



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS,
PROLACTINA Y PROGESTERONA EN LARVAS DE *Haemonchus*
contortus.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Ricardo Alfonso Gutiérrez Amézquita

TUTOR

Dr. Fernando Alba Hurtado (FESC-UNAM)

COMITÉ TUTOR

Dra. Yazmín Alcalá Canto (FMVZ-UNAM)

Dr. Jorge Morales Montor (BIOMEDICAS-UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, me brindó la oportunidad de desarrollar mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos que a través del Proyecto PAPIIT-UNAM IN:222316, hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

Al CONACYT por brindarme la beca que me dio sustento durante el tiempo de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado, al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán y a la Dra. Guadalupe Prado Ochoa por brindarme los conocimientos, la oportunidad y la confianza de desarrollarme en el área de investigación durante tanto tiempo.

Al Técnico Académico M. en C. Cesar Cuenca Verde, por el apoyo proporcionado en las actividades realizadas dentro y fuera del laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor Dr. Jorge Morales Montor y Dra. Yazmín Alcalá Canto que tuvieron la disposición de cooperar en el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez y al Dr. Hugo Ramírez Álvarez que sin ser parte del comité tutor, de igual manera cooperaron en el desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado en la revisión de este escrito.

A todos los compañeros del laboratorio de la FESC y Biomédicas que estuvieron durante estos 7 años de trabajo, apoyando en la realización del proyecto.

A mis amigos Veronica (Teresa), Omar (Licenciado), Anitas (Cervantes y Wera), Raquel y Gabriel por el tiempo compartido en esta etapa dentro y fuera del laboratorio.

DEDICATORIAS

A MI MAMA Y MI HERMANA

Por ser la MEJOR familia que pudo existir para mi.

Por ser firmes cuando quizá renuncié y ser mi apoyo cuando hizo falta.

*Simplemente son lo mejor de lo mejor. **LAS QUIERO.***

A MI AMOR BERENJEE ACEVEDO

Por el apoyo, la comprensión, el soporte, el aliento, en pocas palabras...

*por ser mi compañera de viaje **TE AMO.***

El camino lo construimos juntos y este trabajo solo es un paso más.

A MI PAPA

Por los momentos especiales que hemos tenido y tendremos.

Te quiero viejo.

A MI FAMILIA

*Por que sin importar la distancia, el tiempo o el problema siempre
estarán ahí.*

A TODOS USTEDES LES DEDICO ESTE ESCRITO

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos	AF1/AF2: Factor Activador 1/2
cDNA: DNA Complementario	mL: Mililitros
GMPc: Guanosin Monofosfato Cíclico	mm: Milímetros
CHR3: Caenorhabditis Receptor Hormonal	ng: Nanogramos
DAF: Formación Dauer	NK: Natural Killer
DHT: Dihidrotestosterona	NR: Receptor Nuclear
DNAg: DNA Genómico	PBS: Buffer Fosfato Salino
FACS: Buffer de Citometría de Flujo	PCR: Reacción en Cadena Polimerasa
FOX: Fork Head Box	PR-A: Receptor Progesterona A
FSH: Hormona Folículo Estimulante	PR-B: Receptor Progesterona B
g: Gravedades	PR-C: Receptor Progesterona C
HSP: Proteínas de Choque Térmico	rE2: Receptor de Estrógenos
IGF-1: Factor Crecimiento tipo Insulina	RNA_m: RNA Mensajero
L1: Larva primer estadio	rP4: Receptor de Progesterona
L2: Larva segundo estadio	rPRL: Receptor de Prolactina
L3: Larva tercer estadio	SNC: Sistema Nervioso Central
L4: Larva cuarto estadio	TGF-β: Factor Crecimiento Tumoral
LB: Linfocitos B	μl: Microlitros
LH: Hormona Luteinizante	μm: Micrometros
LT: Linfocitos T	μg: Microgramos
IP3: Inositol Trifosfato	<i>H. contortus:</i> <i>Haemonchus contortus</i>
DBD: Dominio de Unión DNA	EC: Extracelular
LBD: Dominio de Unión a la Hormona	IC: Intracelular
MP: Marcador de Peso	TM: Transmembranal

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Hemoncosis.....	6
Hipobiosis.....	9
Alza postparto.....	10
Alza posparto y su relación endocrina.....	11
Parásitos y su relación con las hormonas.....	13
Factores inmunoendócrinos.....	15
Prolactina.....	16
Hormonas esteroideas.....	17
Receptor de prolactina.....	19
Receptor de estrógenos.....	20
Receptor de progesterona.....	21
Estacionalidad de la reproducción y la hemoncosis.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVOS.....	25
HIPÓTESIS.....	26

MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Ubicación.....	27
Material biológico.....	27
Cepa de <i>H. contortus</i>	27
Infección.....	28
Obtención de larvas de <i>H. contortus</i>	28
Tratamientos hormonales.....	29
Medición de larvas.....	30
Análisis morfométrico.....	30
Citometría de flujo.....	30
Inmunofluorescencia.....	31
Diseño de iniciadores.....	32
PCR Punto final.....	33
RESULTADOS.....	35
Tamaño de la larva.....	35
Movimiento larvario.....	41
Morfología de parte anterior de L3/L4.....	44
Relación L3/L4.....	45
Citometría de flujo.....	51
Inmunolocalización.....	56
PCR.....	58
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Adultos de *Haemonchus contortus* en abomaso

Figura 2: Representación del ciclo biológico de *Haemonchus contortus* en ovinos

Figura 3: Representación del rPRL

Figura 4: Representación del Re2

Figura 5: Representación del rP4

Figura 6: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de tratamiento con diferentes concentraciones de progesterona. * indica diferencia significativa ($p < 0.07$), comparado con el grupo testigo.

Figura 7: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de progesterona. Se observa una disminución en el crecimiento en larvas tratadas con 8 ng/mL y un aumento en el crecimiento en larvas tratadas con 160 ng/mL ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los otros grupos de larvas ($p > 0.05$).

Figura 8: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 9: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. Se observa un aumento en el alargamiento ($p < 0.05$) en larvas tratadas con 200 ng/mL comparadas con el grupo testigo. No se observaron diferencias significativas con los demás grupos ($p > 0.05$).

Figura 10: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. * Indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Figura 11: Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de tratamiento con diferentes dosis de prolactina. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 12: Parte anterior de larvas de *Haemonchus contortus*. a) Parte anterior de L3. b) Parte anterior característico de L4. Flecha señala las protuberancias simétricas a lado de la cavidad oral.

Figura 13: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después de 5 días de estimulación con diferentes concentraciones de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

Figura 14: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después de 10 días de estimulación con diferentes concentraciones de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

Figura 15: Relación L3/L4 de *H. contortus* después de la incubación por 5 días de estimulación con concentraciones inferiores a 1 ng/mL de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$); ** muestra diferencia significativa ($p < 0.01$).

Figura 16: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 10 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 17: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 10 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 18: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 5 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 19: Citometría de flujo de células de larvas de *H. contortus*. a) Dot Plot de células de larvas de L3 recién obtenidas. b) Células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas. c) Células positivas al receptor de progesterona en L3 después de cinco días de cultivo sin hormona. d) Células positivas al receptor de progesterona en L3 después de cinco días de cultivo con 8 ng/mL de progesterona.

Figura 20: a) Medía \pm error estándar del porcentaje de células positivas al receptor de progesterona en L3 de *H. contortus* recién obtenidas, L3 cultivadas 5 días en ausencia de P4 y L3 cultivadas 5 días con 8 ng/mL de P4 (* indica diferencia significativa, $p < 0.05$). b) Medía \pm error estándar de la intensidad media de fluorescencia de células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas, L3 cultivadas 5 días en ausencia de P4 y L3 cultivadas 5 días con 8 ng/mL P4.

Figura 21: Citometría de flujo de células de larvas de *H. contortus*. a) Células positivas al receptor de estrógenos α en L3 recién obtenidas. b) Células positivas al receptor de prolactina en L3 recién obtenidas.

Figura 22: Células positivas al receptor de estrógenos α (rE α), receptor de progesterona (rP4) y receptor de prolactina (Rprl) en L3 recién obtenidas, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

Figura 23: Microscopía confocal de larvas recién obtenidas: Paneles izquierdos larvas observadas en filtro de fluorescencia; Paneles centrales larvas observadas en campo claro; Paneles derechos colocación de imágenes. Figuras 23a, 23b, 23c, control negativo; Figuras 23d, 23e, 23f, inmunolocalización de rP4. Figura 23g, 23h, 23i, inmunolocalización de rPRL, Figura 23j, 23k, 23l, inmunolocalización de rE2.

Figura 24: Electroforesis del amplificado del gen del receptor de estrógenos α ; Carril 1: MP, Carril 4 y 6: DNA *H. contortus*, Carril 3 y 5: DNA útero.

Figura 25: Electroforesis del amplificados de componente de membrana 2 del receptor de progesterona; Carril 1: MP, Carril 3 y 5: DNA *H. contortus*, Carril 7 y 8: DNA útero.

Figura 26: Electroforesis del amplificado del receptor de prolactina; Carril 1: MP, Carril 3 y 4: DNA *H. contortus*, Carril 5: DNA útero. c) Gen del receptor de estrógenos α ; Carril 1: MP, Carril 4 y 6: DNA *H. contortus*, Carril 3 y 5: DNA útero

Tabla 1: Medía \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 12 horas, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes dosis de progesterona. Se observa aumento en la motilidad ($P < 0.05$) de las larvas a partir de la concentración de 8 ng/mL en los tres periodos de observación.

Tabla 2: Medía \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 12 horas, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes dosis de prolactina. No se observó diferencia significativa en el movimiento larvario entre tratamiento ni entre los tres periodos de observación ($p > 0.05$).

Tabla 3: Medía \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 0.5, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes dosis de estrógenos. No se observó diferencia significativa en el movimiento larvario entre tratamiento ni entre los tres periodos de observación ($p > 0.05$).

RESUMEN

En este trabajo se identificaron los receptores para progesterona (rP4), prolactina (rPRL) y estrógenos (rE2) en larvas 3 (L3) de *Haemonchus contortus*, así como los efectos sobre la fisiología y comportamiento generados por la adición *in vitro* de diferentes concentraciones de estrógenos, progesterona y prolactina en cultivos de larvas. Se ha relacionado indirectamente el aumento de prolactina sérica con la reactivación de larvas de *H. contortus* alrededor del parto, lo que produce un fenómeno de aumento en la eliminación de huevos (alza posparto), sin embargo, no existen evidencias directas del efecto de la prolactina o de otras hormonas (progesterona y estrógenos) sobre larvas de este parásito. Por lo anterior los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar los efectos directos de estrógenos, progesterona y prolactina sobre el aumento de tamaño, motilidad y porcentaje de muda L3/L4 en larvas de *H. contortus*, B) identificar (citometría) y localizar (microscopia confocal) posibles receptores para dichas hormonas en L3 de *H. contortus*, C) Amplificar por PCR los genes que codifican los receptores para estrógenos, progesterona y prolactina en L3 de *H. contortus*.

Las larvas de *H. contortus* recién obtenidas en promedio midieron 618 ± 15 μm de longitud. Las larvas del grupo testigo (incubadas sin hormonas) crecieron in. Las larvas incubadas durante 5 y 10 días con algunas concentraciones de progesterona tuvieron un mayor aumento de tamaño ($p < 0.05$) que las larvas del grupo testigo. El aumento de tamaño en las larvas incubadas con diferentes concentraciones de prolactina y estrógenos fue variable. En general, las larvas incubadas con concentraciones mayores de 8ng/mL de progesterona presentaron una mayor motilidad que las larvas del grupo

testigo, mientras que la incubación con diferentes concentraciones de prolactina y estrógenos no modificaron su motilidad. Se observó una inhibición concentración dependiente de la muda L3/L4 en L3 incubadas con diferentes concentraciones de progesterona. No se observaron cambios en la relación de L3/L4 en larvas cultivadas con diferentes concentraciones de prolactina y estrógenos.

Por citometría de flujo se demostró que las L3 recién obtenidas presentaron 15% de células con rP4, 10% rE2 y 5% rPRL. Por inmunofluorescencia con microscopia confocal, se encontró el rP4 se localizaba en la luz del tubo digestivo de las L3 y que el rPRL se localizaba en el citoplasma de células intestinales de las L3. Por PCR se amplificaron fragmentos de DNAg de *H. contortus* con peso semejante al rP4 y al rPRL de borregos. Los resultados de este trabajo sugieren que las larvas de *H. contortus* son capaces de reconocer la progesterona y la prolactina del huésped, a través de posibles receptores hormonales y que estas tienen efectos *in vitro* sobre la fisiología y motilidad de L3 de *H. contortus*. La implicación de estos hallazgos sobre la biología de *H. contortus in vivo* debe ser estudiada.

ABSTRACT

In this work progesterone (Rp4), prolactin (rPRL) and estrogen (rE) receptors were identified in *Haemonchus contortus* larvae 3 (L3), as well as the effects on behavior and physiology generated *in vitro* by the addition of different concentrations of estrogens, progesterone and prolactin in larval cultures. It has been related indirectly the rise in seric prolactin with *H. contortus* larval reactivation during partum which produce an increase in the number of eggs excreted (spring rise phenomena); however, there is no direct evidence of the effect of prolactin and other hormones (progesterone and estrogen) on larvae of this parasite. For the above-mentioned, the aim of this study was: a) To evaluate the direct effects of estrogen, progesterone and prolactin on growth, motility and molting process percentage (L3/L4) on *H. contorts* larvae; b) To identify (cytometry) and to locate (confocal microscopy) possible like-receptors for the above-mentioned hormones in *H. contortus* L3; and c) To amplify through PCR genes which codificate estrogen, progesterone and prolactin receptors in *H. contortus* L3.

Newly obtained *H. contortus* larvae measured 618 ± 15 μm in length. The control group (incubated without hormones) grew 67.5 ± 4 μm . The larvae incubated during 5 and 10 days with some progesterone concentrations had a higher rise in length ($p < 0.05$) than control group larvae. Length increase in larvae incubated with prolactin and estrogens was changeful. In general, larvae incubated with concentrations higher than 8 ng/mL of progesterone had more motility than control group larvae; meanwhile, incubation with prolactin and estrogens did not modify its motility. It was observed an inhibition of

molting process (L3/L4) concentration-dependent in larvae incubated with different concentrations of progesterone. No changes were observed in L3/L4 ratio in larvae incubated with different concentrations of prolactin and estrogens.

Through flow cytometry, it was demonstrated that newly obtained L3 cells had 15% of rP4, 10% rE2 and 5% rPRL. Through immunofluorescence, the rP4 were in the digestive tube lumina of L3, and the rPRL was located in the cytoplasm of L3 intestinal cells. Finally, through PCR, fragments of *H. contortus* gDNA were amplified, which had molecular weight related to sheep rP4 and rPRL amplicates. The results of this work suggest that *H. contortus* larvae can recognize progesterone and prolactin from the host, possibly through hormone-like receptors, and that these have direct effects in the physiology and motility of *H. contortus* L3 in vitro. The implication of these findings of *H. contortus* biology in vivo must be studied.

INTRODUCCIÓN

Los ovinos han sido empleados para el beneficio del ser humano desde su domesticación hace aproximadamente 9000 años. Los principales productos que aportan son: carne, leche, piel y lana. En la actualidad existen alrededor de 1,000 millones de cabezas de ovinos en el mundo, produciendo un estimado de 14 millones de toneladas de carne (FAO, 2014), concentrándose mayoritariamente en China, India y Australia (Morris, 2009).

De acuerdo con reportes de la FAO (2014), México se encuentra en el lugar 41 en cuanto a cabezas de ganado ovino, con una población total de 8,575,908. En cuanto a la producción de carne se refiere, México se localiza en el lugar 35, con una producción de 58,288 toneladas, concentrándose el 53% en el centro del país, 24% en el sureste y 23% en el norte (Partida de la Peña et al., 2013).

La producción ovina se desarrolla en países tropicales y templados, debido a la alta concentración de pastizales y/o praderas existentes en su territorio. De esta forma, la gran mayoría de productores se basan en el pastoreo como sistema de producción predilecto, utilizando gramíneas y leguminosas como principales fuentes de alimento (Hodgson *et al.*, 2005), sin embargo, este sistema productivo favorece la transmisión y el desarrollo de parásitos, los cuales provocan pérdidas económicas asociadas a la disminución de parámetros productivos y costos por tratamientos.

Los parásitos comúnmente encontrados en los ovinos de pastoreo están asociados al tracto digestivo, en donde se desarrolla la enfermedad conocida como

verminosis gastroentérica. La verminosis gastroentérica de los ovinos es una enfermedad parasitaria producida por la presencia y acción de nematodos de los géneros: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Strongyloides*, *Skrjabinema*, *Chabertia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, y *Trichuris*. Este padecimiento induce cambios fisiopatológicos dependiendo de la localización y la edad de los animales, entre otros (Roeber *et al.*, 2013, Sánchez-Paredes, 2017). Dentro de los nematodos encontrados destaca *Haemonchus contortus*, el cual es considerado como el principal parásito de ovinos en climas tropicales debido a su alta prolificidad, resistencia y patogenicidad (Quiroz, 1984; Helman, 1984; Angulo-Cubillan *et al.* 2007).

HEMONCOSIS

La hemoncosis es una enfermedad causada por *H. contortus*, el cual es un nematodo hematófago perteneciente a la familia *Trychostrongyloidea*, se localiza en el abomaso de rumiantes domésticos y salvajes, siendo los borregos los más susceptibles; comúnmente se le conoce como gusano del estómago, gusano del cuajar o gusano en palo de barbería. Los machos miden entre 10-20 mm de longitud, se caracterizan por presentar un color rojizo y tener una bolsa copulatriz con un lóbulo dorsal asimétrico; las hembras miden entre 18-30 mm de longitud y tienen la apariencia característica del género, al presentar los ovarios enrollados en el tracto digestivo, semejando un palo de barbería (figura 1). Ambos presentan una lanceta en el extremo anterior, lo que les permite perforar la mucosa para alimentarse (hematofagia). Los adultos llegan a consumir hasta 0.05 mL de sangre por día. *H. contortus* presenta una alta prolificidad, llegando a producir más de 10,000 huevos por día (Schmidt y Roberts, 2000; Bush *et al.*, 2001; Gasse y Samson, 2016).



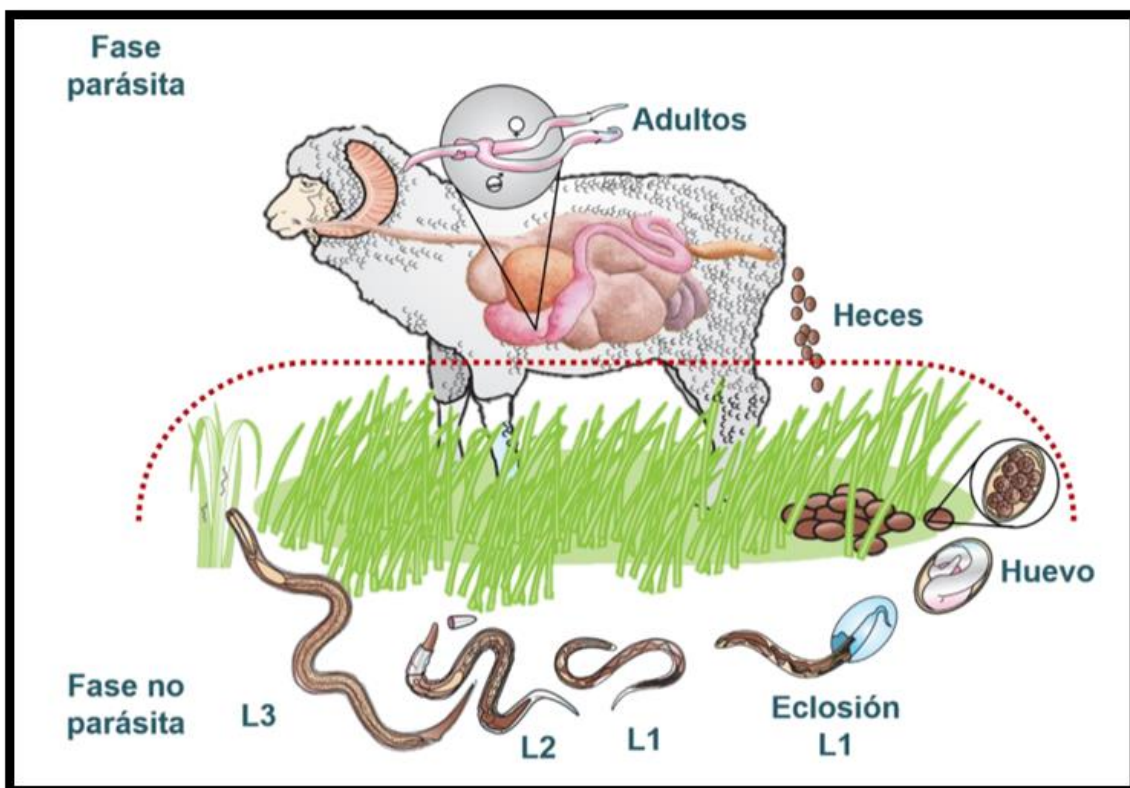
Tomado de Buendía-Jiménez, 2015.

Figura 1. Adultos de *Haemonchus contortus* en abomaso

El ciclo biológico de *H. contortus* es de tipo directo (figura 2), presentando dos etapas: la no parásita en donde se encuentran las fases de huevo, L1, L2 y L3 (infectante), y la etapa parásita, que involucra la muda de L3 a L4 y de L4 a la fase adulta (Quiroz, 1984).

La etapa no parásita inicia cuando el huevo (embrión morulado) sale en las heces; dependiendo de factores ambientales como humedad, temperatura y oxígeno, se desarrolla la L1 dentro del huevo y eclosiona (sale del huevo) en un lapso de dos días; esta se alimenta principalmente de bacterias y muda a L2, posteriormente madura a L3 en un periodo de una semana. La L3 no es capaz de alimentarse debido a que mantiene la muda del estado larvario anterior, por lo que sube a la punta de los pastos para esperar ser ingerida por el hospedero; la L3 es la fase infectante (Quiroz, 1984; Bush et al., 2001).

La etapa parásita inicia cuando el hospedero ingiere la fase infectante, la larva elimina la cutícula en el rumen debido a la secreción de la enzima leucinoaminopeptidasa; se cree que los factores que desencadenan este proceso son la relación bicarbonato (HCO_3^-) / ácido carbónico (H_2CO_3) y los altos niveles de CO_2 presentes en el rumen. Posteriormente la L3 penetra en las glándulas abomasales donde muda a L4 en un periodo de dos días; la L4 se alimenta por 15 días y sale al lumen para convertirse en adulto (machos y hembras). Ya diferenciados sexualmente, se lleva a cabo la cópula. Las hembras fecundadas ovipositan en el abomaso, los huevos son arrastrados por el contenido abomasal e intestinal y son eliminados en heces (Bush et al., 2001, Sutherland et al., 2010).



Tomado de Buendía-Jiménez, 2015.

Figura 2. Representación del ciclo biológico de *Haemonchus contortus* en ovinos

HIPOBIOSIS

La hipobiosis se define como una pausa temporal y reversible en el desarrollo de las fases larvianas de nematodos dentro del hospedero, ocurriendo está en las L4. Este fenómeno sirve para asegurar la supervivencia de la especie cuando las condiciones medio ambientales no son propicias para su especie (Alba-Hurtado, 1983; Gantogi et al, 1998). Los factores que favorecen a esta inhibición son:

- Temperaturas extremas que limitan la supervivencia de la larva (inviernos muy fríos o veranos muy secos y calurosos).
- Presencia de parásitos adultos en el abomaso.
- Inmunidad asociada a exposiciones anteriores con el parásito.

No todas las larvas entran en estado de hipobiosis, aunque los rangos pueden variar de 25 a 95% dependiendo de las condiciones ambientales (Blitz y Gibbs I, 1972; Alba, 1983; Angulo-Cubillan et al, 2007; Sutherland et al, 2010).

El fenómeno de arresto larvario es una característica compartida en diversos géneros de nematodos, tanto parásitos como de vida libre. En este sentido, la mayor parte de los estudios dirigidos al entendimiento del arresto larvario han sido realizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, encontrando que los factores reguladores de este proceso están mediados por factores de crecimiento tipo insulina, así como factores transcripcionales denominados FOX (mamíferos) y DAF (nematodos). Cuando las larvas se encuentran en condiciones apropiadas para su desarrollo, las cinasas del factor de crecimiento tipo insulina fosforilan al factor transcripcional DAF, permitiendo la activación de diversos genes y así continuar con el desarrollo hasta la fase adulta; sin

embargo, cuando las condiciones son desfavorables, la señalización del factor de crecimiento tipo insulina se detiene dejando inactivo el factor DAF y consecuentemente deteniendo el desarrollo larvario (Kenyon et al., 1993; Murphy, 2006).

Estudios realizados por Hu y col. (2010) demostraron la presencia del factor transcripcional DAF en *H. contortus*, encontrando 2 variantes del mismo Hc-daf-16.1 y Hc-daf-16.2. Estos factores se encontraron en los estadios larvales 2, 3 y 4 así como en adultos, encontrándose en una mayor proporción en los estadios de L3 y L4. Al ser comparadas las secuencias de *H. contortus* con *C. elegans*, se encontraron diferencias estructurales, las cuales fueron asociadas a las diferencias en el ciclo de vida.

