



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

TESIS

**Efecto inmunomodulador de las fracciones del metacestodo de
Taenia hydatigena, estudios sobre el ciclo biológico del parásito y su
impacto sobre algunos parámetros productivos en ovinos.**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

César Cuenca Verde

TUTOR

Dr. Fernando Alba Hurtado (UNAM- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

COMITÉ TUTORAL

Dr. Jorge Morales Montor (UNAM-Instituto de Investigaciones Biomédicas)

Dr. Rogelio Alonso Morales (UNAM-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)



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 y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y ser parte de ellas.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por aceptar ser mi tutor, por todo el tiempo dedicado al desarrollo de esta tesis, sin duda alguna, su participación fue fundamental para lograr la culminación y escritura de este trabajo, también por darme la oportunidad de trabajar con él en esta línea de investigación y permitirme ser parte de este equipo.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Jorge Morales Montor por todo el apoyo y críticas hacia este trabajo en aras de mejorarlo, por las asesorías y permitirme realizar gran parte del trabajo de citometría de flujo en su laboratorio. Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales por su apoyo y comentarios para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado, por el tiempo que se tomaron para la revisión y observaciones de este trabajo: Dra. Yasmín Alcalá Canto, Dra. María Eugenia López Arellano, Dr. Jorge Morales Montor Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez y Dr. Fernando Alba Hurtado.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por todo el apoyo en el desarrollo de los diferentes trabajos experimentales así como en el análisis de los datos.

Al Dr. Guillermo Valdivia Anda, por todos los consejos dentro y fuera del laboratorio, su aportación en el desarrollo del trabajo fue muy importante para mi formación.

Al Dr. Javier Alejandro Buendía Jiménez por los consejos, enseñanzas para realizar el trabajo en el laboratorio, también por su apoyo y amistad.

Al M. en C. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz por haberme iniciado en este interesante camino de la parasitología y la producción ovina, por ser más que un amigo.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones del bioterio de la UIM FESC así como por la capacitación para el manejo y toma de muestras de las ratas.

A la M. en C. Sofía González Gallardo Por el apoyo técnico brindado para la toma de imágenes con el microscopio electrónico de barrido de la UIM.

Al Dr. Víctor Hugo Del Río Araiza del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la colaboración y asesoría en la citometría de flujo.

A los compañeros de la UIM: Dra. Guadalupe Prado, Dra. Sandra Lizeth Iturbe Requena, M en C. Adolfo Sánchez Paredes ya que de alguna u otra forma me apoyaron y contribuyeron en parte de este trabajo, no fueron pocas las ocasiones en que pasamos gran parte del día conviviendo cada quien en sus proyectos dentro de la FESC.

A todos los alumnos de la FESC y de la Universidad Politécnica de Cuautitlán Izcalli (UPCI) sin excepción que estuvieron en alguna parte de este trabajo a Omar Espiritusanto Bautista, Gabriel Jimarez Vega, Alma Janeth Abad Doroteo, Josabeth Areli Torres Mata, Mara Giovanna Gómez Torres, María del Rosario Paredes Mendoza, en especial a Karen Jaqueline Vázquez Hernández por la contribución en el desarrollo de esta tesis, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A todos muchas gracias por su valiosa cooperación y aporte intelectual para la culminación de este trabajo.

El presente trabajo se realizó con el equipo e instalaciones de los laboratorios uno y tres de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) así como en el Módulo Pecuario de Posgrado de la FES-Cuautitlán UNAM.

Con financiamiento de los proyectos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM No. IN-210322 e IN-211222.

César Cuenca Verde fue alumno becario COMECYT 2017
17BEPD79-11 (Segunda promoción agosto 2017- enero 2018)

DEDICATORIAS

A Dios y a la vida por permitirme cumplir con este logro.

A mis padres, Sr. Elías Cuenca Molano y María del Pilar Verde Montiel porque siempre me han apoyado, Ustedes me animan a seguir adelante y no darme por vencido, gracias por estar a conmigo.

A Elma, “Flaquita”, porque solo tú sabes cuánto trabajo nos costó terminar esta tesis, las noches de desvelo y preocupación, por aguantarme y tratar de comprenderme en esos momentos en los que ya quería tirar la toalla, porque nunca me dejas solo, por hacer más placentero este camino. Te amo mi vida.

A mis princesas, Metzli, Leslie y Zarina. Ustedes son mi inspiración, lo que hago siempre es pensando en ustedes, quiero que se sientan orgullosas de mí como yo de ustedes. Quiero ser el mejor ejemplo para ustedes, las amo.

A mi hermano Néstor, por sus consejos y críticas que tanto me sirven y a mi hermanita Pili por estar siempre apoyándome, ustedes saben que este trabajo también es de ustedes, los amo.

A Tomy y Ramiro por ser parte de mi familia y compañeros de mis hermanos son muy importantes para mí.

A mis sobrinos Elías Esaú, Irving Fabián, Ángel Gael, César Odín, Víctor Saúl, Samara Heli y Mitzy Citlalli, los quiero mucho y espero este trabajo sea inspiración para ustedes y luchan para lograr sus metas.

A las familias Cuenca y Verde sin excepción.

A mi tío Cuauhtémoc (†) nunca te voy a olvidar.

