. El impacto de la infección no solo depende de la carga parasitaria, sino también del estado fisiológico e inmunológico del hospedador. La enfermedad puede clasificarse en aguda; cuando hay cargas parasitarias muy altas en poco tiempo (lo cual generalmente produce edema, letargo, coloración oscura en las heces, lana quebradiza y ocasionalmente la muerte) y la crónica; cuando la ingesta de L<sub>3</sub> es paulatina, desarrollando un cuadro clínico subagudo con (diarrea, pérdida de peso y

debilidad entre otros). Se ha observado que corderos como ovejas cercanas al parto son más susceptibles a la infección por nematodos (Bishop y Stear, 2001).

Existe un fenómeno en la epidemiología de *H. contortus* conocido como “alza posparto”, que se refiere a un aumento en la eliminación de huevos de NGE en ovejas después del parto y durante la lactancia. Se considera que el desarrollo de nematodos adultos, así como la reactivación de larvas en estado de hipobiosis es favorecido por la prolactina, la cual está presente hacia el final de la gestación y durante la lactación (Gatongi *et al.*, 1998). Además, existen otros factores propios del hospedador que condicionan la severidad de la parasitosis, entre los que están: susceptibilidad heredada de ciertas líneas genéticas, sexo, calidad nutricional, y por último la introducción de animales susceptibles en áreas infectadas (Armour, 1980).

La humedad y la temperatura son los factores climáticos más importantes que determinan el desarrollo y supervivencia de larvas infectantes de *H. contortus*, por lo tanto, la época de lluvias representa una situación de alto riesgo para la adquisición de la hemoncosis. Otro aspecto importante entre los factores ambientales es la hora del día en que pastorean los animales. Esto hace que en ocasiones se ingieran cantidades masivas de larvas que desarrollará cuadros clínicos de nematodosis gastroentérica (Capitini *et al*, 1990).

Los niveles de contaminación del ambiente se ven influenciado por varios factores; que incluyen el potencial biótico de los helmintos (la capacidad de un organismo de tener éxito biológico; es determinado por la fecundidad), densidad de animales por área de pastoreo, respuesta inmune del hospedador e hipobiosis (Armour, 1980).

## **PATOGENIA**

Diferentes factores están involucrados en la patogénesis de la hemoncosis. En condiciones de desarrollo de la enfermedad, los más importantes son la respuesta inmune del hospedador y la virulencia de *H. contortus*. El principal mecanismo patógeno es la acción expoliadora hematófaga en el abomaso provocando lesiones directas a la mucosa gástrica, así como cambios morfofuncionales (Angulo-Cubillán, 2007). Los principales efectos asociados a la hemoncosis son: anemia, hipoproteinemia, diarrea y síndrome de mala absorción.

La anemia se debe a que un adulto de *H. contortus* puede ingerir 0.05 ml de sangre al día (Rowe *et al.*, 1988), causando una reducción del volumen del paquete celular (PCV). dichos parámetros han sido usados como un marcador de virulencia del parasito (Eysker y Ploeger, 2000; Stear *et al.*, 2002). Como estimación indirecta de la carga parasitaria (Fakae *et al.*, 1999; Waller, 1999). A mayor carga parasitaria mayor anemia. La hipoproteinemia puede deberse a la pérdida de proteína en el lumen derivado de la ruptura de uniones intercelulares e incremento de la permeabilidad, así como la deficiencia en la absorción de proteínas (síndrome de mala absorción).

El síndrome de mala absorción es causado por el incremento del pH abomasal que impide la transformación de pepsinógeno producido en las células principales a pepsina (Hertzberg *et al.*, 2000; Mulcahy *et al.*, 2004) induciendo reducción de aminoácidos y absorción de pequeños péptidos (Simcock *et al.*, 1999). El aumento del HCl se debe a una disminución en la producción y excreción de este por las células parietales y la mucosa gástrica, generado por la pérdida y/o disminución en su número, así como por el reemplazo de células inmaduras no funcionales o no secretoras (Hertzberg *et al.*, 2000; Mulcahy *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 1999; Simpson, 2000). Además, la enfermedad induce una menor cantidad de gastrina circulante generando disminución en el consumo de alimento (Fox y Jacob, 1991).

La diarrea se deriva de la ruptura de uniones intercelulares e incremento de la permeabilidad (Baker *et al.*, 2003; Fox y Jacob, 1991), pérdida celular epitelial, reparación de tejido, incremento en la producción de moco. a esto se le agrega la inflamación, extravasación de líquido (edema) y efecto de algunos mediadores químicos como leucotrienos y prostaglandinas (Simpson, 2000).

En la necropsia las lesiones macroscópicas observadas son: emaciación, mucosas pálidas, edema en cavidades corporales (Quiroz, 2003), utilización de los depósitos de grasa, hipertrofia de linfonodos abomasales, edema de la mucosa abomasal con hemorragias petequiales, presencia de nódulos al observar fases adultas (Dominguez-Toraño *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2001). En la evaluación al microscopio, se ha observado infiltración celular, dilatación de las glándulas gástricas, úlceras, edema, hemorragia y un incremento en el número de mastocitos y eosinófilos (Amarante *et al.*, 2005; Balic *et al.*, 2000b).

## **CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA HEMONCOSIS OVINA**

Debido a los factores que intervienen en el control de la hemoncosis no es posible indicar una sola opción totalmente eficiente, por lo cual es necesario llevar un control integral de parásitos en el cual se considere el empleo de antihelmínticos en conjunto con estrategias alternativas de control (Quiroz, 2003). Dentro de estas están: manejo de praderas, suplementación alimenticia, desparasitación selectiva, empleo de razas resistentes a la hemoncosis, control biológico con depredadores naturales y el uso de vacunas e inmunomoduladores.

El uso de sistemas de rotación de potreros puede ser utilizado en el control de nematodos (Cuéllar, 1986). En este los animales nuevos deben tener la menor carga de parásitos posibles, se debe separar por edades, las praderas deben dividirse para pastorear en diferentes tiempos permitiendo la desecación de larvas. Esta alternativa no es del todo adecuada en climas húmedos (Quiroz, 2003).

La buena nutrición favorece la resistencia en contra de las infecciones por *H. contortus*. La suplementación con proteína ha demostrado los mejores efectos, hasta ahora se han utilizado suplementos convencionales como la soya, arboles forrajeros y bloques nutricionales (Torres y Aguilar, 2000).

El sistema FAMACHA© (de Fafa Malan Chart) es un método de desparasitación selectiva utilizado para disminuir la presentación de cepas resistentes a los antihelmínticos. Este se basa en la identificación individual de animales que manifiestan signos de anemia en la mucosa ocular para desparasitar los animales del rebaño más afectados. Para realizar esto se mide la coloración de la mucosa ocular de los corderos comparándola con los colores presentes en cinco niveles de la tarjeta de FAMACHA© (van Wyk y Bath, 2002).

El control biológico se basa en el uso de enemigos naturales contra nematodos gastroentéricos como son los hongos nematofagos: *Arthobotrys robusta*, *A. conoides*, *Monacrosporium thaumasium*, *M. siniense* y *Duddingtonia flagrans*, para el control de larvas infectantes en materia fecal de rumiantes (Araujo *et al.*, 1996; Ojeda-Robertos *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2009; Llerandi-Juárez y Mendoza de Gives, 1998; Torres y Aguilar, 2000; Aguilar *et al.*, 2008a). Así mismo, se ha demostrado el efecto antihelmíntico de la toxina producida por *Bacillus thuringiensis* contra *H. contortus* (López *et al.*, 2006; Linares *et al.*, 2008) y la utilización de partículas de óxido de cobre (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2007).

Se ha utilizado una vacuna recombinante experimental con buenos resultados. Está elaborada con una proteína de bajo peso molecular (rHc23) clonada y expresada en un sistema procariota (*Escherichia coli* BL21) y fue probada en ensayos de protección en corderos. Se observó menor número de fases adultas en el abomaso y menor eliminación de huevos en materia fecal en los corderos que recibieron la vacuna (Fawzi *et al.*, 2015).

El empleo de razas resistentes a NGE ha sido utilizado como una opción para contrarrestar los efectos negativos de la infección. La resistencia a NGE tiene una base genética y se define como la habilidad de un hospedador para iniciar y mantener una respuesta que evite o reduzca el establecimiento de los parásitos o elimine la carga parasitaria. Algunas de las razas ovinas utilizadas por su resistencia son: Blackbelly (Yaswinski *et al.*, 1980; Muñoz, 2007), Romanov (Luffau *et al.*, 1990), Merino (Gill *et al.*, 1993), Saint Croix, Katahdin (Parker *et al.*, 1993), Florida (Torres *et al.*, 1994), Romney (Hohenhaus and Outteridge, 1995), Red Maasai (Mugambi *et al.*, 1996), Nali (Singh *et al.*, 1997), Polaca de lana larga (Bouix *et al.*, 1998), Nativa de Louisiana (Miller *et al.*, 1998), Castella, Florida y sus cruza (Gómez *et al.*, 1999). Estas razas generalmente fueron producto de la selección en condiciones de campo enfrentados permanentemente a altas cargas infectivas por NGE. En contraste, las razas seleccionadas para alta producción de lana o de leche en condiciones de confinamiento son muy susceptibles a NGE.

## **RAZA COLUMBIA COMO MODELO DE SUSCEPTIBILIDAD A LA HEMONCOSIS OVINA**

La raza Columbia es el resultado de la cruce de carneros Lincoln con ovejas Rambouillet, desarrollada por el Departamento de Agricultura de EUA. se le consideran como la primera raza en este país. Los animales de esta raza son de doble propósito y se caracteriza por su gran tamaño y peso. Los machos alcanzan los 160 kg y las hembras hasta los 110 kg. Presentan cara blanca, recubierta de pelo son acornes y carecen de arrugas en la piel y el cuello. Los corderos a los dos meses pueden alcanzar pesos promedios de 35 kg. Su tasa reproductiva se considera buena, con fertilidades superiores al 90%. Su presencia en México data desde hace 20 años, sin embargo no logró establecerse en el país. Cuando tuvo auge se localizó principalmente en Tlaxcala, Puebla, Veracruz e Hidalgo (De Lucas y Arbiza, 2001).

En un trabajo realizado por Muñoz-Guzmán (2007), se observó que la raza Columbia es altamente susceptible a la hemoncosis y cargas parasitarias elevadas en comparación a otras razas como la Blackbelly en infecciones experimentales con *H. contortus*. La susceptibilidad de la raza Columbia se relacionó a una menor cantidad de anticuerpos séricos, linfocitos T (CD4+ y gama-delta) y eosinófilos abomasales en los corderos Columbia en relación a la raza Blackbelly. Ambas razas mostraron niveles similares de pepsinógeno sérico y de índice FAMACHA, lo cual indica una buena resiliencia de los corderos Columbia ante la infección.

## **RESPUESTA INMUNE**

Los ovinos cuentan con diversos mecanismos de defensa que le permiten mantener su bienestar y salud (Balic *et al.*, 2000a). Los mecanismos inmunológicos a través de los cuales los ovinos tienen o adquieren resistencia a la hemoncosis no son claros (Saddiqi *et al.*, 2011; Shakya *et al.*, 2011), esta resistencia es una característica individual que se ha asociado a edad, raza, y exposiciones previas al parásito (infección o reinfección).

La respuesta inmune del hospedador a la hemoncosis es compleja, en esta interactúan factores inmunológicos específicos (respuesta inmune adaptativa celular y humoral) e inespecíficos (mecanismos inflamatorios, complemento y granulocitos), los cuales pueden variar dependiendo de los estadios evolutivos del parásito (McClure *et al.*, 1996; Meeusen, 1999; Balic *et al.*, 2000b). En general, los antígenos del parásito interactúan con las células del sistema inmune innato, induciendo la liberación de mediadores químicos (citocinas) los cuales dirigen la respuesta inmune adquirida para generar una respuesta específica (Falcone *et al.*, 2001; Howart *et al.*, 1999).

## **INMUNIDAD INNATA CONTRA *H. contortus***

El complemento constituye una de las primeras señales de activación de la respuesta inespecífica a la infección por *H. contortus*, en varios estudios se ha comprobado la capacidad de los helmintos para activar el complemento por la vía alterna y fijar algunas moléculas en la superficie (Meussen *et al.*, 2005; Balic, *et al.*, 2000b). Los péptidos vasoactivos y quimiotácticos (C3a y C5a), consecuencia de la activación del complemento por la larva, movilizan eosinófilos a la zona de infección de manera independiente de los mecanismos específicos (Linfocitos T CD4+ e *IL-5*).

Otros mecanismos importantes son la hipermotilidad e hipersecreción gástrica y la hiperplasia de células calciformes con el consecuente aumento en la producción de moco (Miller, 1996; Balic *et al.*, 2002). Se ha encontrado que algunas razas o genotipos ovinos genéticamente resistentes emplean estos mecanismos para contrarrestar la infección desde etapas muy tempranas. La expulsión inmediata del parásito también está asociada a la presencia en el moco abomasal de histamina y leucotrienos, que inhiben la motilidad de las larvas *in vitro* (Douch *et al.*, 1996).

## **INMUNIDAD ADAPTATIVA CONTRA *H. contortus***

*H. contortus* como otros NGE induce una respuesta tipo Th2, esta respuesta está asociada a susceptibilidad/resistencia en el hospedador. Las bases de la protección contra la hemoncosis han sido ampliamente investigadas (Smith *et al.*, 1984). En estudios previos realizados se observó un incremento de linfocitos T CD4+ (Sher, 1992) en infecciones experimentales de *H. contortus* tanto en ovinos susceptibles como en resistentes, este incremento se observó en mucosa y linfonodos abomasales (Balic *et al.*, 2000b). El efecto protector de los LT CD4+ se debe a la producción de citocinas que regulan la diferenciación, proliferación y reclutamiento de células efectoras y producción de anticuerpos evitando el establecimiento del parásito (Gill *et al.*, 1993). Karanu (1997), demostró que la

administración de un anticuerpo monoclonar anti-D4+ disminuyó la resistencia a la hemoncosis y produjo una mayor cantidad de HGH en corderos y cabritos, además de la disminución de mastocitos y eosinófilos en la mucosa (Gill *et al.*, 1993).

La existencia de una dicotomía en la respuesta contra la hemoncosis (Th1/Th2) ha sido establecida como la diferencia entre susceptibilidad y resistencia (Gill *et al.*, 2000). En este sentido se ha demostrado que en una primoinfección por *H. contortus* en ovinos susceptibles se produce una respuesta tipo Th1 encontrando aumento de *IFN* $\gamma$ , reducción de anticuerpos séricos específicos, eosinófilos sanguíneos y eosinofilos abomasales (Gill *et al.*, 2000; Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006; Hein *et al.*, 2010; Shakya *et al.*, 2011) en comparación con ovinos resistentes quienes montan una respuesta tipo Th2 en donde se sobreexpresan genes para *IL-5*, *IL-13* y *TNF* $\alpha$  (Pernthaner *et al.*, 2005), así como aumento de eosinófilos, mastocitos y globulinas IgG1 e IgE (Gill *et al.*, 2000). Las reinfecciones con *H. contortus* en corderos susceptibles inducen la polarización de la respuesta y el aumento de citocinas tipo Th2 (Meeusen *et al.*, 2005).