ALZA POSTPARTO

Se le conoce como “alza postparto” o “spring-rise” al fenómeno parasitario en el cual se presenta un aumento significativo en la eliminación de huevos en heces; la mayor eliminación se produce entre las 4 y 8 semanas después del parto. Se cree que la causa de este aumento en la eliminación de huevos es la reactivación y desarrollo de larvas hipobióticas, mayor implantación de fases adultas, así como un aumento en el tamaño y prolificidad de las hembras parásitas. Como causas de este fenómeno se asume una disminución en la inmunidad, deficiencias nutricionales y cambios hormonales (aumento de la prolactina) derivados del último tercio de la gestación y la lactancia (Blitz y Gibbs II, 1972; Quiroz, 1984; Chartier et al, 1998; Rimbaud et al, 2005).

La inmunidad y la nutrición se han asociado ampliamente con el alza postparto, debido a que durante el periodo periparto la inmunidad de la madre disminuye

considerablemente (Hafez, 2002), además que, en el tercer tercio de la gestación y lactancia, las borregas presentan un elevado gasto energético y disminuye considerablemente su condición corporal. Debido a esto, se cree que el aumento en la liberación de huevos en heces se relaciona positivamente con la relajación de la inmunidad, así como con una deficiencia energética (Barret et al., 2010).

Se ha encontrado que borregas lactantes alimentadas con dietas deficientes en proteína metabolizable eliminan una mayor concentración de huevos en heces, además de alojar una mayor cantidad de parásitos adultos, comparado con borregas lactantes alimentadas con dietas ricas en proteína metabolizable; también se ha visto que la eosinofilia circulante/tisular, así como los anticuerpos en suero, son mayores en borregas no gestantes que en gestantes, independientemente de la dieta (Beasley et al., 2010-I, 2010-II y 2012).

ALZA POSPARTO Y SU RELACIÓN ENDOCRINA

En nematodos de vida libre, la reactivación de larvas en arresto ha sido asociada a factores hormonales, los cuales funcionan como reguladores del desarrollo. En *C. elegans* se ha descrito que el receptor hormonal CHR3 es indispensable para su desarrollo, demostrando que la inhibición del mismo detiene el desarrollo de este nematodo (Kostrouchova et al., 2001). Así como el receptor nuclear CH3, se ha encontrado una red de señalización neuroendocrina asociada a la formación de larvas en diapausa en *C. elegans*. Dentro de las moléculas de señalización reportadas se encuentra: IGF-1, TGF- β , cGMP y serotonina, las cuales al ser activadas convergen en

el receptor nuclear DAF en sus distintas variantes dependiendo de la célula blanco (Gerisch et al, 2001).

En *H. contortus* también se han asociado factores endocrinos en su biología, el sexo y el estado fisiológico, los cuales se han asociado a diferencias en cuanto a susceptibilidad se refiere. Estas variaciones están relacionadas en gran medida a las concentraciones plasmáticas de las diferentes hormonas encontradas, tanto en hembras como machos, así como en las diferentes etapas fisiológicas de las hembras como son la gestación y la lactancia (Barger, 1993).

Los machos presentan una mayor propensión a infestaciones por *H. contortus* con respecto de las hembras, pero este fenómeno puede igualarse cuando las hembras son gonadectomizadas (Barger, 1993). Se ha encontrado que las hembras gestantes/monoparas eliminan hasta el doble de huevos en heces con respecto de las hembras que no han sido empadradas; también en este punto se observó que hembras que presentan abortos o mortinatos eliminan la misma cantidad de huevos que las hembras que no han sido empadradas (Brunsdon, 1967).

También se ha visto que las borregas gestantes presentan una mayor reactivación de larvas hipobióticas con respecto de las borregas vacías y que esta proporción se mantiene durante la lactancia; así mismo, también se observó que las borregas secas después de una reinfestación disminuyen en gran medida su carga parasitaria, contrario a las borregas gestantes y lactantes las cuales mantienen altas cargas parasitarias (Gibbs y Barger, 1986). Por lo anterior, esta alza se ha asociado a la prolactina (Fleming, 1993).

PARÁSITOS Y SU RELACIÓN CON LAS HORMONAS

La evolución en la relación huésped-parásito, ha llevado al desarrollo de diversos mecanismos en el parásito con el fin prolongar y favorecer su establecimiento; uno de los mecanismos descritos ha sido el fenómeno de transregulación, el cual establece que el parásito se beneficia al utilizar ciertas hormonas y algunos factores de crecimiento producidos por el huésped, favoreciendo su implantación y crecimiento (Escobedo et al, 2005).

Para establecer que un parásito tiene la capacidad de aprovechar el ambiente endocrino encontrado en el huésped, es necesario que este exprese moléculas con afinidad a las hormonas (receptores); aparte de esta afinidad, las moléculas tipo-receptor deben ser funcionales (Cervantes y Carrero, 2008). Se ha demostrado que los nematodos poseen un alto número de receptores nucleares (NR), los cuales funcionan como reguladores de la transcripción y señalización en vertebrados e insectos (Hoss y Weltje, 2007).

En algunos parásitos como *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis* y *Dirofilaria immitis* se han identificado receptores nucleares (NR) para testosterona y progesterona cuya función es colaborar en la regulación de la homeostasis (Wu, 2011). Hu y col. (2003) reportaron la presencia del receptor de andrógenos, así como el receptor membranar de progesterona en *Schistosoma mansoni*. Tratamientos *in vitro* de cercarías, esquistosomas y gusanos adultos de *S. mansoni* con dehidroepiandrosterona (DHEA) inhibieron hasta un 100% la viabilidad y oviposición de

estos parásitos, mientras que en el tratamiento con cortisol solo afectó a los gusanos adultos (Liu et al., 2009).

Se ha demostrado que larvas de *Toxocara canis* modifican su longitud y motilidad al ser estimuladas con prolactina y progesterona *in vitro*; de igual manera se encontró la presencia de moléculas semejantes a receptores para las hormonas anteriormente mencionadas en el extremo anterior de las larvas (Chávez-Guitrón, 2016). El rPRL de *T. canis* tiene una homología del 99% comparado con el receptor descrito en caninos (Chávez-Guitrón et al, 2016).

Por otro lado se ha descrito que los cisticercos de *Taenia crassiceps* presentan un receptor de estrógenos (Ibarra, 2011). La aplicación de estrógenos a ratones machos gonadectomizados aumenta la reproducción y la implantación de metacestodos de *T. crassiceps* (incrementa el número de gemas producidas), mientras que la aplicación de testosterona o dihidrotestosterona (DHT) reduce estas funciones. La presencia de estas últimas hormonas en *Trichinella spiralis* favorecen la implantación, afectando principalmente a machos (Klein, 2000).

En *Plasmodium falciparum*, por ejemplo, el tratamiento *in vitro* de merozoitos con cortisol aumenta el número y tamaño de gametocitos de este parásito; por otro lado, los merozoitos tratados con estradiol, progesterona y testosterona, incrementan considerablemente el número de gametocitos producidos *in vitro*, aumentando en los dos casos el crecimiento y la reproducción del parásito en este estadio (Maswoswe et al., 1985). Los trofozoítos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* al ser expuestos constantemente al estradiol, progesterona y testosterona no se ve afectada ninguna

función del parásito; sin embargo, se incrementa la síntesis de ADN y la proliferación de los trofozoítos al ser tratados con cortisol (Escobedo y Morales, 2005).

FACTORES INMUNOENDOCRINOS

Los efectos de las hormonas sexuales (prolactina, estrógenos y progesterona) durante mucho tiempo estuvieron en su mayoría relacionados a los efectos reproductivos como ciclo estral, gestación y lactancia, entre otros. Actualmente se sabe que estas hormonas tienen efectos directos en la respuesta inmune, modificando el tipo celular y/o los mediadores químicos de esta, lo que ha originado un nuevo sistema de interacción conocido como red inmunoendocrina, la cual modifica la respuesta inmune dependiendo de las concentraciones hormonales en el medio (Escobedo et al, 2001; Cervantes y Carrero; 2008).

Se sabe que la progesterona modifica la inmunidad durante la gestación, al disminuir la actividad de linfocitos NK y macrófagos, así como factores transcripcionales proinflamatorios (Klein y Robinson, 2010). Se ha establecido que los linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK expresan receptores para estrógenos; cuando estas células son expuestas a concentraciones de 17β estradiol, modifican la expresión de citocinas en estos. Por ejemplo, los LT CD4 polarizan la respuesta hacia TH1 cuando son expuestos a bajas concentraciones de estrógenos, sin embargo, cuando la concentración de estrógenos aumenta el tipo de respuesta se polariza hacia TH2. De igual manera los estrógenos promueven la proliferación de LT reguladores, así como la proliferación de LB auto reactivos y el aumento en la producción de inmunoglobulinas. En polimorfonucleares, disminuyen la producción de

óxido nítrico, la capacidad de quimiotaxis, y la secreción de citocinas proinflamatorias (Fish.; 2008).

PROLACTINA

La prolactina es la principal hormona asociada a la lactancia, esta es secretada por las células lactótropas de la adenohipófisis; guarda una estrecha relación con la hormona del crecimiento. La prolactina es una hormona peptídica compuesta de 199 aa y presenta tres enlaces disulfuro; los receptores de esta hormona (rPRL) son glicoproteínas monoméricas que atraviesan una sola vez la membrana plasmática y se ubican en diversos tejidos. El aumento de la concentración plasmática de la prolactina se cree es la responsable del aumento de rPRL durante la gestación y la lactancia (Baulieu, 1990; Neville et al, 2002).

La principal función de la prolactina está asociada a la glándula mamaria, en donde estimula la proliferación de células epiteliales, aumenta la síntesis de caseína, lactoalbúmina, ácidos grasos libres y lactosa. Se ha observado que los glucocorticoides (cortisona, cortisol y corticosterona) son esenciales para el funcionamiento adecuado de la glándula mamaria, además de potenciar los efectos de la prolactina al inducir mayor producción de leche y mayor permanencia del RNAm sintetizador de caseína y lactoalbúmina (Baulieu, 1990; Neville et al, 2002).

Los niveles de prolactina en plasma durante la gestación se encuentran en bajas concentraciones (2 a 29 ng/mL), sin embargo, tres días antes del parto, los niveles plasmáticos de prolactina se elevan, alcanzando niveles que van de 100 a 640ng/mL. Los niveles de prolactina disminuyen durante los dos días siguientes al parto, pero al

cuarto día vuelve a subir la concentración plasmática, alcanzado los niveles antes mencionados durante todo el periodo lactacional. Los estrógenos, la oxitocina y los glucocorticoides son hormonas que estimulan la liberación de prolactina, por el contrario, la dopamina es el mediador químico encargado de la inhibición de esta hormona, aunque de igual forma, se ha encontrado que altos niveles de prolactina generan una retroalimentación negativa induciendo su autocontrol (Chamley et al, 1973; Neville et al, 2002).

HORMONAS ESTEROIDEAS

Las hormonas esteroideas son moléculas derivadas del colesterol, las cuales desempeñan diversas funciones vitales en el organismo. Estas se dividen en tres grandes grupos, glucocorticoides donde se encuentra el cortisol; mineralocorticoides donde se encuentra la aldosterona y los sexicorticoides en donde se encuentra la testosterona, el estradiol y la progesterona entre otras (Lehninger, 2004).

Los estrógenos es una familia de hormonas que caracterizan la madurez sexual de las hembras, dentro de estas se encuentra el estradiol, la estrona y el estriol, siendo el estradiol la que mayor potencia tiene en el organismo. Los estrógenos se caracterizan por tener 18 carbonos y provienen del metabolismo de la testosterona a través de la acción de la enzima aromatasa. Los estrógenos son sintetizados principalmente en ovarios, cuerpo luteo y placenta, aunque también son sintetizados en tejido adiposo, hígado, músculo y cerebro. Los estrógenos viajan por torrente sanguíneo acoplados principalmente a la albumina, aunque también pueden viajar unidos a globulinas de unión a esteroides y/o de forma libre (Barret et al., 2010).

Los principales efectos inducidos por los estrógenos están determinados por la localización de sus receptores, teniendo los principales efectos en el tejido reproductor. Estos inducen el desarrollo de los folículos ováricos, el desarrollo del endometrio durante el ciclo estral, así como la contractilidad e irrigación uterina; de igual manera actúan sobre SNC modificando el comportamiento durante el ciclo estral, así como regulando la secreción de hormonas hipofisarias. Los niveles séricos de estrógenos dependen en su totalidad del ciclo estral y la estacionalidad(Hafez, 2010; Lehninger, 2014).

La progesterona es el precursor de la mayoría de hormonas esteroides (gluco, mineralo y sexicorticoides) sintetizadas en el organismo. Esta proviene del metabolismo del colesterol y se caracteriza por tener 21 carbonos dentro de su estructura, aunque la vida media de la hormona en plasma es muy reducida. Dicha hormona se produce en la mayoría de células en donde se sintetizan hormonas esteroides, aunque la principal producción y liberación se da en el cuerpo luteo de gestación (ovarios) y placenta (Botana, 2002).

La principal función de la progesterona está directamente relacionada al útero, manteniendo la viabilidad del endometrio. Uno de sus principales efectos es la capacidad antiestrogénica que tiene, al disminuir la conversión de estradiol y aumentar la síntesis de estrona y estriol; de igual forma inhibe la expresión de receptores a estrógenos, por lo que la excitabilidad y susceptibilidad a oxitocina de las células endometriales disminuye. En SNC la progesterona regula la actividad hipotálamo-hipofisaria, inhibiendo la secreción de LH y FSH, retrasando la síntesis y secreción de estrógenos (Lehninger, 2014).

RECEPTOR DE PROLACTINA

El receptor de prolactina (rPRL) es una proteína transmembranal presente en la mayoría de los mamíferos, este forma parte de los receptores de clase 1, compuestos por tres dominios diferentes; el extracelular (EC), el cual tiene contacto directo con la hormona, el transmembranal (TM), el cual permite el anclaje a la membrana y el intracelular (IC), que genera la señalización y media los efectos de la hormona en las células blanco (Krumenacker, 1998). El rPRL (figura 3) presenta una diversidad de variantes dependiendo de la complejidad presente en los dominios EC e IC, encontrándose en el humano una versión larga, una versión intermedia y dos versiones cortas; por el contrario, en los ovinos solo existe una versión larga, una versión corta y un receptor soluble (www.uniprot.org, Bignon *et al*, 1997).

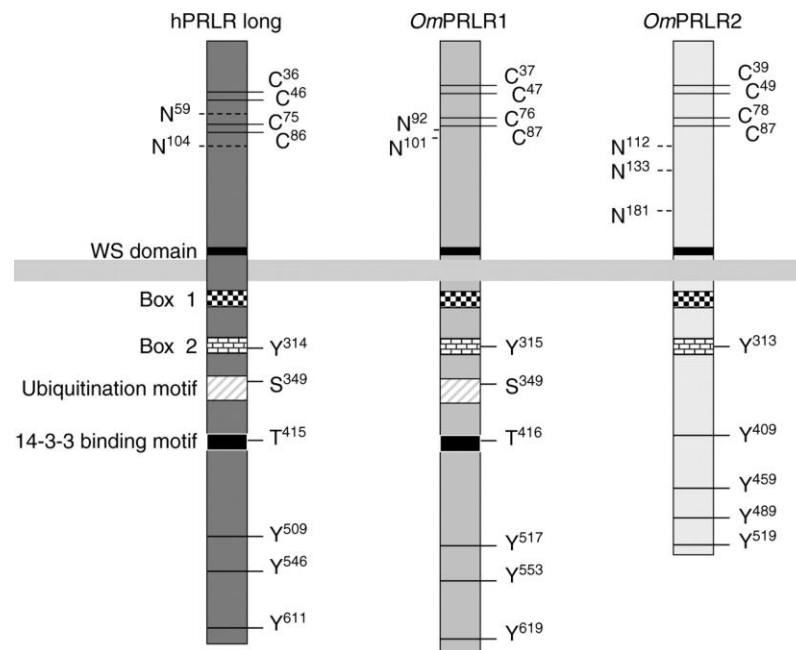


Figura 3. Representación esquemática del Rprl. Tomado de <http://jeb.biologists.org/>

RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

El receptor de estrógenos (rE2) es una proteína localizada en diversos tejidos de mamíferos dentro de los que se encuentran tracto digestivo, genitourinario, tejido hematopoyético etc. Estos receptores (figura 4) forman parte de la familia de receptores esteroideos, mediando las acciones fisiológicas de los estrógenos en las distintas células blanco. Los receptores clásicos reportados presentan dos isotipos, los cuales son el receptor de estrógenos alfa (rE- α) y el receptor de estrógenos beta (rE- β). Estos receptores son codificados por genes diferentes, aunque ambos coexisten en diversos tipos celulares (Levin, 2001), siendo el rE- α el predominante en los tejidos.

Los receptores de estrógenos se encuentran en el citoplasma acoplados a proteínas de choque térmico ya sea como homodimeros o heterodimeros. Estos presentan cinco dominios, de los cuales dos tienen la función de activación génica, el dominio AF-1 no requiere de la unión al estradiol para desempeñar su función reguladora mientras que el dominio AF-2 depende completamente de la interacción con estrógenos para realizar la activación. Una vez que se da la activación del receptor mediada por estrógenos, estos se translocan al núcleo regulando la activación génica de la célula blanco. Estos receptores tienen la capacidad de autorregular su expresión, dependiendo de la concentración de hormona (Gennari *et al*, 2004; Levin, 2001).

Adicionalmente a los receptores clásicos, se han reportado receptores de membrana, los cuales inducen la activación de segundos mensajeros como IP3, fosfolipasa C, cAMP entre otros. Estos receptores membranales no tienen la capacidad

de activarse de manera independiente, por lo que su expresión requiere la interacción con E2.

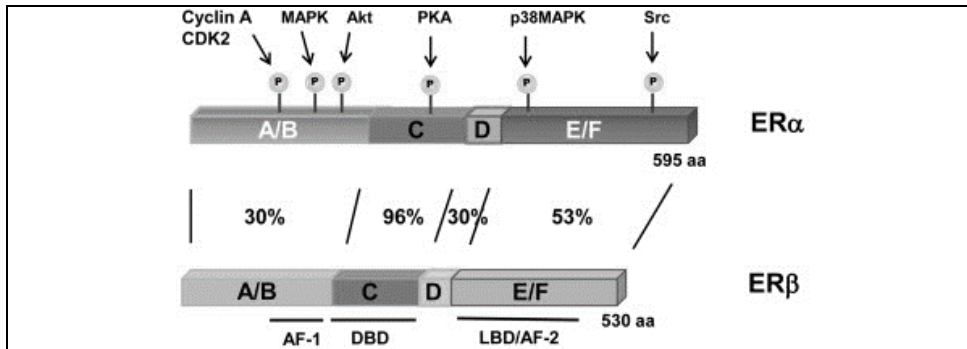


Figura 4: Representación esquemática del rE2. Tomado de <http://caibco.ucv.ve>

RECEPTOR DE PROGESTERONA

El receptor de progesterona (rP4) es una proteína localizada en diversos tejidos de mamíferos dentro de los que se encuentra tracto genitourinario (hembra y macho), cerebro, páncreas, hueso y glándula mamaria. Estos, pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, encontrándose generalmente en citoplasma o núcleo unidos a. El rP4 (figura 5) presenta tres isoformas transcritas dentro del mismo gen, los cuales son PR-A, PR-B y PR-C. Las isoformas A y B están compuestas por 8 exones, mientras que la C solo se compone de 6 (Kowalik et al, 2013). El receptor B está compuesto por 933 aa, mientras que el A se compone de 769 (uniprot.org). En general los receptores A y B se componen de la región de unión a hormona (LBD), región de unión al DNA (DBD) y una región amino terminal compuesta de las fracciones AF-1 e ID, las cuales son responsables de la unión con factores transcripcionales; adicionalmente, el receptor B tiene la fracción AF-3 en la parte amino terminal. El

receptor C nada más presenta la región LBD, aunque puede interactuar con rP-A y B (Mote *et al*, 1999).

Los receptores clásicos se encuentran de forma inactiva asociados a la membrana nuclear o libres en citoplasma, asociados a un complejo proteico formado por “Proteínas de Choque Térmico” HSP90, HSP70, p23 e inmunofilinas. Este complejo proteico favorece la unión con progesterona al dejar libre el dominio LBD; posterior a la unión ligando-receptor, el complejo de chaperonas se disocia permitiendo la translocación del receptor al núcleo. Dentro del núcleo el complejo hormona-receptor se une a dominios conocidos como HRE por sus siglas en inglés, los cuales están en regiones promotoras de genes específicos, induciendo y/o inhibiendo la activación génica. Este efecto trans regulador derivado de la activación clásica de receptores nucleares se considera de largo plazo, ya que tarda horas en inducirse (Kowalik *et al*, 2013).

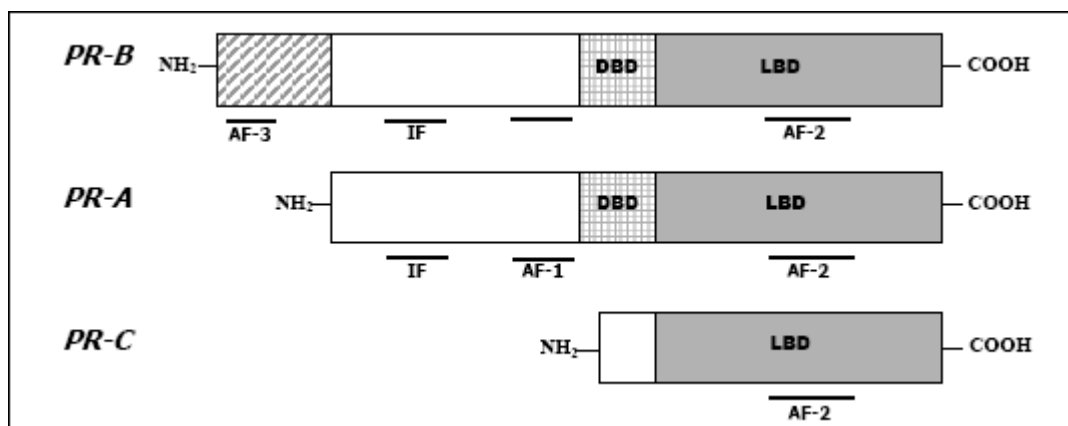


Figura 5: Representación esquemática del rP4. Tomado de <http://jpp.krakow.p>

Aparte de los receptores intracelulares clásicos, se han descrito variantes de receptores asociados a membrana plasmática, considerados de efecto rápido o no

genómico por la activación alterna que presentan. El anclaje de estos receptores se basa en la interacción con proteínas, las cuales le dan su carácter extracelular. Las proteínas descritas hasta el momento con esta capacidad son los componentes de membrana asociados al receptor de progesterona 1 y 2, proteína de anclaje serpin RNAm 1, adipoQ 7 y 8 y progestina entre otros (Intlekofer y Petersen, 2011).

ESTACIONALIDAD DE LA REPRODUCCIÓN Y LA HEMONCOSIS

Las ovejas son especies con actividad ovárica poliéstrica estacional, teniendo actividad reproductiva durante los meses con fotoperiodo corto (agosto a diciembre), siendo más marcada esta característica en latitudes alejadas al ecuador. La gestación dura aproximadamente cinco meses que ocurre durante las estaciones de otoño-invierno, los partos suceden en primavera-verano; Blitz (1972) encontró que el mayor porcentaje de larvas en estado de hipobiosis se encuentra en los meses de noviembre hasta marzo, mientras que el porcentaje más elevado de adultos estaba en los meses de abril a junio (Blitz. 1972a, b; PROGAN 2013).

JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han demostrado la importancia del sistema endocrino en la adquisición, desarrollo, establecimiento y susceptibilidad de infecciones parasitarias en el hospedero. De manera directa se relaciona la interacción del sistema inmunológico con el sistema endocrino, modificando el tipo de respuesta, permitiendo o impidiendo el desarrollo de las parasitosis; sin embargo, se ha demostrado que los parásitos también tienen la capacidad de responder a estímulos hormonales a través de moléculas semejantes a receptores hormonales, modificando su comportamiento fisiológico tanto *in vitro* como *in vivo* (Cervantes y Carrero; 2008). A través de cultivos *in vitro* se puede determinar el efecto que las hormonas ejercen sobre distintos parásitos, al estar expuestos de manera directa. De esta forma, es posible determinar si estas modifican su comportamiento y/o sus parámetros morfofisiológicos.

H. contortus es un nematodo que presenta un fenómeno de aumento en la eliminación de huevos después del parto (alza posparto). Este fenómeno se ha relacionado indirectamente con los altos niveles de prolactina encontrados durante el periodo de lactancia, sin embargo, hasta este momento no hay evidencia del efecto directo de la prolactina ni de otras hormonas asociadas a la gestación (progesterona y estrógenos) sobre larvas de *H. contortus*. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende demostrar la presencia/ausencia de receptores hormonales para estrógenos, progesterona y prolactina en L3 de *H. contortus*. Además, de demostrar *in vitro* el efecto de estas hormonas sobre algunos parámetros morfológicos y fisiológicos de las L3.

OBJETIVOS

- Determinar los efectos *in vitro* de la prolactina, progesterona y estrógenos, sobre el crecimiento, motilidad y viabilidad de L3 de *H. contortus*.
- Medir el efecto de la prolactina, progesterona y estrógenos sobre la muda L3/L4 en larvas de *H. contortus* cultivadas en presencia de dichas hormonas.
- Evaluar por citometría de flujo e inmunofluorescencia la presencia de receptores de estrógenos, progesterona y prolactina en células de larvas *H. contortus*.
- Comparar la cantidad de células que presentan receptores de estrógenos, progesterona y prolactina en larvas *H. contortus* cultivadas en presencia y ausencia de las hormonas respectivas.
- Amplificar por PCR los genes que codifican los receptores para estrógenos, progesterona y prolactina en *H. contortus*.