Con todo mi corazón les dedico este trabajo, por todo el tiempo que le dedique y deje de compartirlo con Ustedes.

“El tiempo es implacable y la vida tan frágil, que más vale tratar de vivirla haciendo las cosas que amas con pasión. De preferencia disfrutarla como una copa de vino, sin prisa, pero sin pausa, caminarla lento y sin apuro, pero con pasos firmes, por si tropiezas, no caer hasta el fondo”.

César Cuenca Verde

ÍNDICE

ÍNDICE.....	Pg
1	1
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	3
ABRVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
Morfología.....	12
Ciclo biológico.....	13
Epidemiología.....	14
Patogenia.....	16
Diagnostico.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
CAPITULO I	
Los concentrados vesiculares de metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> aumentan la IgG Anti-OVA y la producción de algunas citoquinas en ratas.....	22
CAPITULO II	
Pérdidas productivas asociadas a infección experimental subclínica con <i>Taenia hydatigena</i> en ovinos.....	42
CAPITULO III	
Estudio del establecimiento de <i>Taenia hydatigena</i> en perros y ovinos.....	60

DISCUSIÓN GENERAL.....	73
CONCLUSIONES GENERALES.....	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXO I. Artículo original publicado como resultado de esta tesis.....	83

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Taenia hydatigena</i>	14
CAPITULO I	
Cuadro 1. Tratamientos aplicados a las ratas de los diferentes grupos.....	27
Figura 2. Patrones de bandas proteicas de las fracciones de Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> observadas en SDS-PAGE.....	30
Cuadro 2. Peso molecular calculado de las proteínas contenidas en las fracciones del Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i>	31
Figura 3. Porcentaje de absorbancia específica de la IgG sérica anti-ovoalbúmina en ratas inmunizadas con Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> o alguna fracción y ovoalbúmina.....	32
Cuadro 3. Promedio del area bajo la curva de eosinófilos sanguíneos en ratas inmunizadas con Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> o alguna fracción y ovoalbúmina.....	33
Figura 4. Promedio del conteo semanal de eosinófilos sanguíneos en ratas inmunizadas con Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> o alguna fracción y ovoalbúmina.....	33
Figura 5. Porcentaje de subpoblaciones celulares CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD45RA+ en nódulo linfático mesentérico y bazo de ratas inmunizadas con Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> o alguna fracción y ovoalbúmina.....	34
Figura 6. Porcentajes del índice medio de fluorescencia (IMF) de IL-5, IL-4, IL-2, IL-6, IL-17 e IL-22 en suero de ratas inmunizadas con Concentrado Vesicular de Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> o alguna fracción y ovoalbúmina.....	35

CAPITULO II

Figura 1.	Promedio de ganancia de peso, consumo de alimento, puntaje de condición corporal y conversión alimenticia final en corderos infectados oralmente con huevos de <i>Taenia hydatigena</i>	50
Figura 2.	Conformación de las canales de corderos inoculados con huevos de <i>Taenia hydatigena</i>	51
Figura 3.	Promedio de eosinófilos, hematocrito y fosfatasa alcalina en sangre de corderos infectados huevos de <i>Taenia hydatigena</i>	52
Cuadro 1.	Correlaciones entre el AUC de la puntuación de la condición corporal, el AUC de la ganancia de peso, la conversión alimenticia final, el consumo final de alimento, el AUC de hematocrito, AUC de eosinófilos sanguíneos y AUC de fosfatasa alcalina sérica de corderos infectados huevos de <i>Taenia hydatigena</i>	53
Figura 4.	Lesiones macroscópicas y microscópicas en el hígado de corderos infectados con <i>Taenia hydatigena</i>	54

CAPITULO III

Cuadro 1.	Número de metacestodos administrados, periodo de prepatencia, número, promedio de tamaño y porcentaje de establecimiento de cestodos recuperados en perros infectados experimentalmente con metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i>	64
Figura 1.	Adultos de <i>Taenia hydatigena</i> en el intestino delgado de perro (a) y detalle de proglótido maduro (b).....	65
Figura 2.	Fotomicrografía electrónica de barrido del escólex de adultos de <i>Taenia hydatigena</i>	66
Cuadro 2.	Número y localización de metacestodos recuperados al momento de la inspección de la canal de ovinos infectados experimentalmente con huevos de <i>Taenia Hydatigena</i>	67
Figura 3.	Metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i> en hígado a) y omento menor de ovino b).....	68

ABREVIATURAS

% Abs	Porcentaje de absorbancia
°C	Grados Celsius (centígrados)
µm	Micrómetros
AST	Aspartato aminotransferasa
AUC	Área bajo la curva
CD11b/c+	Macrófagos
CD3- CD45RA+	Linfocitos B
CD3+ CD4+	Linfocitos T CD4
CD3+ CD8+	Linfocitos T CD8
CICUAE	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
cm	Centímetros
CVMTh	Concentrado vesicular de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>
CVMTh >100 kDa	Fracción del CVMTh <i>mayor de</i> 100 kilodaltons
CVMTh 10-30 kDa	Fracción del CVMTh entre 10 y 30 kilodaltons
CVMTh 30-100 kDa	Fracción del CVMTh entre 30 y 100 kilodaltons
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ES	Eosinófilos en sangre
FA	Fosfatasa alcalina
FES-Cuautitlán	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
g	Gravedades
GGT	Gama-glutamil transferasa
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