Otro factor fundamental en la respuesta protectora contra la hemoncosis son los eosinófilos (Claerebout *et al.*, 2000; Stear *et al.*, 2002). Estos son considerados marcadores de infecciones por nematodos (Falcone *et al.*, 2001), los cuales son reclutados en el sitio de infección por factores quimiotácticos (C3a y C5a) y citocinas como *IL-4* e *IL-5* producidas por LT CD4+ y LT  $\gamma\delta$  favoreciendo su activación e incremento en la medula ósea (Collins *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1994).

Durante la infección por nematodos, los eosinófilos presentan un efecto citotóxico, en particular debido a la proteína de los gránulos lanzada y la producción de anión superóxido, matando estadios larvarios y tejido del hospedador (Klion *et al.*, 2004; Mulcahy *et al.*, 2004). Algunas células que también participan en este proceso inmunológico son los mastocitos (Falcone *et al.*, 2001) los leucocitos globulares (Huntley *et al.*, 1984; Macalldowie *et al.*, 2003).

Las citocinas son polipéptidos solubles sintetizados por las células, capaces de modificar el comportamiento de las mismas, así como también el de otras células en respuesta a microorganismos y otros antígenos median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. (Abbas, 2004; Filella *et al.*, 2002).

**Cuadro 1.- Función de algunas citocinas asociadas a la respuesta inmune contra *H. contortus***

<b>Citocina</b>	<b>Célula productora</b>	<b>Función</b>	<b>Asociación con <i>H. contortus</i></b>
<b><i>IL-2</i></b>	Linfocitos T	Proliferación y diferenciación en células efectoras y de memoria; en linfocitos B promueve la proliferación y síntesis de anticuerpos.	Ha sido observada en células de la submucosa abomasal que recibieron un CVTh previo a la infección (Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , 2015), además se ha observado que la expresión decrece a los 5 días post- infección en LNA y mucosa abomasal (Balic <i>et al.</i> , 1999a)
<b><i>IL-4</i></b>	Linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, y células Natural Killer	Activa y regula el MHC clase II, además es crucial en la activación de las células B y regulación de la señalización por IgE.	Ha sido observado en células de la mucosa abomasal que recibieron un CVTh (Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , 2015), la expresión ha sido observada a los 5 días en LNA, y ha sido asociada a poblaciones de animales resistentes a la hemoncosis (Pernthaner <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>IL-5</i></b>	Linfocitos Th2, mastocitos, células Natural Killer y eosinófilos	Promueve la permanencia, diferenciación, quimiotaxis de eosinófilos en la respuesta Th2. Promueve la producción de IgE y IgA, induce el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B	Ha sido observada sobreexpresada en la región fúndica y linfonodo abomasal a los 15 y 28 días en ovejas INRA 401. (Lacroux <i>et al.</i> , 2006). Así mismo, en mucosa abomasal en ovinos resistentes (BlackBelly) y susceptible (INRA 401) en linfonodo abomasal la sobreexpresión fue mayor en ovinos resistentes (Terefe <i>et al.</i> , 2007).
<b><i>IL-6</i></b>	Linfocitos T, macrófagos y células endoteliales	Actúa en la respuesta inmune adaptativa, inflamación, así como en la hematopoyesis. Promueve la producción de la IgA en la mucosa.	Ha sido observada subexpresada en ovinos Pelibuey en muestras tomadas de sangre periférica a las 8 semanas (Pacheco <i>et al.</i> , 2015). Ha sido observada en células de la mucosa abomasal que recibieron un CVTh (Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , 2015).

<b>IL-8</b>	Monocitos, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos	Es un factor quimiotáctico de neutrófilos, de naturaleza proinflamatoria, además de regular la producción de proteínas de adhesión.	Ha sido observada subexpresada en ovinos pelibuey en muestras tomadas de sangre periférica a las 8 semanas (Pacheco <i>et al.</i> , 2015).
<b>IL-10</b>	Macrófagos, Linfocitos T reguladores	Inhibición de la expresión de <i>IL12</i> , coestimuladores y clase II del MHC.	Su expresión ha sido observada en LNA a los tres días. sin embargo, regresa a sus niveles iniciales observados en corderos no infectados. (Balic <i>et al.</i> , 1999) Ha sido observado en células de la mucosa abomasal que recibieron un (CVTh Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , 2015).
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Linfocitos T	Interviene en el reclutamiento y activación de monocitos circulantes, células dendríticas, y linfocitos natural killer, diferenciación de linfocitos T CD4+ en linfocitos Th1, en linfocitos B promueve el cambio de isotipo a subclase de IgG, diferenciación celular	Ha sido observada en submucosa abomasal que recibieron un CVTh Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , (2015) ha sido asociada dentro de un perfil Th1 en animales susceptibles (Buendía-Jiménez <i>et al.</i> , 2015; Else and Finkelman, 1998; Zaros <i>et al.</i> , 2010).
<b>TGFB1</b>	Linfocitos, T, eosinófilos, neutrófilos, basófilos y monocitos	Control del crecimiento proliferación, diferenciación celular y apoptosis.	Ha sido asociada su sobreexpresión a infecciones por NGE en animales susceptibles (Gossner <i>et al.</i> , 2012; Craig <i>et al.</i> , 2014).
<b>SOD1</b>	Células eucariotas	Enzima antioxidante	Se asocia la actividad de esta enzima como respuesta al daño oxidativo de las células por NGE (Siwela <i>et al.</i> , 2010)
<b>PRDX6</b>	Células eucariotas	Enzima antioxidante	Se ha observado sobreexpresada en citoplasma de células inflamatorias. (Khoontawad <i>et al.</i> , 2010). Ha sido asociada como un mecanismo de defensa en infecciones por NGE (Maza, 2015; Estrada-Reyes <i>et al.</i> , 2017 ).

## **CITOCINAS RELACIONADAS A LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *H. contortus***

Las células de la respuesta inmune de ovinos infectados con *H. contortus* muestran una diferenciación de linfocitos CD4+ hacia un perfil Th2 con producción de citocinas *IL-4*, *IL-5* e *IL-13* en mucosa y linfonodo abomasal (Gill *et al.*, 2000; Schallig, 2000; Balic *et al.*, 2000b; Lacroux *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos estudios en donde utilizaron corderos Romney de líneas genéticas resistentes y susceptibles a *Trichostrongylus colubriformis*, se observó una respuesta Th2 modificada en los corderos resistentes, encontrando mayor cantidad de *IL-13*, *IL-5* y *TNF $\alpha$* , pero no de *IL-4* e *IL-10* (Meeusen *et al.*, 2005 y Pernthaner *et al.*, 2005).

Se ha utilizado la técnica de microarreglos para conocer la expresión de citocinas y otros genes involucrados en la resistencia y/o susceptibilidad a la hemoncosis ovina, a partir de cDNA de tejido abomasal en líneas genéticas de ovinos resistentes (Blackbelly y St. Croix) y susceptibles (Dorset y Rambouillet). Los resultados obtenidos a través de la técnica de microarreglos, mostró que las ovejas de pelo (resistentes) expresan una mayor cantidad de genes implicados en la motilidad intestinal (transgelina, actina $\gamma$ 2 y Torsina-3a), así como citocinas inflamatorias (*IL-4*, *IL-12*, *TNF $\alpha$* ). Los cambios en dichos perfiles indican que los ovinos de pelo presentan una fuerte respuesta inflamatoria cuando son infectados con *H. contortus*, lo cual puede favorecer la resistencia a dicha parasitosis (Mackinnon *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que las reinfecciones con *H. contortus* inducen una protección parcial (Gomez-Muñoz *et al.*, 1999 y Lacroux *et al.*, 2006), en donde los corderos resistentes mostraron un aumento en la expresión de las citocinas *IL-4*, *IL-5* e *IL-13* (Terefe *et al.*, 2007) a diferencia de los corderos con una infección primaria; en el mismo estudio no se observó aumento de las citocinas *IFN $\gamma$* , *IL-10*, *IL-12*, *TNF $\alpha$*  ante la infección por *H. contortus*.

Gill *et al.* (2000), reportaron que la infección por *H. contortus* a nivel de linfonodos abomasales y mesentéricos abomasales presentaban una

subexpresión de *IFN* $\gamma$  y una sobreexpresión de *IL-5* en comparación con los no infectados (Gill *et al.*, 2000).

## **INMUNOMODULACIÓN DE LA RESPUESTA A LA HEMONCOSIS OVINA**

Los ovinos están expuestos a diferentes agentes etiológicos, por lo tanto, las infecciones son raramente producidas por un solo género parasitario (Balic *et al.*, 2000a). Esta interacción podría promover la existencia de sinergia o antagonismo entre especies (Dobson, 1985; Terefe *et al.*, 2005). Se ha observado que ovinos infectados con *Oestrus ovis* y *H. contortus*, eliminan menor cantidad de huevos en heces que los animales infectados solo con *H. contortus* (Dorchies *et al.*, 1997).

El mismo efecto fue observado con una infección mixta de *Oestrus ovis* y *Trichostrongylus colubriformis* (Yakob *et al.*, 2004). Durante esta infección mixta se observó eosinofilia, incremento de eosinófilos abomasales y leucocitos globulares, así como una respuesta inflamatoria en la mucosa abomasal (Terefe *et al.*, 2005), por lo que esta puede estar asociada a la disminución de HGH en heces y al control de la hemoncosis. También, se ha observado que los componentes de diferentes metacestodos, como son *Taenia solium* o *Taenia crassiceps*, son capaces de modular la respuesta inmune de sus hospedadores, ya sea para estimularla o deprimirla (Tato *et al.*, 1996; Segura-Velázquez *et al.*, 2009; Dissanayake y Shahin, 2007).

Estudios recientes han evaluado el efecto de la inoculación de un concentrado vesicular de larvas de *Taenia hydatigena* (CVTh) sobre el establecimiento de una infección experimental de *H. contortus* en corderos (Cuenca-Verde, 2008; Cuenca-Verde *et al.*, 2011). Estos resultados mostraron que animales inoculados con el CVTh mostraron mayor número de eosinófilos comparado con los animales que no lo recibieron; además de mostrar mayor HGH en materia fecal y fases adultas en abomaso. La protección inducida por el CVTh

se asoció a eosinofilia y con la cantidad de células productoras de citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10* e *IFN $\gamma$*  en el abomaso de corderos infectados (Buendia- Jimenez *et al.*, 2015). Sin embargo, esta protección no solo se atribuye al papel de los eosinófilos, sino a un efecto regulador inespecífico inducido por el CVTh (Buendia-Jimenez *et al.*, 2015)

También se observó una mayor cantidad de células productoras de *IL-2* e *IFN $\gamma$*  en la submucosa abomasal; por el contrario, mayores cantidades de células productoras de *IL-4* fueron encontradas en la mucosa, lo que sugiere que la respuesta en la submucosa del abomaso es de tipo Th1 y tipo Th2 en la mucosa abomasal.

La inoculación del CVTh en corderos, indujo una menor implantación de adultos de *H. contortus* en el abomaso y una disminución significativa en la eliminación de HGH asociado a eosinofilia, y modificación de la expresión de citocinas en tejido abomasal (Buendia-Jimenez *et al.*, 2015).

## JUSTIFICACIÓN

La hemoncosis es una enfermedad causada por el nematodo *H. contortus* la cual limita la producción ovina en México como en otras partes del mundo, causando pérdidas económicas a los productores resultado de la baja productividad animal y a los costos en tratamientos. Por lo tanto, diversas investigaciones se han enfocado en generar alternativas de control de esta parasitosis, dentro de las cuales se encuentra el desarrollo de inmunomoduladores.

En el laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, se ha demostrado la capacidad de un CVTh para conferir protección a corderos susceptibles contra *H. contortus* determinada por la reducción significativa de los conteos de huevos en heces (Cuenca-Verde *et al.*, 2011), posteriormente se asoció la protección inducida por el CVTh a la presencia de citocinas tanto del perfil Th2 (*IL-4*, *IL-6*, *IL-10*) como del perfil Th1 (*IL-2* e *IFN $\gamma$* ) en la pared abomasal lo cual sugirió un efecto inmunomodulador del CVTh (Buendía- Jiménez *et al.*, 2015), sin embargo, no se determinó la cantidad de RNAm codificador de citocinas producido en el abomaso de los corderos a los que se les administró el concentrado vesicular, ni la causa del efecto inmunomodulador contra la infección por *H. contortus*.

## **HIPÓTESIS**

La protección contra la hemoncosis inducida por la administración del CVTh en corderos Columbia, está relacionada al perfil y cantidad (expresión relativa) de algunas citocinas en linfonodo y pared abomasal de estos corderos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

- Determinar y cuantificar la expresión relativa de algunas citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN $\gamma$* , *TGFB1*, el receptor de inmunoglobulina E (FC $\epsilon$ R1A) y dos genes de estrés (*SOD1*, *PRDX6*) involucrados en la protección inducida por el CVTh en la hemoncosis experimental ovina.

### Objetivos particulares.

- Cuantificar la expresión relativa de los genes de citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN $\gamma$* , *TGFB1*, el receptor de inmunoglobulina E FC $\epsilon$ R1A, dos genes de estrés *SOD1*, *PRDX6* en linfonodo y pared abomasal de ovinos Columbia con protección inducida CVTh previa a la infección con *H. contortus* y en ovinos solo infectados
- Medir por ELISA la cantidad de citocinas (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* e *IFN $\gamma$* ) producidas por células de linfonodo abomasal cultivadas *in vitro* con antígenos de *H. contortus*, en corderos Columbia con protección inducida
- Correlacionar la producción de las citocinas estudiadas con la cantidad de eosinófilos sanguíneos y la eliminación de huevo en heces en una infección experimental con *H. contortus* en corderos Columbia con protección inducida.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **LOCALIZACIÓN**

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los corderos se mantuvieron en el Módulo de Investigación del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES Cuautitlán. El desarrollo de la técnica RT-qPCR así como el diseño del anillo para el mismo, se realizó en el Laboratorio de Helmintos del CENID-PAVET del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Jiutepec, Morelos.

### **ANIMALES**

Se utilizaron 50 corderos machos de la raza Columbia que procedieron de una unidad de producción ovina dedicada a la producción de pie de cría, que garantizaron pureza y homogeneidad racial. Los corderos fueron contemporáneos, del mismo sexo y con una edad de entre 4 a 6 meses. Los corderos se mantuvieron en condiciones libres de parásitos. La alimentación consistió en alimento balanceado comercial para ovinos (14% de proteína cruda) y forraje seco molido (alfalfa achicalada) a razón de 4% de su peso corporal al día. El agua se ofreció *ad libitum*.

### **LARVAS DE *Haemonchus contortus***

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica de *H. contortus*, aislada a partir de un rebaño ovino comercial de Jilotepec, Estado de México, la cual ha sido mantenida por pases sucesivos en corderos criados bajo condiciones de estabulación total y con alimentación basada en forraje henificado y alimento balanceado comercial. Las L<sub>3</sub> de *H. contortus* fueron obtenidas a partir del cultivo de heces colectadas del cordero donador, con las cuales se elaboraron inóculos individuales de 5,000 L<sub>3</sub>. Las larvas se administraron con una sonda

bucoesofágica para colocar el inóculo directamente en el rumen del animal (Muñoz-Guzmán, 2007; Alba-Hurtado *et al.*, 2010).