HIPÓTESIS

Las larvas de *H. contortus* tienen receptores para estrógenos, progesterona y prolactina, los cuales, al ser estimulados *in vitro* con su respectiva hormona, generarán cambios en su fisiología.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN.

El presente proyecto se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Las pruebas de citometría de flujo se realizaron en el laboratorio del Dr. Jorge Morales Montor en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

MATERIAL BIOLÓGICO

Animales

Para el mantenimiento de la cepa de *H. contortus*, se utilizaron corderos de tres a cinco meses de edad, con un peso aproximado de 10 kg, se alojaron en corrales de 5x5 m² y en condiciones libres de nematodos. La alimentación consistió en heno de alfalfa y alimento balanceado comercial para ovinos (14% de proteína) a razón de 4% de peso corporal por día. La alimentación cubrió los requerimientos nutricionales de los corderos, basandose en valores establecidos (Shimada, 2003). Se proporcionó agua *ad libitum*.

CEPA DE *H. contortus*

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica de *H. contortus*, la cual fue aislada de un rebaño ubicado en Jilotepec, Edo. México. Esta cepa ha sido mantenida

a través de infestaciones sucesivas en corderos libres de otros nematodos gastroentéricos y criados bajo completa estabulación. Esta cepa ha sido utilizada en diversos trabajos de investigación (Valdez-Ramírez, 2004; Muñoz-Guzmán et al, 2006; Alba-Hurtado et al, 2010; Cuenca-Verde et al, 2011; Muñoz-Guzmán et al 2012).

INFECCIÓN

Para la obtención de larvas de *H. contortus*, se infestó un cordero con 5000 L3 activas por vía oral. Previo a la infestación, el cordero se desparasitó, para eliminar la carga parasitaria existente y se realizaron exámenes coproparasitológicos para comprobar la ausencia total de helmintos gastroentéricos. A partir los 18 días post infestación se realizaron cada tercer día exámenes coproparasitológicos (McMaster) para cuantificar los huevos de *H. contortus* eliminados en heces del ovino.

OBTENCIÓN DE LARVAS DE *H. contortus*

Para la obtención de L3 de *H. contortus* se hizo cultivo larvario (Alba, 2007). Directamente del recto se tomaron heces del ovino infectado, las cuales fueron colocadas en cajas de Petri chicas, que posteriormente fueron colocadas en cajas de Petri grandes y en el espacio restante se agregó agua corriente, las cajas petri grandes se taparon y se incubaron a 26-28 °C. Se mantuvieron por siete días los cultivos y se colectaron las larvas por medio de la técnica de Baermann.

Para obtener L3 sin cutícula, se tomaron 9.5 mL de L3 del concentrado de larvas obtenidas por la técnica de Baermann, se les agregó 500 µl de hipoclorito comercial (Cloralex), para tener larvas a una concentración final de 0.25%. Se centrifugaron a 600

g por cinco minutos; posterior al centrifugado se eliminó el sobrenadante, se realizaron tres lavados con agua destilada, aforando el sedimento final a 1 mL.

TRATAMIENTOS HORMONALES DE LARVAS

El cultivo *in vitro* de las larvas de *H. contortus* se realizó modificando la técnica descrita por Kotze (2003). Las L3 desenvainadas se incubaron a 37°C por 3 horas en PBS (pH 7.4) con 10 µg/mL de anfotericina B, 200UI/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomycin y 32 µg/mL de ceftriaxona. Pasado este tiempo las larvas se enjuagaron con PBS (pH 7.4) 3 veces y se utilizaron para los cultivos.

Las larvas obtenidas se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640, buferado con 10 mM de HEPES, adicionado con 0.4% de glucosa, 2 mM de glutamina, 200 UI/mL de penicilina estreptomycin, 10 µg/mL de anfotericina B y 32µg/mL de ceftriaxona. Por triplicado, se colocaron 2000 larvas por pozo en cajas de poliestireno de 24 pozos (2 mL/pozo), estas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. A cada pozo se agregó cada tercer día una solución con hormona fresca disuelta en medio de cultivo, la estimulación hormonal duró 10 días. Las concentraciones de hormonas utilizadas fueron considerando las concentraciones fisiológicas en los ovinos. Las concentraciones de progesterona que se emplearon fueron de 1, 8, 16, 80 y 160 ng/mL (Sigma, No. catalogo P7556). Las concentraciones de 17β-estradiol fueron 7, 70, 140, 700 y 1400 pg/mL (Sigma, No. Catálogo E4389). Las concentraciones de prolactina fueron 20, 80 200 y 400 ng/mL (Sigma, No. catálogo L6520).

MEDICIÓN DE LARVAS

Los días 0, 5 y 10 de cultivo, se obtuvieron 100 µl de medio con larvas de cada pozo y se mezclaron con 100 µl de lugol al 0.5% (Hycel) durante 20 minutos. Posteriormente, se midió la longitud de 30 larvas de cada pozo (90 larvas por concentración/día). Noventa larvas obtenidas el día cero se procesaron de la misma forma y se midieron. La medición del tamaño se realizó con un microscopio óptico Olympus BX43, en objetivo de 10x, utilizando un software de procesamiento de imágenes (Image Premiere Plus). A la longitud de cada día experimental de medición le fue sustraída la longitud inicial correspondiente (día 0), el resultado de esta diferencia fue expresado como el aumento de tamaño de la larva en micrómetros.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Los días 0, 5 y 10 de cultivo, se obtuvieron 100 µl de medio con larvas de cada pozo y se mezclaron con 100 µl de lugol al 0.5% (Hycel) durante 20 minutos. Posteriormente, se analizó la morfología de 30 larvas de cada pozo (90 larvas por concentración/día), con un microscopio óptico Olympus BX43. La diferenciación entre estadios de L3 y L4 se realizó de acuerdo con los criterios de Sommerville (1966). Las L3 no presentaron desarrollo de la cavidad bucal, mientras que las L4 fueron aquellas que presentaron una cavidad bucal bien desarrollada.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se realizó modificando la técnica descrita por Nava-Castro et al. (2011). Las células de *H. contortus* se obtuvieron al disgregar L3 con un micropistilo hasta no ver grumos. La suspensión obtenida, se centrifugó a 600 g por

cinco minutos, se decantaron y se agregaron 100 μ l de paraformaldehído al 4% por quince minutos a 37°C para fijar las células disgregadas. Posteriormente, las células se permeabilizaron con metanol al 70% por 30 minutos a 4°C y después se enjuagaron con buffer de FACS centrifugando a 600 g durante cinco minutos. Las células obtenidas se incubaron con una dilución 1:50 de los anticuerpos de ratón anti-rPRL, anticuerpos de conejo anti-rP4, y anti-rE α (Santa Cruz, Biotechnology, USA) por quince minutos a 4°C y se enjuagaron con buffer de FACS para eliminar el exceso de anticuerpo primario; después se incubaron con los anticuerpos secundarios (1:100) anti-IgG de ratón (eBioscience, USA) y anti-IgG de conejo (Molecular, Probes®, USA) acoplados a Alexa 647, por quince minutos a 4°C. Como control de calibración se utilizaron células de útero de ratón tratadas de la misma manera que las células de *H. contortus*. Todas las muestras fueron analizadas utilizando un equipo FACS Calibur (BD, Biosciences, USA) y los datos fueron analizados con el software FlowJo®.

INMUNOFLUORESCENCIA

La localización de rPRL, rP4 y rE α en las larvas fue determinada por inmunofluorescencia modificando el método descrito por Guerrero-Estevez y Moreno Mendoza (2012). Larvas recién obtenidas, fueron lavadas con PBS a pH 7.4 y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se mantuvieron durante toda la noche en una solución de sacarosa al 30% a 4 ° C. Se lavaron con PBS, se mantuvieron en Tritón 100 al 1% por 60 min a 4 ° C y se bloquearon toda la noche con albumina al 1% en PBS a 4 ° C. Las larvas estimuladas con las diferentes hormonas fueron incubadas a 4 ° C con los anticuerpos primarios utilizados en la citometría de flujo a una concentración de 1:100. Posteriormente, se incubaron con los mismos anticuerpos secundarios utilizados en la

citometría de flujo a una concentración de 1:300. Como control negativo se utilizaron larvas incubadas solo en presencia del anticuerpo secundario utilizado a la misma dilución.

Finalmente, las larvas fueron colocadas en medio de montaje (DAKO) y examinadas en un microscopio con focal (Zeiss LSM5 Pascal), las imágenes fueron construidas usando el software Zeiss LSM Imagen Browser.

DISEÑO DE INICIADORES

Receptor de prolactina: se obtuvieron secuencias de RNAm disponibles en el GenBank de diferentes rumiantes: ovinos (No. de accesos Y10578, AF041977 y AF041257), caprinos (No. de accesos XM_013972806, XM_018065466, XM_013972804, KF850473 y NM_001285669) bovinos (No. de accesos NM_001039726, XM_019983031, XM_019983032, XM_005221575 y XM_005221577); se identificó la región de interacción con la hormona y se comparó con la secuencia nucleotídica, identificando el cromosoma en ovinos relacionado con la expresión génica del receptor de prolactina. Se identificaron los exones que componen al RNAm maduro y se diseñó un juego de iniciadores utilizando el programa Primer3 Input versión 0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). La secuencia de los iniciadores diseñados fue Fw AAGTTCCACATTCCAGAGG y Rv TCTCATTTTGT TTTGGGAAC; se comprobó la funcionalidad tanto para ADN genómico como para el RNAm.

Receptor de progesterona: se obtuvieron secuencias de RNAm disponibles en el GenBank de diferentes rumiantes: ovinos (No. de accesos XM_015100878 y z66555.1), caprinos (No. de acceso XM_018059880), bovinos (No. de acceso NM_001205356),

rumiantes salvajes (No. de accesos XM_010848231, XM_012169082) y *Schistosoma mansoni* (No. de acceso XM_018794857). se identificó la región de interacción con la hormona y se comparó con la secuencia nucleotídica, identificando el cromosoma en ovinos relacionado con la expresión génica del receptor de progesterona. Se identificaron los exones que componen al RNAm maduro y se diseñó un juego de iniciadores utilizando el programa Primer3 Input versión 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000). La secuencia de los iniciadores diseñados fue Fw GACGCAGTTCTCGCTCTA y Rv TTGAGATAGGGCTGGTAGAC; se comprobó la funcionalidad tanto para ADN genómico como para el RNAm.

Componente 2 asociado al receptor de progesterona: se obtuvieron secuencias de RNAm disponibles en el GenBank de diferentes rumiantes: ovinos (No. de accesos XM_004017531 y XM_012126105), bovinos (No. de accesos NM_001099060, XM_019977549), rumiantes salvajes (No. de acceso XM_012126105.1) y *Trichinella spiralis* (No. de acceso XP_003375934.1). Se identificaron las secuencias nucleotídicas que componen al RNAm maduro y se diseñó un juego de iniciadores utilizando el programa Primer3 Input versión 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000). La secuencia de los iniciadores diseñados fue Fw ACCAAGGATCACAATAAACAGG y Rv GAATGGATTTTCAGGTGGATTTA; los exones que codifican al componente 2 asociado al receptor de progesterona son cortos por lo que solo son funcionales para RNAm.

PCR-PUNTO FINAL

Para la reacción de PCR se utilizaron 120 ng de ADN, polimerasa 2.5 U/ μ L, 200 nM de mezcla de dNTPs, 1.5 nM de Mg y agua libre de nucleasas (Jacobs et al, 1997;

Borecka, et al, 2008). La concentración utilizada de los iniciadores fue de 250 nM por reacción. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron, una desnaturalización inicial a 95°C/5min, 35 ciclos en donde cada ciclo tuvo una desnaturalización a 95°C/30seg, alineamiento de 30seg (la t_m varió dependiendo los iniciadores usados; para prolactina fue de 47.2 °C, para progesterona 48.3 °C y para estrógenos de 47.9 °C) y el paso de extensión a 72°C/30 seg; por último una extensión final a 72°C/5 min. En cada prueba de PCR se utilizó un control negativo de la PCR y como control positivo de ADNg se usó útero de borrega. Los amplicones obtenidos de la PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% por 30 minutos y teñidos con GELRED® (Biotium Labs), visualizados con un trans iluminador de UV y fotografiados para su estudio. El tamaño del amplicon se determinó comparándolo contra marcadores de referencia (100 pb DNA Ladder, PROMEGA).

RESULTADOS

TAMAÑO DE LA LARVA

Las larvas de *H. contortus* recién obtenidas en promedio midieron $618 \pm 15 \mu\text{m}$ de longitud. En la figura 6 se presenta el aumento de tamaño (alargamiento) de larvas de *H. contortus* incubadas durante cinco días con diferentes concentraciones de progesterona. Las larvas del grupo testigo crecieron $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$. De igual manera las larvas incubadas con diferentes concentraciones de progesterona durante el mismo periodo aumentaron de tamaño. Las larvas estimuladas con 8 ng/mL de progesterona durante cinco días presentaron mayor alargamiento ($p < 0.07$) que las larvas sin estimular (77.5 ± 5 y $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$ respectivamente).

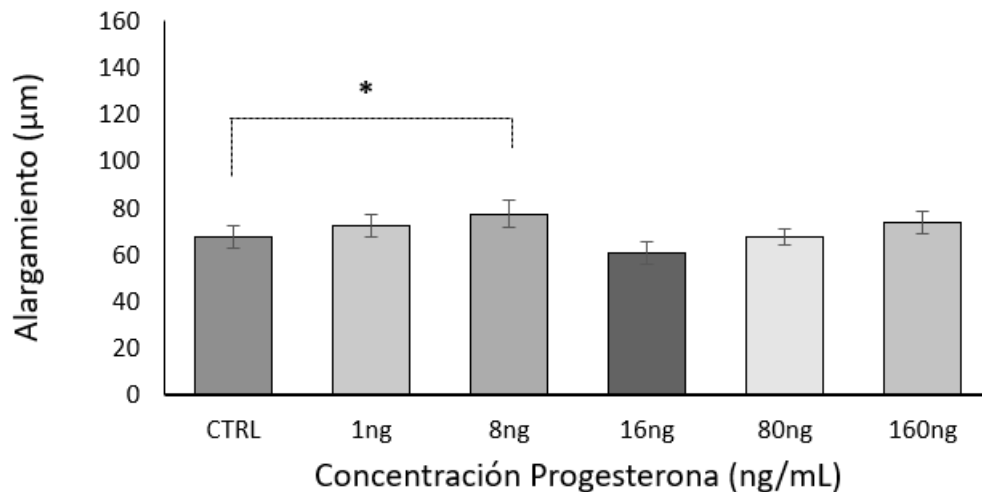


Figura 6. Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de tratamiento con diferentes concentraciones de progesterona. * indica diferencia significativa ($p < 0.07$) comparado con el grupo testigo.

En la figura 7 se presenta el alargamiento de larvas de *H. contortus* incubadas durante 10 días con diferentes concentraciones de progesterona. Las larvas del grupo incubadas sin hormonas (testigo) crecieron 110 ± 5 μm . Las larvas incubadas con 8 ng/mL de progesterona crecieron menos ($p < 0.05$) que las larvas del grupo control (92 ± 5 y 110 ± 5 μm respectivamente). Las larvas estimuladas con 160 ng/mL de progesterona presentaron un mayor alargamiento ($p < 0.05$) en comparación con las larvas de grupo testigo (134 ± 6 y 110 ± 5 μm respectivamente).

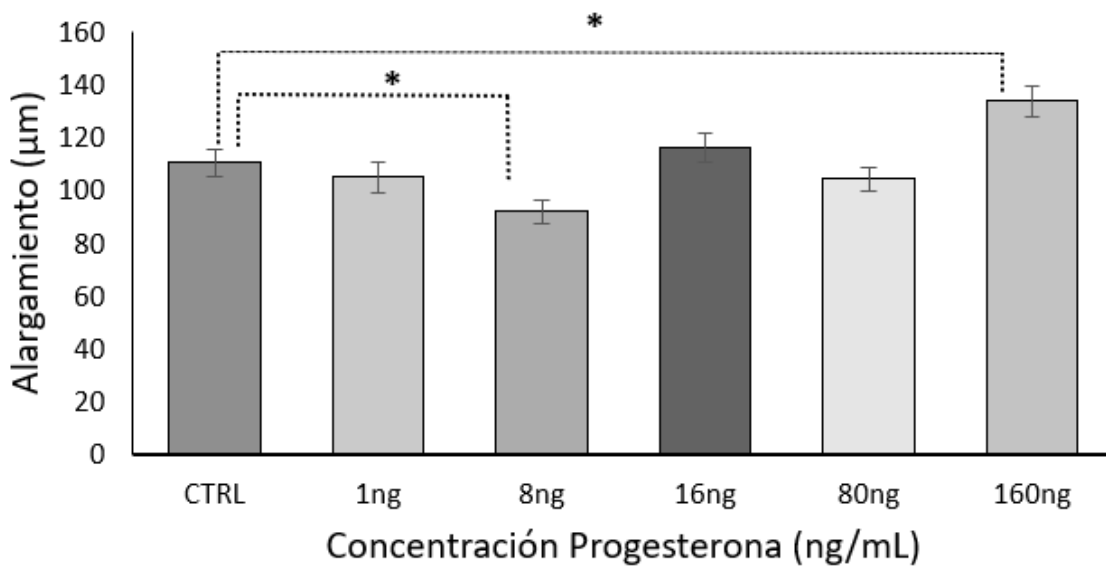


Figura 7. Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de progesterona. Se observa una disminución en el crecimiento en larvas tratadas con 8 ng/mL y un aumento en el crecimiento en larvas tratadas con 160 ng/mL ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los otros grupos de larvas ($p > 0.05$).

En la figura 8 se presenta el alargamiento de larvas de *H. contortus* a los cinco días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. Todas las larvas aumentaron de tamaño, las larvas del grupo testigo crecieron $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$ y las larvas de los grupos incubados con la prolactina tuvieron un alargamiento promedio de 66.5 ± 3 . La concentración que generó un alargamiento mayor fue de 80 ng/mL , sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se comparó con el grupo testigo (78 ± 5 y $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$ respectivamente).

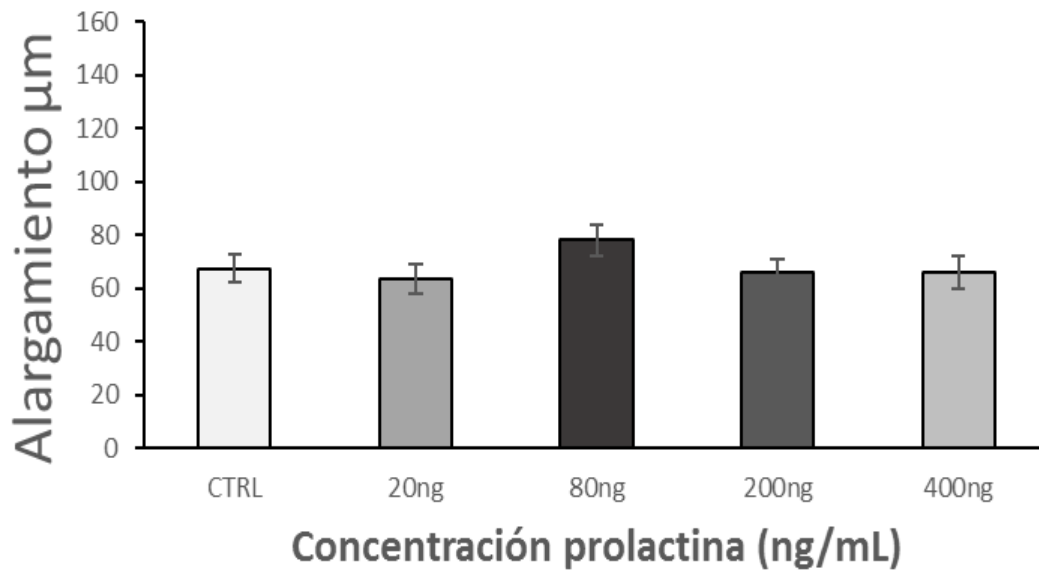


Figura 8. Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

En la figura 9 se presenta el alargamiento de larvas de *H. contortus* a los diez días de tratamiento con diferentes concentraciones de prolactina. Las larvas del grupo testigo crecieron $110 \pm 5 \mu\text{m}$. Las larvas incubadas con 200 ng/mL de prolactina fueron las que tuvieron un alargamiento mayor ($p < 0.05$) comparadas con el grupo testigo (126 ± 4 y $110 \pm 5 \mu\text{m}$ respectivamente).

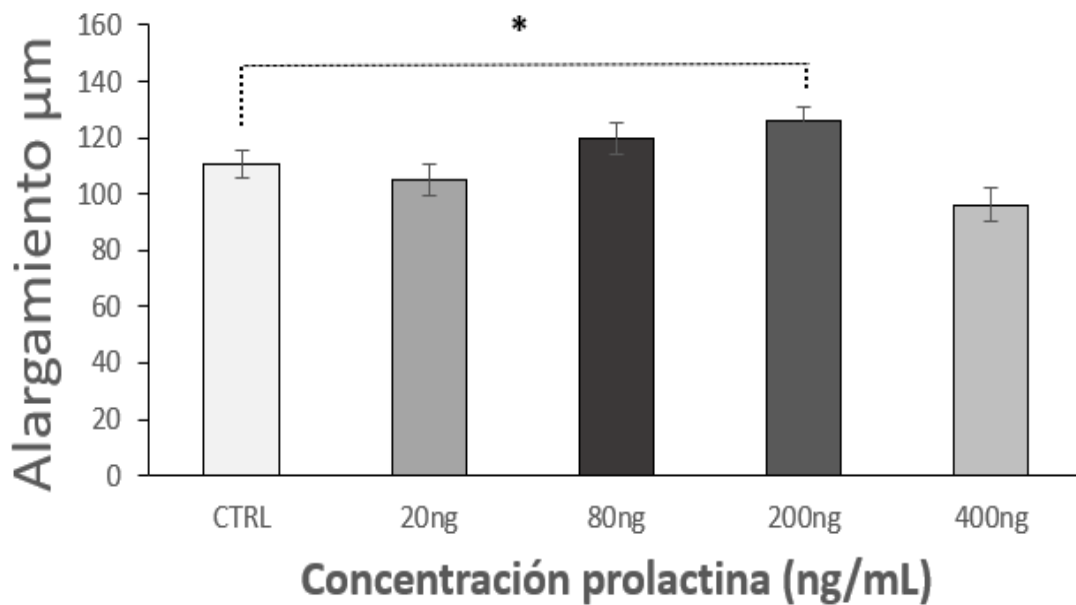


Figura 9. Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. Se observa un aumento en el alargamiento ($p < 0.05$) en larvas tratadas con 200 ng/mL comparadas con el grupo testigo (*). No se observaron diferencias significativas con los demás grupos ($p > 0.05$).

En la figura 10 se presenta el alargamiento de larvas de *H. contortus* a los cinco días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. Todas las larvas aumentaron de tamaño, las larvas del grupo testigo crecieron $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$. Las larvas estimuladas con 700 pg/mL tuvieron un alargamiento mayor ($p < 0.05$) que las larvas del grupo testigo (86 ± 5 y $67.5 \pm 4 \mu\text{m}$, respectivamente).

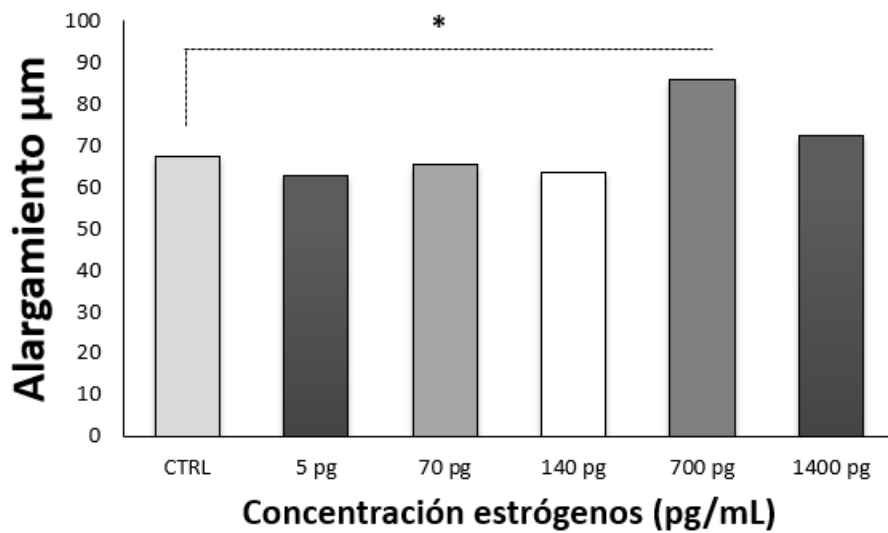


Figura 10. Medía \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. * Indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

En la figura 11 se presenta el alargamiento de larvas de *H. contortus* a los diez días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. Todos los grupos aumentaron de tamaño, no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos ($p>0.05$).