IL-10	Interleucina 10
IMF	Íntensidad media de fluorescencia
INF γ	Interferón gama
kDa	Kilodaltons
mA	Miliamperios
MANOVA	Análisis de varianza multivariado
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ³	milímetro cúbico
MPM	Marcador de peso molecular
n	Número
NLM	Nódulo linfático mesentérico
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Acrónimo en inglés de solución buffer de fosfatos
PRDX6	Peroxiredoxina 6
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SOD1	Superoxido dismutasa 1
<i>T. hydatigena</i>	<i>Taenia hydatigena</i>
Th1	Linfocitos cooperadores tipo 1
Th17	Linfocitos cooperadores tipo 17
Th2	Linfocitos cooperadores tipo 2
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Voltios

RESUMEN

Efecto inmunomodulador de las fracciones del metacestodo de *Taenia hydatigena*, estudios sobre el ciclo biológico del parásito y su impacto sobre algunos parámetros productivos en ovinos.

En esta tesis se incluyen una serie de trabajos de una línea de investigación sobre la relación entre *Taenia hydatigena* (*T. hydatigena*) y sus hospedadores. De los resultados obtenidos, se escribieron tres trabajos en forma de artículos, cada uno de ellos en diferentes fases de su publicación en revistas internacionales indexadas.

En el primer trabajo, se observó que el concentrado vesicular de metacestodos de *T. hydatigena* (CVMTh) total y la fracción de CVMTh 30-100 kDa modifican la respuesta inmune de ratas de diferente forma. Ambas fracciones inhibieron la eosinofilia y la producción de IL-5 producida por la administración de ovoalbúmina (OVA) en ratas. El CVMTh 30-100 kDa activó fuertemente la producción de anticuerpos IgG específicos anti-OVA y la proliferación de linfocitos T y B. El CVMTh total aumentó moderadamente los anticuerpos anti-OVA específicos y la activación de una respuesta Th17. Aunque se requieren más estudios para confirmar nuestras observaciones, los resultados sugieren que ambas fracciones de CVMTh tienen potencial para modificar la respuesta inmune de sus hospedadores y podrían ser utilizados como adyuvantes. Este trabajo fue publicado en *Experimental Parasitology*, (2022); 242, 108400.

En el segundo trabajo experimental, se observó que algunas variables dependientes relacionadas a la producción, como la condición corporal fue claramente mayor ($p < 0.001$) en los corderos del grupo testigo que en los corderos del grupo infectado con dosis altas de huevos de *T. hydatigena*, sin embargo, la diferencia entre los grupos fue moderada en la conversión alimenticia, consumo de alimento y ganancia de peso ($p < 0.1$). Cuando estas variables se agruparon en un MANOVA, el efecto negativo sobre la producción fue altamente significativo ($p < 0.0001$). Los corderos del grupo infectado con dosis alta presentaron una menor condición corporal ($p < 0.001$), un menor rendimiento de la canal ($p < 0.1$) y apreciativamente una menor conformación de la canal que los corderos del grupo testigo. Los

resultados de este estudio, muestran una disminución en la eficiencia productiva, alteraciones de algunos valores hematológicos y bioquímicos, además de un ligero deterioro en el aspecto general de los corderos infectados, factores que sólo pueden ser detectados en este tipo de estudios, pero que, aunque son imperceptibles para la mayoría de los productores repercuten en la productividad de los animales infectados. Este trabajo fue enviado a la revista *Veterinary Parasitology*, estamos en espera de la respuesta.

El tercer trabajo experimental está en proceso en el momento en el que se escribió esta tesis, por lo que los datos con los que se cuenta son preliminares, sin embargo, los resultados al momento muestran algunos datos específicos del ciclo de infección en los hospedadores de *Taenia hydatigena*. Todos los perros infectados mostraron evidencia de infección en materia fecal (huevos o proglótidos), sin embargo, al momento del sacrificio solamente ocho presentaron gusanos adultos en el intestino. El periodo de prepatencia varió entre los 53 a los 88 días, el tamaño promedio de los gusanos adultos fue de 147.8 ± 8.6 cm (43 gusanos). En ningún perro infectado se observaron alteraciones en el comportamiento o estado de salud evidentes, aun en aquellos que presentaron mayores cargas de gusanos adultos (10, 11 y 12 respectivamente); En los hospedadores intermediarios (ovinos) el porcentaje de infección (44.4%) es mucho menor que en los hospedadores definitivos (perros) y el porcentaje de establecimiento (2%) todavía es menor. Actualmente se trabaja con la administración de diferentes cantidades de huevos a corderos y con la activación de oncósferas. Este proyecto todavía está en proceso y los resultados como se menciono anteriormente, son preliminares.

Abstract

Immunomodulatory effect of the fractions of the metacestode of *Taenia hydatigena* studies on the life cycle of the parasite and its impact on some productive parameters in sheep.