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

A todos los corderos antes de ingresar a las corraletas se les realizaron exámenes clínicos, hematológicos y coproparasitoscópicos. Ingresaron al experimento aquellos animales clínicamente sanos y sin evidencia coproparasitoscópica de NGE. Antes de empezar los protocolos de inoculación, todos los animales fueron mantenidos en las corraletas por dos semanas para adaptarse a las nuevas condiciones de manejo.

Los 50 corderos fueron distribuidos homogéneamente de acuerdo con el peso en cuatro grupos (cuadro 2).

Cinco corderos de los grupos 2, 3 y 4 fueron sacrificados en las semanas 1, 4 y 7 p.i., los corderos del grupo 1 se sacrificaron en la semana 7 p.i. En el momento del sacrificio se colectó el linfonodo abomasal (LNA) y una muestra de las regiones fúndica y pilórica abomasal (RFA y RPA). Por RT-qPCR se cuantificó la cantidad de RNAm codificador de citocinas presente en las muestras obtenidas. Se obtuvieron células de LNA y se utilizaron para realizar los cultivos en el laboratorio con antígenos de L3 de *H. contortus*. En los sobrenadantes de estos cultivos se determinó la concentración de las diferentes citocinas.

Semanalmente se tomaron muestras de sangre y materia fecal desde el inicio del experimento hasta el final del mismo (8 semanas). Se contaron la cantidad de huevos de *H. contortus* eliminados en las heces, y la cantidad de ES sanguíneos.

El sacrificio se realizó en el Taller de Carnes de la FES Cuautitlán, UNAM por medio de una pistola de émbolo oculto. Posteriormente, el abomaso fue retirado para tomar las muestras de tejido de las regiones anteriormente señaladas mismas que se enviaron inmediatamente al laboratorio para ser procesadas.

**Cuadro 2.- Grupos experimentales y tratamientos**

Grupos	Días previos a la infección			Días de la infección
	-10	-6	-2	0
1	---	---	---	---
2	---	---	---	5,000 L3 de <i>H. contortus</i>
3	600 µg I.M. 600 µg I.P.	600 µg I.P.	600 µg I.P.	5,000 L3 de <i>H. contortus</i>
4	600 µg I.M. 600 µg I.P.	600 µg I.P.	600 µg I.P.	---

Inoculación con concentrado vesicular de *T. Hydatigena* (CVTh), I.M. Intramuscular, I.P. Intraperitoneal.

## **TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS**

Las muestras de heces se tomaron directamente del recto, para el conteo de huevos eliminados se utilizó una técnica modificada de McMaster, donde cada huevo encontrado representa 50 huevos por gramo de heces (Alba-Hurtado 2007). Quincenalmente se realizaron cultivos larvarios y se verificó la pureza de la infección.

## **CONTEO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS**

Para contar los ES se utilizó sangre obtenida mediante punción de la vena yugular en tubos al vacío con EDTA como anticoagulante (Rocha *et al.*, 2004) y se realizó una dilución de sangre fresca de 1:10 con una solución de Carpentier (Eosina Y al 1% y formaldehído al 40 %).

Se utilizó una pipeta de Thoma para leucocitos. Se agregó sangre hasta la marca con el número uno, después de agregó la solución de Carpentier hasta la marca con el número 11, se agitó por tres minutos y se dejó reposar por 15 minutos posteriormente se homogeneizó lentamente, se eliminaron las primeras tres gotas de la dilución y se llenó la cámara Neubauer, se dejó en reposo por tres minutos y finalmente se realizó el conteo con objetivo de 40x los resultados se expresaron como ES por mm<sup>3</sup> de sangre (Hohenhaus *et al.*, 1998; Muñoz, 2007).

## **OBTENCIÓN DEL CVTh**

Se colectaron metacestodos de *T. hydatigena* a partir de ovinos sacrificados en un rastro. Las larvas colectadas se trasladaron a 4° C al laboratorio, donde se mantuvo en congelación a -20° C hasta su utilización. Para obtener los extractos, se descongelaron los metacestodos y el líquido vesicular se colectó y mezcló con inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, iodoacetamida 1.8 mg/ml y PMSF 1 mM SIGMA Labs), posteriormente se filtró, y precipitó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se centrifugó por una hora a 5,000 rpm a 4° C y la pastilla se resuspendió en PBS. El extracto se filtró nuevamente a través de membrana millipore de 0.22µm, se alicuotó y almacenó a -80° C hasta su utilización (Cuenca-

Verde y col., 2011). La cantidad de proteína contenida en el concentrado se determinó por el método de Bradford (1976).

### **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS SOMÁTICOS DE L<sub>3</sub> DE *Haemonchus contortus***

El extracto se hizo a partir de 10<sup>6</sup> L<sub>3</sub> de *H. contortus*. De la forma descrita anteriormente. Las larvas fueron lavadas tres veces en solución salina fisiológica estéril con antibióticos (penicilina, 10,000 UI, estreptomina 100 µg/ ml, anfotericina B 10 µg/ ml SIGMA labs) y maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y una muestra de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/ ml, leupeptina 10 µg/ ml, iodiacetamida 1.8 µg/ ml y PMSF 1Mm SIGMA labs) hasta la obtención de una pasta homogénea sin fragmentos identificables de larvas. Posteriormente el extracto fue centrifugado por una hora a 20,000 g a 4° C y el sobrenadante fue filtrado con membrana de 0.22 µm, alícuotado y conservado a -20° C hasta su utilización (Camargo *et al.*, 1992). La cantidad total de proteína fue verificada por el método de Bradford, (1976), utilizando albúmina sérica bovina como referencia.

### **CULTIVOS DE CÉLULAS ABOMASALES**

Los cultivos celulares se realizaron modificando la descrita por Gill *et al.*, (2000). se obtuvieron los LNA inmediatamente después del sacrificio. Se lavaron con solución salina fisiológica y se limpiaron de todo rastro de tejido adiposo. Se colocaron en medio de lavado, que contiene medio de cultivo más antibiótico y se seccionaron finamente con tijeras, posteriormente se maceraron en organza fina y la suspensión celular obtenida se centrifugó a 2000 rpm por cinco minutos. Las células recuperadas se lavaron tres veces en el mismo medio. Se realizó una dilución 1:100 y las células se tiñeron con azul tripán para contar células vivas y muertas. Se ajustó la concentración a 2 X 10<sup>6</sup> células/ml y se colocaron 2 ml de la suspensión en placas de 24 pozos. Se estimularon por triplicado las células con 50 µg/pozo de antígeno somáticos de L<sub>3</sub> de *H. contortus* y tres pozos se mantuvieron sin estimular como testigos, los cultivos se mantuvieron por 24 horas. Los

sobrenadantes de cada pozo se obtuvieron por separado y se almacenaron a -20 ° C hasta su utilización para la cuantificación de las citocinas. En el sobrenadante de cada pozo se cuantificó la cantidad de *IFN* $\gamma$ , *IL-2*, *IL-4*, *IL-5* e *IL-6* utilizando *kits* comerciales de ELISA (Cusabio Labs No's cat: CSB-E14018Sh, CSB-E11217Sh, CSB-E15963Sh, CSB-EL011662Sh, CSB-E10116Sh respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante).

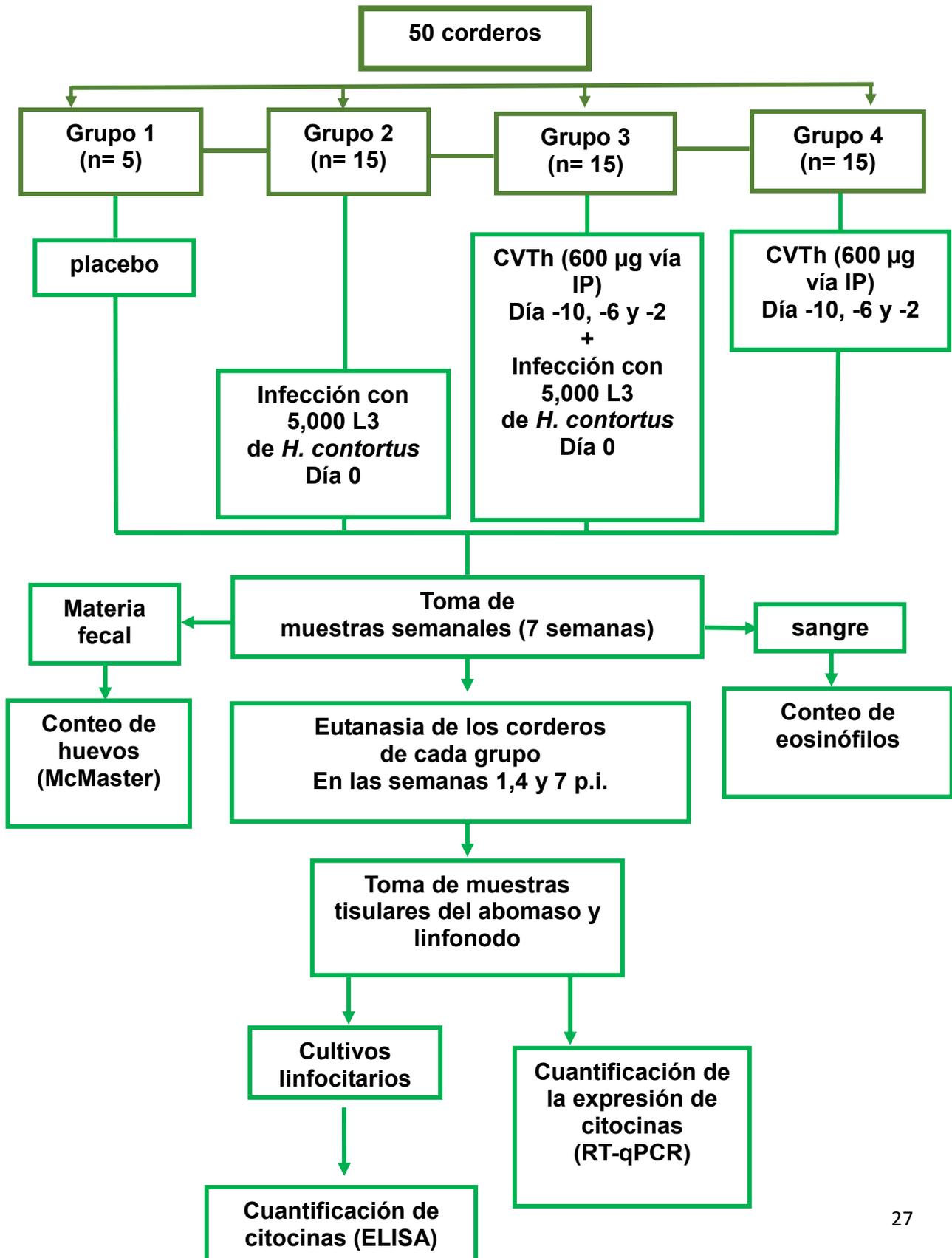
## Extracción de RNA y transcripción reversa

La obtención del RNA total de las muestras de LNA, RFA y RPA se realizó utilizando el *kit* comercial RNeasy® Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). La concentración y pureza del RNA fue estimada por espectrofotometría a 260 nm (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, USA). El RNA obtenido se descontaminó de trazas de DNA genómico utilizando el *kit* RQ1 RNase-Free DNase® (Promega, Madison, USA). La retrotranscripción se hizo con el *kit* comercial RT<sup>2</sup> First Strand Kit® (Qiagen Sciences, Maryland, USA) de acuerdo con el protocolo técnico del fabricante.

## Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se utilizó el arreglo de genes comercial Custom Rt<sup>2</sup> Profiler PCR Array con número de catálogo CAPB12263R (Qiagen, Sciences, Maryland), los cuales incluyen los cebadores sintetizados por SABiosciences Corporation® (Qiagen, Germany) basados en secuencias nucleotídicas de la base de datos GenBank, (Estrada-Reyes *et al.*, 2017) correspondientes a los genes de las citocinas (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *TGFB1* e *IFN $\gamma$* , el receptor de inmunoglobulina E (*FC $\epsilon$ R1A*) y dos genes de estrés *SOD1* y *PRDX6*) y un control positivo de la reacción; en donde el gen  *$\beta$ -actina* se utilizó como gen constitutivo de referencia “HouseKeeping”. Los ensayos de la RT-qPCR fueron realizados en un equipo Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) usando un Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se utilizó un robot QIAgility (Qiagen, Hilden, Germany) para cargar los anillos. Un control negativo sin cDNA fue usado para descartar contaminación de RNA. Se realizaron 40 ciclos de amplificación (inicial de 95° C por 10 minutos; desnaturalización a 95° C/ 15 segundos; alineamiento/extensión a 60° C por 45 segundos). El análisis de la expresión relativa de cada citocina fue realizado con el software RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis v3 SABiosciences® usando los valores resultantes de C<sub>T</sub> de los genes en estudio. Se obtuvo la  $\Delta\Delta C_T$ , y valores del cambio en la expresión (*fold change*) de cada citocina (Estrada-Reyes *et al.*, 2017).

Figura 2.- Diagrama de flujo del diseño experimental.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de HGH y ES fueron analizados mediante un modelo general lineal (*General linear model*) utilizando la prueba de análisis de varianza para muestras repetidas del programa Statistica for Windows®. Los datos de HGH fueron transformados por la fórmula  $\log_{10}(\text{HGH}+1)$  para estabilizar las varianzas previo al análisis. Los datos de D.O. de las pruebas de ELISA para cuantificación de citocinas fueron analizados por análisis de varianza factorial y se utilizó una prueba de Tukey para establecer las diferencias entre medias. Se utilizó una correlación de Pearson para todas las variables utilizadas.

## RESULTADOS

### ELIMINACION DE HGH EN CORDEROS COLUMBIA

Los promedios semanales de eliminación de HGH de los corderos Columbia infectados con 5,000 L<sub>3</sub> (Grupo 2) y corderos inoculados con CVTh e infectados con 5,000 L<sub>3</sub> (Grupo 3) se ilustran en la figura 3. En la tercera semana pos-infección (p.i), los animales de ambos grupos comenzaron a eliminar huevos de *H. contortus* en la materia fecal. Los corderos del grupo 2 eliminaron una mayor cantidad de HGH que los corderos del grupo 3 desde la semana 4 y hasta la semana 7 del experimento ( $p = 0.07$ ). Los promedios finales de los conteos de HGH fueron de 13,250 ( $\pm 1773$ ) y de 7,466 ( $\pm 1294$ ) para los grupos 2 y 3 respectivamente. Los corderos testigo y a los que sólo se les administró el CVTh no eliminaron huevos en la materia fecal durante el desarrollo del experimento.