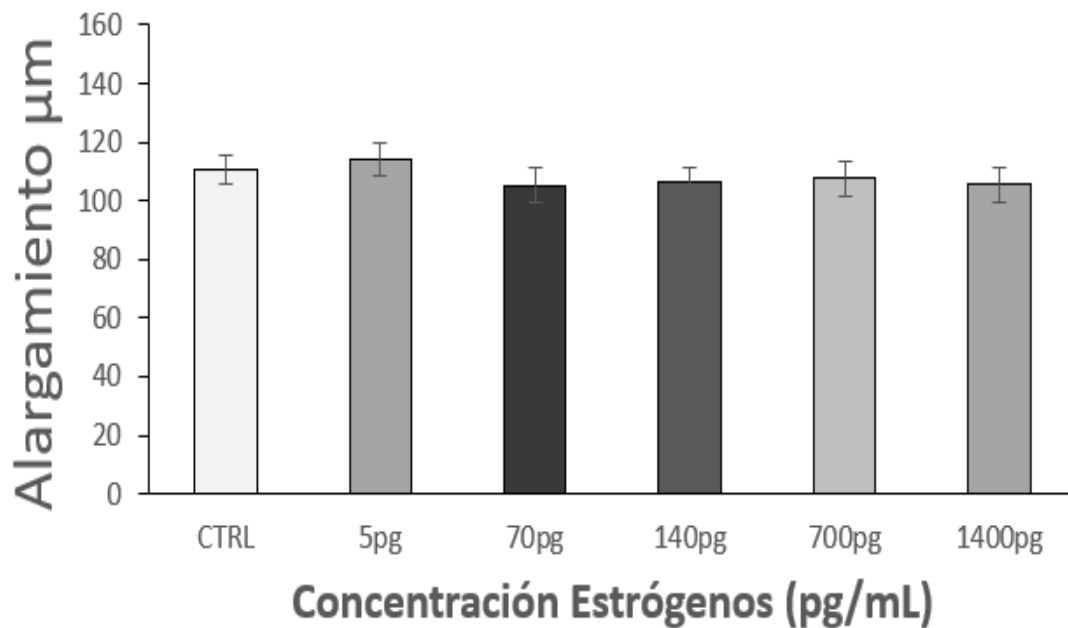


Figura 11. Media \pm error estándar del alargamiento de las larvas después de 10 días de tratamiento con diferentes dosis de prolactina. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$).

MOVIMIENTO LARVARIO

En la tabla 1 se presenta el movimiento larvario a los 0.5, 5 y 10 días de incubación con diferentes concentraciones de progesterona. El movimiento promedio de las larvas sin estimular en los tres periodos fue de 2.3 ± 0.1 . En los tres periodos las larvas incubadas a las concentraciones de 8, 16, y 160 ng/mL presentaron mayor movimiento que en su respectivo grupo de larvas incubadas sin hormonas ($p < 0.05$). No se observaron diferencia ($p > 0.05$) en la motilidad por concentración/día de estimulación.

Tabla 1: Media \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 0.5, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes concentraciones de progesterona. Se observa aumento en la motilidad ($p < 0.05$) de las larvas a partir de la concentración de 8 ng/mL en los tres periodos de observación.

CONCENTRACION	DIAS DE TRATAMIENTO		
	DIA 0.5	DIA 5	DIA 10
0 ng/mL	2.3 ± 0.10	2.2 ± 0.10	2.3 ± 0.10
1 ng/mL	2.4 ± 0.10	$2.4 \pm 0.10^*$	2.3 ± 0.10
8 ng/mL	$2.6 \pm 0.10^*$	$2.6 \pm 0.11^*$	$2.6 \pm 0.10^*$
16 ng/mL	$2.6 \pm 0.10^*$	$2.4 \pm 0.10^*$	$2.7 \pm 0.11^*$
80 ng/mL	$2.6 \pm 0.10^*$	$2.4 \pm 0.11^*$	$2.6 \pm 0.11^*$
160 ng/mL	$2.7 \pm 0.10^*$	$2.6 \pm 0.10^*$	$2.7 \pm 0.12^*$

En la tabla 2 se presenta el movimiento larvario a los 0.5, 5 y 10 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el movimiento larvario en ninguno de los grupos de larvas a ninguna concentración/día.

Tabla 2: media \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 0.5, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes concentraciones de prolactina. No se observó diferencia significativa en el movimiento larvario entre tratamiento ni entre los tres periodos de observación ($p>0.05$).

CONCENTRACION	DIAS DE TRATAMIENTO		
	DIA 0.5	DIA 5	DIA 10
0 ng/mL	2.3 \pm 0.10	2.2 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10
20 ng/mL	2.4 \pm 0.10	2.4\pm0.10*	2.1 \pm 0.10
80 ng/mL	2.2 \pm 0.10	2.3 \pm 0.11	2.4 \pm 0.10
200 ng/mL	2.1 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10	2.3 \pm 0.11
400 ng/mL	2.3 \pm 0.10	2.3 \pm 0.11	2.1 \pm 0.11

En la tabla 3 se presenta el movimiento larvario a los 0.5, 5 y 10 días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el movimiento larvario en ninguno de los grupos de larvas a ninguna concentración/día.

TABLA 3: Media \pm error estándar del movimiento de las larvas después de 0.5, 5 y 10 días de tratamiento con diferentes concentraciones de estrógenos. No se observó diferencia significativa en el movimiento larvario entre tratamiento ni entre los tres periodos de observación ($p>0.05$).

CONCENTRACION	DIAS DE TRATAMIENTO		
	DIA 0	DIA 5	DIA 10
0 pg/mL	2.3 \pm 0.10	2.2 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10
5 pg/mL	2.4 \pm 0.10	2.4 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10
70 pg/mL	2.2 \pm 0.10	2.4 \pm 0.11	2.3 \pm 0.10
140 pg/mL	2.1 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10	2.3 \pm 0.11
700 pg/mL	2.3 \pm 0.10	2.3 \pm 0.11	2.1 \pm 0.11
1400 pg/mL	2.2 \pm 0.10	2.4 \pm 0.10	2.2 \pm 0.12

MORFOLOGÍA DE PARTE ANTERIOR DE L3 Y L4

En la figura 12 se presentan las características morfológicas de la parte anterior de la L3 y de la L4 de *H. contortus*. Las L3 recién obtenidas después de haber perdido la cutícula, presentan el extremo anterior en forma roma, sin desarrollo aparente de la cavidad oral (figura 12a); a partir de 5 días de cultivo, se puede observar que la L4 presentan un desarrollo completo de la cavidad oral, en los extremos se observan dos protuberancias (mouthparts) que sobresalen y se observa una cápsula bucal en forma de cono invertido (figura 12b).

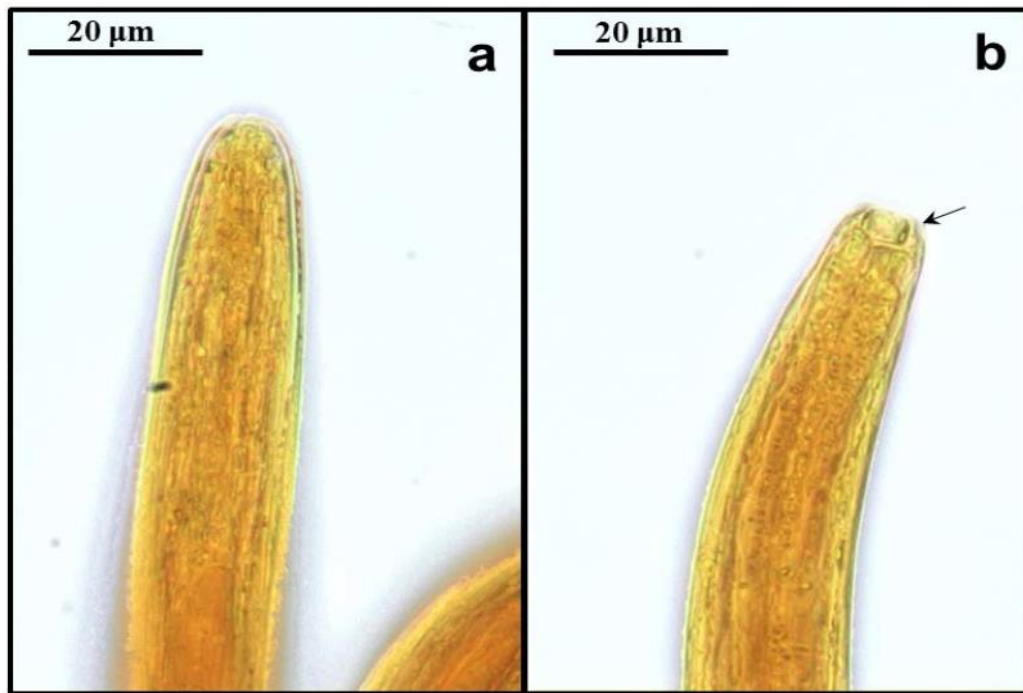


Figura 12. Parte anterior de larvas de *Haemonchus contortus*. a) Parte anterior de L3. b) Parte anterior característico de L4. Flecha señala las protuberancias simétricas a lado de la cavidad oral.

RELACIÓN L3/L4

Todas las larvas de *H. contortus* recién obtenidas, presentaron una morfología típica de L3. En la figura 13 se presenta la relación de L3/L4 después de 5 días de incubación con concentraciones de progesterona superiores a 1 ng/mL. El 52% de las larvas incubadas en ausencia de hormonas mudaron a L4. Las larvas incubadas con las diferentes concentraciones de progesterona (1, 8, 16, 80 y 160 ng/mL) presentaron un menor porcentaje de L4 que las larvas del grupo testigo ($p < 0.05$). La inhibición de la muda se observó desde la concentración menor y no presentó un patrón concentración dependiente, por lo que se realizó otro experimento con menores concentraciones de la hormona.

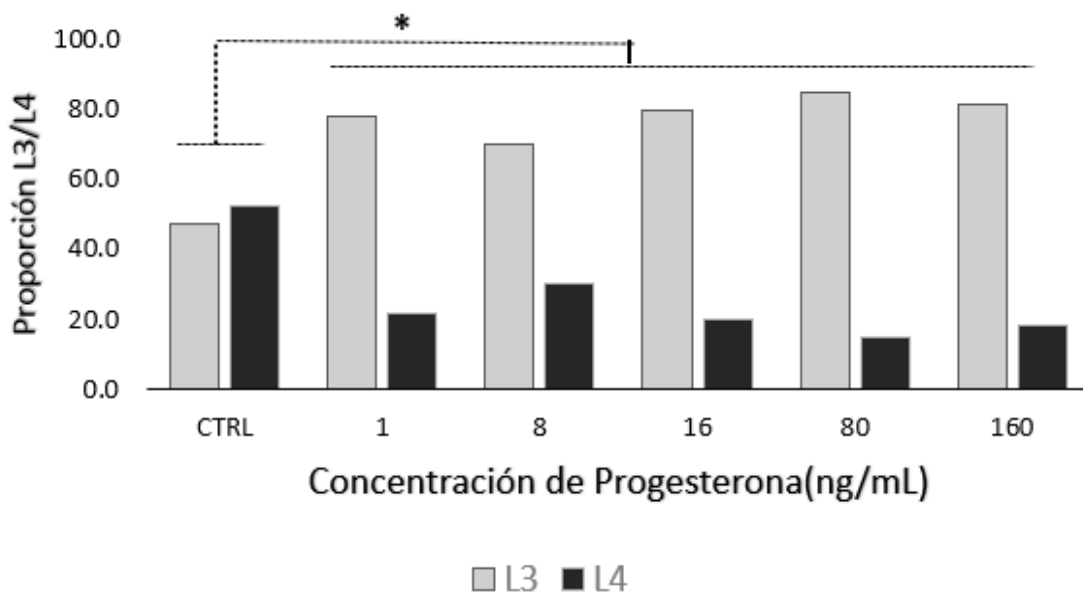


Figura 13. Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después de 5 días de estimulación con diferentes concentraciones de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 14 se presenta la relación L3/L4 después de 10 días de incubación con concentraciones de progesterona superiores a 1 ng/mL. El 65% de las larvas incubadas en ausencia de hormonas mudaron a L4, Las larvas tratadas con las diferentes concentraciones de progesterona (1, 8, 16, 80 y 160 ng/mL) mantuvieron un menor porcentaje de L4 que las larvas del grupo testigo ($p < 0.05$)

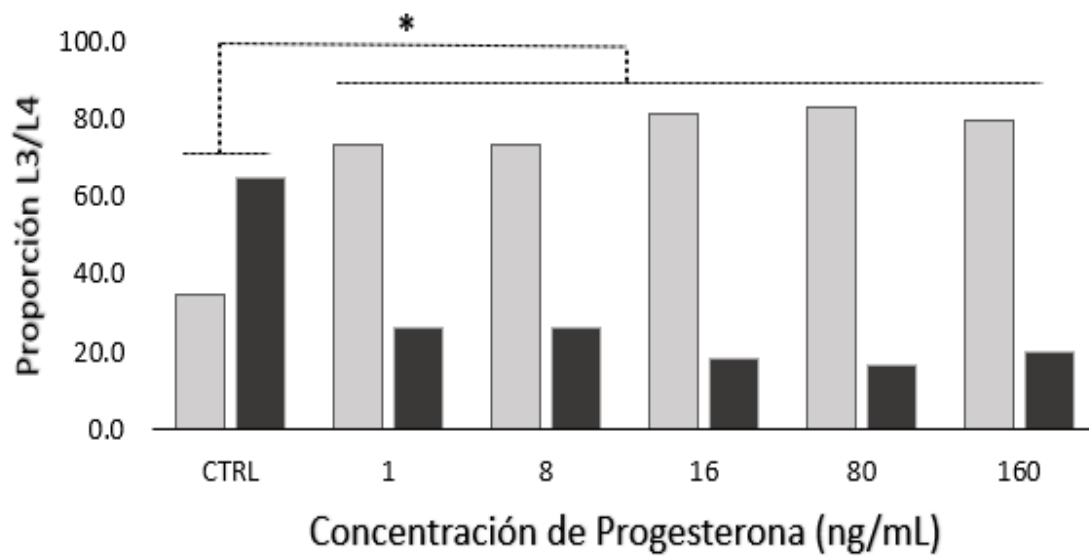


Figura 14: Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después de 10 días de estimulación con diferentes concentraciones de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 15 se presenta la relación de L3/L4 después de 5 días de incubación con concentraciones de progesterona inferiores a 1 ng/mL. Se observa un aumento del porcentaje de L4 conforme disminuye la concentración de progesterona.

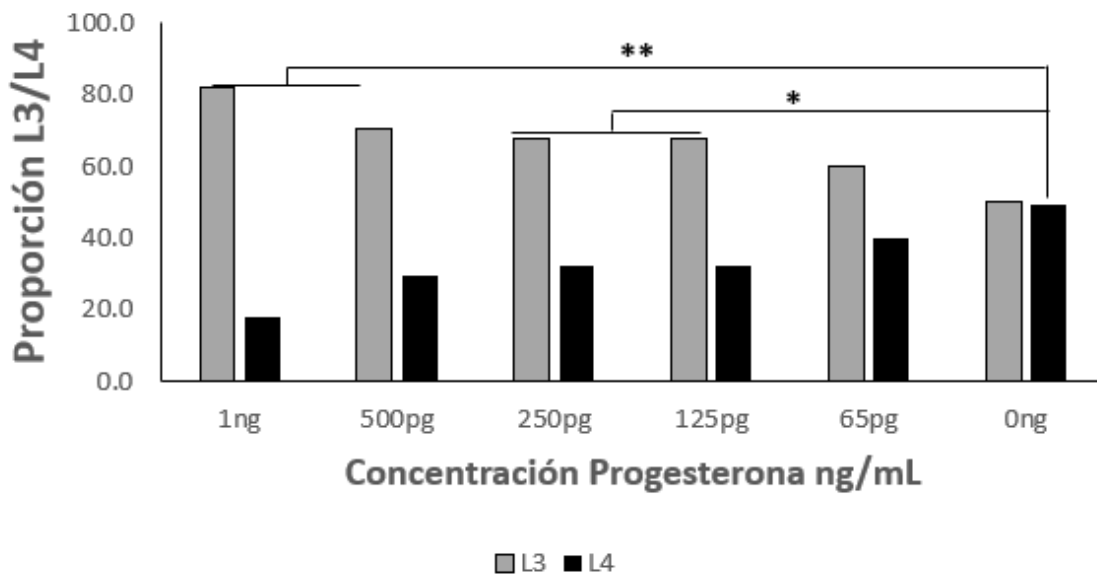


Figura 15. Relación L3/L4 de *H. contortus* después de la incubación por 5 días de estimulación con concentraciones inferiores a 1 ng/mL de progesterona. * muestra diferencia significativa ($p < 0.05$); ** muestra diferencia significativa ($p < 0.01$).

En la figura 16 se presenta la relación de L3/L4 después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. No se observaron diferencias estadísticas ($p>0.05$) en la proporción de L3/L4 entre ninguno de los grupos de larvas.

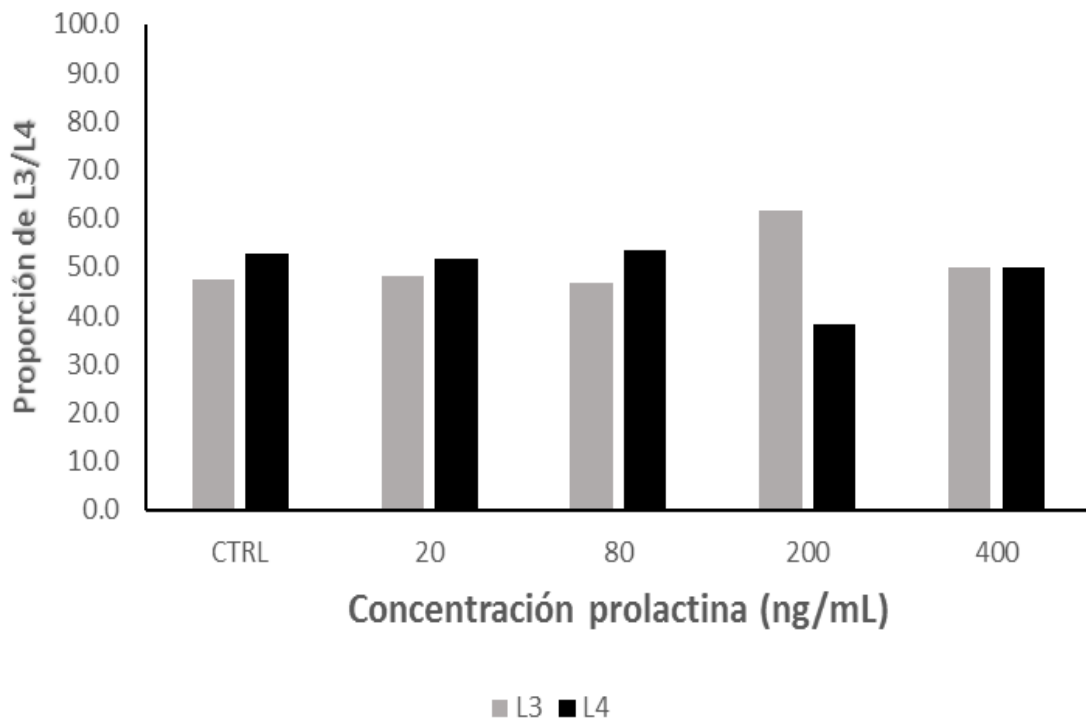


Figura 16. Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 5 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

En la figura 17 se presenta la relación de L3/L4 después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de prolactina. No se observaron diferencias estadísticas ($p>0.05$) en la proporción de L3/L4 entre ninguno de los grupos de larvas.

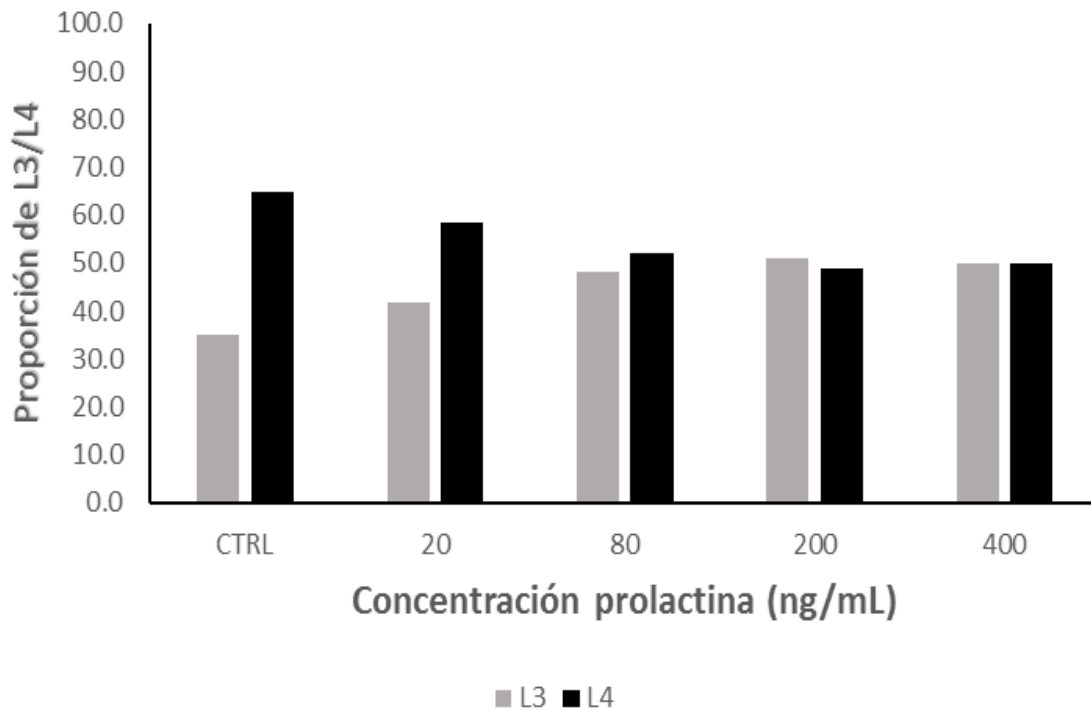


Figura 17. Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 10 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

En la figura 18 se presenta la relación de L3/L4 después de 5 días de incubación con diferentes concentraciones de estrógenos. No se observaron diferencias estadísticas ($p>0.05$) en la proporción de L3/L4 entre ninguno de los grupos de larvas.

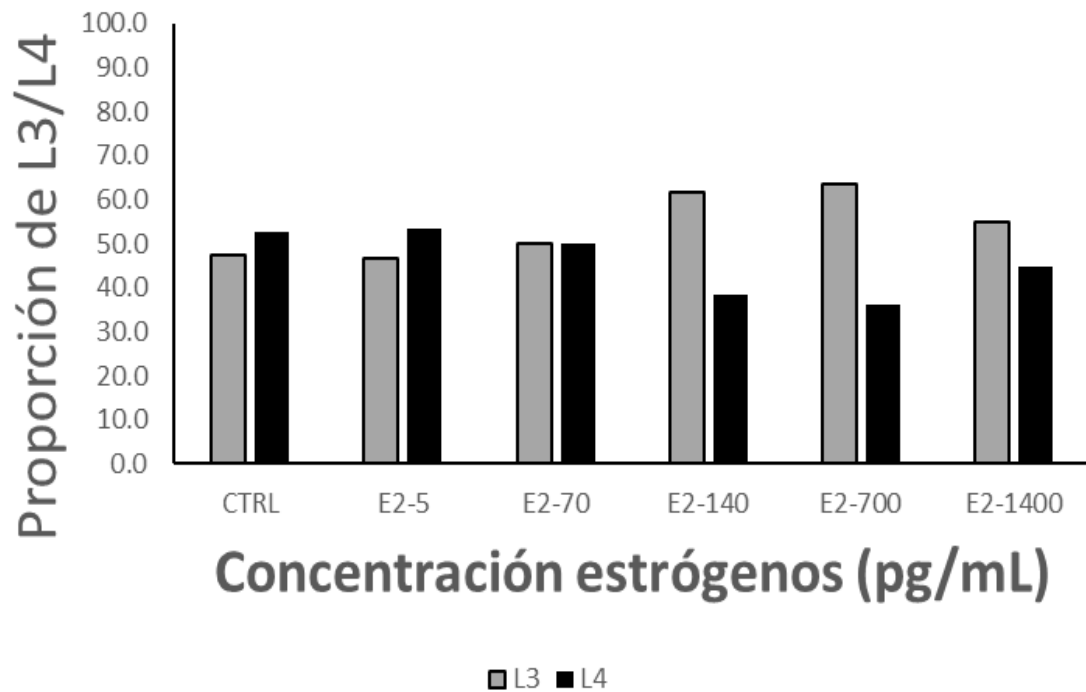


Figura 18. Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* después 5 días de estimulación con diferentes concentraciones de prolactina. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

CITOMETRÍA DE FLUJO

En la figura 19a se muestra el dot plot de las L3 de *H. contortus* recién obtenidas, en esta se puede observar que el mayor porcentaje de células se encuentran localizadas cerca del origen (85%), lo que indica que estas son pequeñas y de poca complejidad. Debido a que no se conocen poblaciones celulares específicas, se ocupó el total de eventos para realizar los análisis de fluorescencia.

En las figuras 19b, 19c y 19d se presentan los histogramas representativos de: células de L3 *H. contortus* recién obtenidas, células de L3 incubadas por 5 días en ausencia de hormonas y células de L3 después de cinco días de incubación con 8 ng/ml de progesterona, respectivamente. Todas las células fueron incubadas con un anticuerpo dirigido al receptor de progesterona. La línea roja del histograma indica células sin teñir, la línea azul indica células incubadas con el anticuerpo secundario y la línea verde indica células incubadas con anticuerpo anti-receptor de progesterona. El promedio ($n=4$) de células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas fue de 15%, el porcentaje de células obtenidas de L3 incubadas por 5 días en ausencia de hormonas se redujo significativamente al 3% ($p<0.05$), mientras que el porcentaje de células de L3 incubadas por cinco días con 8 ng/ml de progesterona fue de 12.5 (figura 20a); no hubo diferencias estadísticas entre células positivas al rP4 de larvas recién obtenidas y células positivas al rP4 de larvas incubadas con hormona ($p>0.05$).