This thesis includes a series of papers from a line of research on the relationship between *Taenia hydatigena* (*T. hydatigena*) and its hosts. From the results obtained, three works were written in the form of articles, each one of them in different phases of its publication in indexed international journals. In the first work, we observed that a total *T. hydatigena* larvae vesicular concentrate (ThLVC) and a 30-100 kDa ThLVC fraction modify the immune response of rats in differentiated ways. Both fractions inhibited eosinophilia and IL-5 production induced by OVA administration in rats. The 30-100 kDa ThLVC fraction strongly activated the production of specific anti-OVA IgG antibodies and the proliferation of T and B lymphocytes. Total ThLVC moderately increased specific anti-OVA antibodies and activation of a Th17 response. Although further studies are required to confirm our observations, the results suggest that both ThLVC fractions have the potential to modify the immune response of their hosts, even to be used as adjuvants. This work was published in *Experimental Parasitology*, (2022); 242, 108400.

In the second experimental work, we observe that some dependent variables related to production, like body condition, was clearly higher ($p < 0.001$) in lambs from the control group than in lambs from the group infected with high doses of *T. hydatigena* eggs, nevertheless, the difference between the groups was moderate in feed conversion, feed consumption and weight gain ($p < 0.1$). When these variables were pooled in a MANOVA, the negative effect on production was highly significant ($p < 0.0001$). Lambs from the high-dose infected group had lower body condition ($p < 0.001$), lower carcass yield ($p < 0.1$) and significantly less conformation of the carcass than the lambs of the control group. The results of this study show a decrease in productive efficiency, changes in some hematological and biochemical values, in addition to a slight deterioration in the general appearance of the infected lambs, factors that can only be detected in this type of study, but which, although

they are imperceptible to most producers, have an impact on the productivity of infected animals. This work was sent to the Veterinary Parasitology journal, we are awaiting the response.

The third experimental work is in progress at the time this thesis was written, so the data we have are preliminary, however, our results so far show some specific data on the infection cycle in *Taenia hydatigena* hosts. All infected dogs showed evidence of fecal infection (eggs or proglottids), however, at the time of the necropsy only eight had adult worms in the intestine. In dogs, the prepatent period ranged from 53 to 88 days, the average size of adult worms was 147.8 ± 8.6 cm (43 worms). In any infected dog, even in those with a greater number of adult worms (10, 11 and 12 respectively) evident alterations in behavior or state of health were observed. In the intermediate hosts (sheep) the percentage of infection (44.4%) is much lower than in the definitive hosts (dogs) and the percentage of establishment (2%) is still lower. We are currently working with the administration of different amounts of eggs to lambs and with the activation of oncospheres. This project is still in progress and the results are preliminary.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina es una actividad económicamente importante en todo el mundo. En las unidades de producción ovina, comúnmente se presentan problemas sanitarios relacionados con las parasitosis, sobre todo cuando esta actividad se desarrolla de forma extensiva, es decir, cuando los ovinos son alimentados en pastoreo.

Algunos de los problemas sanitarios producidos por parásitos más fácilmente reconocidos como causa de pérdidas económicas por los productores de ovinos, son la coccidiosis, fasciolosis y las nematodiosis gastroentéricas (Qamar et al., 2011; Andrews, 2013; Mehmood et al., 2017; Bangoura y Bardsley, 2020). Esto se debe a que es evidente y fácil de detectar la presencia y daño causado por estas enfermedades en los ovinos. Sin embargo, hay otras parasitosis presentes en las unidades de producción ovina, como la metacestodosis causada por larvas de *T. hydatigena*, que pasan desapercibidas en la mayoría de las ocasiones. Lo anterior, es debido a que no se detecta el momento en que los ovinos se infectan de forma natural y a que estos, no presentan manifestaciones clínicas características. Por esta razón, la presencia de los metacestodos de *T. hydatigena* solo son detectados después del sacrificio, al momento que se realiza la inspección de las canales y su presencia se considera como un hallazgo a la necropsia. Muchos productores, incluso muchos médicos veterinarios consideran que esta metacestodosis no tiene ninguna repercusión en la salud de los ovinos. Lo anterior, probablemente es la razón por la que existen muy pocos trabajos recientes sobre la relación hospedero-parasito de *T. hydatigena* en ovinos y en general con cualquiera de sus hospedadores.

La mayoría de los estudios actuales (nacionales o internacionales) se han enfocado a medir la prevalencia de esta parasitosis en los hospedadores definitivos (principalmente perros) y en los hospedadores intermediarios (principalmente rumiantes, cerdos y equinos).

Algunos estudios se han enfocado e evaluar el impacto económico de la metacestodosis producida por *T. hydatigena*, pero solo por el decomiso de vísceras. Por ejemplo, en la isla de Cerdeña en Italia (Scala et al, 2015), calcularon solo en un periodo de siete meses, costos económicos relacionados con el decomiso por esta metacestodosis a casi 330 000 euros con una prevalencia de 14.6 % en corderos. En México, en general no se registra la presencia de

los metacestodos de *T. hydatigena* en ovinos sacrificados en rastros o en mataderos de traspatio, por lo que se desconoce la prevalencia actual de esta parasitosis en los ovinos del país. Algunos trabajos esporádicos realizados en México, reportaron una prevalencia del 3% de 4520 hígados de ovinos sacrificados en el rastro de Milpa Alta (Tenorio-Fuentes, 1982) y otro, realizado en el rastro de Netzahualcóyotl una prevalencia del 18.8% de 297 ovinos y del 16.2% en 707 caprinos (González-Mendoza, 1976). Aunque no se tienen datos registrados metódicamente, en la colecta de metacestodos de *T. hydatigena* a lo largo de varios años en diferentes rastros del centro del país, se ha observado frecuentemente la presencia de este parásito.