### NIVELES DE ES EN CORDEROS COLUMBIA CON PROTECCION INDUCIDA E INFECCIÓN CON *Haemonchus contortus*

Los promedios semanales de conteos de eosinófilos sanguíneos en los cuatro grupos experimentales se ilustran en la figura 4. En los corderos de los grupos 3 y 4 aumentaron ( $p < 0.05$ ) sus niveles de ES a partir de la semana 0 y hasta la semana 3 PI con respecto al inicio del experimento (semana -1) y al grupo 1 (testigo). En los corderos del grupo 2 aumentaron sus niveles de ES a partir de la semana 1 y hasta la semana 3 PI con respecto al inicio del experimento (semana -1) y al grupo 1 (testigo). Los corderos de los grupos 3 y 4 presentaron una mayor ( $p < 0.05$ ) cantidad de ES sanguíneos que los corderos del grupo 2 entre las semanas 0 (infección) y hasta la semana 2 PI. Los promedios finales de ES sanguíneos de los grupos 2, 3 y 4 fueron de 83.4 ( $\pm 9.2$ ), 140.7 ( $\pm 20.9$ ) y 158 ( $\pm 21.1$ ) ES/mm<sup>3</sup> respectivamente.

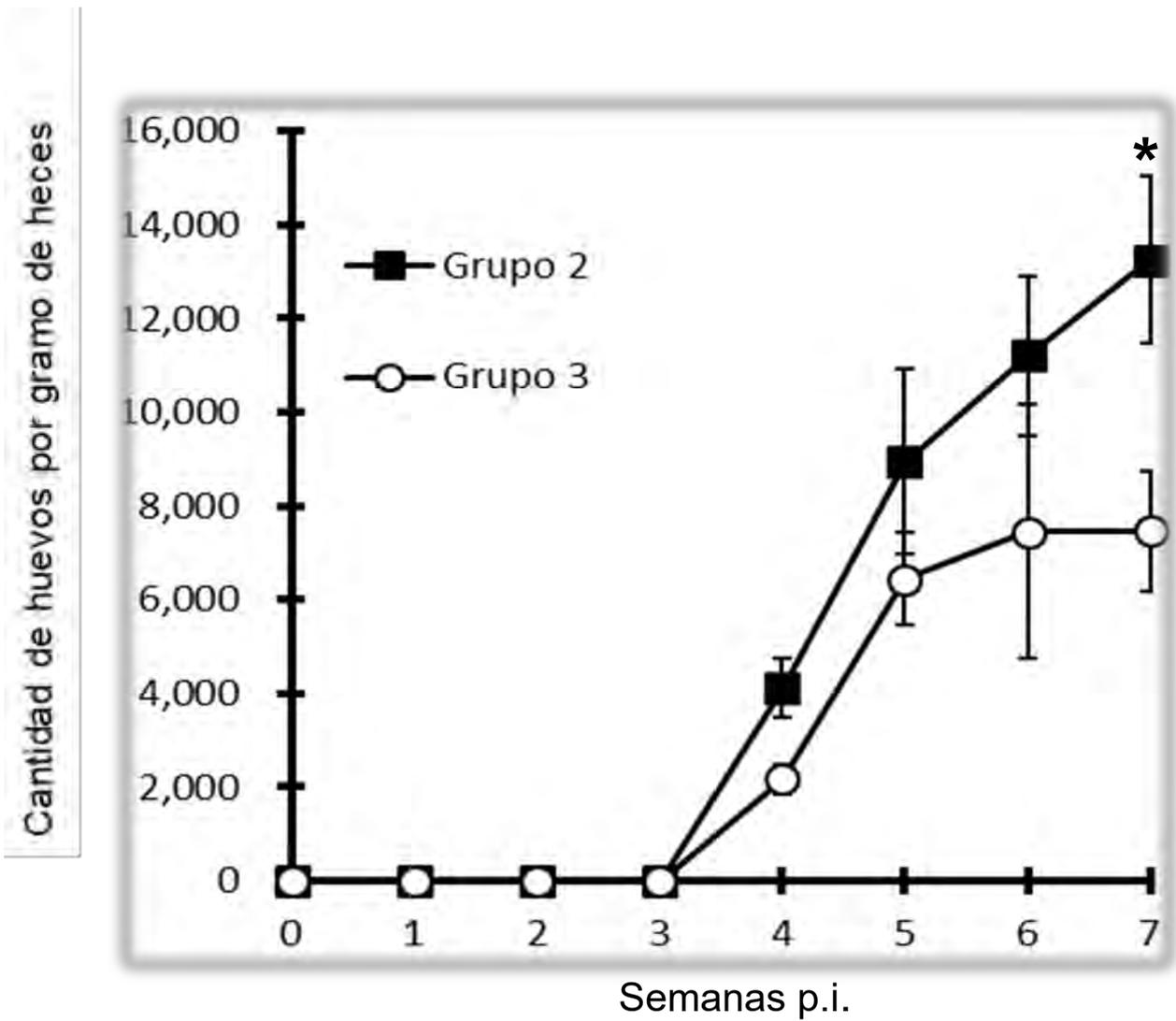


Figura 3. Promedio ( $\pm$ EE) de la cantidad de huevos de *Haemonchus contortus* eliminados en materia fecal de corderos Columbia infectados con 5,000 L3 (Grupo 2) y corderos protegidos con un concentrado vesicular de *Taenia hydatigena* e infectados con 5,000 L3 (Grupo 3). \* Diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

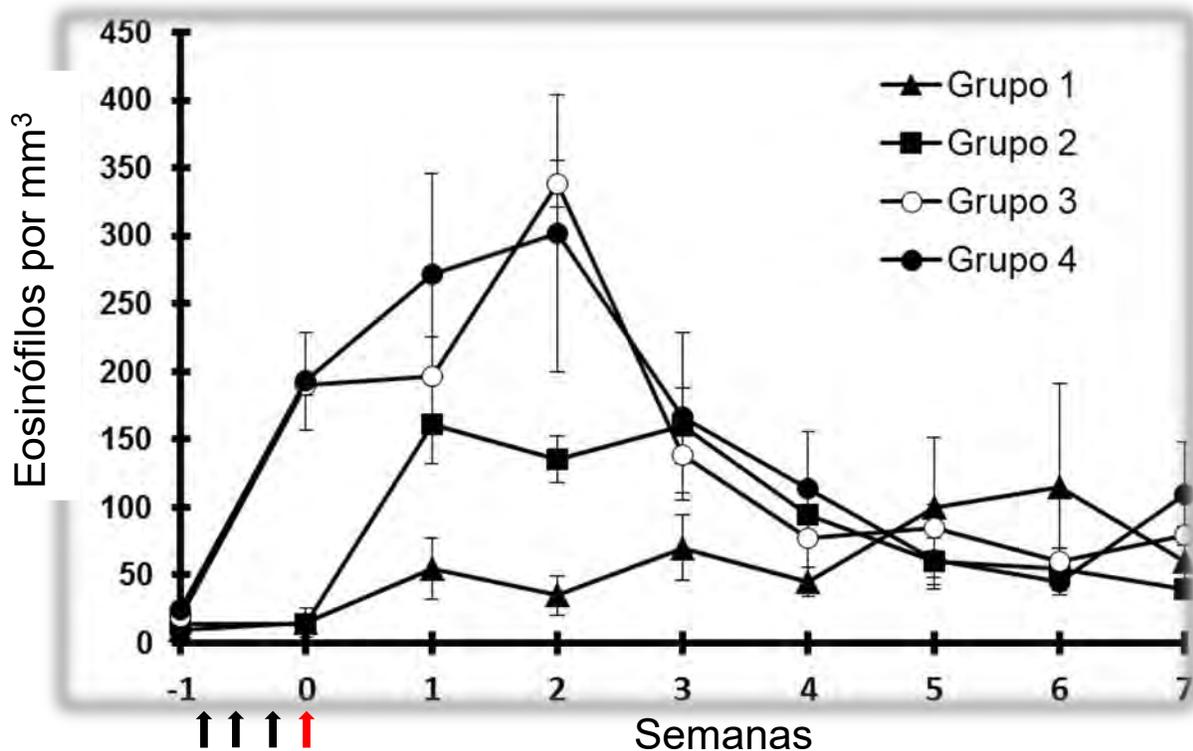


Figura 4. Promedios ( $\pm$ EE) de la cantidad de eosinófilos sanguíneos en corderos testigo (Grupo 1), corderos infectados con 5,000 L3 de *H. contortus* (Grupo 2), corderos inoculados con un concentrado vesicular de *Taenia hydatigena* (CVTh) e infectados con 5,000 L3 de *H. contortus* (Grupo 3) y corderos solo inoculados con CVTh. Las flechas negras indican el momento de la inoculación del CVTh a los grupos 3 y 4, la flecha roja indica el momento de la infección en los grupos 2 y 3. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias ( $p < 0.05$ ).

## **MEDICIÓN DE CITOCINAS POR ENSAYO INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS**

Los resultados de la medición de diferentes citocinas en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con *H. contortus*, se muestran en las figuras 5 y 6. Con respecto a la *IL-2*, se observó una mayor cantidad ( $p < 0.05$ ) en los cultivos linfocitarios de los corderos del grupo 3 en la semana 1, en los cultivos linfocitarios de los corderos del grupo 4 en la semana 4 y en los cultivos linfocitarios de los corderos del grupo 2 en la semana 7 en relación al resto de los grupos en sus respectivas semanas. Con respecto a la *IL-4*, se observó una mayor cantidad ( $p < 0.05$ ) de esta citocina en los cultivos linfocitarios de los corderos del grupo 4 en la semana 4 y en los cultivos linfocitarios de los corderos del grupo 2 en la semana 7 en relación con los otros grupos en sus respectivas semanas. En la semana 1 no se observaron diferencias en la cantidad de *IL-4* entre los diferentes grupos ( $p > 0.05$ ). En el resto de las citocinas estudiadas, no se observaron diferencias significativas entre sus cantidades producidas por los diferentes grupos ( $p > 0.05$ ). La metodología para la medición de las citocinas estudiadas se encuentra en el anexo 1.

## **EXPRESIÓN GENÉTICA RELATIVA**

Los resultados de la expresión genética relativa de las citocinas evaluadas en la RFA de los corderos experimentales se muestran en la figura 7. Los corderos del grupo 2 sobreexpresaron *IL-4*, *IL-6*, *INF $\gamma$* , *Fc $\epsilon$ R1a* y *TGF $\beta$ 1* mientras que los corderos del grupo 3 sobreexpresaron *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *Fc $\epsilon$ R1a*, *TGF $\beta$ 1* y *SOD1* en esta región. En los corderos del grupo 4 solo sobreexpresaron *Fc $\epsilon$ R1a* y *TGF $\beta$ 1* en esta región.

El resultado de la expresión genética relativa de las citocinas evaluadas en la RPA de los corderos experimentales se muestra en la figura 8. Los corderos del grupo 2 sobreexpresaron *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* y *Fc $\epsilon$ R1a* mientras que los corderos del grupo 3 sobreexpresaron *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *Fc $\epsilon$ R1a*, *TGF $\beta$ 1* y *SOD1* en esta región. Los corderos del grupo 4 no se observó sobreexpresión en esta región.

Los resultados de la expresión genética relativa de las citocinas evaluadas en LNA de los corderos experimentales se muestra en la figura 9. Los corderos de los grupos 2 y 3 sobreexpresaron *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN $\gamma$*  y *TGF $\beta$ 1* mientras que los corderos del grupo 4 solo sobreexpresaron *IL-2*, *IL-5* y *TGF $\beta$ 1* en esta región.

Se observó la subexpresión de *IFN $\gamma$*  y *PRDX6* en la RPA y LNA respectivamente de los corderos del grupo 4 y de *IL-8* en RFA de los corderos del grupo 2.

En el cuadro 4 se muestran las correlaciones encontradas entre diferentes variables estudiadas con el promedio total de HGH de los corderos de los grupos 2 y 3. Se encontró una correlación negativa entre el número de HGH en la semana 7 y el número de ES presentes en la semana 0 del experimento (-0.71, p= 0.07). Las correlaciones positivas más importantes con respecto a la expresión genética relativa de citocinas fueron con *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* y *Fc $\epsilon$ R1a* en el LNA, y ES de las semanas 1 y 2 en la RFA. Las correlaciones negativas fueron con la expresión de *IFN $\gamma$*  en la RFA y con la expresión de *IL-5* e *IL-8* en la RPA.

En el anexo 1 se muestran los resultados de análisis de expresión relativa (Fold change) basados en el cálculo de la  $\Delta\Delta C_T$  con respecto al gen endógeno  *$\beta$ -actina* de cada grupo experimental.

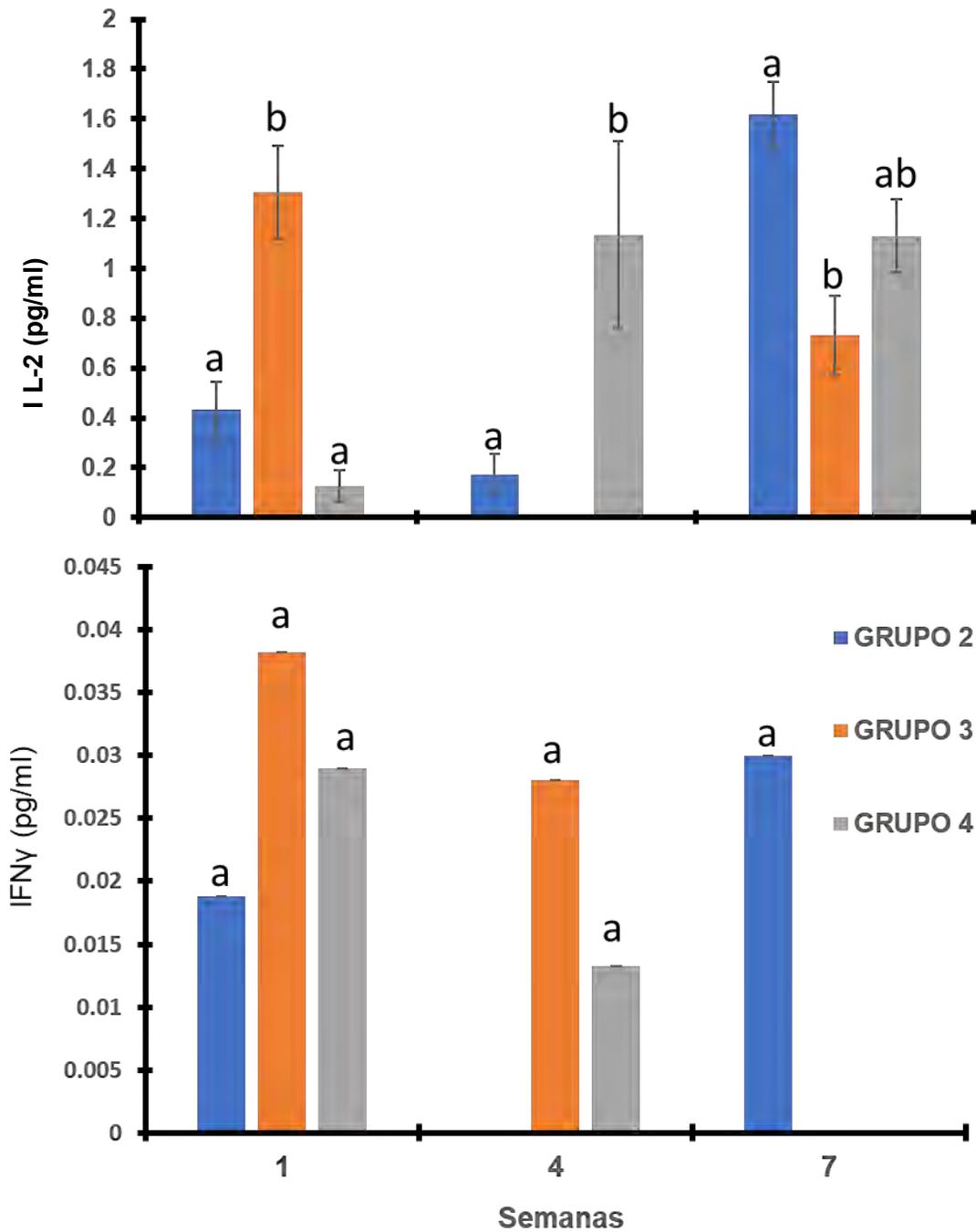


Figura 5. Promedios ( $\pm$ EE) de los niveles de citocinas del perfil Th1 en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con *Haemonchus contortus*. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias ( $p < 0.05$ ).