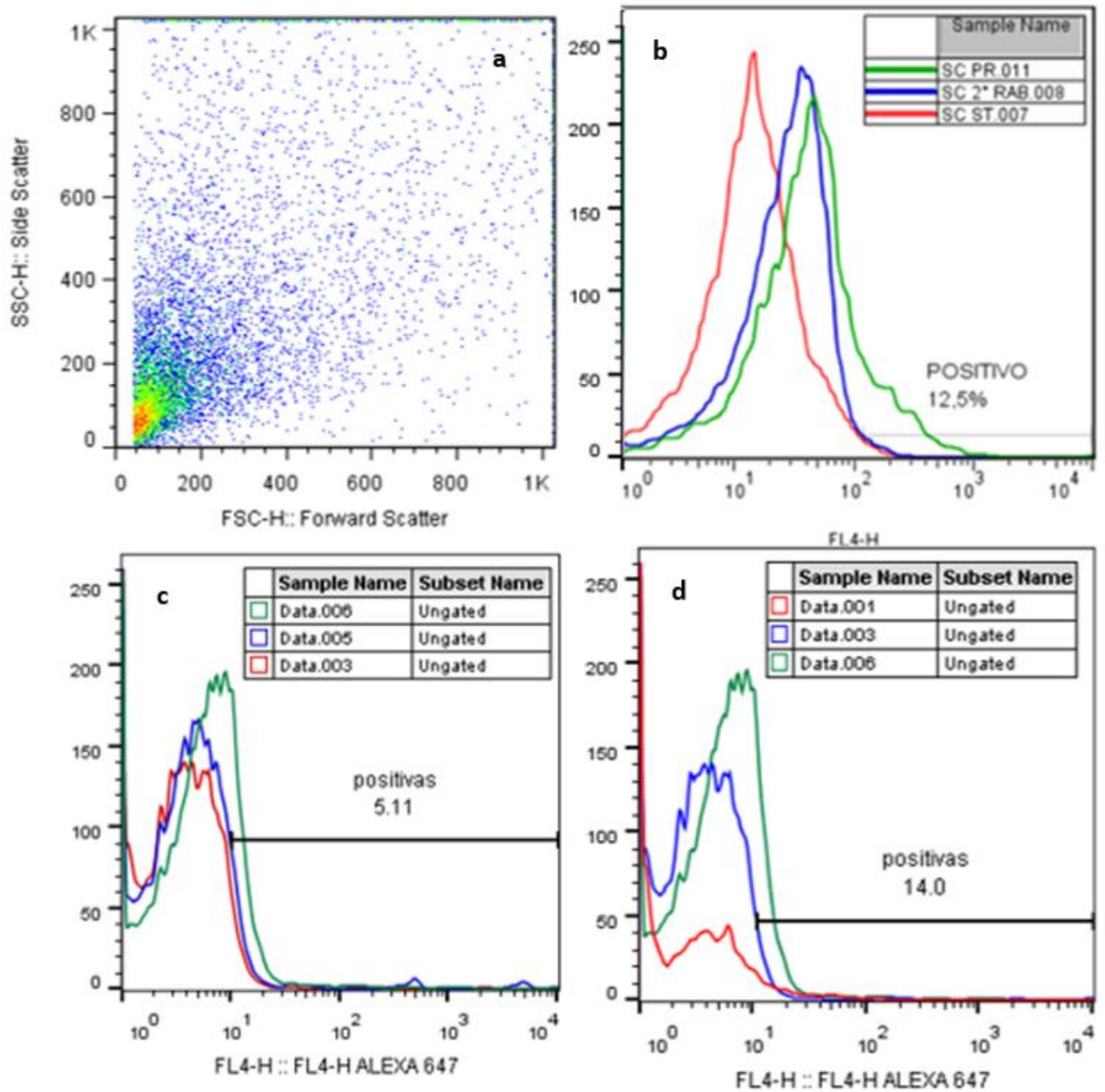


Figura 19. Histograma representativo de células de *H. contortus* obtenidas por citometría de flujo. a) Dot Plot de células de larvas de L3 recién obtenidas. b) Células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas. c) Células positivas al receptor de progesterona en L3 después de cinco días de cultivo sin hormona. d) Células positivas al receptor de progesterona en L3 después de cinco días de cultivo con 8 ng/mL de progesterona.

En la figura 20b se presenta la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas, L3 incubadas por cinco días en ausencia de hormonas y L3 cultivadas durante cinco días en presencia de 8 ng/mL de progesterona. Las células provenientes de L3 cultivadas en presencia de progesterona presentaron una mayor intensidad de fluorescencia, sin embargo, no fueron significativamente diferentes a las células obtenidas de los otros grupos de larvas ($p>0.05$).

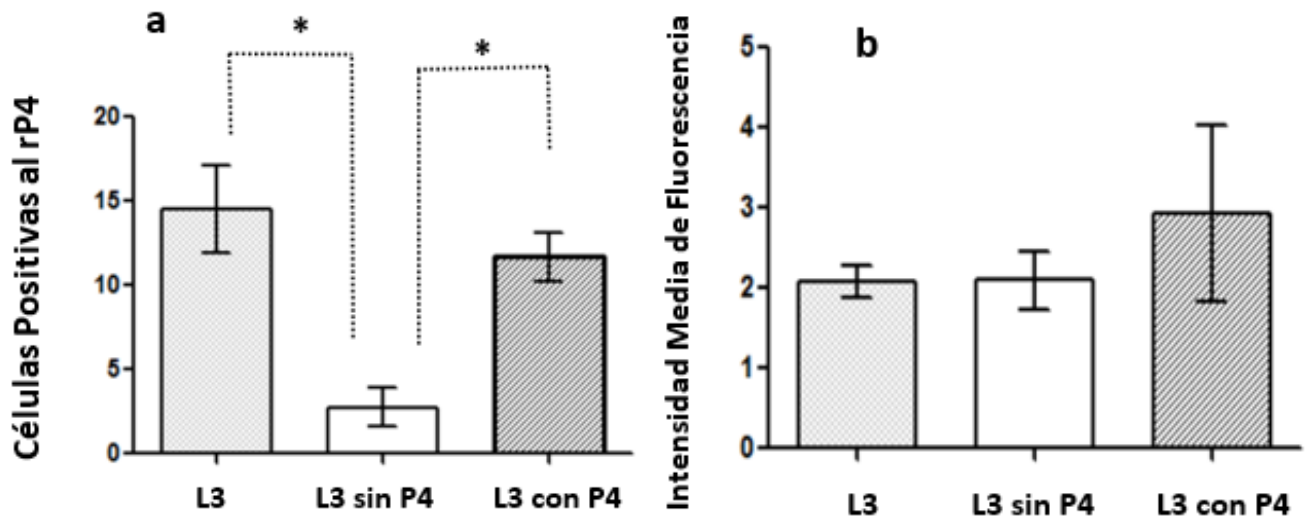


Figura 20. a) Medía \pm error estándar del porcentaje de células positivas al receptor de progesterona en L3 de *H. contortus* recién obtenidas, L3 cultivadas 5 días en ausencia de progesterona y L3 cultivadas 5 días con 8 ng/mL de progesterona (* indica diferencia significativa, $p<0.05$). b) Medía \pm error estándar de la intensidad media de fluorescencia de células positivas al receptor de progesterona en L3 recién obtenidas, L3 cultivadas 5 días en ausencia de P4 y L3 cultivadas 5 días con 8 ng/mL progesterona.

En las figuras 21a, y 21b se presentan los histogramas representativos de células de L3 de *H. contortus* recién obtenidas incubadas con un anticuerpo dirigido al receptor de estrógenos α (a) y un anticuerpo dirigido al receptor de prolactina respectivamente. La línea roja del histograma indica células sin teñir, la línea azul indica células incubadas con el anticuerpo secundario y la línea verde indica células incubadas con anticuerpo anti-receptor de progesterona. El promedio (n=4) de células positivas al receptor de estrógenos α en L3 recién obtenidas fue de 10%, mientras que el promedio de células positivas al receptor de prolactina fue de 5%.

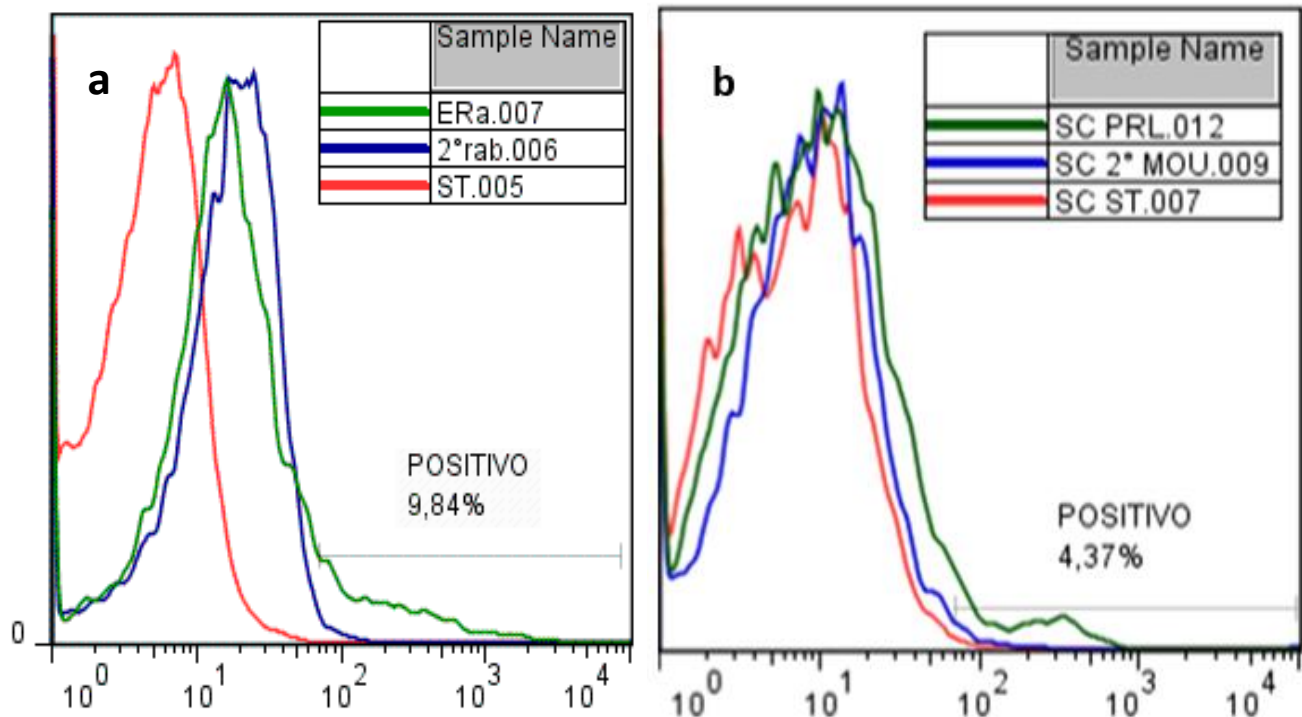


Figura 21. Histograma representativo de células de L3 de *H. contortus* obtenidas por citometría de flujo. a) Células positivas al receptor de estrógenos α en L3 recién obtenidas. b) Células positivas al receptor de prolactina en L3 recién obtenidas.

En la figura 22 se presenta el promedio de células positivas a los tres receptores hormonales en larvas recién obtenidas de *H. contortus*. En esta se observa que el receptor de progesterona se encontró en una mayor cantidad de células ($p < 0.05$), comparado con el número de células que presentaron los otros dos receptores.

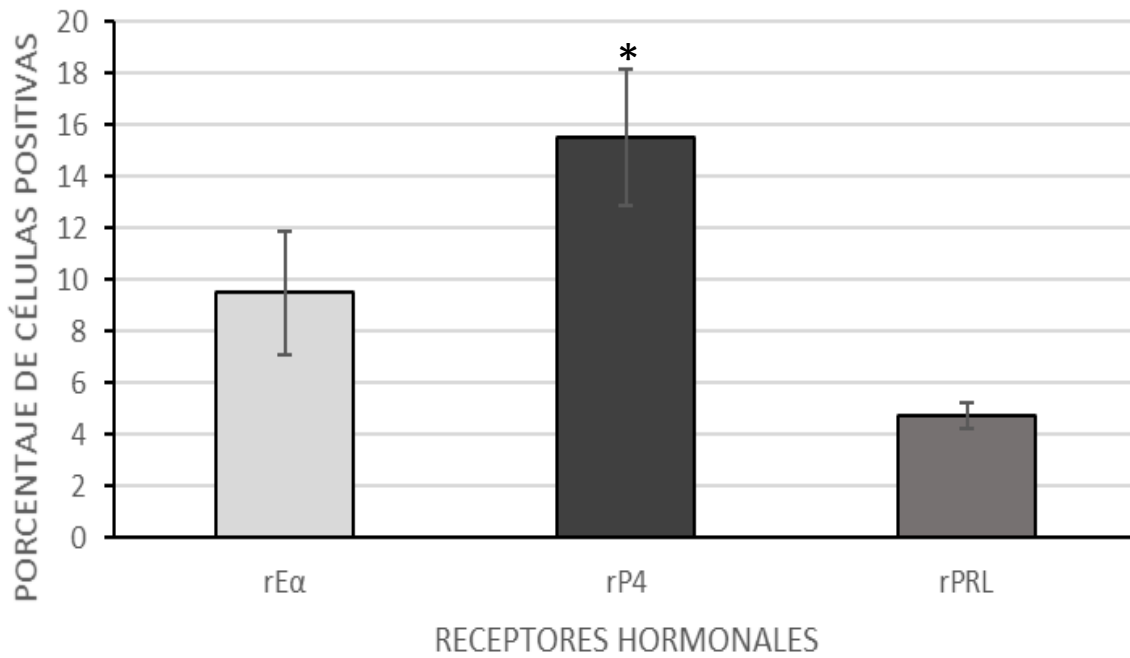


Figura 22. Células positivas al receptor de estrógenos α (rE α), receptor de progesterona (rP4) y receptor de prolactina (Rprl) en L3 recién obtenidas, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

INMUNOLOCALIZACIÓN

En las figuras 23a, 23b y 23c se presenta la microscopia confocal de L3 de *H. contortus* incubadas con un anticuerpo secundario (control negativo), no se observó fluorescencia en el interior de las larvas.

En la figura 23d, 23e y 23f se presenta la microscopia confocal de L3 de *H. contortus* incubadas con un anticuerpo anti-rP4. En la figura 23d se observa con el filtro de fluorescencia una larva, la figura 23e es la misma larva observada en campo claro y la figura 23f es una imagen sobrepuesta de las dos anteriores, lo que permite ver la localización de la fluorescencia en el interior. En esta figura, se aprecia una línea continua fluorescente color azul dentro de la larva, en donde se encuentra la luz del tubo digestivo, lo que indica la posible localización del rP4.

En la figura 23g, 23h y 23i se presenta la microscopia confocal de L3 de *H. contortus* incubadas con un anticuerpo anti-rPRL. En la figura 23g se observa una larva con fluorescencia verde difusa, en la figura 23h se observa la misma larva en un campo claro y en la figura 23i se observa la sobreposición de las imágenes. La fluorescencia observada en esta figura indica que la posible localización del rPRL es en citoplasma de células intestinales de las larvas.

En la figura 23j, 23k y 23l se presenta la microscopia confocal de L3 de *H. contortus* incubadas con un anticuerpo dirigido al receptor de estrógenos α . En la figura 23j se observa una larva a con el filtro de fluorescencia, en la figura 23k se observa la misma larva con un campo claro y en la figura 23l se observa la sobreposición de imágenes. En esta figura no se encontró fluorescencia en las larvas analizadas.

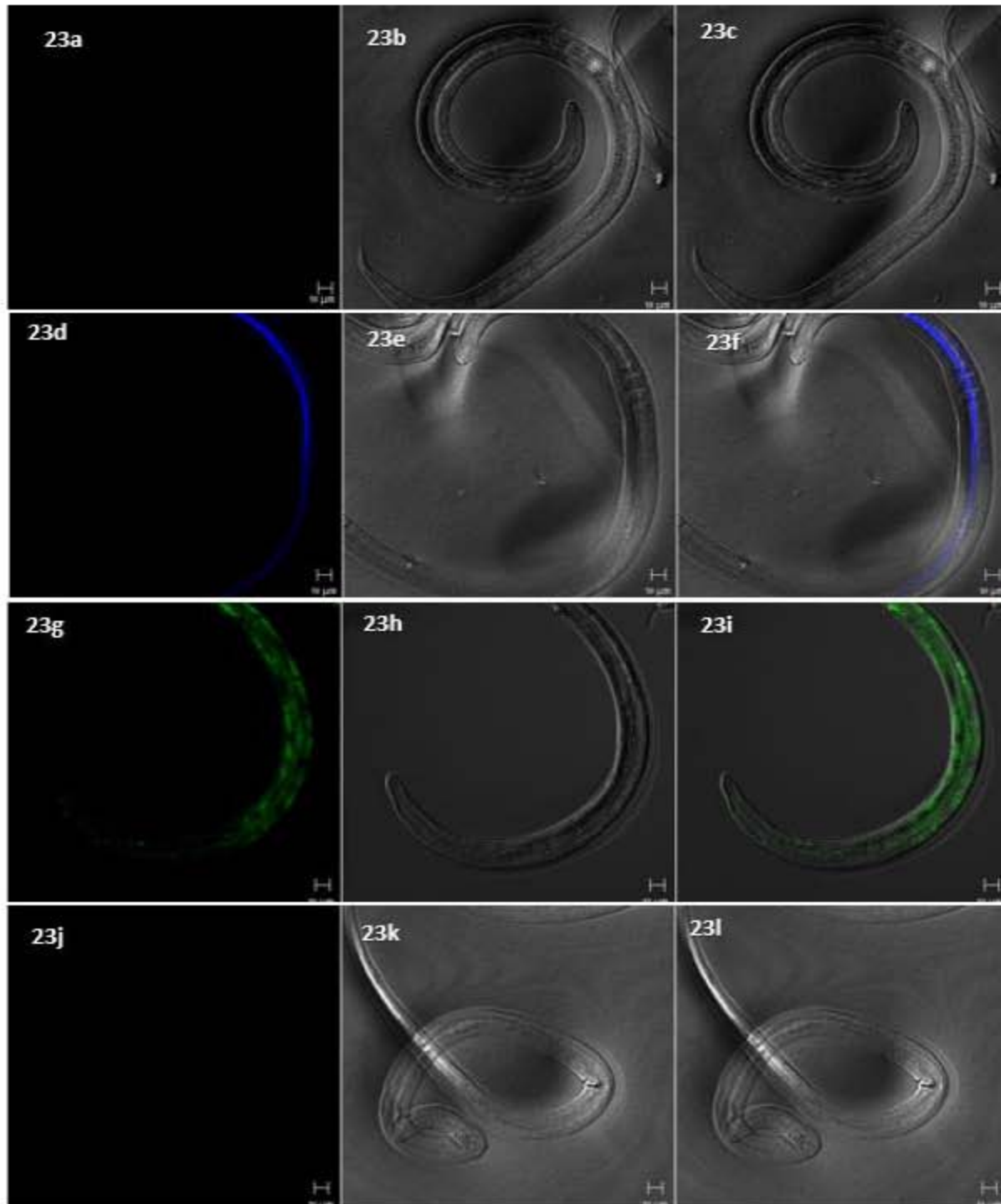


Figura 23. Microscopía confocal de larvas recién obtenidas. Paneles izquierdos larvas observadas en filtro de fluorescencia; paneles centrales larvas observadas en campo claro; paneles derechos colocación de imágenes. Figuras 23a, 23b, 23c, control negativo; figuras 23d, 23e, 23f, inmunolocalización de rP4. figura 23g, 23h, 23i, inmunolocalización de rPRL y figura 23j, 23k, 23l, inmunolocalización de rE2.

PCR

En la tabla 4 se muestran las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la amplificación de los genes para rPRL, rE α y rP4 en L3 de *H. contortus*.

GEN	INICIADORES Fw 5' - 3'	INICIADORES Rv5' - 3'
rPRL	CAT-TTA-ACA-CTC-CCA-AGA-GC	CAT-TTA-ACA-CTC-CCA-AGA-GC
rE α	GCA-TTG-AGC-CTC-TCT-ACA-TC	ACA-CCA-TAG-TGG-TAG-CCA-GA
rP4	AAA-ACT-GTA-AGC-AGC-CAG-TGC-AT	CGC-TGT-TCT-CTT-TCT-GTT-TT

En la figura 24 se muestran fragmentos de ADN amplificados por PCR con iniciadores que hibridan en el gen de rE α . Con el ADN de *H. contortus* se amplificó una banda cercana a 500 pb, tamaño superior al esperado que era de 350 pb (ADN útero).

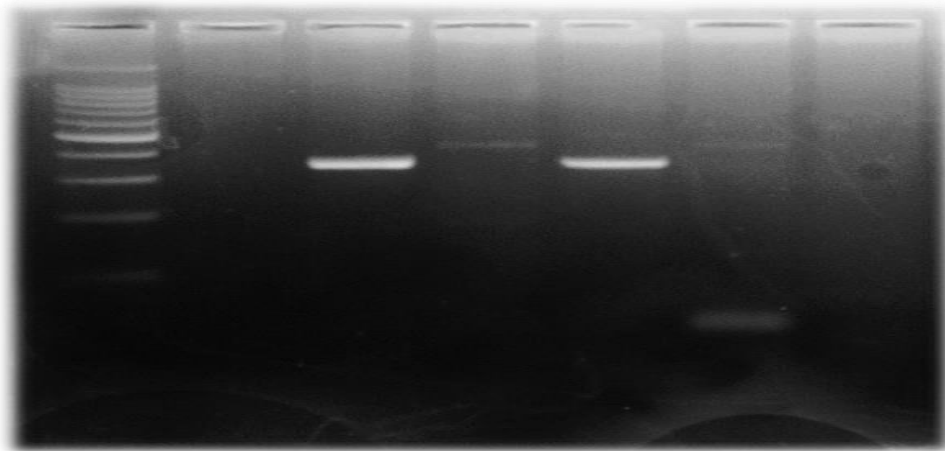


Figura 24: : Gel de agarosa que muestra productos de amplificación de la PCR de un fragmento del gen que codifica para el receptor de estrógenos α separados por electroforesis; carril 1: PB, carril 4 y 6: DNA *H. contortus*, carril 3 y 5: ADN de útero de borrega.

En la figura 25 se muestran fragmentos de ADN amplificados por PCR utilizando iniciadores que hibridan en el gen del componente 2 asociado al receptor membranal de rP4. El producto de amplificación obtenido fue de aproximadamente 450 pb tanto en el ADN derivado de *H. contortus* como en el ADN control de útero de borrega.

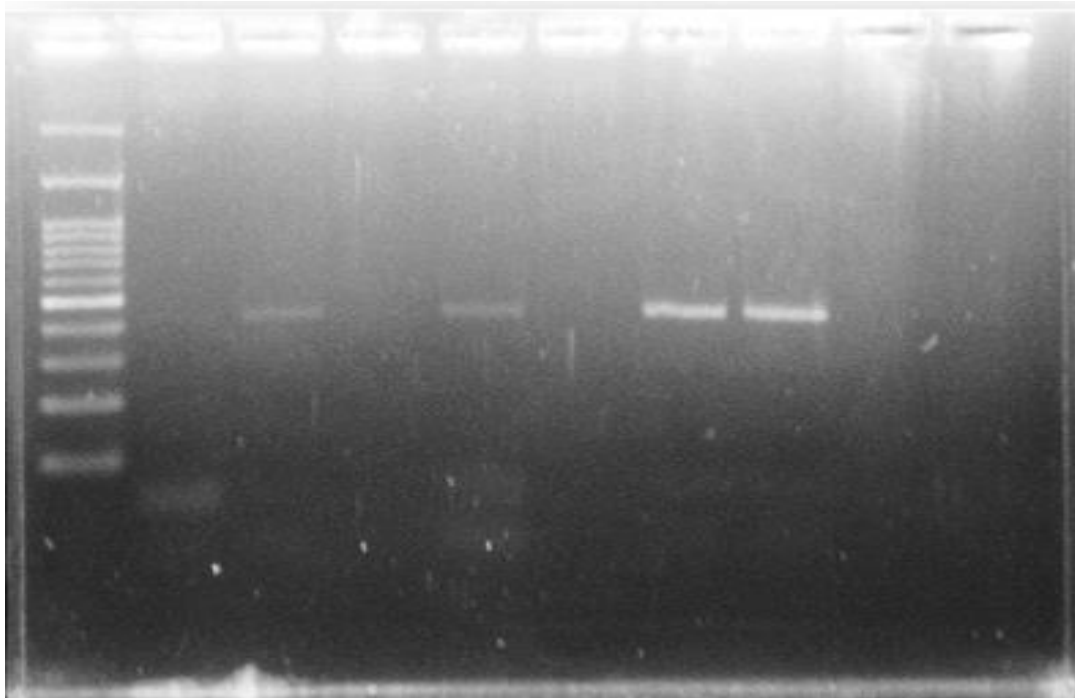


Figura 25. Gel de agarosa que muestra productos de amplificación de la PCR de un fragmento del gen que codifica para el componente de membrana 2 del receptor de progesterona separados por electroforesis. Carril 1 MPB, carril 3 y 5 ADN de *H. contortus* y carril 7 y 8 ADN de útero de borrega.