Muchos de los conocimientos sobre la biología de otras especies del género *Taenia* se han extrapolado a la literatura publicada sobre *T. hydatigena*, lo que no siempre refleja la realidad de la biología de este parásito. Además, por no producir manifestaciones clínicas específicas, existe desconocimiento sobre la afectación económica que ésta parasitosis pudiera tener en las unidades de producción ovina. Tampoco se ha estudiado como este parásito se relaciona con sus hospedadores, y si es capaz de modificar la respuesta inmune de su hospedador para vivir en un ambiente más confortable, como lo hacen otros parásitos (Terrazas et al., 2011).

Morfología.

Los gusanos adultos viven en el intestino de los hospedadores definitivos (principalmente perros). Son cestodos blancos y miden de 50 a 250 cm de largo. En la parte anterior presentan un escólex armado de 798-1720 μm de diámetro. El róstelo está formado por dos coronas de ganchos (26-36 ganchos). Los ganchos de la corona anterior son más grandes (175-224 μm) que los de la corona posterior (133-157 μm). Presenta cuatro ventosas de 220 a 350 μm (Edwards y Herbert, 1981).

El estróbilo está formado por proglótidos de diferente forma. Los proglótidos inmaduros son más anchos que largos, los proglótidos maduros son tan anchos como largos (tienden a tener forma cuadrada) y los proglótidos grávidos son más largos que anchos. Los proglótidos maduros presentan un ovario bilobulado y de 600 a 700 testículos. Los proglótidos grávidos miden de 10 a 14 mm de largo por 4 a 7 mm de ancho, y el útero presenta

entre 5-10 ramas. Los huevos son elípticos y miden entre 38 a 39 por 34 a 35 μm y presentan un embrión exacanto en su interior (Quiroz, 1984; Taylor et al., 2016).

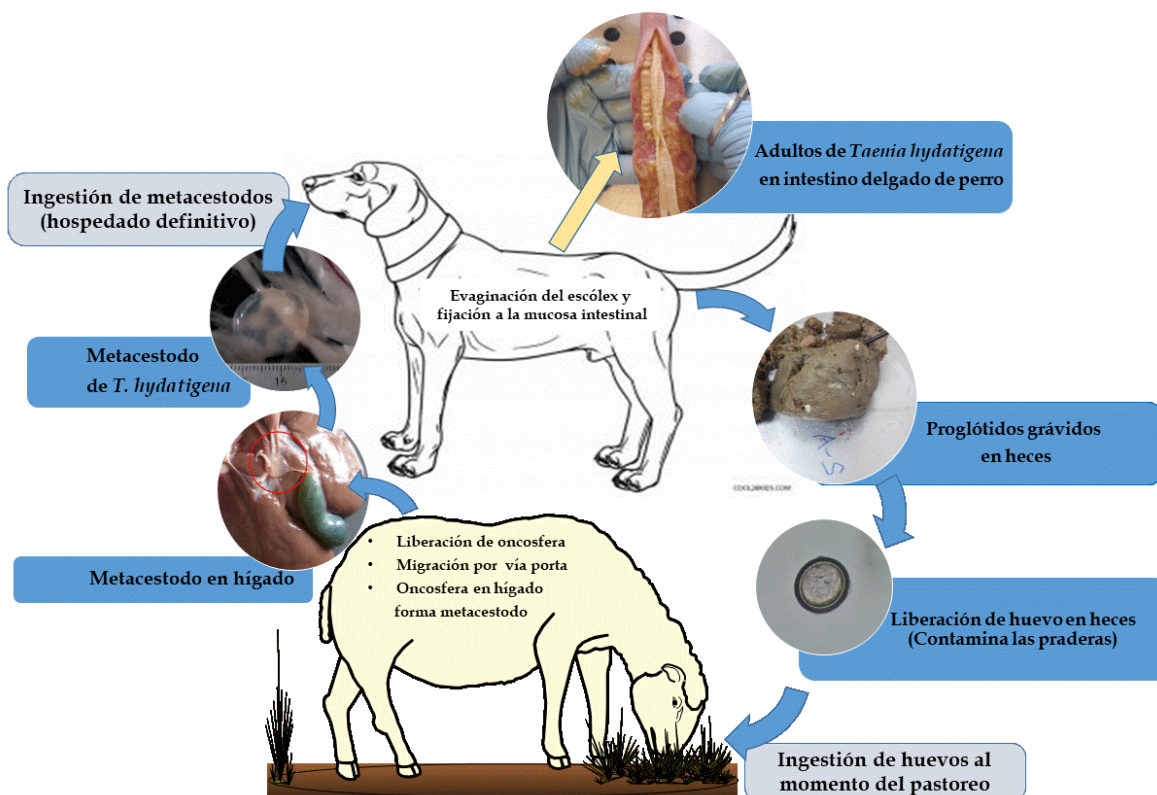
Los metacestodos de *T. hydatigena* (*Cisticercus tenuicollis*) se localizan en serosa de vísceras, principalmente hígado, omentos y mesenterios. Estos metacestodos son vesículas llenas de un líquido claro. Presentan dos membranas sobre su superficie, la más externa es producida por la respuesta inflamatoria del hospedador, la interna es propia del parásito. Pegado a la membrana interna presenta un escólex invaginado con características similares al del cestodo adulto. Miden de 4 a 8 cm (Alba-Hurtado, 2020).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *T. hydatigena* se esquematiza en la figura 1. Los proglótidos grávidos son eliminados en la materia fecal de los perros, en el ambiente, se liberan los huevos que son ingeridos por los hospedadores intermediarios. En el paso de abomaso a intestino delgado se realiza la eclosión y se liberan las oncósferas. Estas, atraviesan la pared intestinal, penetran en un capilar y viajan por sangre hasta el parénquima hepático, mesenterios y en menor proporción a pulmones. En hígado y pulmón viajan por parénquima hasta llegar a las serosas. Finalmente se desarrollan los metacestodos (*cisticercus tenuicollis*) en la serosa de vísceras, mesenterios y omentos.