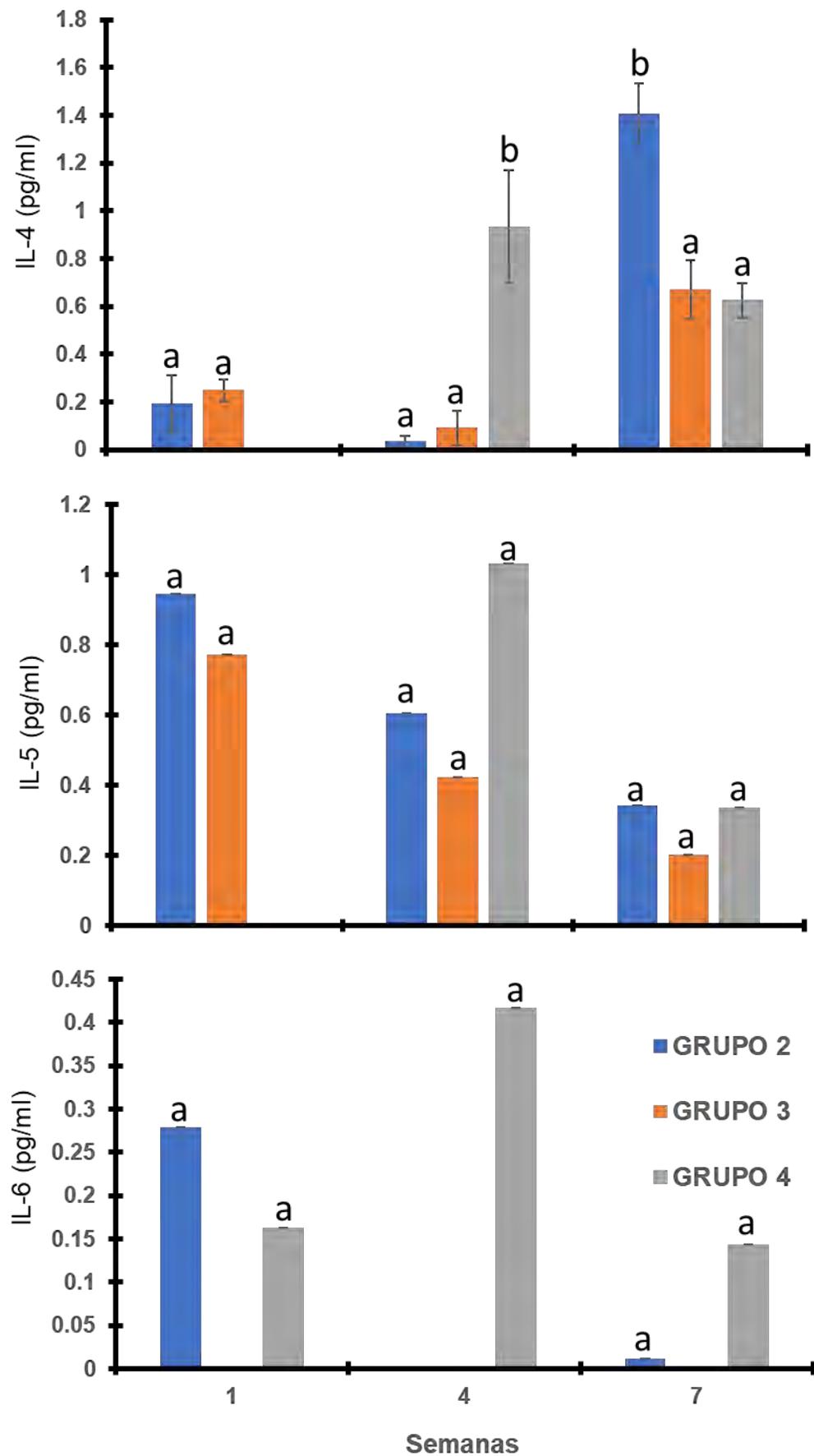


Figura 6. Promedios ( $\pm$ EE) de los niveles de citocinas del perfil Th2 en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con *Haemonchus contortus*. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias ( $p < 0.05$ ).

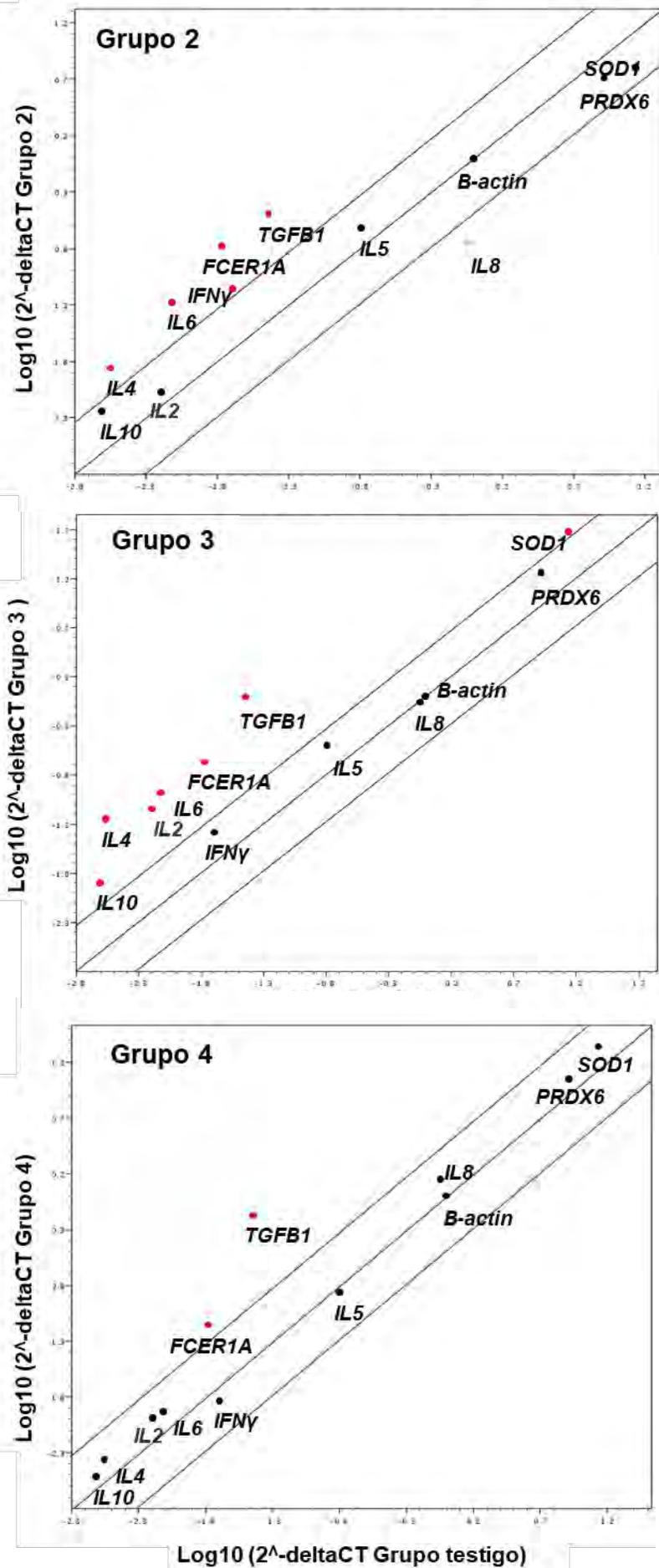


Figura 7. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en la región fúndica abomasal (RFA), de corderos con y sin protección inducida previo a la infección con *Haemonchus contortus*.

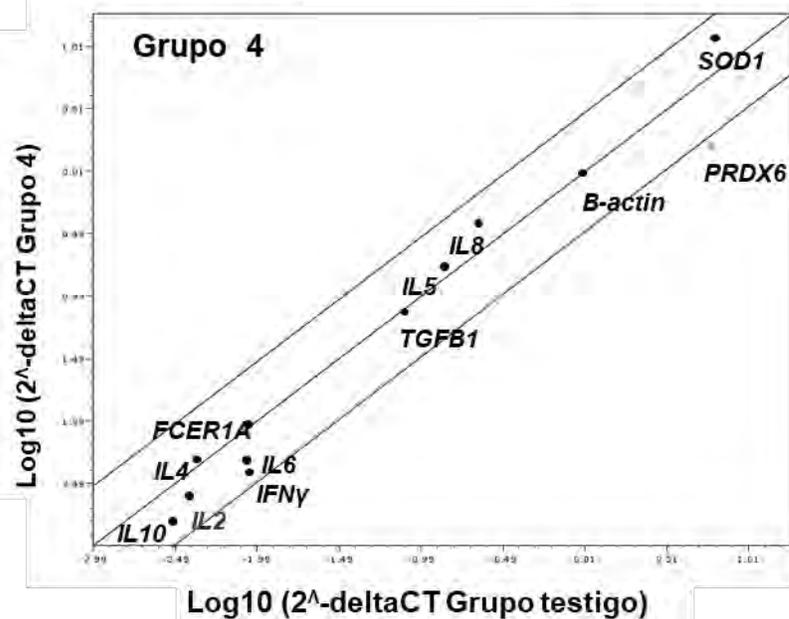
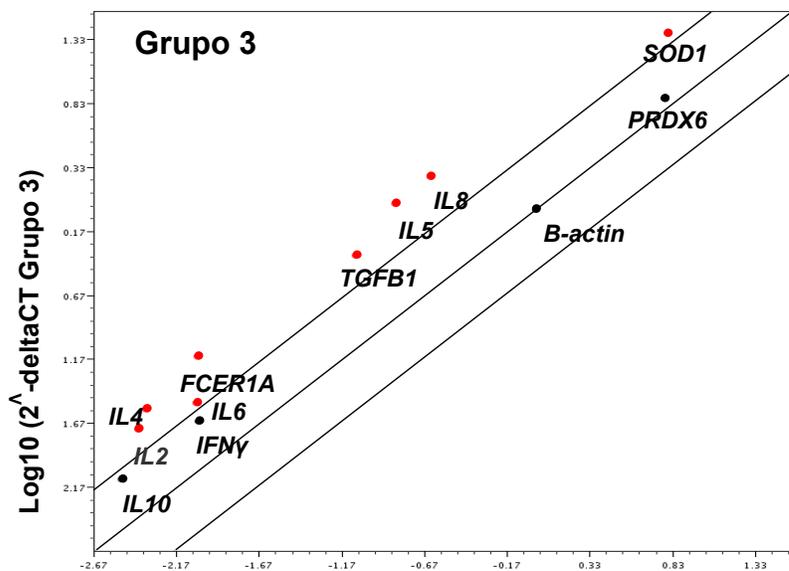
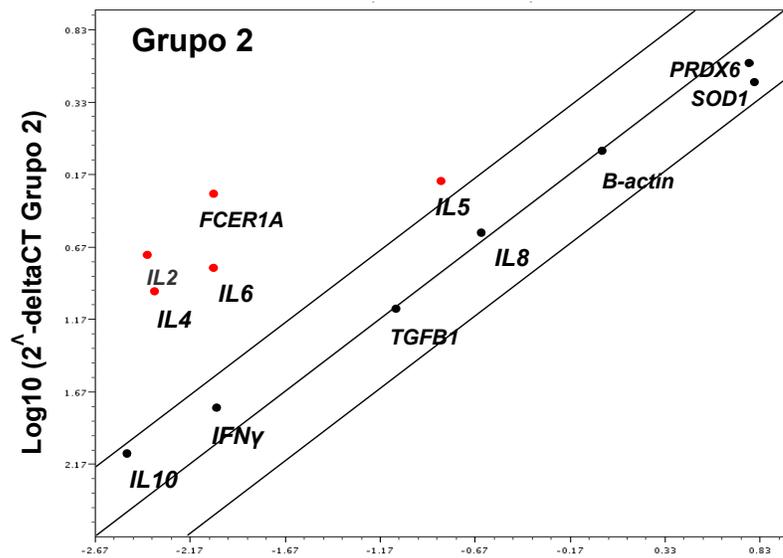


Figura 8. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en la región pilórica abomasal (RPA), de corderos con y sin protección inducida a la hemoncosis.

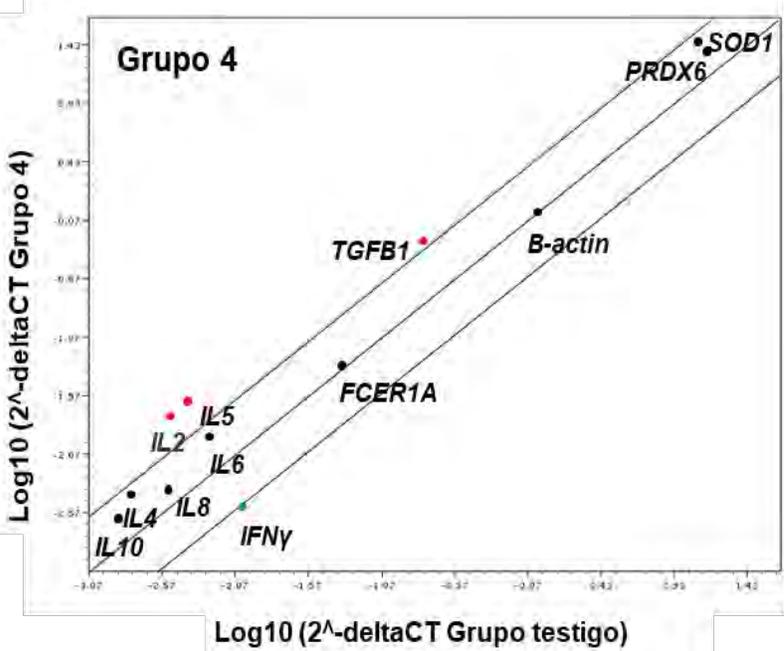
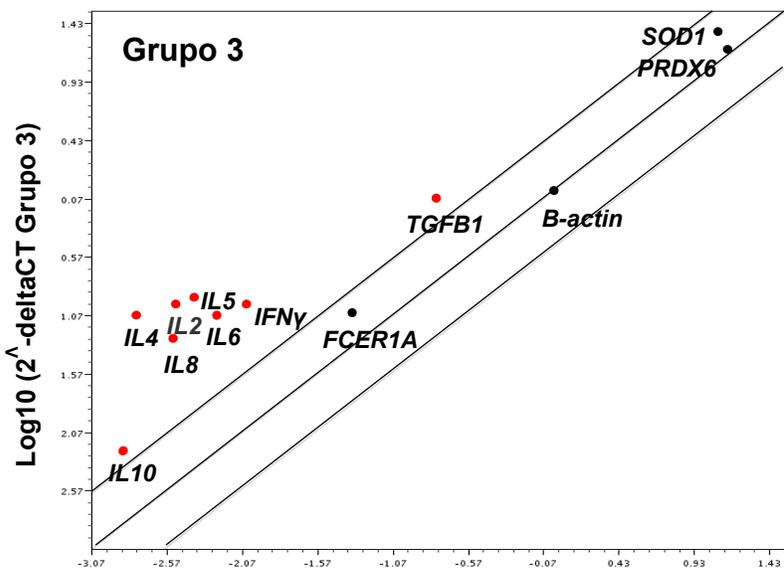
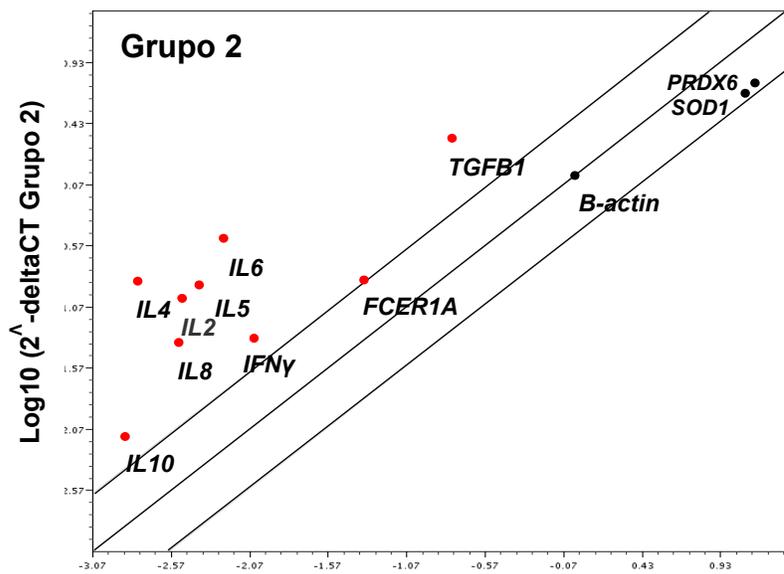