En la figura 26 se muestran fragmentos de ADN amplificados por PCR utilizando iniciadores que hibridan en el gen de rPRL. El producto de amplificación obtenido fue de aproximadamente 470 pb tanto en el ADN derivado de *H. contortus* como en el ADN control de útero de borrega.

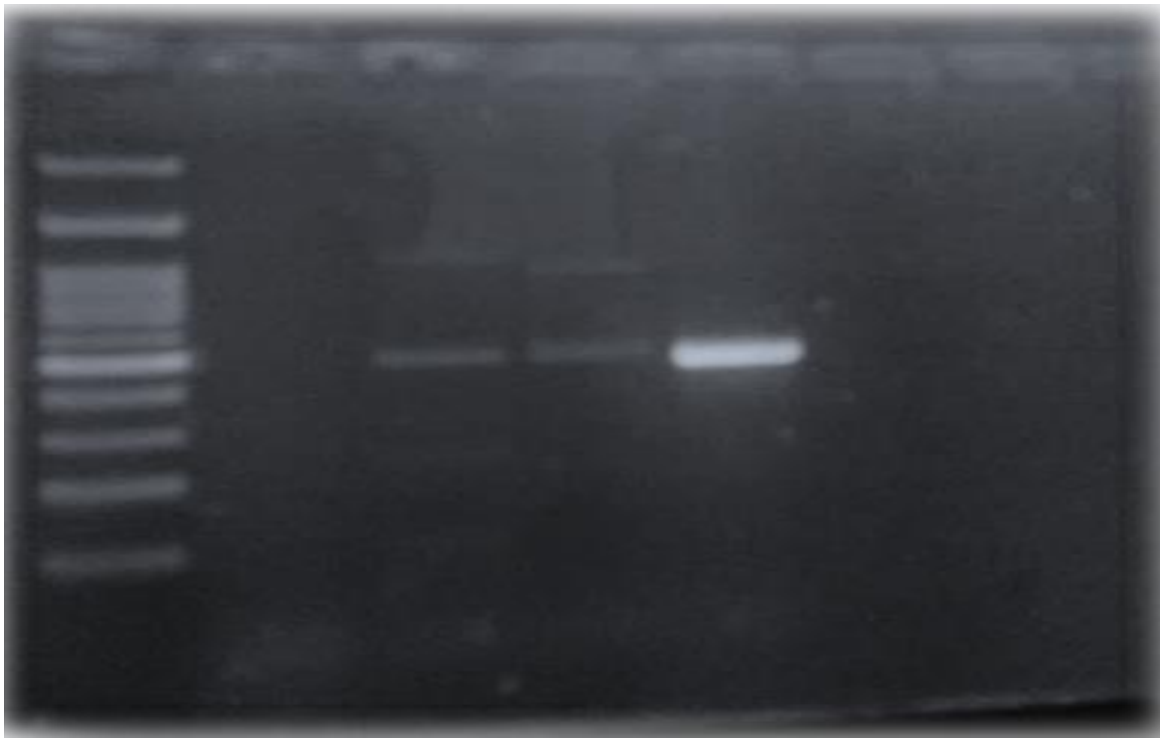


Figura 26: Gel de agarosa que muestra productos de amplificación de la PCR de un fragmento del gen que codifica para el receptor de prolactina separados por electroforesis. Carril 1 MPB, carril 3 y 4 ADN de *H. contortus* y carril 5 ADNA de útero de borrega.

DISCUSIÓN

La presencia de moléculas semejantes a receptores hormonales del hospedador ha sido descrito desde protozoarios hasta nematodos parásitos, en los cuales se han reportado diversos efectos al ser estimulados con la hormona en cuestión (Romano, et al, 2003; Freebern et al, 1999; Wu y LoVerde, 2011). Se ha sugerido que las hormonas de la gestación en ovinos afectan el desarrollo de *H. contortus*; incluso, por inferencia se ha relacionado la prolactina con el fenómeno de alza postparto (Alba, 1983; Brunsdon, 1967; Blitz y Gibbs II, 1972; Fleming, 1989; Gibbs y Barger, 1986), sin embargo, no existe evidencia molecular de esta relación. En el presente estudio se demostró la presencia de posibles receptores de prolactina y progesterona en larvas de *H. contortus* y que la adición de estas hormonas a cultivos afecta la fisiología y comportamientos larvarios.

Una forma directa de observar el efecto de las hormonas sobre algún parásito es agregar la hormona a un cultivo y observar su efecto sobre los parásitos en el mismo. Nosotros observamos, que el cultivo de las larvas de *H. contortus* en medios de cultivo (RPMI-1640) favoreció el crecimiento, independientemente de la presencia de hormonas en el medio. Las larvas que se cultivaron en presencia de 1, 8 y 160 ng/mL de progesterona durante 5 días fueron más grandes ($p < 0.07$) que las larvas cultivadas sin la hormona. Después de 10 días de incubación con progesterona se observó que las estimuladas con 8 ng/mL crecieron menos en comparación con las del grupo testigo, mientras que las estimuladas con 160 ng/mL crecieron más. Lo anterior muestra que la progesterona acelera el crecimiento de las larvas los primeros días de

la incubación y posteriormente dependiendo de la concentración, disminuye o aumenta su alargamiento. Con lo que se demuestra que las larvas de *H. contortus* son capaces de reconocer la hormona y responder modulando su crecimiento.

La prolactina ha sido la principal hormona que indirectamente se ha asociado al fenómeno de alza postparto de *H. contortus*, infiriendo que esta puede tener efectos directos sobre la reactivación de las larvas o en el aumento de la fertilidad de hembras en el abomaso (Blitz y Gibbs II, 1972; Quiroz, 1984; Rimbaud *et al*, 2005). Nuestros resultados demostraron que la estimulación *in vitro* con prolactina ovina no produjo cambios en la longitud de las larvas comparadas con el grupo control, al menos durante los periodos de tiempo evaluadas. Chavez-Guitron *et al.* (2016) reportaron que la prolactina *in vitro* sobre larvas de *Toxocara canis* estimulaba el crecimiento de estas en periodos de exposición mayores a 10 días, por lo que probablemente aumentando los tiempos de estimulación de *H. contortus* pueda verse el efecto *in vitro*, sin embargo, la gran dificultad de mantener larvas *H. contortus* viables y libres de contaminación bacteriana no permitieron realizar estas evaluaciones. Además, el no haber observado un aumento de tamaño, no indica que no pudieran haberse presentado cambios fisiológicos o moleculares en las larvas estimuladas.

Los estrógenos son hormonas esteroideas muy potentes, siendo necesarias concentraciones muy bajas para inducir sus efectos. Ibarra *et al* (2011) encontraron que la estimulación *in vitro* de *Taenia crassiceps* con estrógenos inducía un aumento en la producción de gemas; sin embargo, la estimulación de larvas de *H. contortus* con estrógenos no arrojó resultados significativos en la diferencia de tamaño respecto del grupo control. La ausencia de respuesta de las larvas al estímulo estrogénico *in vitro*,

probablemente indica que las larvas de *H. contortus* no tienen la capacidad de reconocer a los estrógenos de su hospedador.

Se ha observado que la incubación de L3 en medio RPMI induce el desarrollo larvario y la muda al siguiente estadio (L4), a partir del 5° día ya es posible observar un gran porcentaje de L4 en los cultivos (Rothwell y Sangster, 1993; Kotze, 2003). Nosotros encontramos que al estimular las L3 con las diferentes hormonas, el desarrollo de las larvas cultivadas en presencia de prolactina y estrógenos era similar a las larvas de los grupos incubados sin hormonas (testigo). Sin embargo, las larvas incubadas con progesterona por 5 días, inhibió el desarrollo a L4, nosotros encontramos una disminución en la proporción de L4 en los cultivos. El efecto inhibitor en la evolución larvaria se mantuvo durante los 10 días de tratamiento hormonal ($p < 0.05$). El efecto inhibitor inducido por la progesterona en helmintos ya había sido descrito por Hernández-Bello *et al* en un estudio realizado en 2011, donde observó que los tratamientos con progesterona disminuían el proceso de muda en un 50% en *Trichinella spiralis*. El impacto del efecto inhibitor de progesterona en el desarrollo de larvas de *H. contortus in vitro* en la relación huésped-parásito es polémico. Sin embargo, se podría hipotetizar que la progesterona facilita la entrada de larvas de *H. contortus* en un estado de hipobiosis durante la gestación y que la disminución de esta hormona durante la parte final del parto contribuye a la reactivación larvaria. Se requieren estudios posteriores más profundos para determinar si estas observaciones *in vitro* tienen una repercusión en la relación huésped-parásito *in vivo*.

El movimiento larvario es una característica intrínseca de las fases larvarias de nematodos, por lo que es otra forma de evaluar los efectos directos de un compuesto *in*

vitro, por ejemplo, se ha utilizado para evaluar *in vitro* el efecto de fármacos sobre helmintos o el efecto de hormonas (Kiuchi et al, 1987; Satou et al., 2002; Zaridah et al., 2001). Nuestros resultados demostraron que la incubación de larvas con prolactina y estrógenos no modifica su actividad, sin embargo, la progesterona aumenta el movimiento larvario de manera dosis dependiente. Efectos similares producidos por prolactina y progesterona en larvas de *Toxocara canis* han sido reportados por nuestro grupo (Chavez-Guitron, 2016). Igual que en la observación anterior, la implicación de este fenómeno sobre la biología del parásito solo puede ser hipotetizada. El movimiento larvario, permite a las larvas entrar a las glándulas abomasales, un mayor aumento de la motilidad le daría ventajas en la implantación en el abomaso. Lo que sí es claro, es que las larvas reconocen a la progesterona y que esta modifica su comportamiento.

La citometría de flujo ha sido empleada para la caracterización de células con base en su tamaño y complejidad, además de utilizarse para la identificación de proteínas específicas presentes en estas células (Helin, et al, 1989; De-Rosa et al, 2001; Skliris, et al, 2002). Nuestros resultados mostraron que las células provenientes de L3 de *H. contortus* en su gran mayoría se encontraban cerca del origen, lo que indica que son células de poca complejidad y de poco tamaño. Estos patrones en la distribución celular concuerdan con los reportados en otros helmintos como: *Trichinella spiralis* (Nava-Castro et al., 2011), *Taenia crassiceps* (Ibarra-Coronado et al, 2011) y *Toxocara canis* (Chávez-Guitron et al, 2016). Nuestros resultados demuestran que las células de *H. contortus* son similares a las de otros helmintos. Debido a que no existen

poblaciones celulares definidas en larvas de *H. contortus*, se utilizan todas las células contabilizadas para los estudios de citometría de flujo.

Una de las formas para determinar si una célula es afectada por una hormona, es identificar la presencia de un receptor o una proteína tipo receptor para dicha hormona en la célula estudiada (Olszewski, et al, 1981; Benten, et al, 2002; De León-Nava, et al, 2009). En este estudio, analizando las células de L3 por citometría de flujo se encontró que el 15% del total de células fueron positivas al rP4, el 5% fueron positivas al rPRL y el 10% al rE2 α . La identificación de receptores para estas hormonas han sido reportados en algunos parásitos como: *Taenia solium* que presenta un rP4 tipo B (Escobedo et al. 2004), *Toxoplasma gondii* presenta un rPRL (Dzitko et al, 2013), *Toxocara canis* presenta rPRL y rP4 (Chávez-Guitron, 2016; Chávez-Guitron et al, 2016) y *Taenia crassipiceps* con un rE2 α (Ibarra-Coronado et al., 2011). La presencia de posibles receptores hormonales sugiere que las larvas son capaces de reconocer estas hormonas a través de receptores y de utilizarlas en su beneficio.

Las hormonas tienen la capacidad de autorregular su función a través de la modificación de la expresión de sus receptores en las células blanco (Burnstein, et al, 1991; Nixon, et al, 2002; Marlatt, et al, 2008). Los resultados de este trabajo muestran que inicialmente las larvas presentan un 15% de células con rP4, si se cultivan en ausencia de hormonas, la expresión disminuye por lo que el número de células positivas disminuye, pero si se incuban con progesterona, la expresión se mantiene y el número de células positivas a rP4 se mantiene. Estos resultados muestran que la progesterona regula el número de células positivas al rP4 y que, por lo tanto, estos

receptores son específicos de progesterona y que los efectos observados son probablemente el resultado de la activación de estos receptores.

Los efectos generados por las hormonas en los mamíferos se asocian al tipo de células blanco en los diferentes tejidos. En este estudio se demostró que las células que tienen el receptor para progesterona se localizan en la luz del tubo digestivo, así como en el extremo anterior de la L3, mientras que el posible receptor para prolactina se encuentra en el citoplasma de las células intestinales de la larva. Se sabe que el proceso inicial en la evolución de las fases larvarias es la pérdida de la cutícula, la cual se fragmenta en el extremo anterior formando un anillo y después un espacio por el cual la larva migrará y se deshará de la cutícula (Gamble et al., 1989). El efecto inhibitor del desarrollo podría asociarse a la localización en el extremo anterior, así como en el tubo digestivo, modulando las funciones celulares de estas. El papel de los rPRL en células intestinales de la larva no se conoce, pero podría estar relacionado a la reactivación de larvas durante el alza-posparto como ya se ha propuesto.

Estudios realizados por Yan et al. (2014) demostraron que las larvas de *H. contortus* presentan moléculas específicas de arresto larvario (Hc-FAUA y Hc.-FAUB) en células intestinales; si bien nuestros resultados no se enfocaron en el arresto larvario y sus marcadores, el efecto inhibitorio en la evolución inducido por progesterona y la localización de su receptor en tracto digestivo, hace pensar en la importancia de estas células y la posible interacción de la progesterona y las proteínas del arresto larvario.

Aparte de la estimulación con su respectiva hormona, es necesario conocer si los posibles receptores expresados en las larvas tienen semejanzas genéticas respecto de su hospedero. A través de la PCR logramos identificar un amplicón que correspondía al tamaño del ADN control, los iniciadores empleados estaban diseñados para identificar el componente membranal 2 del receptor de progesterona, lo que posiblemente indica que es la variante de receptor que se encuentra en *H. contortus*. Este componente ha sido reportado en nematodos como *C. elegans* (Runko, 2004), metacestodos de *Taenia solium* (Aguilar-Díaz et al, 2006) y *Trichinella spiralis* (Colín-Oviedo, 2014), en donde se plantea que permitiría a los nematodos responder en menos tiempo a los efectos de la progesterona. Nuestros resultados muestran que es posible amplificar en las larvas de *H. contortus* fragmentos genicos utilizando iniciadores diseñados para hibridarse en el gen del componente 2 del rP4 y el gen del rPRL. Los amplicones generados con el uso de estos iniciadores fueron del mismo tamaño en ambas muestras de ADNg de células del útero borrega y ADNg del L3, lo que apoya la especificidad de los mismos, sin embargo, para confirmarlo se requiere secuenciar y comparar dichos amplicones.

La presencia de receptores hormonales similares a los de su hospedador y la utilización de las hormonas del hospedador en su beneficio, es sin duda una expresión de la adaptación al parasitismo que presentan algunos organismos. En este trabajo encontramos evidencias claras de que la progesterona y la prolactina tienen un efecto directo sobre la fisiología y comportamiento de las larvas de *H. contortus* y aunque no es totalmente claro qué ventajas obtendría el parásito, si es claro que las larvas no son indiferentes a la presencia de hormonas de su hospedador. Por otro lado, hay que

considerar el efecto indirecto de las hormonas sobre los parásitos, puesto que modifican la respuesta inmune del hospedador y con esto el microhábitat donde vive el parásito. Por ejemplo, la progesterona tiene un efecto antiinflamatorio en el hospedador, aumenta la producción de IL-10 e inhibe las citocinas proinflamatorias IL-2, IL-6, IL-12 y TNF- α (Cheng y Sharma, 2015; Thaxton y Sharma, 2010), cambiando una respuesta tipo Th1 a una tipo Th2 (Szekeres-Bartho y Wegmann, 1996; Szekeres-Bartho et al., 1997; Srivastava et al., 2007).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que las células de las L3 de *H. contortus* presentan moléculas tipo rP4 y rPRL y que, si consideramos que las larvas responden a la prolactina y a la progesterona, entonces es probable que lo hagan a través de estos receptores. Futuros trabajos en donde se evalúe la activación de células de las larvas de *H. contortus* con estas hormonas y las cascadas de activación celular confirmarían o rechazarán esta hipótesis.

CONCLUSIONES

- Las larvas 3 de *Haemonchus contortus* tienen células que tienen receptores para estrógenos, progesterona y prolactina.
- Los receptores para progesterona se localizan en las células de la luz del tubo digestivo de larvas 3 de *Haemonchus contortus*.
- La estimulación *in vitro* con progesterona a una concentración de 8 ng induce aumento de tamaño, así como la inhibición en la evolución larvaria.
- La estimulación por 5 días con progesterona *in vitro* mantiene la expresión de células positivas a los receptores de progesterona.
- Las larvas en medio RPMI sin estimulación con progesterona, pierden la expresión de los receptores para progesterona.
- Los receptores de prolactina se localizan en el citoplasma de las células intestinales de larvas 3 de *Haemonchus contortus*.
- En las larvas 3 de *H. contortus* se logró un producto de amplificación positivo a un fragmento del gen que codifica al receptor de prolactina y al componente 2 asociado al receptor de progesterona en mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Alba-Hurtado, F.**, 1983. Evaluación del conteo de huevos de nematodos gastroentéricos después del parto en borregas criollas (Tesis de Licenciatura). Cuautitlán Izcalli, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
2. **Alba-Hurtado, F.**, 2007. Manual de prácticas de Medicina Veterinaria. UNAM.
3. **Alba-Hurtado, F.**, Muñoz-Guzmán, M.A., Torres-Hernández, G., Becerril-Pérez, C.M., 2010. Comparison of parasitological and productive traits of criollo lams native to central America plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 172:277-282.
4. **Aguilar-Díaz, H.**, Bobes, R.J., Carrero, J.C., Camacho-Carranza, R., Cervantes, C., Cevallos, M.A., Dávila, G., Rodríguez-Dorantes, M., Escobedo, G., Fernández, J.L. and Fragoso, G., 2006. The genome project of *Taenia solium*. *Parasitol. Int.* 55,S127-S130.
5. **Angulo-Cubillán, F.**, García-Coiradas, J., Cuquerella, L., Fuente, M., C. D. L., Alunda, J. M., 2007. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Rev. Cient.* 17(6).
6. **Barger, I.**, 1993. Influence of sex and reproductive status on susceptibility on ruminants to nematode parasitism. *Int. J. Parasitol.* 23:463-469.
7. **Barrett, K.**, Barman, S., Boitano, S., Brooks, H., 2010. Ganong's review of medical physiology. McGraw Hill, USA.

8. **Baulieu, E.**, Kelly, P., 1990. Hormones: From molecules to disease. Francia: Hermann publishers in arts and sciences.
9. **Beasley, A.**, Kahn, L., Windon, R., 2010 The periparturient relaxation of immunity in Merino ewes infected with *Trichostrongylus colubriformis*: Parasitological and immunological responses II. Vet. Parasitol. 168:60-70.
10. **Beasley, A.**, Kahn, L., Windon, R., 2010. The periparturient relaxation of immunity in Merino ewes infected with *Trichostrongylus colubriformis*: Endocrine and body compositional responses I. Vet. Parasitol.168:51-59.
11. **Beasley, A.**, Kahn, L., Windon, R., 2012. The influence of reproductive physiology and nutrient supply on the periparturient relaxation of immunity to the gastrointestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* in Merino ewes. Vet. Parasitol. 1-19
12. **Benten, W. P. M.**, Stephan, C., Wunderlich, F. 2002. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. Steroids, 67(7), 647-654.
13. **Bignon, C.**, Binart, N., Ormandy, C., Schuler, L. A., Kelly, P. A., Djiane, J. 1997. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. J. Mol. Endocrinol. 19(2), 109-120.
14. **Blitz, N.**, Gibbs, H., 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-I; The induction of arrested development. Int. J. Parasitol. 2:5-12.

15. **Blitz, N.**, Gibbs, H., 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-II; Termination of arrested development and the spring-rise phenomena. *Int. J. Parasitol.* 2:13-22.
16. **Borecka, A.**, Gawor, J., Niedworok, M., Sordyl, B., 2008. Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Helminthology* 45(3), 147-149.
17. **Botana L.** 2002 Farmacología y Terapéutica Veterinaria. España: McGraw Hill.
18. **Brunsdon, R.**, 1967. The seasonal variations in the nematode egg counts of sheep: a comparison of the spring-rise phenomenon in breeding and unmated ewes in New Zeland. *Vet. Parasitol.* 12:75-80.
19. **Buendía-Jiménez, A.**, 2015. Patrones de interleucinas producidas por linfocitos abomasales asociados a la resistencia en la hemoncosis experimental ovina (Tesis de Doctorado). Cuautitlán Izcalli (México) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
20. **Burnstein, K. L.**, Bellingham, D. L., Jewell, C. M., Powell-Oliver, F. E., Cidlowski, J. A. 1991. Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids*, 56(2), 52-58.
21. **Bush, A.**, Fernández, J., Esch, G., Seed, R., 2001 Parasitism; The diversity and ecology of animal parasites. Reino Unido: Cambridge University Press.
22. **Cervantes-Rebolledo, C.**, Carrero-Sánchez, J. C., 2008. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. *Rev. Med. Ext. Port.*

23. **Chamley, W.**, Joan, M., BuckMaster, M., Cerini, M., Cumming, I., Goding, J., Obst, J., William, A., Winfield, C., 1973. Changes in the levels of Progesterone, Corticosteroids, Estrone, Estradiol-17B, Luteinizing Hormone, and Prolactin in the peripheral plasma of the ewe during late pregnancy and at parturition. *Biol. Reprod.* 9:30-35.
24. **Chartier, C.**, Hoste, H., Bouquet, W., Malpoux, B., Pors, I., Koch, C., 1998 Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats. *Parasitol. Res.* 84:806-810.
25. **Chávez-Guitrón, L.E.**, 2016. Estudio de algunos factores endócrinos sobre la reactivación de larvas 2 de *Toxocara canis*. (Tesis de Doctorado). Cuautitlán Izcalli (México) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
26. **Chávez-Guitrón, L.E.**, Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Nava-Castro, K.E., Ramírez-Álvarez, H., Moreno-Mendoza, N.A., Hernández-Cervantes, R., Alba-Hurtado, F., 2016 The *in vitro* effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 224:33-38.
27. **Cheng, S.B.**, Sharma S., 2015 Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 73(6):487-500.
28. **Clevenger, C.**, Freier, D., Kline, J., 1998. Prolactin receptor signal transduction in cells of immune system (Review). *J. Endocrinol.* 157:187-197.

29. **Colín-Oviedo, Á.** 2014. Caracterización molecular e inmunolocalización del receptor de progesterona durante la diferenciación del adulto de *Trichinella spiralis*. (Tesis de Maestría). Facultad de Medicina, UANL. <https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/5982/21546.pdf?sequence=1>
30. **Cuenca-Verde, C.**, Buendía-Jiménez, J., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J., 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.
31. **De León-Nava, M. A.**, Nava, K., Soldevila, G., López-Griego, L., Chávez-Ríos, J. R., Vargas-Villavicencio, J. A., & Morales-Montor, J. 2009. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 113(1), 57-64.
32. **De Rosa, S. C.**, Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., Roederer, M., 2001. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Med.* 7(2): 245-248.
33. **Escobedo, G.**, Larralde, C., Chavarría, A., Cerbón, M.A., Morales-Montor, J., 2001. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 9:1235-44.
34. **Escobedo, G.**, Roberts, C., Carrero, J., Morales-Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: and old mechanism of host exploitation?. *Trends in Parasitol.* 21.

35. **FAO**, Food and Agriculture Organization, 2008. Food Outlook.
<http://www.fao.org/docrep/004/ad452e/ad452e2y.htm>
36. **Fish, E.N.**, 2008. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8(9):737-744.
37. **Fleming, M.**, 1993. Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 50:109-115.
38. **Fleming, M.**, Conrad, S., 1989. Effects of exogenous progesterone and/or prolactin on *Haemonchus contortus* infections in ovariectomized ewes. *Vet. Parasitol.* 34:57-62.
39. **Freebern, W.J.**, Osman, A., Niles, E.G., Christen, L., LoVerde, P.T., 1999b. Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. Evidence for a role in female-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 274: 4577–4585.
40. **Gamble, H.R.**, Lichtenfels, J.R., Purcell, J.P., 1989. Light scanning electron microscopy of the ecdysis of *Haemonchus contortus* infective larvae. *J. Parasitol.* 75:303-307.
41. **Gasser, R.**, Samson-Himmelstjerna, G.V., 2016. *Haemonchus contortus* and Haemonchosis—Past, Present and Future Trends (Vol. 93). Academic Press.
42. **Gatongi, P.**, Prichard, R., Ranjan, S., Gathuma, J., Munyua, W., Cheruiyot, H., Scott, M., 1998. Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet. Parasitol.* 77:49-61.

43. **Gennari, L.**, Merlotti, D., De Paola, V., Calabro, A., Becherini, L., Martini, G., Nuti, R. 2005. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *AJE* 161(4): 307-320.
44. **Gerisch, B.**, Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V., Antebi, A., 2001. A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Dev. Cell* 1(6): 841-851.
45. **Gibbs, H.**, Barger, I., 1986. *Haemonchus contortus* and other trichostrongylides, infections in parturient, lactating and dry ewes. *Vet. Parasitol.* 22:57-66.
46. **Guerrero-Estévez, S.**, Moreno-Mendoza, N. 2012. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J. Fish Biol.* 80(3): 572-594.
47. **Hafez, B.**, Hafez, E., 2002. Reproducción e inseminación artificial en los animales. México: McGraw Hill.
48. **Helin, H. J.**, Helle, M. J., Kallioniemi, O. P., Isola, J. J., 1989. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry. *Cancer*, 63(9): 1761-1767.
49. **Helmam, M.**, 1976. Producción ovina. Argentina: El Ateneo.
50. **Hernández-Bello, R.**, Ramírez-Nieto, R., Muñoz-Hernández, S., Nava-Castro, K., Pavón, L., Sánchez-Acosta, A.G., Morales-Montor, J., 2011. Sex steroids effects

on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. J. Biomed. Biotech. 1-10.