Los perros se contaminan por ingerir vísceras crudas o mal cocidas con metacestodos de *T. hydatigena* viables. En el estómago e intestino delgado del hospedador, el escólex recibe los estímulos necesarios para su evaginación, se fija a la pared intestinal para iniciar el proceso de estrobilación y desarrollarse hasta adulto. Cada proglótido es una unidad reproductora independiente, cuenta con órganos sexuales masculinos y femeninos, por lo cual se puede autofecundarse y en algunas ocasiones intercambiar espermatozoides con otros proglótidos del mismo cestodo o con proglótidos de otro gusano. Los huevos producidos se almacenan paulatinamente en las ramas del útero. Posteriormente, los proglótidos grávidos llenos de huevos se eliminan en materia fecal y se cierra el ciclo (Silverman, 1954; Desplazes et al., 2016; Bowman, 2020).

Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia hydatigena*.



Epidemiología

La infección por *T. hydatigena* en perros se ha detectado prácticamente en todo el mundo. Los estudios publicados muestran una prevalencia variable de acuerdo al país, al tipo de perro muestreado, al número de perros muestreados y a la técnica de diagnóstico. Algunos ejemplos de esta prevalencia en perros de diferentes regiones del mundo son: 45.5% en Arizona y Nuevo México (Schantz, 1977); 11.3% en Snowdonia, UK (Edwards, 1979); 40.9% en Uttar Pradesh, India (Pathak et al., 1982); 13.9% en Uruguay (Cabrera et al., 1996); 19.7% en China (Wang et al., 2006); 10.3% en Vietnam (Ng-Nguyen et al, 2021) y 6.6% en Mongolia (Temuujin, 2022), entre muchos otros. En México se ha reportado una prevalencia en perros de 2.5 % en Ciudad de México (Eguía-Aguilar et al, 2005) y 2.91% en Mexicalli (Trasviña-Muñoz, 2020).

Los perros se contaminan por ingerir metacestodos de *T. hydatigena*. La alimentación de perros con vísceras crudas de los hospedadores intermediarios (rumiantes, cerdos y

equinos, entre otros), es un factor predisponente. La ingestión de cadáveres de animales que murieron por otras causas en las unidades de producción, es un factor importante en el mantenimiento de la infección en estas unidades. Se ha demostrado que los perros que viven cerca de rastros y que se alimentan de sus desechos presentan una mayor incidencia de esta parasitosis (Quiroz, 1984; Ng-Nguyen et al, 2021).

La prevalencia de metacestodos de *T. hydatigena* en los hospedadores intermediarios es variable, se ha reportado una prevalencia del 37% en ovinos, 27.2% en cabras y 8.3% en cerdos de Uttar Pradesh State, India (Pathak et al., 1982); 12.8% en ovinos y 18% en cabras de Irán (Radfar et al., 2005); 4.2% en ovinos de la India (Singh et al 2015); 14.6% en ovinos en Cerdeña, Italia (Scala 2015); 61.1% en cabras y 42.2 en ovinos de Ngorongoro, Tanzania (Miran et al., 2017); 7.6% en cerdos y 11.1% de bovinos en Vietnam (Ng-Nguyen et al., 2021); y 9.6% en cabras de la India (Moudgil et al., 2022). En México se ha reportado una prevalencia del 3% de ovinos sacrificados en el rastro de Milpa Alta (Tenorio-Fuentes, 1982) y del 18.8% en ovinos y del 16.2% en caprinos sacrificados en el rastro de Netzahualcóyotl (González-Mendoza, 1976).

Los ovinos y en general los hospedadores intermediarios, adquieren la metacestodosis por ingerir huevos de *T. hydatigena* (Braae et al., 2015). Estos huevos, generalmente son eliminados dentro de proglótidos en materia fecal de perros, en el ambiente, los proglótidos liberan los huevos. Muchos huevos, son liberados dentro del intestino del perro y son eliminados libres en la materia fecal. La alta prolificidad de *T. hydatigena* es un factor a considerar, las fases adultas presentan un enorme potencial biótico, cada proglótido grávido produce de 25000 a 50000 huevos y cada adulto elimina de 2 a 3 proglótidos diariamente. Lo anterior, provoca que un perro con gusanos adultos pueda contaminar el ambiente donde vive. Los perros son muy frecuentes en las unidades de producción y estos defecan continuamente en los potreros, por lo que las áreas donde pastorean los ovinos potencialmente pueden estar contaminadas. En este contexto, hay que considerar que los huevos son altamente resistentes a las condiciones ambientales, aunque son susceptibles a la desecación. En condiciones adecuadas, protegidos de los rayos directos del sol (protección de pasto) y alta humedad pueden sobrevivir varios meses (Cordero del Campillo, 1999; Desplazes et al., 2016).