Figura 9. Expresión relativa de diferentes citocinas estudiadas en linfonodo abomasal (LNA), de corderos con y sin protección inducida a la hemoncosis

Cuadro 3. Correlaciones más importantes encontradas entre la eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* (HGH) y diferentes variables estudiadas en los corderos experimentales.

HGH vs.	Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	Valor de $p$
ES semana 0	-0.71	0.07
ES semana 1	0.88	0.04
ES semana 2	0.88	0.04
Expresión de citocinas en LNA:		
IL-2	0.82	0.04
IL-4	0.75	0.08
IL-5	0.95	0.002
IL-6	0.86	0.02
Expresión de FCeR1a	0.80	0.05

Cuadro 4. Expresión relativa<sup>1</sup> de RNAm codificador de diferentes interleucinas en tres regiones abomasales de corderos con infección con *H. contortus* y corderos que recibieron un concentrado vesicular de *Taenia hydatigena* (CVTh) previo a la infección con *H. contortus*

TEJIDO	GRUPO <sup>2</sup>		
	2	3	4
<b>RFA</b>	↑IFN $\gamma$ (3.5) ↑IL-4 (4.9)* ↑IL-6 (6.9)* ↓IL-8 (0.2)	↑IL-2 (11.2)* ↑IL-4 (20.3)* ↑IL-6 (13.7)* ↑IL-10 (5.0)*	---
<b>RPA</b>	↑IL-2 (47.2) ↑IL-4 (24.4) ↑IL-5 (4.2) ↑IL-6 (17.4)	↑IL-2 (4.8) ↑IL-4 (6.3) ↑IL-5 (7.8)* ↑IL-6 (3.5) ↑IL-8 (7.8)*	---
<b>LNA</b>	↑INF $\gamma$ (5.3)* ↑IL-2 (32.8) ↑IL-4 (84.0) ↑IL-5 (32.0) ↑IL-6 (55.0)* ↑IL-8 (14.8)* ↑IL-10 (5.5)*	↑INF $\gamma$ (37.2) ↑IL-2 (33.5)* ↑IL-4 (51.1)* ↑IL-5 (29.7) ↑IL-6 (14.5) ↑IL-8 (18.2)* ↑IL-10 (4.2)	↑IL-2 (5.7)* ↑IL-5 (5.8)* ↓INF $\gamma$ (0.3)

<sup>1</sup> las flechas indican en cada grupo la sobreexpresión (↑) o subexpresión (↓) de cada citocina con respecto al grupo 1. Se presenta entre paréntesis el *fold change* de cada citocina que indica el número de veces que se expresa cada gen con relación a la  $\beta$ -actina y a la expresión en el grupo testigo (grupo 1).

<sup>2</sup> los grupos experimentales recibieron los siguientes tratamientos: Grupo 2, corderos solo infectados con *H. contortus*; grupo 3, corderos inoculados con el CVTh previo a la infección con *H. contorus* y grupo 4, corderos inoculados sólo con el CVTh.

\* Valor de  $p < 0.2$ .

## DISCUSIÓN

La resistencia de los ovinos a la hemoncrosis está sustentada en su capacidad para responder inmunológicamente a *H. contortus*. Esta resistencia se ha relacionado a la presencia de células efectoras como eosinófilos, mastocitos, leucocitos globulares y linfocitos T, y a la presencia de algunas moléculas entre las más importantes, citocinas (Angulo-Cubillán *et al.*, 2007). Estudios recientes realizados por este grupo de investigación, demostraron que la inoculación de un CVTh disminuye significativamente el establecimiento de *H. contortus* y produce un mayor número de eosinófilos en corderos (Cuenca-Verde, 2008; Cuenca-Verde *et al.*, 2011). Posteriormente se asoció la protección inducida por el CVTh a una mayor cantidad de células productoras de citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10* e *IFN $\gamma$*  en el abomaso de corderos infectados (Buendía- Jimenez *et al.*, 2015) por lo que se sugirió un efecto inmunomodulador del CVTh. Los resultados del presente estudio mostraron que la protección inducida por el CVTh contra *H. contortus* en corderos Columbia, se produce al mismo tiempo que la sobreexpresión genética de algunas citocinas en el abomaso de los corderos y que algunas de estas citocinas están correlacionadas a la carga parasitaria, lo que probablemente modifica la susceptibilidad de los corderos.

Se ha observado que pueden existir efectos antagónicos entre especies parásitas en un hospedador, por ejemplo: en el caso de los ovinos, la infección con *Oestrus ovis* puede producir disminución de la carga parasitaria por nematodos gastroentericos como *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Dorchies *et al.*, 1997; Yacob *et al.*, 2004). En estudios previos realizados por nuestro grupo, se reportó la capacidad de un extracto proteico del metacestodo de *T. hydatigena* para inducir una reducción en la carga parasitaria de *H. contortus* en corderos a la cual se le denominó protección inducida (Cuenca-Verde *et al.*, 2011; Buendía-Jiménez *et al.*, 2015). En este trabajo se observó que los corderos que recibieron el CVTh antes de la infección eliminaron una menor cantidad de HGH que los corderos que no lo recibieron ( $p < 0.05$ ), los promedios totales fueron de 6,703 ( $\pm 1,420$ ) y de 8,190 ( $\pm 2,156$ ) HGH respectivamente, lo que significó una

reducción del 44 % por efecto de la inoculación del extracto. Cuenca-Verde *et al.* (2011) y Buendía-Jiménez *et al.* (2015) observaron respectivamente reducciones del 54.5% y del 41% en la eliminación de HGH en corderos a los que se les administró CVTh en relación con corderos a los que no les fue administrado. La diferencia en el nivel de protección observada entre los estudios mencionados puede deberse principalmente a que en cada experimento se utilizó un lote diferente de CVTh.

Para la preparación del CVTh los metacestodos utilizados fueron obtenidos en diferentes lugares y no se utilizaron inhibidores de proteasas en su elaboración, por lo que su vida en almacenamiento fue muy corta, esto imposibilitó la utilización del mismo lote para todos los estudios. Si bien, los resultados previos y los obtenidos en este estudio confirman un efecto protector del CVTh contra la hemoncosis ovina, dicho efecto puede variar dependiendo posiblemente de factores como la procedencia de los metacestodos, edad de los mismos u otros. El aislamiento, caracterización y mantenimiento de una cepa de *T. hydatigena* para la elaboración del CVTh y el estudio de los componentes activos del mismo, podrían ayudar a mejorar y homogeneizar el efecto protector observado.

La eosinofilia es uno de los principales signos de infección por helmintos, en particular observado en la hemoncosis ovina. Algunos autores han descrito a los eosinófilos tisulares en la mucosa abomasal como efectores importantes en la respuesta a *H. contortus* (Meeusen y Balic, 2000; Reinhardt *et al.*, 2011; Balic, 2002; Terefe *et al.*, 2005), por lo que los niveles de eosinófilos sanguíneos se han relacionado con la resistencia a la hemoncosis ovina (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006). En el presente trabajo se observó que el CVTh, indujo un aumento de los niveles de ES ( $p < 0.05$ ) en los corderos a los que les fue suministrado (grupos 2 y 3). Además, se observó que los niveles de ES en la semana 0 (momento de la infección) tuvieron una correlación negativa ( $r = -0.71$ ,  $p = 0.07$ ) con la carga parasitaria medida por el número de HGH en los corderos que fueron infectados. Lo anterior sugiere que la menor cantidad de HGH en los corderos del grupo 3 (CVTh+ infección) con respecto a los del grupo 2 (sólo infección) está relacionado

a la inducción de un mayor número de ES en estos corderos por efecto del CVTh. Estos resultados son similares a los observados en los estudios anteriormente citados (Cuenca-Verde *et al.*, 2011; Buendía-Jiménez *et al.*, 2015) donde también se reportaron correlaciones negativas entre la carga parasitaria y la eosinofilia ( $r = -0.54$  y  $r = -0.71$  respectivamente). Varios autores han encontrado también evidencia de la relación entre la eosinofilia y baja carga parasitaria por *H. contortus*, por ejemplo: Bricarello *et al.* (2004) y Figueroa-Castillo *et al.* (2011), reportaron una correlación de -0.5 entre la cantidad de HGH y la cantidad de ES, mientras que Lacroux *et al.* (2006), reportaron una correlación de -0.41 entre estas dos variables. La constante asociación de niveles elevados de ES con baja carga parasitaria y en particular, la asociación de la eosinofilia producida por el CVTh con la protección inducida (reducción de la carga) lograda en este estudio, sugieren que los niveles de ES pueden ser un buen indicador de la protección inducida por el CVTh y que en futuros estudios pueda ser utilizada para estimar indirectamente el nivel de protección.

Algunos autores han reportado la presencia de citocinas del perfil Th2 en mucosa y linfonodo abomasal en respuesta a la infección por *H. contortus* en ovinos de razas naturalmente resistentes a la hemoncosis (Gill *et al.*, 2000; Schallig, 2000; Balic *et al.*, 2000a). En el presente estudio se observó que la administración del CVTh (grupo 4) indujo en los cultivos linfocitarios de corderos sacrificados en la semana 4 p.i. la producción de una mayor cantidad ( $p < 0.05$ ) de citocinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-6) que los cultivos de corderos que sólo fueron infectados (grupo 2), y de los que antes de la infección recibieron el CVTh (grupo 3). Sin embargo, este efecto ya no fue observado en los corderos de este grupo sacrificados en la semana 7. Lo anterior sugiere un efecto estimulador del CVTh para la producción de citocinas del perfil Th2 el cual se mantiene sólo durante algunas semanas.

Por otro lado, se observó que la administración del CVTh previo a la infección con *H. contortus* (grupo 3) indujo en cultivos linfocitarios de los corderos sacrificados en la semana 1 p.i. la producción de mayores cantidades de IL-2 e

IFN $\gamma$  que los cultivos de corderos que solo fueron infectados (grupo 2). Ambas citocinas pertenecen al perfil Th1 y frecuentemente se ha observado la presencia de IFN $\gamma$  en la respuesta a *H. contortus*, sobre todo en etapas tempranas de la infección (Meeusen *et al.*, 2005; Schallig, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de todas las citocinas estudiadas indican una posible respuesta temprana Th1 seguida de una respuesta Th2 posterior.

La expresión de RNAm codificador de diferentes citocinas asociadas a la infección por nematodos gastroentéricos o su relación con la resistencia a los mismos, ha sido observada por diferentes autores. En general, tanto la infección como la resistencia a *H. contortus* se ha relacionado más a la sobreexpresión genética de citocinas de respuesta Th2 (Meeusen *et al.*, 2005; Lacroux *et al.*, 2006; Ibelli *et al.*, 2011; Zaros *et al.*, 2014), sin embargo, algunos estudios han encontrado asociación de infección/resistencia a la respuesta Th1 (Schallig *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 2005; McKinnon *et al.*, 2009), por lo que no existe claridad al respecto. En este estudio los corderos que sólo fueron infectados con *H. contortus* (grupo 2), sobreexpresaron IFN $\gamma$  (Th1), IL-4 e IL-6 (Th2) en la RFA y sobreexpresaron IL-2 (Th1), IL-4, IL-5 e IL-6 (Th2) en la RPA. Adicionalmente, sus cultivos linfocitarios produjeron citocinas de ambos perfiles: Th1 (IL-2) y Th2 (IL-4). En los corderos del grupo 3, la administración del CVTh previo a la infección, promovió la sobreexpresión de IL-10 (Th2) en la RFA y de IL-8 (Th2 y pro-inflamatoria) en la RPA al mismo tiempo que promovió una menor expresión de IFN $\gamma$  (Th1) en la RFA y de IL-2 (Th1) en la RPA (cuadro 4). Lo anterior parece indicar un efecto promotor del CVTh de una respuesta tipo Th2 pro-inflamatoria en la mucosa abomasal. Meeusen *et al.* (2005), reportaron que el desafío con 50,000 L3 de *H. contortus* en corderos indujo la expresión tanto de IFN $\gamma$  e IL-2 (perfil Th1) como de IL-4 e IL-5 (perfil Th2). Por otro lado, McKinnon *et al.* (2009), reportaron la sobreexpresión de IL-2 y del receptor beta para IFN $\gamma$  en razas ovinas de pelo resistentes a la hemoncosis. Los resultados de los estudios anteriormente mencionados junto con los resultados obtenidos en el presente estudio parecen indicar que la dicotomía Th1/Th2 en la respuesta a la hemoncosis no está estrictamente polarizada y que la administración del CVTh en corderos promueve

la expresión genética de citocinas Th2 y la subexpresión de citocinas del perfil Th1.

Otros autores han relacionado la susceptibilidad a diferentes nematodosis incluyendo la hemoncosis, con una respuesta tipo Th1 (Else y Finkelman, 1998; Zaros *et al.*, 2010). En este contexto, se utilizó una raza ovina altamente susceptible a la hemoncosis y se observó en los corderos solo infectados con *H. contortus* (grupo 2) la sobreexpresión de IFN $\gamma$  e IL-2 en las tres regiones abomasales estudiadas. Sin embargo, en corderos de la misma raza, infectados con la misma carga parasitaria y mantenidos bajo las mismas condiciones, la administración del CVTh (grupo 4) indujo una expresión normalizada de IFN $\gamma$  e IL-2 en la mucosa abomasal, mientras que en LNA se observó la subexpresión de IFN $\gamma$ . Esto sugiere que el CVTh tiene capacidad de suprimir parte de la respuesta Th1 de corderos susceptibles confiriéndoles probablemente de esta forma resistencia a la hemoncosis.