51. **Hodgson, J.**, Cameron, K., Clark, D., Condrón, L., Fraser, T., Hedley, M., Holmes, C., Kemp, P., Lucas, R., Moot, D., Morris, S., Nicholas, P., Shadbolt, N., Sheath, G., Valentine, I., Waghorn, G., Woodfield, D., 2005. New Zealand's pastoral industries: efficient use of grassland resources. In: Reynolds, S.G., Frame, J. (Eds.), Grasslands, Developments, Opportunities, Perspectives. Science Publication, New Hampshire, USA, pp. 181–205.
52. **Hoss, S.**, Lennart, W., 2007. Endocrine disruption in nematodes: effects and mechanisms. Ecotoxicol. 16:15-28.
53. <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeDiez/Articulos/MedicinaMolecular/Archivos/GIF/FiguraUno.gif>
54. <http://jeb.biologists.org/content/jexbio/212/13/2007/F1.large.jpg>
55. http://jpp.krakow.pl/journal/archive/12_08_s9/gfx/rys0702.gif
56. **Hu, M.**, Lok, J. B., Ranjit, N., Massey, H. C., Sternberg, P. W., Gasser, R. B., 2010. Structural and functional characterisation of the fork head transcription factor-encoding gene, Hc-daf-16, from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* (Strongylida). Int. J. Parasitol. 40(4), 405-415.
57. **Hu, W.**, Yan, Q., Shen, D.K., Liu, F., Zhu, Z.D., Song, H.D., Xu, X.R., Wang, Z.J., Rong, Y.P., Zeng, L.C. and Wu, J., 2003. Evolutionary and biomedical

implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nature Genet.* 35(2): 139-147.

58. **Ibarra-Coronado, E.**, Galileo, E., Nava-Castro, K., Chávez-Rios, J., Hernández-Bello, R., García-Varela, M., R-Ambrosio, J., Reynoso-Ducoing, R., Fonseca-Liná, R., Ortega-Pierres, G., Pavón, L., Hernández, M., Morales-Montor, J., 2011. A helminth cestode parasite express an estrogen-binding protein resembling a classic nuclear estrogen receptor. *Steroids* 76:1149-1159.
59. **Intlekofer, K. A.**, Petersen, S. L. 2011. Distribution of mRNAs encoding classical progestin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progestin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience*, 172: 55-65.
60. **Jacobs, D. E.**, Zhu, X., Gasser, R. B., Chilton, N. B., 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica.* 68(2): 191-200.
61. **Kenyon, C.**, Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464.
62. **Kiuchi, F.**, Miyashita, N., Tsuda, Y. ,Kondo, K., Yoshimura, H., 1987. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 2880–2886.
63. **Klein, S.L.**, 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *J. Neurosci. Biobehav. Rev.* 24:627-638.

64. **Klein, S. L.**, Roberts, C. W., 2010. Sex hormones and immunity to infection (pp. 93-122). Springer.
65. **Kotze, A.**, 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 33:393-400.
66. **Kostrouchova, M.**, Krause, M., Kostrouch, Z., Rall, J. E., 2001. Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(13), 7360-7365.
67. **Kowalik, M. K.**, Rekawiecki, R., Kotwica, J. 2013. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod. Biol.*, 13(4): 279-289
68. **Krumenacker, J.**, Montgomery, D., Buckley, D., Gout, P., Buckley, A., 1998. Prolactin receptor signaling. *Endocrine.* 9:313-320.
69. **Lehninger, A. L.** 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*: David L. Nelson, Michael M. Cox. Recording for the Blind & Dyslexic.
70. **Levin, E. R.**, 2001. Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.* 91(4): 1860-1867.
71. **Liu, F.**, Zhou, Y., Wang, Z.Q., Lu, G., Zheng, H., Brindley, P.J., McManus, D.P., Blair, D., Zhang, Q.H., Zhong, Y., Wang, S., Han, Z.G., Chen, Z., 2009. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature* 460:345–351.

72. **Marlatt, V. L.**, Martyniuk, C. J., Zhang, D., Xiong, H., Watt, J., Xia, X., Moon, T. Trudeau, V. L. 2008. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17 β -estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Mol. Cel. Endocrinol.* 283(1): 38-48.
73. **Maswoswe, S.M.**, Peters, W., Warhurst, D.C., 1985. Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79:607-16.
74. **Morris, S. T.**, 2009. Economics of sheep production. *Small ruminant research*, 86(1): 59-62.
75. **Mote, P. A.**, Balleine, R. L., McGowan, E. M., Clarke, C. L. 1999. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(8): 2963-2971.
76. **Muñoz-Guzmán, M.A.**, 2006. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Haemonchus contortus* en razas de alta y baja susceptibilidad. Tesis de Doctorado, UNAM México.
77. **Muñoz-Guzmán, M.A.**, Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2012. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 185: 175–180.
78. **Murphy, C.T.**, 2006. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp. Gerontol.* 41: 910–921.

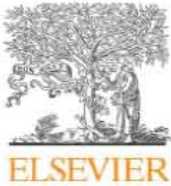
79. **Nava-Castro, K.**, Hernández-Bello, R., Muñiz-Hernández, S., Escobedo, G., Morales-Montor, J., 2011. New method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: proof of concept. *Biomed Res. Int.* 2011.
80. **Neville, M.**, McFadden, T., Forsyth. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia.* 7:1-18.
81. **Nixon, A. J.**, Ford, C. A., Wildermoth, J. E., Craven, A. J., Ashby, M. G., Pearson, A. J., 2002. Regulation of prolactin receptor expression in ovine skin in relation to circulating prolactin and wool follicle growth status. *J. Endocrinol.* 172(3): 605-614.
82. **Olszewski, W.**, Darzynkiewicz, Z., Rosen, P. P., Schwartz, M. K., Melamed, M. R. 1981. Flow cytometry of breast carcinoma: II. Relation of tumor cell cycle distribution to histology and estrogen receptor. *Cancer*, 48(4): 985-988.
83. **Partida de la Peña, J. A.**, Braña Varela, D., Jiménez Severiano, H., Ríos Rincón, F.G., Buendía-Rodríguez, G., 2013. *Producción de Carne Ovina.* Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP.
84. **Quiroz, H.**, 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* México: Limusa.

85. **Rimbaud, E.**, Pineda, N., Luna, L., Morales, X., Rivera, G., Olivares, A., 2005. Primera comprobación del alza post parto en el contaje de huevos de nematodos en materia fecal de ovinos en Nicaragua. REDVET. 11(VI):1-5.
86. **Roeber, F.**, Jex, A. R., Gasser, R. B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. Parasit. Vectors. 6(1): 153.
87. **Romano, M.C.**, Valdez, R.A., Cartas, A.L., Gómez, Y., Larralde, C., 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 85: 221–225.
88. **Rothwell, J. T.**, Sangster, N. C., 1993. An in vitro assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. Int. J. Parasitol. 23(5): 573-578.
89. **Rozen, S.**, Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*. Meth. Mol. Biol. 365-386.
90. **Runko, E.**, Kaprielian, Z., 2004. *Caenorhabditis elegans* VEM-1, a novel membrane protein, regulates the guidance of ventral nerve cord-associated axons. J. Neurosci., 24(41): 9015-9026.
91. **Sánchez-Paredes, A.**, 2017. Patrones de RNAm codificador de citocinas en linfocitos asociados a la protección contra la hemoncosis experimental ovina.

(Tesis de maestría). Cuautitlán Izcalli (México) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

92. **Satou, T.**, Akao, N., Matsubishi, R., Koike, K., Fujita, K., Nikaido, T. 2002. Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. Biol. Pharm. Bull. 25(12): 1651-1654.
93. **Schmidt, G.**, Larry, R., 2000. Foundations of Parasitology. USA: McGraw Hill.
94. **Shimada, A.**, 2003. Nutrición animal. México: Trillas,
95. **Skirris, G. P.**, Parkes, A. T., Limer, J. L., Burdall, S. E., Carder, P. J., Speirs, V. 2002. Evaluation of seven oestrogen receptor β antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue. The Journal of pathology, 197(2), 155-162.
96. **Sommerville, R.**, 1966. The development of *Haemonchus contortus* to the fourth stage *in vitro*. J. Parasitol. 52:127-136.
97. **Srivastava, M.D.**, Thomas, A., Srivastava, BIS., Check, J.H., 2007 Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. Leukemia Lymph. 48(8):1610-7.
98. **Sutherland, I.**, Scott, I., 2010. Gastrointestinal nematodes in sheep and cattle. India: Waley-Blackwell.

99. **Szekeres-Bartho, J.**, Par, G., Dombay, Gy., Smart, Y.C., Volgyi, Z., 1997 The anti-abortive effect of PIBF in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol.* 177:194-9.
100. **Szekeres-Bartho, J.**, Wegmann, T.G., 1996. A progesterone-dependent immuno-modulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 31:81-95.
101. **Thaxton, J.E.**, Sharma S., 2010. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Rep Immunol.* 63(6):482-91.
102. **Valdez-Ramírez.** 2004. Aislamiento de una cepa de *Haemonchus contortus*. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
103. **Wu, W.**, LoVerde, P., 2011. Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. *Mol. Cel. Endocrinol.* 334:56-66.
104. <http://www.uniprot.org/uniprot/P01240>
105. **Yan, B.**, Guo, X., Zhou, Q., Yang, Y., Chen, X., Sun, W., Du, A., 2014. Hc-fau, a novel gene regulating diapause in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 775–786.
106. **Zaridah, M. Z.**, Iddid, S. Z., Omar, A. W., Khozirah, S. 2001. In vitro antifilarial effects of three plant species against adult worms of subperiodic *Brugia malayi*. *J. Ethnopharmacol.* 78(1): 79-84.



Research paper

Progesterone inhibits the *in vitro* L3/L4 molting process in *Haemonchus contortus*

R.A. Gutiérrez-Amézquita^a, J. Morales-Montor^c, M.A. Muñoz-Guzmán^b, K.E. Nava-Castro^d,
H. Ramírez-Álvarez^b, C. Cuenca-Verde^b, N.A. Moreno-Mendoza^e, J.A. Cuéllar-Ordaz^b,
F. Alba-Hurtado^{b,*}

^a Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad Universitaria, CDMX, Mexico

^b Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan S/N, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico, Mexico

^c Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, CDMX 0415, Mexico

^d Departamento de Genotoxicología Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México and Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX, Mexico

^e Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, CDMX, 0415, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Progesterone
Haemonchus
Hormone
Parasite receptor
Molting

ABSTRACT

We evaluated the direct effects of progesterone on the morphology, maturation and behavior of *Haemonchus contortus* larvae *in vitro*. The presence and location of possible progesterone receptors in these larvae were also determined. The addition of 8 ng/mL of progesterone to larval cultures over 10 days reduced larval enlargement, while the addition of 160 ng/mL of the hormone increased the enlargement. Up to 62% and 65% of the *H. contortus* larvae molted from third-stage larvae (L3) to fourth-stage larvae (L4) when cultured in RPMI-1640 media without hormone for 5 and 10 days, respectively. The addition of different progesterone concentrations (1, 8, 16, 80 and 160 ng/mL) to the larval cultures significantly inhibited the molting process within the same periods. The addition of 8 ng/mL or higher progesterone concentrations to the cultures significantly increased larval motility ($p < 0.05$) compared with unstimulated larvae. Flow cytometry showed the expression of progesterone receptors (P₄-R) in 15% of the cells from newly isolated *H. contortus* larvae. When the larvae were cultured for 5 days in the presence of the hormone, the percentage of P₄-R⁺ cells remained the same. In contrast, unstimulated larvae showed a significant reduction in the number of P₄-R⁺ cells. Using confocal microscopy, a greater concentration of P₄-Rs was immunolocalized in the anterior portion of the alimentary tract of the larvae, suggesting that the cells in this region are targeted by the hormone. The results of the present study show that *H. contortus* larvae have possible P₄-Rs and respond to this hormone by inhibiting their molting process, thereby suggesting the participation of progesterone in the larval arrest phenomenon.

1. Introduction

The effect of various host hormones has been demonstrated *in vitro* on the genetic and metabolic activity of certain parasitic helminths. The treatment of *Taenia crassiceps* metacestodes with 17- β -estradiol increases their reproductive capacity (the number of buds), while treatment with testosterone decreases it (Escobedo et al., 2004). In a previous study, we demonstrated that *Toxocara canis* larvae have prolactin receptors and that the *in vitro* addition of prolactin accelerates their growth and modifies their activity (Chávez-Guitrón et al., 2016).

Similarly, several studies present evidence of hormone effects on certain parasites within the host. More specifically, the susceptibility of

some parasitic infections is influenced by the sexual hormones of the host. For example, the susceptibility of male mice to infections by *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma cruzi* and *Strongyloides venezuelensis* is suppressed when estrogenic compounds, such as estradiol, are administered (de Souza et al., 2001; Rivero et al., 2002; Libonati et al., 2006).

The progesterone is able to stimulate reproduction of *Taenia crassiceps in vitro*, by a probable non-classic progesterone receptor (Escobedo et al., 2004). Progesterone treatment increased *Taenia crassiceps* metacestodes loads 2-fold in females and 3-fold in males, compared with their respective controls (Vargas-Villavicencio et al., 2006). Conversely, progesterone protects mice from infections by *Trichinella*

* Corresponding author at: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
E-mail address: fealba@hotmail.com (F. Alba-Hurtado).

spiralis larvae (Nuñez et al., 2005) and hamsters from infections by *Taenia solium* metacestodes (Escobedo et al., 2011). Furthermore, progesterone-derived DHEA protects mice from infections by *Taenia crassiceps* metacestodes (Vargas-Villavicencio et al., 2006). Hernández-Bello et al. (2011) showed that progesterone inhibits *in vitro* molting of *Trichinella spiralis*, while testosterone does not have any effect.

Stage three/four (L3/L4) *Haemonchus contortus* larvae can temporarily and reversibly stop their development and remain arrested (hypobiosis) in the abomasal wall of sheep. Not all larvae enter hypobiosis; factors that have been demonstrated to favor it are adverse climatic conditions, the immunological state of the host and the nematode strain (Blitz and Gibbs, 1972a, 1972b). Nevertheless, the effects of host hormones on arrested *H. contortus* larvae have not been considered. The reactivation of hypobiotic larvae to continue their development has been associated with climatic conditions and the reduced immune response that occurs close to parturition.

Increased shedding of *H. contortus* eggs has been observed in the feces of ewes starting 4 weeks prior to parturition and peaking at 6–8 weeks after parturition (periparturient rise). This phenomenon has been associated with the maturation of arrested larvae and the increased fecundity of adult worms in the abomasum. Hormonal changes, such as the decrease in progesterone levels and the increase in serum prolactin levels, are among the most important physiological events that occur simultaneously with larval reactivation (Rhaman and Collins, 1992). Several studies have associated high serum prolactin levels with a greater shedding of eggs in feces (Fleming and Conrad, 1989; Fleming, 1993; Chartier et al., 1998). However, the role of progesterone in this phenomenon has not been studied. The aim of the present study was to evaluate the direct effects of progesterone on the morphology, maturation and behavior of *H. contortus* larvae *in vitro*. The presence and location of possible progesterone receptors in these larvae were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Derivation of *H. contortus* larvae

A strain of *H. contortus* that was isolated, characterized and used in previous studies, having a prepatent period of 18–20 days and high virulence, was used in the present study (Valdez-Ramírez, 2004; Cuenca-Verde et al., 2011; Muñoz-Guzmán et al., 2012; Buendía-Jiménez et al., 2015). This strain has been maintained by successive infections of susceptible lambs, and the virulence, fertility and morphology of the strain have been periodically verified. *H. contortus* L3 were obtained by the culture of feces from a donor lamb (Alba-Hurtado, 2007). The Internal Committee for the Care of Experimental Animals of the Postgraduate Program of Animal Production and Health (UNAM, Mexico) approved this study.

Larvae obtained from fecal cultures were washed with distilled water and placed in a Baermann apparatus to recover live and active specimens. The latter were incubated in a 5% sodium hypochlorite solution, centrifuged for 5 min at 700 g, washed three times with axenisation fluid (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, amphotericin 10 mg/mL, penicillin 200 UI/mL, streptomycin 200 mg/mL and ceftriaxone 32 mg/mL), and placed again in the Baermann apparatus (Kotze, 2003). The exsheathed larvae that were recovered were incubated with axenisation fluid for 3 h. After the larvae were washed with axenisation fluid, their viability and absence of cuticle was verified, and they were counted for further use in the RPMI-1640 cultures.

2.2. Effect of progesterone on larval morphology, motility, viability and maturation

Approximately 500 exsheathed larvae/well were incubated in triplicate in cell culture plates (Nunc) with 2 mL of RPMI-1640 medium (buffered with HEPES at pH 7.2, amphotericin 10 mg/mL, penicillin 200 UI/mL, streptomycin 200 mg/mL, ceftriaxone 32 mg/mL, 0.4% glucose and 2 mM glutamine). The progesterone concentrations used were 0 (negative control), 1, 8, 16, 80 and 160 ng/mL. The progesterone concentrations used were selected considering the minimum, medium and maximum serum concentration in pregnant ewes (1, 8 and 16 ng/mL respectively) reported by Hansen (1998), additionally 10 and 20 times the mean concentration were used (80 and 160 ng/mL respectively). The hormone was added on day 0 of the experiment to stimulate the larvae. The culture medium was replaced every 48 h with fresh medium and hormone. The plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 10 days. On days 0, 5 and 10, 300 µL of medium with larvae was obtained from each well and mixed with 300 µL of Lugol's iodine for 20 min. Following staining, 30 larvae from each well (90 larvae per concentration/day) were photographed at 100× magnification with an Olympus BX43 optic microscope and then measured with image processing software (Image-ProPremier). Larval enlargement was obtained by subtracting the mean length of the larvae on day 0 from that measured of each larva on each experimental day. The percentage of larval viability was

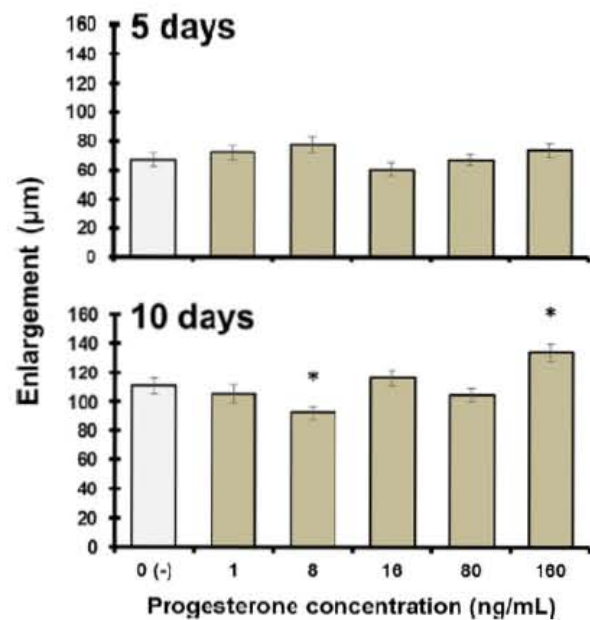


Fig. 1. Mean (\pm SE) enlargement (μm) of *Haemonchus contortus* larvae after 5 and 10 d of exposure to different progesterone concentrations. *indicates significant differences among the means on each day of exposure ($p < 0.05$).

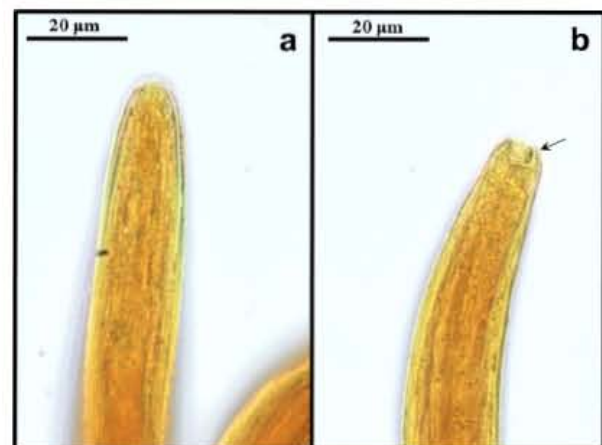


Fig. 2. Morphological characteristics of the buccal capsule from a) L3 and b) L4 *Haemonchus contortus*. The arrow shows a buccal capsule with mouthparts in L4.

Nunc) with 2 mL of RPMI-1640 medium (buffered with HEPES at pH 7.2, amphotericin 10 mg/mL, penicillin 200 UI/mL, streptomycin 200 mg/mL, ceftriaxone 32 mg/mL, 0.4% glucose and 2 mM glutamine). The progesterone concentrations used were 0 (negative control), 1, 8, 16, 80 and 160 ng/mL. The progesterone concentrations used were selected considering the minimum, medium and maximum serum concentration in pregnant ewes (1, 8 and 16 ng/mL respectively) reported by Hansen (1998), additionally 10 and 20 times the mean concentration were used (80 and 160 ng/mL respectively). The hormone was added on day 0 of the experiment to stimulate the larvae. The culture medium was replaced every 48 h with fresh medium and hormone. The plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 10 days. On days 0, 5 and 10, 300 µL of medium with larvae was obtained from each well and mixed with 300 µL of Lugol's iodine for 20 min. Following staining, 30 larvae from each well (90 larvae per concentration/day) were photographed at 100× magnification with an Olympus BX43 optic microscope and then measured with image processing software (Image-ProPremier). Larval enlargement was obtained by subtracting the mean length of the larvae on day 0 from that measured of each larva on each experimental day. The percentage of larval viability was

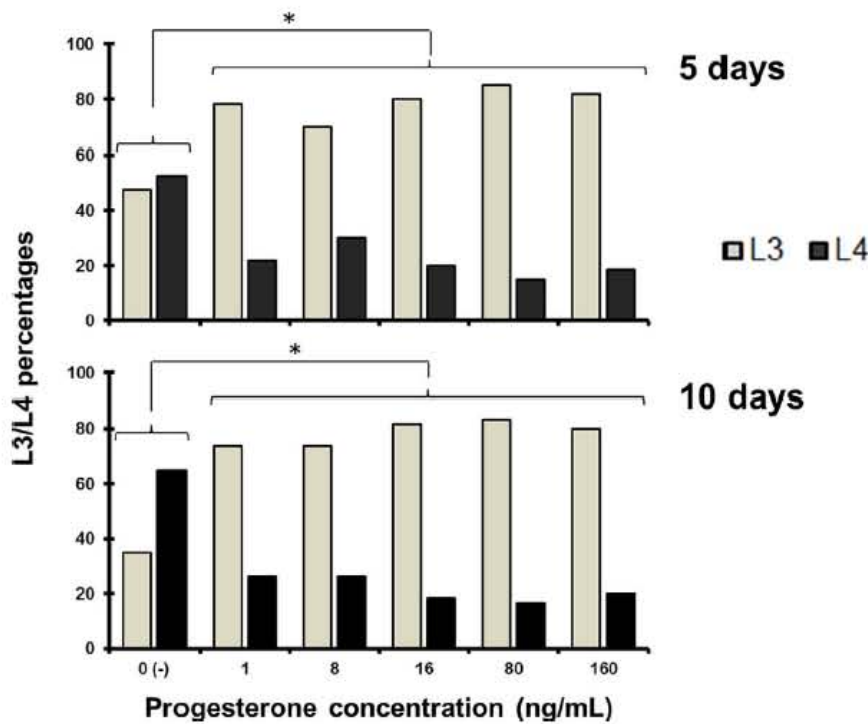


Fig. 3. Percentages of L3 and L4 *Haemonchus contortus* larvae after 5 and 10 d of exposure to different progesterone concentrations. *indicates significant differences among the means ($p < 0.05$).

Table 1
Mean (\pm SE) of motility values of *H. contortus* larvae (n = 90) stimulated with different concentrations of progesterone.

Culture Days	Concentration of progesterone					
	0 ng/mL	1 ng/mL	8 ng/mL	16 ng/mL	80 ng/mL	160 ng/mL
Day 0	2.3 \pm 0.10	2.4 \pm 0.10	2.6 \pm 0.10*	2.6 \pm 0.10*	2.6 \pm 0.10*	2.7 \pm 0.10*
Day 5	2.2 \pm 0.10	2.4 \pm 0.10*	2.6 \pm 0.11*	2.4 \pm 0.10*	2.4 \pm 0.11*	2.6 \pm 0.10*
Day 10	2.3 \pm 0.10	2.3 \pm 0.10	2.6 \pm 0.10*	2.7 \pm 0.11*	2.6 \pm 0.11*	2.7 \pm 0.12*

Motility values: 1 = larvae alive and immobile, 2 = larvae that moved only a portion of the body, 3 = larvae that moved the total body.
* Indicate significant differences ($p < 0.05$) with the control (0 ng/mL).

estimated by observing 100 larvae per concentration/day with an optic microscope. Live larvae were either mobile or immobile but maintained their internal structures without visible modifications, whereas dead larvae were immobile and had internal granules or modified internal structures.