Patogenia

En el hospedador definitivo, cuando se fija el escólex a la pared intestinal ejerce un efecto traumático. Los adultos se alimentan a través de su superficie, absorben el contenido intestinal (acción expoliatriz quimófaga) y compiten con el hospedador por los nutrientes. La presencia de adultos en el hospedador definitivo produce grados variables de desnutrición, que dependen de la edad, cantidad y calidad del alimento ingerido, así como del número de gusanos que se desarrollan. Las manifestaciones clínicas generalmente son ligeras (Cordero del Campillo, 1999).

En el hospedador intermediario, cuando las oncósferas atraviesan la pared intestinal ejercen un efecto traumático. Estas oncósferas, viajan por vena porta al hígado y migran por parénquima hepático produciendo túneles hemorrágicos que posteriormente se vuelven fibróticos. Cuando llegan a la serosa se transforman en cisticercos. Algunas oncósferas continúan su migración hasta la cavidad abdominal y forman cisticercos en omentos y mesenterios (Pullin 1955; Desplazes et al., 2016). Generalmente, los niveles de infestación en los ovinos son bajos (Soulsby, 1982; Scala et al., 2014), sin embargo, esporádicamente se pueden presentar infestaciones masivas con zonas hemorrágicas y fibrosas en hígado y pulmón (Perl et al., 2015). Se ha observado un aumento de proteínas séricas totales, bilirrubina total, gama glutamiltransferasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa en infecciones agudas en ovinos, lo que muestra claramente el compromiso hepático en los ovinos infectados (Scala et al., 2014). Un comportamiento parecido se ha observado en caprinos, donde se ha observado un aumento de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina en suero de animales con infección natural (Radfar et al., 2014). Las manifestaciones clínicas en ovinos generalmente son inespecíficas y muchas veces pasan desapercibidas (Christodoulopoulos et al., 2008), sin embargo, como demostramos en el segundo experimento de esta tesis, se pueden producir pérdidas económicas que merman la productividad de los ovinos afectados. Esporádicamente se pueden presentar muertes por hepatitis traumática en corderos (Soulsby, 1982).

Diagnóstico

En el hospedador definitivo (perros), se pueden observar en forma macroscópica la eliminación de proglótidos grávidos en la materia fecal. También se pueden detectar huevos

por exámenes coproparasitoscópicos de Faust. Los huevos son redondeados, miden de 30 a 40 μm , con un cascaron grueso y radiado, en el interior se puede observar un embrión hexacanto con seis ganchos (Alba-Hurtado, 2020). Los huevos de las diferentes especies de *Taenia* y los de *Echinococcus* son indistinguibles, sin embargo, se pueden diferenciar por el análisis de su DNA (Zhu et al., 2019; Ulziijargal et al., 2020). También se pueden detectar copro-anticuerpos en la materia fecal de perros (Desplazes et al., 1990).

En los ovinos y en general en los hospedadores intermediarios, el diagnóstico se realiza a la inspección sanitaria en los rastros. Por su tamaño y su morfología, la identificación de los metacestodos de *T. hydatigena* es fácil (Scala 2015; Miran et al., 2017; Ng-Nguyen et al., 2021; Moudgil et al., 2022).

JUSTIFICACIÓN

En el desarrollo cada vez más especializado de la producción ovina, se han identificado enfermedades subclínicas que producen un impacto negativo para la producción, que, por ser difícilmente medibles o detectables, no son consideradas como causa de pérdidas económicas. En la metacestodosis producida por larvas de *T. hydatigena*, es muy complicado calcular las pérdidas económicas debido a que, en la mayoría de los casos, no produce signos clínicos evidentes (Desplazes et al., 2016). La presencia de los metacestodos en los ovinos, convencionalmente solo se considera como un hallazgo al momento del sacrificio en el matadero y la mayoría de los productores, así como muchos médicos veterinarios piensan que no tiene ninguna repercusión en la salud de los ovinos. Lo anterior, probablemente es la razón por la que existen pocos trabajos recientes sobre la relación hospedero-parasito de *T. hydatigena* en ovinos y en general con cualquiera de sus hospedadores. En esta tesis se presentan tres trabajos desarrollados a partir de una línea de investigación en la que por varios años se ha estudiado la relación que guarda *T. hydatigena* con sus diferentes hospedadores.