Por otra parte, ha sido demostrado que algunas citocinas como IL-4 IL-5, IL-6 e IL-13 confieren protección a infecciones causadas por parásitos dentro de los cuales se considera la hemoncosis (Else y Finkelman, 1998; Claerebout *et al.*, 2005; Craig *et al.*, 2007; Zaros *et al.*, 2010). En este estudio los corderos que sólo fueron infectados con *H. contortus* (grupo 2), sobreexpresaron IL-4, IL-5 e IL-6 en las tres regiones del abomaso, además la expresión de estas tres citocinas correlacionó positivamente con la carga parasitaria, lo cual sugiere que la presencia del parásito es la que estimula la producción de estas citocinas. Por su parte en los corderos que se les administró CVTh previo a la infección (grupo 3), se observó también sobreexpresión de las tres citocinas mencionadas anteriormente, sin embargo, en general se observó una menor intensidad en relación con los corderos del grupo 2. Los resultados anteriores sugieren que el CVTh regula la expresión de estas citocinas y su presencia podría ser más consecuencia de la infección que la causa de protección.

El daño tisular causado por la presencia y acción de *H. contortus* en la mucosa abomasal produce la atracción de células inflamatorias (neutrófilos,

eosinófilos y mastocitos) productoras de especies reactivas de oxígeno (ERO) como parte de sus mecanismos de defensa contra el parásito. Las ERO son inactivadas por mecanismos reguladores como las enzimas antioxidantes *PRDX6* y *SOD1* en los ovinos (Maza, 2015; Estrada-Reyes *et al.*, 2017). En este estudio se observó la sobreexpresión del gen *SOD1* en la RFA y RPA de los corderos a los que les fue administrado el CVTh previo a la infección con *H. contortus* (grupo 3) pero no en los corderos que solo fueron infectados (grupo 2) o a los que solo se les administró el CVTh (grupo 4). Además, en la RPA también se sobreexpresó IL-8 la cual es una citocina promotora de inflamación. Estos resultados sugieren que la administración del CVTh induce la activación de mecanismos protectivos en la mucosa abomasal contra el estrés oxidativo producido por la presencia de *H. contortus*, lo cual puede redundar en un efecto positivo y quizá en la protección inducida.

La selección de los genes utilizados para el presente trabajo, así como el análisis de la expresión relativa utilizando el método de la  $\Delta\Delta C_T$ , se basó en estudios previamente reportados (Robinson *et al.*, 2010; Miller y Horohov, 2006). La expresión relativa de cada citocina fue determinada a través de la normalización de la expresión en relación con la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -*actina*, donde los niveles de su expresión son constantes (Rena y Yong, 2013). En este estudio se cuantificó el grado de expresión genética relativa de cada citocina, sin embargo, se debe de tomar en cuenta que en el proceso de traducción del RNAm a proteína, la expresión de información puede ser inhibida por RNA de interferencia (RNAi) o mecanismos de regulación pos-traduccionales que produzcan la supresión de la expresión fenotípica de la citocina por lo cual no siempre existe correlación entre la cantidad de RNAm y de proteína expresada. En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron consistentes con los obtenidos en un estudio previo (Buendía-Jiménez *et al.*, 2015) en el que se contó el número de células positiva a diferentes citocinas (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) en la mucosa abomasal. En ambos estudios se observó que la administración del CVTh produjo el aumento de la expresión (genética y fenotípica respectivamente) de todas las citocinas mencionadas, tanto del perfil Th1 como

del perfil Th2, confirmando la capacidad del CVTh para estimular inespecíficamente la respuesta inmune. Futuros estudios en donde se fraccione el CVTh permitirán establecer que componente o componentes son los responsables de la protección observada y de los efectos sobre el sistema inmune de los ovinos.

## CONCLUSIONES

- Los corderos que recibieron el CVTh antes de la infección con *H. contortus* eliminaron una menor cantidad de HGH que los corderos que no lo recibieron, lo que significó una reducción del 44% de la carga parasitaria.
- El CVTh indujo eosinofilia en los corderos a los que les fue suministrado, la cual correlacionó negativamente con la cantidad de HGH en los corderos infectados.
- Los perfiles de citocinas producidos por los cultivos celulares de LNA en los corderos sugieren que el CVTh tiene un efecto estimulador para la producción de citocinas del perfil Th2, sin embargo, también fue observada una respuesta temprana de citocinas del perfil Th1.
- Los resultados obtenidos indican que la dicotomía Th1/Th2 en la respuesta por citocinas a la hemoncosis no está estrictamente polarizada.
- La sobreexpresión de SOD1 e IL-8 en la mucosa abomasal inducida por el CVTh en los corderos, sugiere la activación de mecanismos protectivos contra el estrés oxidativo producido por la presencia de *H. contortus*, lo cual podría coadyuvar a la protección inducida.
- La administración del CVTh en corderos promovió la sobreexpresión genética de citocinas Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) y la menor expresión de citocinas del perfil Th1 (IFN $\gamma$  e IL-2) en la mucosa abomasal.

## REFERENCIAS

Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. Capitulo 1: Propiedades generales de la respuesta inmunitaria, Inmunología celular y molecular 3ra. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España, 2004. pp. 4-15.

Achi, Y.L., Zinsstag, J., Yao, K., Yeo, N., Dorchie, P., Jacquet, P., 2003. Host specificity of *Hemonchus spp.* for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory coast. *Vet. Parasitol.* 116, 151-158.

Aguilar, J.A.C., De Gives, P.M., López-Arellano, M.E., Hernández, E.L., 2008a. Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamyospore for the control of ovine haemonchosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 161-163.

Alba-Hurtado, F., Romero-Escobedo, E., Muñoz-Guzmán, M.A., Torres-Hernández, G., Becerril-Pérez, C.M., 2010. Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 172, 277-282.

Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A, Huntley, J.F., Mazzolin, L.P., Gomes, J.C., 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific Immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 128, 99-107.

Angulo-Cubillán, F.J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., de la Fuente, C., Alunda, J.M. 2007. *Haemonchus contortus*-Sheep Relationship: A review. *Revista Científica, FCV-LUZ/Vol. XVII, N° 6, 577-587.*

Araújo, J.V., Neto, A.P., Azevedo, M.H.F., 1996. Screening parasitic nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48, 543-552.

Armour, J., 1980. The epidemiology of helminth disease in farm animals. *Vet. Parasitol.* 6, 7-46.

Balic, A., 1999. Immunobiology of *Haemonchus contortus* infections in sheep. Ph.D. Thesis, The university of Melbourne, Australia.

Balic, A., Bowles, V.M., Meussen, E.N.T., 2000a. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181-241.

Balic, A., Bowles, V.M., Meussen, E.N.T. 2000b. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75, 109-120.

Balic, A., Bowles, V.M., Meussen, E.N.T. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39-46.

Baker, R.L., Nagda, S., Rodriguez-zas, S.L., Southey, B.R., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W., 2003. Resistance and resilience to gastrointestinal nematode parasites and relationships with productivity of Red Massai and Dorper and Red Massai X Dorper crossbred lambs in the sub-humid tropics. *Anim. Sci.* 76, 119-136.

Bishop, S.C., Stear, M.J., 2001. Inheritance of faecal egg counts during early lactation in Scottish Blackface ewes facing mixed natural nematode infections. *Anim. Sci.* 73, 389-395.

Bouix, J., Krupinski, J., Rzepeki, R., Nowosad, B.1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *Int. J. Parasitol.* 28, 1797-1804.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248- 254.

Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Vas, C.M.S.L., Golcalves de Goncalves, I., Echeverria, F.A.M. 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Criuola Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Rumin. Res.* 51, 75-83.

Buendía-Jiménez, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Vega-López, M.A., Cuenca-Verde, C., Martínez-Labat, J.A., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F. 2015. Partial protection and abomasal cytokine expression in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and pre-treated with *Taenia hydatigena* vesicular concentrate. *Vet. Parasitol.* 211, 60-66.

Campos, A.K., Araújo, J.V., Guimarães, M.P., Dias, A.S., 2009. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitol. Res.* 105, 913-919.

Camargo, E., Nakamura, P., Vas, A., Silva, M., Chieffi, P., Melo, E. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 34, 55-60.

Capitini, L.A., McClure, K.E., Herd, R.P., 1990. Effect of environmental stimuli on pre-infective and infective stages of *Haemonchus contortus* in the Northern United States for the induction of hypobiosis. *Vet. Parasitol.* 35, 281-293.

Claerebout, E., Vercruyssen, J. 2000. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: A review. *Parasitol.* 120, 25-42.

Claerebout, E., Vercauteren, I., Geldhof, P., Olbrechts, A., Zarlenga, D.S., Goddeeris, B.M., Vercruyse, A. 2005. Cytokine response in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia Ostertagi* infection. *Parasite Immunol.* 27, 325-331.

Collins, R.A., Sopp, P., Parsons, K.R., Morrison, W.I., Howard, C.J. 1996. What are the cells and molecules involved in stimulating bovine  $\gamma/\delta$  T cells?. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 93.

Craig, N., Smith, D., Pate, J., Morrison, I., Knight, P. 2014. Local cytokine transcription in naïve and previously infected sheep and lambs following challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res.* 9,10-87.

Cuéllar, O.J.A. Nematodiasis gastroentérica, Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Editores Pijoan A.C., Tortora P.J. UNAM-Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán, México, 1986. pp.112-118.

Cuenca-Verde, C. 2008. Efecto del aumento de eosinófilos sanguíneos inducido con Ag de metacestodo de *Taenia hydatigena* sobre el establecimiento de larvas de *Haemonchus contortus* en ovinos inoculados experimentalmente. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México City. 311, 71 pp.

Cuenca-Verde, C., Buendía-Jiménez, J.A., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F. 2011. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. *Vet. Parasitol.* 177, 332-338.

De Lucas, T.J., Arbiza, A.I.S. Producción ovina en México, Producción ovina en el mundo y en México. Editores Mexicanos Unidos S.A. México D.F., México. 2000. 83-136.

Dissanayake, S., Shahin, A., 2007. Induction of interferon-gamma by *Taenia crassiceps* glycans and Lewis sugars in naïve BALB/c spleen and peritoneal exudate cells. *Molecular Immunol.* 44, 1623-1630.

Dobson, A.P., 1985. The population dynamics of competition between parasites. *Parasitology* 91, 317-347

Dominguez- Toraño, I.A., Fernandez-Perez, F.J., Gomez-Muñoz, M.T., Alunda, J.M., Cuquerella, M., 2003. Humoral and cellular response in lambs vaccinated against *Haemonchus contortus* with p26/22. *Parasitol. Immunol.* 50, 29-37.

Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Van Khanh, N., Morand, S., 1997. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? *Parasitol. Res.* 83, 727-730.

Douch, P.C.G., Morum, P.E., Rabel, B. 1996. Secretion of antiparasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissue and isolated mucosal mast cells. *Int. J. Parasitol. Res.* 26, 205-211.

Else, K.L., Finkelman, F.D., 1998. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitol.* 28, 1145-1158.

Estrada-Reyes, Z., López-Arellano, M.E., Torres-Acosta, F., López-Reyes, A., Lagunas-Martínez, A., Mendoza-de-Gives, P., González-Garduño, R., Olarzá-Jenkins, S., Reyes-Guerrero, D., Ramírez-Vargas, G. 2017. Cytokine and antioxidant gene profiles from peripheral blood mononuclear cells of Pelibuey lambs after *Haemonchus contortus* infection. *Parasite. Immunol.* 39, 12427.

Eysker, M., Ploeger, H.W., 2000. Value of present diagnostic methods of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitol.* 120, 109-119.

Falcone, F.H., Pritchard, D.I., Gibbs, B.F. 2001. Do basophils play a role in immunity against parasites?. *Trends Parasitol.* 17, 126-129.

Fawzi, E.M., González-Sánchez, M.E., Corral, M.J., Alunda, J.M., Cuquerella M. 2015. Vaccination of lamb with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211, 54-59.

Fakae, B.B., Chiejina, S.N., Benhke, J.M., Ezeok-onkwo, R.C., Nnadi, P.A., Onyenwe, W.I., Gilbert, F.S., Wakelin, D., 1999. The response of Nigerian West Africans Dwarf goats to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 66, 147-158.

Figuroa-Castillo, J.A., Méndez-Medina, R.D., Berruecos-Villalobos, J.M., Gayosso-Vásquez, A., Ulloa-Arvizu, R., Acosta-Rodríguez, R., Pérez-Ramírez, H. 2011. Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 77, 339- 344.

Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schoft, L., Urban Jr., J.F. 2006. Interleukine-4 and interleukine-13 mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Inmunol. Rev.* 201, 139-155.

Filella, X., Molina, R., Ballesta, A.M., 2002. Estructura y función de las citocinas. *Med. Integr.* 39, 63-71.

Fox, M.T., Jacobs, D.E., 1991. Blood gastrin and pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 263-267.

Gatongi, P.M., Prichard, R.K., Ranjan, S., Gathuma, J.M., Manyua, W.K., Cheruiyot, H., Scott, M.E. 1998. Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet. Parasitol.* 77, 49-61.

Gill, H.S., Colditz, I.G., Watson, D.L. 1993. Immune responsiveness of lambs selected for resistance to haemonchosis. *Res. Vet. Sci.* 54, 361-365.

Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J., 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology.* 99, 458-462.

Gómez-Muñoz, M.T., Cuquerella, M., Gomez, I.L.A., Méndez, S., Fernández, P.F.J., Fuente, C. 1999. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection in challenge: Relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81, 281-293.

Gossner, A. G., Venturina, V. M., Shaw, D. J., Pemberton, J. M., Hopkins, J. 2012. Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. *Vet. Res.* 43, 43-26.

Hertzberg, H., Gucetti, F., Lischer, C., Kolher, L., Neiger, R., Eckert, J., 2000. Evidence for a parasite-mediated inhibition of abomasal acid secretion in sheep infected with *Ostertagia leptospicularis*. *Vet. J.* 159, 238-251.

Hein, W.R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., Meeusen, E.N., 2000. Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasite Immunol.* 32, 241-248.

Hober, E., Lichtenfels, J., Gibbons, L., 2004. Phylogeny for species of the genus *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *J. Parasitol.* 90, 1378-1386.

Hohenhaus, M.A., Outteridge, P.M. 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Brit. Vet. J.* 151, 119-140.

Howard, C.J., Brooke, G.P., Werling, D., Sopp, P., Hope, J.C., Parsons, K.R., Collins, R.A. 1999. Dendritic cells in cattle: Phenotype and function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 119-124.

Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.P.R. 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasitol. Immunol.* 6, 371-390.

Ibelli, A.M.G., Nakata, L.C., Andréo, R., Cotinho, L.L., Oliveira, M.C.S., Amarante, A.F.T., Furlong, J., Zaros, L.G., Regitano, L.C.A. 2011. mRNA profile of Nellore calves after primary infection with *Haemonchus placei*. *Vet. Parasitol.* 176, 195-200.