The movement of 30 larvae from each well (90 larvae per concentration/at 0.5, 5 and 10 days) was videotaped directly from the culture plates using an inverted microscope, and larval motility was evaluated following the criteria of Kiuchi et al. (1987). Larvae with total body movement were assigned the value of 3, those that moved only a portion of the body were assigned a value of 2 and those that were alive and immobile were assigned a value of 1.

Larval maturation was measured by estimating the L3 and L4 ratio. A total of 30 larvae were inspected from each well (90 larvae per concentration/day). The criteria established by Sommerville (1966) were used to determine the larval stage. L3 lacked an buccal cavity, while L4 had a developed buccal cavity.

2.3. Detection of progesterone receptors in *H. contortus* larvae cells using flow cytometry

Flow cytometry was conducted in triplicate following the technique described by Nava-Castro et al. (2011). Approximately 3000 newly isolated larvae, or those cultured for 5 days in 0 and 8 ng/mL of progesterone, were completely disaggregated with a micropestle (Eppendorf, USA). The recovered cells were fixed in a 4% paraformaldehyde solution in PBS at pH 7.4 for 15 min at 37 °C and permeabilized with

100% methanol for 30 min at 4 °C. The cells were then washed by centrifugation at 700g two times with PBS at pH 7.4. The cells were first incubated with a rabbit anti-P₄-R (progesterone receptor) polyclonal antibody (PR sc-539; 1:100; Santa Cruz, Biotechnology, USA) for 10 min at 4 °C and later with an Alexa Fluor[®]647 F(ab)₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (A21246; 1:300, molecular probes, USA) for 10 min at 4 °C. The cells were washed with PBS at pH 7.4 and protected from light until analyzed. Murine uterine cells were treated identically as the *H. contortus* cells and used for calibration control. The samples were analyzed with a FACS Calibur (BD, Biosciences, USA), and the data were analyzed with FlowJo[®] software. The percentage of P₄-R+ cells and the mean fluorescence intensity were measured. The latter was estimated by dividing the mean fluorescence of cells stained with the primary antibody by the mean fluorescence of cells stained only with the secondary antibody.

2.4. Location of P₄-Rs in *H. contortus* larvae

The location of P₄-Rs in larvae was determined by immunofluorescence following the method described in Chávez-Guitrón et al. (2016) with modifications. Newly isolated larvae were washed with PBS at pH 7.4, fixed with 4% paraformaldehyde solution for 30 min and maintained overnight in a 30% saccharose solution at 4 °C. The larvae were washed with PBS and maintained in 1% Triton-100 for 60 min at 4 °C and later blocked overnight with 1% albumin in PBS at 4 °C. The larvae were incubated overnight at 4 °C, first with a rabbit anti P₄-R polyclonal antibody (PR sc-539; 1:100; Santa Cruz, Biotechnology,

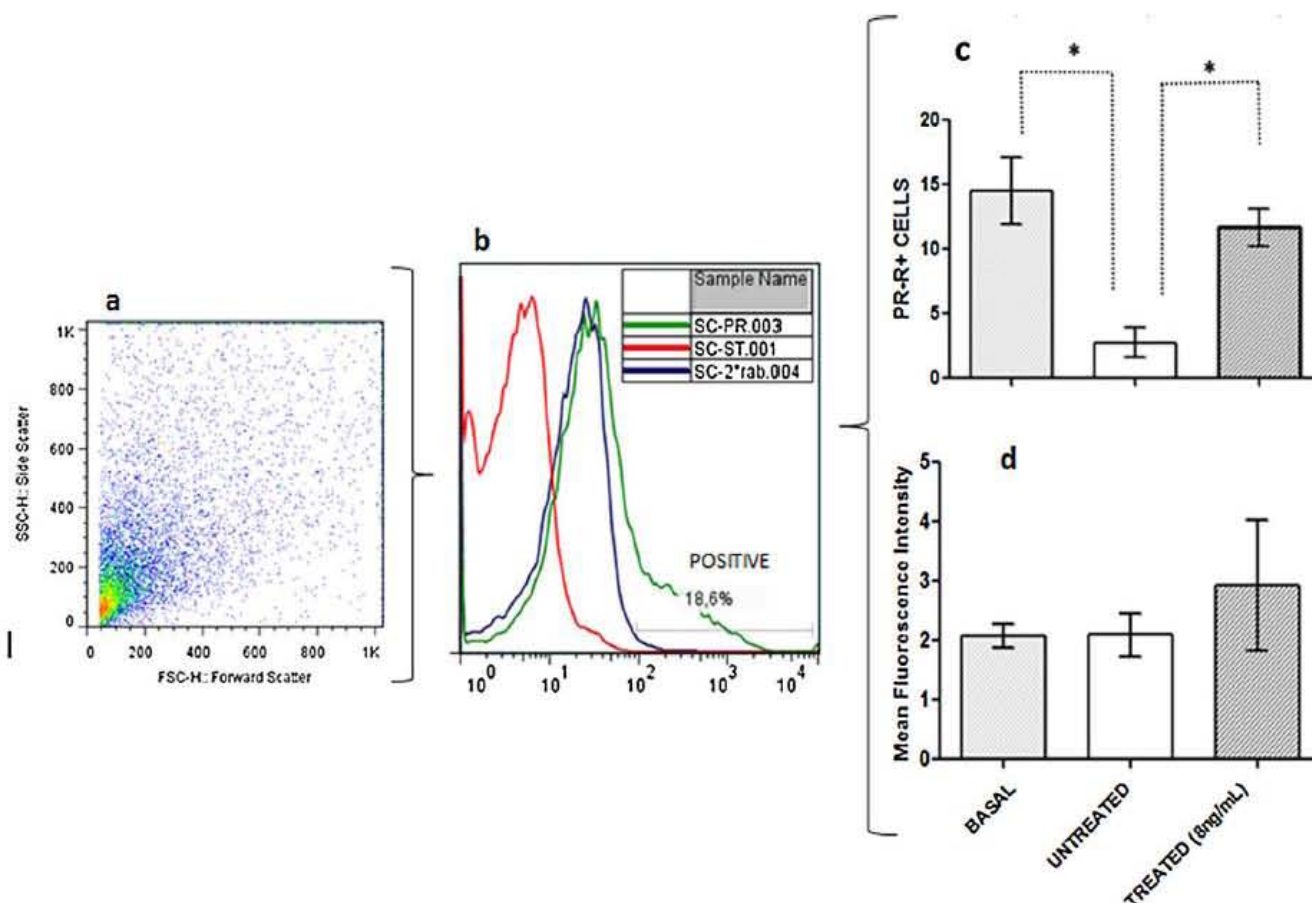


Fig. 4. Flow cytometry specific detection of progesterone receptors (P_4 -Rs) in *Haemonchus contortus* larvae stimulated with progesterone for 5 d. a) Determination of the side and forward of cells from non-stimulated *H. contortus* larvae; b) Representative histogram of P_4 -R+ cells (green line), unstained cells (red line) and non-specific secondary antibody binding (blue line); c) Mean (\pm SE) percentage of P_4 -R+ cells from newly isolated non-stimulated (discontinuous line) and progesterone stimulated *H. contortus* larvae (*indicates significant differences, $p < 0.05$); d) Mean (\pm SE) fluorescence intensity ratios between stained and unstained cells of newly obtained *H. contortus* larvae stimulated with different progesterone concentrations. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

USA), and then with an Alexa Fluor[®]647 F(ab)₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (A21246; 1:300, molecular probes, USA) overnight at 4 °C. Once placed in a mounting medium (DAKO), the larvae were examined with a Zeiss LSM5 Pa confocal microscope and the images were constructed using Zeiss LSM Image Browser software. Larvae incubated with a rabbit anti-E₂-R (estrogen receptor) and an Alexa Fluor[®]647-conjugated antibody, or incubated only with the Alexa Fluor[®]647-conjugated antibody at an identical dilution were used as negative controls.

2.5. Statistical analysis

Larval enlargement, motility and fluorescence intensity were analyzed using a one-way ANOVA and Tukey's test to determine significant differences among the means. The L3/L4 ratio in different treatments was analyzed using chi-square and Fisher exact test to determine significant differences among the means (STATISTICA 7.0 for Windows software). A p value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

The mean larval length at day 0 was $618 \pm 18 \mu\text{m}$. The enlargement of *H. contortus* larvae stimulated with different progesterone concentrations for 5 and 10 days is shown in Fig. 1. No significant differences in enlargement were observed among the larvae groups stimulated for 5 days with different progesterone concentrations versus the control group. The enlargement of larvae ($134 \pm 5.85 \mu\text{m}$) stimulated for 10 days with 160 ng/mL of progesterone was greater than

that of the control group ($110 \pm 5.12 \mu\text{m}$), while the enlargement of larvae ($92 \pm 4.6 \mu\text{m}$) stimulated with 8 ng/mL of progesterone was less ($p < 0.05$) than that of the control group. No significant differences were observed among the remaining groups of larvae and the control group. In all groups, larval viability was greater than 99%.

Morphological differences of the buccal capsule in L3 and L4 are shown in Fig. 2. L4 showed the development of a buccal capsule as an inverted cone and a pair of symmetric structures (mouthparts).

The L3/L4 ratios of *H. contortus* stimulated with different progesterone concentrations are shown in Fig. 3. Newly isolated larvae showed no development of the buccal capsule and were therefore classified as L3. At stimulation days 5 and 10, the respective percentage of larvae that molted from L3 to L4 was less ($p < 0.05$) in larvae treated with 1 (21 and 26%), 8 (30 and 29%), 16 (20 and 19%), 80 (15 and 17%), and 160 (18 and 20%) ng/mL of progesterone than that of untreated larvae in the control groups (52 and 65%). The percentage of larvae that molted from L3 to L4 was greater ($p < 0.07$) in the control group cultured for 10 days compared with the control group cultured for 5 days.

The motility of larvae stimulated with different progesterone concentration/day combinations is shown in Table 1. The administration of 8 ng/mL or higher concentrations of progesterone increased larval motility compared with unstimulated larvae ($p < 0.05$) at the three observation times (0.5, 5 and 10 days). No differences ($p > 0.05$) were observed in larval motility among the different observation periods.

Fig. 4a shows the size and complexity of cells from *H. contortus* larvae that were used for flow cytometry. The histogram in Fig. 4b shows the expression of the P_4 -Rs in non-stimulated *H. contortus* larvae

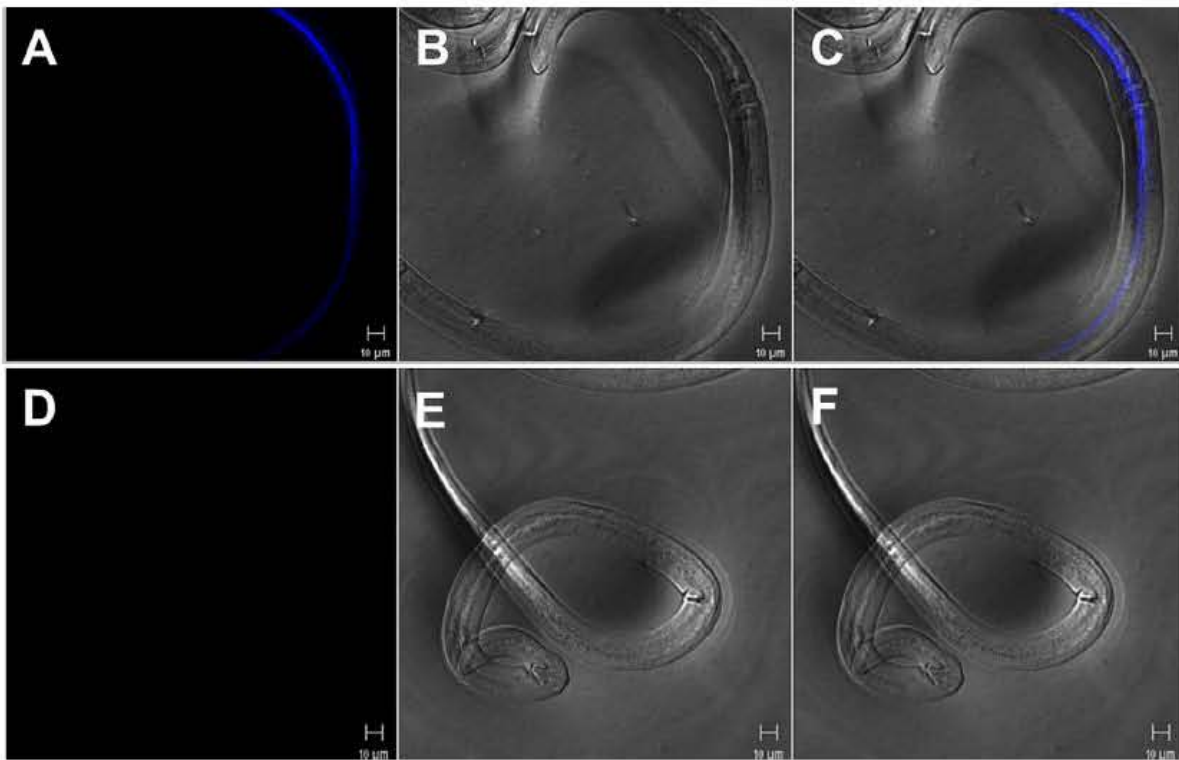


Fig. 5. Immunolocalization of P₄-Rs in newly isolated *Haemonchus contortus* larvae by confocal microscopy. In images A, B and C, the larvae were incubated with polyclonal rabbit anti-P₄-R (progesterone receptor) and stained with a secondary anti-rabbit Alexa Fluor[®]647-conjugated antibody. A) L2 of *H. contortus* under U.V. microscopy; B) L2 of *H. contortus* under light microscopy; C) Merged images by confocal microscopy. In images D, E and F, the larvae were incubated with polyclonal rabbit anti-E₂-R (estrogen receptor) and stained with a secondary anti-rabbit Alexa Fluor[®]647-conjugated antibody. D) L2 of *H. contortus* under U.V. microscopy; E) L2 of *H. contortus* under light microscopy; F) Merged images by confocal microscopy.

cells: the red line indicates cells that were not stained, the blue line shows nonspecific staining of the secondary antibody and the green line indicates the specific staining of P₄-Rs. The percentage of P₄-R+ cells of non-stimulated larvae was $15 \pm 3\%$. Fig. 4c shows the percentage of P₄-R+ cells from newly isolated larvae and larvae cultured in the presence of 0 and 8 ng/mL of progesterone for 5 days. The percentage of P₄-R+ cells in larvae cultured without progesterone ($2.73 \pm 0.88\%$) was less ($p < 0.05$) than that of newly isolated larvae ($15 \pm 3\%$) and larvae cultured with 8 ng/mL of progesterone ($11.68 \pm 1.1\%$). Fig. 4d shows the mean fluorescence intensity of cells from newly isolated larvae and larvae cultured with 0 and 8 ng/mL of progesterone for 5 days. No differences were observed among the three groups ($p > 0.05$).

The location of P₄-Rs in *H. contortus* larvae is shown in Fig. 5. A constant fluorescence signal was observed in the anterior portion of the alimentary tract of the larvae where anti-P₄-R antibodies attached to the receptors indicated their location (Figs. 5a, b and c). No specific fluorescence (Figs. 5d, e and f) was observed when the larvae were incubated only with the secondary antibody or with antibodies against estrogen receptors (negative controls).

4. Discussion

The presence of molecules similar to hormone receptors has been widely reported in parasitic nematodes, and various effects on their morphology and behavior have been reported when stimulated with the hormone under study (Hood et al., 2000; Wu and LoVerde, 2011; Li et al., 2014; Chávez-Guitrón et al., 2016). The increased shedding of *H. contortus* eggs at the end of gestation (periparturient rise) suggests that pregnancy hormones influence the physiology and behavior of the nematode. There is, however, no direct evidence of the effect of these hormones on the parasite larvae. The present study demonstrated for the first time that progesterone inhibited the *in vitro* molting process of *H. contortus* larvae from L3 to L4 and increased their motility during the

time of exposure to the hormone used. Furthermore, the presence and location of possible progesterone receptors were detected in the larvae.

Molting is an indispensable biological process for the development of nematodes and clearly marks the passage from one larval stage to the next (Deplazes et al., 2016). Hernández-Bello et al. (2011) reported that the addition of progesterone to *Trichinella spiralis* larvae cultures decreased molting by up to 50%. In the present study, we observed that stimulation of *H. contortus* larvae with progesterone inhibited the molting process from L3 to L4 by up to 50% and that this effect was maintained for at least 10 days of hormonal treatment. In a subsequent assay, we observed that this effect was concentration-dependent at concentrations less than 1 ng/mL (data not shown). Our results show that *H. contortus* larvae are capable of recognizing progesterone and respond by stopping their development.

Flow cytometry has been used for cell characterization based on their size and complexity and for the identification of specific proteins in cells. The results from the present study showed that cells obtained from *H. contortus* larvae remained close to the origin, small and with little complexity. These cell distribution patterns agree with those reported for other helminths, such as *Trichinella spiralis* (Nava-Castro et al., 2011), *Taenia crassiceps* (Ibarra-Coronado et al., 2011) and *Toxocara canis* (Chávez-Guitrón et al., 2016). These results, as well as that the larvae under study had no contact with the host, indicate that the analyzed cells came only from the parasite and were not contaminated with host cells.

The effect of hormones is produced by their interaction with specific receptors present in target cells. Therefore, one way to determine if a cell is affected by a hormone is to identify the presence of receptors for that hormone in the studied cell. In the present study, up to 15% of the cells from newly isolated *H. contortus* larvae were recognized by the anti-P₄-R antibody, indicating that these cells had possible progesterone receptors. The lack of progesterone stimulation in the cultures significantly decreased the number of cells with possible progesterone receptors. In contrast, progesterone stimulation maintained the number

of cells that expressed receptors. These results suggest that progesterone can regulate the expression of receptors in *H. contortus* larvae cells, similar to what occurs in other nematodes, such as *T. canis* (Chávez-Guitrón, 2016), and in mammals (Cunningham and Klein, 2012).

The effects of hormones in mammals are associated with the type and location of the target cells. In the present study on nematodes, we did not specifically determine the target cells. Nevertheless, the immunolocalization of possible progesterone receptors in the anterior portion of the alimentary tract of L3 suggests that intestinal cells are probable target cells for this hormone. The Hc-FAUA and Hc-FAUB proteins in the intestinal cells of *H. contortus* have been associated with larval arrest (Yan et al., 2014). Although molecular markers for larval arrest were not determined in our study, the location of the possible progesterone receptors and the proteins associated with larval arrest in *H. contortus* cells warrants further investigation.

The presence of hormonal receptors in intestinal cells has been reported in other nematodes, such as *Trichinella spiralis* and *Toxocara canis* (Hernández-Bello et al., 2011; Chávez-Guitrón et al., 2016). Combined with our observations, these results suggest a relevant role for intestinal cells in the recognition of host hormones and therefore in the host-parasite relationship.

Larval arrest has been previously associated with exposure of Strongylid larvae to unfavorable climatic conditions, the presence of preexisting adult populations in the abomasum, and the immune response of the host at the time of establishment. Nevertheless, other physiological factors of the host that could favor this phenomenon have not been considered. The results of our study show that *H. contortus* larvae have possible P₄-Rs and respond to progesterone by inhibiting their molting and, in consequence, their development. These results suggest that progesterone participates in larval arrest. Future studies should determine the specific role of progesterone in this phenomenon.

Acknowledgment

This study was supported by the PAPIIT/UNAM project IN222316.

References

- Alba-Hurtado, F., 2007. Manual de prácticas de medicina veterinaria. UNAM.
- Blitz, N., Gibbs, H., 1972a. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-I; the induction of arrested development. *Int. J. Parasitol.* 2, 5–12.
- Blitz, N., Gibbs, H., 1972b. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-II; termination of arrested development and the spring-rise phenomena. *Int. J. Parasitol.* 2, 13–22.
- Buendía-Jiménez, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Vega-López, M.A., Cuenca-Verde, C., Martínez-Labat, J.P., 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.
- Chávez-Guitrón, L.E., Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Nava-Castro, K.E., Ramírez-Álvarez, I.L., Moreno-Mendoza, N.A., Hernández-Cervantes, R., Alba-Hurtado, F., 2016. The *in vitro* effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 224, 33–38.
- Chávez-Guitrón, L.E., 2016. Estudio de algunos factores endócrinos sobre la reactivación de larvas 2 de *Toxocara canis*. Doctorate Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, pp. 101pp. <http://132.248.9.195/ptd2016/agosto/084520030/Index.html>.
- Chartier, C., Hoste, H., Bouquet, W., Malpoux, B., Pors, I., Koch, C., 1998. Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats. *Parasitol. Res.* 84, 806–810.
- Cuenca-Verde, C., Buendía-Jiménez, J., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F., 2011. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae cesicular concentrate. *Vet. Parasitol.* 177, 332–338.
- Cunningham, J.G., Klein, B.G., 2012. *Veterinary Physiology*, 5th ed. Saunders Elsevier, Missouri, pp. 624 pp.
- Deplazes, P., Eckert, J., Mathis, A., Samson-Jimmelstjerna, G., Zahner, H., 2016. *Parasitology in Veterinary Medicine*. Wageningen Academic Publishers, Netherlands, pp. 652 pp.
- de Souza, E.M., Rivera, M.T., Araújo-Jorge, T.C., de Castro, S.L., 2001. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol. Res.* 87, 513–520.
- Escobedo, G., Larralde, C., Chavarria, A., Cerbón, M.A., Morales-Montor, J., 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 9, 1235–1244.
- Escobedo, G., Camacho-Arroyo, I., Nava-Luna, P., Olivos, A., Pérez-Torres, A., Leon-Cabrera, S., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2011. Progesterone induces mucosal immunity in a rodent model of human taeniosis by *Taenia solium*. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1443–1456.
- Fleming, M., Conrad, S., 1989. Effects of exogenous progesterone and/or prolactin on *Haemonchus contortus* infections in ovariectomized ewes. *Vet. Parasitol.* 34, 57–62.
- Fleming, M., 1993. Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 50, 109–115.
- Hansen, P.J., 1998. Regulation of uterine immune function by progesterone—lessons from the sheep. *J. Reprod. Immunol.* 40, 63–79.
- Hernández-Bello, R., Ramírez-Nieto, R., Muñoz-Hernández, S., Nava-Castro, K., Pavón, L., Sánchez-Acosta, A.G., Morales-Montor, J., 2011. Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *J. Biomed. Biotech.*
- Hood, T.E., Calabrese, E.J., Zuckerman, B.M., 2000. Detection of an estrogen receptor in two nematode species and inhibition of binding and development by environmental chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 74–81.
- Ibarra-Coronado, E., Galileo, E., Nava-Castro, K., Chávez-Ríos, J., Hernández-Bello, R., García-Varela, M., R-Ambrosio, J., Reynoso-Ducuing, R., Fonseca-Linán, R., Ortega-Pierres, G., Pavón, L., Hernández, M., Morales-Montor, J., 2011. A helminth cestode parasite express an estrogen-binding protein resembling a classic nuclear estrogen receptor. *Steroids* 76, 1149–1159.
- Kiuchi, F., Miyashita, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H., 1987. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2880–2886.
- Kotze, A., 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 33, 393–400.
- Li, F., Lok, J.B., Gasser, R.B., Korhonen, P.K., Sandeman, M.R., Shi, D., Zhou, R., Li, X., Zhou, Y., Zhao, J., Hu, M., 2014. Hc-daf-2 encodes an insulin-like receptor kinase in the barber's pole worm, *Haemonchus contortus*, and restores partial dauer regulation. *Int. J. Parasitol.* 44, 485–496.
- Libonati, R.M.F., Cunha, M.G., de Souza, J.M., Santos, M.V.N., Oliveira, S.G., Daniel-Ribeiro, C.T., Carvalho, L.J.M., do Nascimento, J.L.M., 2006. Estradiol, but not dehydroepiandrosterone, decreases parasitemia and increases the incidence of cerebral malaria and the mortality in *Plasmodium berghei* ANKA-infected CBA mice. *Neuroimmunomodulation* 13, 28–35.
- Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2012. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 185, 175–180.
- Nava-Castro, K., Hernández-Bello, R., Muñoz-Hernández, S., Escobedo, G., Morales-Montor, J., 2011. New method to disaggregate and analyze single isolated helminth cells using flow cytometry: proof of concept. *Biomed. Res. Int.* 2011.
- Núñez, G.G., Gentile, T., Costantino, S.N., Sarchi, M.L., Venturiello, S.M., 2005. *In vitro* and *in vivo* effects of progesterone on *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasitology* 131, 255–259.
- Rhaman, W., Collins, G., 1992. An association of faecal egg counts and prolactin concentrations in sera of periparturient Angora goats. *Vet. Parasitol.* 43, 85–91.
- Rivero, J.C., Inque, Y., Murakami, N., Horii, Y., 2002. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in wistar rats. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 457–461.
- Sommerville, R., 1966. The development of *Haemonchus contortus* to the fourth stage *in vitro*. *J. Parasitol.* 52, 127–136.
- SValdez-Ramírez, L., 2004. Aislamiento de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino. *Veterinary Bachelor Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México City*, pp. 36 pp. <http://132.248.9.195/ppt2004/0332608/Index.html>.
- Vargas-Villavicencio, J.A., Larralde, C., Morales-Montor, J., 2006. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. *Parasite Immunol.* 28, 667–674.
- Wu, W., LoVerde, P., 2011. Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. *Mol. Cell. Endocrinol.* 334, 56–66.
- Yan, B., Guo, X., Zhou, Q., Yang, Y., Chen, X., Sun, W., Du, A., 2014. Hc-fau, a novel gene regulating diapause in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 775–786.