Johnstone, C. 1998. *Parasitos y enfermedades parasíticas de los animales domesticos*. Pennsylvania University.

Karanu, F.N., McGuire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E., Jasmer, D.P., 1997. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19, 435-445.

Klion, A.D., Nutman, T.B. 2004. The rol of eosinophils in host defense againts helminths parasites. *J. Allerg. Clinic. Immunol.* 113, 30-37.

Khoontawad, J., Wongkham, C., Hiraku, Y., Yongavanit, P., Prakobwong, S., Boonmars, T., Pinlaor, P., Pinlaor, S. 2010. Preteomic identification of peroxiredoxin 6 for host defense against *Opisthorchis viverrini* infection. *Parasite immunol.* 32, 314-323.

Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicitics and unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-622.

Lapage, G. 1976. *Parasitología veterinaria*. Editorial continental. México. 121-127.  
L. Coop, I. Kyriazakis., 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants, *Trends Parasitol.* 17, 325-330.

Le Jambre, L.F. 1995. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *Int. J. Parasitol.* 25, 269-263.

Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Hoberg, E.P., 1994. New morphological carácter for identifying individual especimens of *Haemonchus spp.* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and key to especies in ruminants of north America. *J. Parasitol.* 80, 107-119.

Linares, I.H., Arellano, M.E.L., De-Gives, P.M., Hernández, E.L., De-La-Parra, A.B., 2008. Lethal activity of two *Bacillus thuringiensis* strains against *Haemonchus contortus* histotropic larvae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 164-166.

Llerandi-Juárez, R.D., Mendoza-de Gives, P., 1998. Resistance of chlamydo spores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. *J. Helminthol.* 72, 155-158.

López, M.E., Flores, J., Mendoza, P., Vázquez, V., Liébano, E., Bravo, A., Herrera, D., Godínes, E., Vargas, P., Zamudio, F., 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* toxin

as an alternative method of control against *Haemonchus contortus*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 347-354.

Luffau, G., Vutien, Khang, J. 1990. Resistance to experimental infection with *Haemonchus contortus* in Romanov sheep. Genetics Selection and Evolution. 22, 205-209.

Macaldowie, C., Jackson, F., Huntley, J., Mackellar, A., Jackson, E. 2003. A comparison of larval development and mucosal mast cell responses in worm-naive goat yearling kids and lambs undergoing primary and secondary challenge with *Teladorsagia circumcincta*. Vet. Parasitol. 114, 1-13.

MacKinnon, K.M., Burton, J.L., Zajac, A.M., Notter, D.R. 2009. Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 130, 210-220.

Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda- Soberanis, L., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2007. Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles improves the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. Vet. Parasitol. 146, 66-76.

Maza, L.J., 2015. Respuesta periférica a la infección por el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus* en corderos Pelibuey bajo condiciones de pastoreo. Tesis. Jiutepec, Mor.

McClure, S.J., Davey, R.L., Emery, D.L., Colditz, I.G., Lloyd, J.B., 1996. In vivo depletion of T- cells and cytokines during primary exposure of sheep to parasite. Vet. Immunol. Immunopathol. 54, 83-90.

Meana M.A., Rojo V.F.A. 1999. Tricostrogilosis y otras nematodosis. En: Parasitología veterinaria. Edit. por Cordero, C.M. Rojo V.F.A. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

Meeusen, E.N.T. 1999. Immunology of helminth infection, with special reference to immunopathology. Vet. Parasitol. 84, 259-273.

Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V. 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematodes parasites. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 121-125.

Meeusen, E.N.T., Balic, A. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. Parasitol. Today. 16, 95-101.

Miller, H.R.P. 1996. Prospects for the immunological control of ruminants gastrointestinal nematodes: natural immunity, Can it be harnessed?. Int. J. Parasitol. 26, 801-811.

Miller, J.E., Bahirathan, M., Lamerie S.L., Hembry., F.G., Kearney, M.T., Barras, S.R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native Sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 74, 55-74.

Miller, J.E., Horohov, D.W. 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. J. Anim Sci. 84, 124-132.

Mulcahy, G., O'Neill, S., Donnelly, S., Dalton, J.P., 2004. Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. Adv. Drug. Deliv. Rev. 56, 853-868.

Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Kari, M., Owango, M.O., Duncan, J.L.1996. Response of Dorper and Red Massai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infection. Res. Vet. Sci. 61, 218-221.

Muñoz, G.M.A. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Haemonchus contortus* en razas de alta y baja susceptibilidad. Tesis doctoral, UNAM. México, 2007.

Muñoz- Guzmán, M.A., Cuéllar-Ordaz, J.A., Valdivia-Anda, G., Buendía-Jimenez, J.A., Alba-Hurtado, F., 2006. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemoncosis. Can. J. Anim. Sci. 86, 363-371.

Ojeda-Robertos, N.F., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Aguilar-Caballero, A.J., 2005. Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. J. Helminthol. 79, 151-157.

Pacheco, A.M.J., López, A.M.E., Ramirez, V.G., Reyes, G.D.E, Masa, L.J., González, R., Santamaría, M., López, R.A., Olarzarán, J.S., 2015. Expresión de genes asociados a la respuesta inmune y a los factores del estrés en tejido abomasal de ovinos Pelibuey infectados naturalmente con *Haemonchus contortus*. Mem. Congreso de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Ciudad de México. 2016.

Parker, C.F., McClure, K.E., Herd, R.P.1993. Hair sheep potential for especific environmental condition and production systems in North America. Mem Sexto Congreso de Producción Ovina. Cd. Valles San Luis Potosí.

Perez, J., Garcia, P.M., Hernandez, S., Martinez-Moreno, A., De las Mulas, J.M., Camara, S., 2001. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* 32, 463-473.

Pernthaner, A., Vlassoff, A., Douch, P.G., Maass, D.R., Cytokine mRNA and IFN- $\gamma$  production in nematode resistant and susceptible line lambs artificially infected with gastrointestinal nematodes., 1997. *Acta Parasitol.* 42, 55-61.

Pernthaner, A., Cole, S.A, Morrison, L., Hein, W.R. 2005. Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect. Immun.* 73, 2175-2183.

Quiroz, R.H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 2da. Ed. Limusa. México D.F. México, 2000.

Rena, L., Yong, S., 2013. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci.* 13, 747-751.

Reinhardt, S., Scott, I., Simpson, H.V. 2011. Neutrophil and eosinophil chemotactic factors in the excretory/ secretory products of sheep abomasal nematode parasites: NCF and ECF in abomasal nematodes. *Parasitol. Res.* 109, 627-635.

Robinson, N., Piedrafita, D., Snibson, K., Harrison, P., Meeusen, E.N. 2010. Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunization and challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* 41, 37-47.

Rowe, J.B., Nolan, J.V., De chaneet, G., Teleni, E. 1988. The effect Haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *Brit. J. Nut.* 59, 125-139.

Sangter, N.C. 1995. Introduction to Symposium on Recent Research on *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 25, 1271-1272.

Saddiqi, H.A., Jabbar, A., Sarwa, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M. Shazad, A. 2011. Small ruminants resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *haemonchus contortus*. *Parasitol Res.* 109, 1483-1500.

Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D. 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Vet. Parasitol.* 181, 239-247.

Sher, A., 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 10, 385-409.

Schallig, H.D., 2000. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 120, 63-72.

Siwela, A.H., Mambvura, C.I., Masanganize, K.E., Dube, S. 2010. Oxidative stress associated with nematode infection in sheep: a preliminary study. Int. J. Biol. Chem. Sci. 4, 235-240.

Scott, I., Dick, A., Irvine, J., Stear, M.J., McKellar, Q.A., 1999. The distribution of pepsinogen within the abomasa of cattle and sheep infected with *Ostertagia spp.* and sheep infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 82, 145-159.

Segura-Velázquez, R., Fragoso, G., Sciutto, E., Sarukhan, A., 2009. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. Clinical and Vaccine Immunology 16, 1338-1343.

Simcock, D.C., Joblin, K.N., Scott, I., Burgess, D.M., Rogers, C.W., Pomroy, W.E., Simpson, H.V., 1999. Hypergastrinaemia, abomasal bacterial population densities and pH in sheep Infected with *Ostertagia circumcincta*. Int. J. Parasitol. 29, 1053-1063.

Simpson, H.V., 2000. Pathophysiology of parasitism abomasal: Is the host or parasite responsible?. Vet. J. 160, 177-191.

Singh, S., Yadav, C.L., Bannerjee, D.P. 1997. Comparison of the post-pasture rise in faecal egg counts in of indigenous and cross-bred ewes. J. Helminthol. 71, 249-252.

Smith, H.E., Jacobs, R.M., Smith, C., 1994. Flow cytometric analysis of ovine peripheral blood lymphocytes. Can. J. Vet. Res. 58. 152-155.

Soulsby, E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª Ed. Interamericana México.

Stear, M.J., Henderson, N.G., Kerr, A., McKellar, Q.A., Mitchell, S., Seeley, C., Bishop, S.C. 2002. Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish blackface lambs. Parasitol. 124, 553-560.

Tato, P., White, A.C., Willms, K., Rodríguez, D., Solano, S., Sepúlveda, J., Molinari, J.L., 1996. Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. Parasitol. Res. 82, 590-597.

Terefe, G., Lacroux, C., Andreolitti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Boiux, J., Dorchies, P., Jacquet, P., 2007. Immune response to *Haemonchus contortus*

infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol.* 29, 415-424.

Terefe, G., Yacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dumas, E., Bergeaund, J.P., Dorchies, P., Hoste, H., Jacquiet, P., 2005. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* 128, 271-283.

Torres, A.J.F., Aguilar, C.A., 2000. Nematodos gastrointestinales de caprinos y ovinos en el trópico: Control integral. Notas de curso Medicina y enfermedades infecciosas de pequeños rumiantes en el trópico. Yucatán, México. 114-117.

Torres, H.G., Castillo R.H., López L.R. 1994. Resultados preliminares con ovinos florida en el trópico mexicano. Mem. Sexto Congreso Nacional de Producción Ovina. Toluca, México.

Waller, P.J., 1999. International approaches to the concept of integral control of nematode parasites of livestock. *J. Parasitol.* 29, 155-164.

Van Wyk, J.A. and Bath, G.F., 2002. THE FAMACHA© system for managing for haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animal for treatment. *Vet. Res.* 3, 509-529.

Yacob, H.T., Dorchies, P., Jacquiet, P., Bleuart, C., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Hoste, H., 2004. Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by a subsequent infection with *Oestrus ovis*. *Vet. Parasitol.* 121, 297-306

Yaswinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Morgan, G.W., Linnerud, A.C. 1980. *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. *J. Anim. Sci.* 51, 279-284.

Zaros, L.G., Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Kooyman, F.N.J., De Vries, E., Coutinho, L.L. 2010. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Vet. Parasitol.* 171, 68-73.

Zaros, L.G., Neves, M.R.M., Benvenuti, C.L., Navarro, A.M.C., Sider, L.H., Coutinho, L.L., Vieira, L.S. 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 113, 1155-1161.

Anexo 1. Resultados de análisis de expresión relativa (Fold change) basados en el cálculo de la  $\Delta\Delta C_T$  con respecto al gen endógeno  $\beta$ -actina.

Gene Symbol	LNA- Grupo 2	
	Fold Change	p-value
IL2	32.84	0.34
IL4	84.01	0.34
IL5	32.05	0.31
IL6	55.04	0.22
IL8	14.87	0.19
IL10	5.55	0.19
IFNy	5.32	0.14
FCER1A	3.14	0.34
TGFB1	12.48	0.34
SOD1	0.39	0.36
PRDX6	0.40	0.36
B-actin	1	0

Gene Symbol	LNA- Grupo 3	
	Fold Change	p-value
IL2	33.59	0.29
IL4	51.17	0.27
IL5	29.70	0.33
IL6	14.57	0.32
IL8	18.22	0.16
IL10	4.28	0.35
IFNy	37.27	0.31
FCER1A	1.93	0.79
TGFB1	5.13	0.90
SOD1	1.85	0.60
PRDX6	1.13	0.46
B-actin	1	0

Gene Symbol	LNA- Grupo 4	
	Fold Change	p-value
IL2	5.77	0.24
IL4	2.33	0.26
IL5	5.88	0.01
IL6	2.09	0.30
IL8	1.40	0.94
IL10	1.77	0.97
IFNy	0.31	0.64
FCER1A	1.04	0.57
TGFB1	3.44	0.69
SOD1	2.31	0.66
PRDX6	1.63	0.51
B-actin	1	0

Gene Symbol	RFA- Grupo 2	
	Fold Change	p-value
IL2	5.77	0.24
IL4	2.33	0.26
IL5	5.88	0.01
IL6	2.09	0.30
IL8	1.40	0.94
IL10	1.77	0.97
IFNy	0.31	0.64
FCER1A	1.04	0.57
TGFB1	3.44	0.69
SOD1	2.31	0.66
PRDX6	1.63	0.51
B-actin	1	0

Gene Symbol	RFA- Grupo 3	
	Fold Change	p-value
IL2	11.24	0.08
IL4	20.35	0.13
IL5	1.97	0.32
IL6	13.73	0.12
IL8	0.96	0.73
IL10	5.07	0.20
IFNy	2.05	0.68
FCER1A	12.86	0.17
TGFB1	27.62	0.00
SOD1	3.42	0.02
PRDX6	2.15	0.00
B-actin	1	0

Gene Symbol	RFA- Grupo 4	
	Fold Change	p-value
IL2	1.63	0.31
IL4	1.58	0.37
IL5	0.85	0.41
IL6	1.55	0.37
IL8	1.57	0.23
IL10	1.24	0.41
IFNy	0.72	0.46
FCER1A	4.19	0.20
TGFB1	18.55	0.32
SOD1	1.59	0.36
PRDX6	1.36	0.37
B-actin	1	0

Gene Symbol	RPA- Grupo 2	
	Fold Change	p-value
IL2	47.28	0.35
IL4	24.42	0.37
IL5	4.27	0.36
IL6	17.42	0.37
IL8	1.14	0.72
IL10	2.53	0.31
IFNy	1.78	0.45
FCER1A	54.56	0.36
TGFB1	0.97	0.64
SOD1	0.46	0.93
PRDX6	0.66	0.92
B-actin	1	0

Gene Symbol	RPA- Grupo 3	
	Fold Change	p-value
IL2	4.81	0.47
IL4	6.32	0.45
IL5	7.83	0.08
IL6	3.51	0.56
IL8	7.88	0.16
IL10	2.48	0.51
IFNy	2.40	0.40
FCER1A	7.93	0.08
TGFB1	5.39	0.15
SOD1	3.76	0.02
PRDX6	1.23	0.42
B-actin	1	0

Gene Symbol	RPA- Grupo 4	
	Fold Change	p-value
IL2	0.64	0.28
IL4	1.15	0.53
IL5	1.23	0.39
IL6	0.56	0.32
IL8	1.70	0.34
IL10	0.51	0.31
IFNy	0.43	0.39
FCER1A	1.05	0.44
TGFB1	0.92	0.49
SOD1	1.89	0.32
PRDX6	0.26	0.84
B-actin	1	0

Números en color rojo indican: Sobreexpresión, en verde: Subexpresión y en negro normalidad.