Se ha propuesto que los cestodos modulan la respuesta inmune del hospedador para generar un ambiente más permisivo en su establecimiento (Terrazas et al., 2011). Esto sugiere que la modulación de la respuesta inmune del huésped por parte de algunos cestodos podría modificar positiva o negativamente la respuesta a otros patógenos concomitantes. En estudios previos se ha demostrado que el CVMTh induce eosinofilia y disminuye la implantación de *Haemonchus contortus* en el abomaso de ovejas (Cuenca-Verde et al., 2011). Posteriormente, esta disminución de la implantación se asoció con un aumento en el número de células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF γ en la mucosa abomasal de corderos infectados con *H. contortus* (Buendía-Jiménez et al., 2015) y una fuerte sobreexpresión de citocinas que representan los perfiles Th1 (INF γ e IL-2) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), enzimas del estrés oxidativo (SOD1 y PRDX6) y receptor IgE en la pared abomasal (Muñoz-Guzmán et al., 2021). Estas observaciones sugieren que el CVMTh completo o algunas de sus fracciones podrían modificar la respuesta inmune frente a antígenos heterólogos como la OVA, lo que confirmaría su efecto inmunomodulador. Por lo anterior, en el primer trabajo presentado en esta tesis, se evaluaron los efectos de diferentes fracciones de CVMTh (de alto, medio o bajo

peso molecular) sobre la producción de anticuerpos, eosinófilos en sangre, subpoblaciones celulares y la producción de algunas citocinas en ratas inoculadas con OVA.

La mayoría de los estudios publicados hasta el momento son observacionales, sin embargo, existen pocos estudios donde se haga una infección experimental con este parásito y ninguno de ellos, ha sido diseñado para medir el impacto de la infección por metacestodos de *T. hydatigena* sobre diversos parámetros de la producción ovina. Se ha reportado que en los ovinos con infección experimental crónica desarrollaron un aumento significativo de los niveles séricos de diferentes enzimas hepáticas, lo que evidencia un compromiso hepático (Scala et al., 2014; Cuenca-Verde et al., 2019) y sugiere que esta metacestodosis puede producir pérdidas sutiles y continuas en la productividad. Por lo que, el objetivo del segundo trabajo experimental presentado en esta tesis, fue evaluar el efecto de la infección experimental de *T. hydatigena* sobre diferentes parámetros productivos en ovinos.

La mayoría de los estudios en perros es sobre la frecuencia de gusanos adultos en intestino delgado (Díaz-Castrellon, 1997; Trasviña-Muñoz, 2020). Los estudios sobre infecciones experimentales en perros son pocos e incompletos (Featherston, 1969; Coman and Rickard, 1975; Gemmell et al., 1987). En ovinos, la información disponible es similar, la mayoría de los reportes es sobre la frecuencia de metacestodos de *T. hydatigena* observada en vísceras de ovinos sacrificados en rastros y existen pocos estudios experimentales recientes. Por lo anterior, el objetivo del tercer trabajo experimental fue determinar el porcentaje de infección y el porcentaje de establecimiento de *T. hydatigena* en hospedadores definitivos (perros) y hospedadores intermediarios (ovinos), así como caracterizar una cepa de origen mexicano. Este tercer experimento, actualmente sigue en desarrollo.

HIPÓTESIS

- El CVMTh actúa como inmunomodulador en ovinos por lo cual este CVMTh o alguna de sus fracciones también podrían actuar como inmunomoduladores en ratas.
- Aunque la mayoría de las infecciones por metacestodos de *T. hydatigena* no producen manifestaciones clínicas características, la migración tisular y el daño producido por el parásito en hígado, puede alterar en forma negativa la eficiencia productiva de los ovinos.

OBJETIVOS

1. Caracterizar electroforéticamente en geles SDS-PAGE las bandas proteicas presentes en diferentes fracciones de un CVMTh (de alto, medio o bajo peso molecular).
2. Evaluar el efecto de la administración de diferentes fracciones de CVMTh sobre la producción de anticuerpos, eosinófilos en sangre, subpoblaciones celulares y la producción de algunas citocinas en ratas inoculadas con ovoalbúmina.
3. Determinar el impacto de la infección experimental de *T. hydatigena* en ovinos sobre consumo diario de alimento, conversión alimenticia final, ganancia de peso y condición corporal. Así como rendimiento y calidad de la canal al sacrificio.
4. Evaluar el efecto de la infección experimental de *T. hydatigena* en ovinos sobre la cantidad de eosinofilos en sangre, hematocrito y la concentración sérica de algunas enzimas hepáticas.
5. Reproducir el ciclo biológico de *T. hydatigena* en perro y ovinos, para obtener algunos parámetros parasitológicos de la infección a partir de parásitos de origen mexicano.

CAPITULO I

Los concentrados vesiculares de metacestodos de *Taenia hydatigena* aumentan la IgG Anti-OVA y la producción de algunas citoquinas en ratas

Resumen

Se evaluaron los efectos de la administración de cuatro diferentes fracciones de CVMTh antes de la inmunización con OVA en ratas sobre diferentes parámetros de la respuesta inmune. La cantidad de IgG anti-OVA por ELISA, la cantidad de eosinófilos en sangre (ES), el porcentaje de subpoblaciones celulares por citometría de flujo (CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD45RA+ y CD11b/c+) y la producción de citocinas séricas mediante inmunoensayos basados en perlas (IL-2, IL-4, INF γ , IL-5, TNF α , GM-CSF, IL-17F, IL-17A, IL-13, IL-22 e IL-6). Las ratas que recibieron CVMTh total ($p \leq 0,05$) y la fracción CVMTh 30-100 kDa ($p < 0,001$) antes de la administración de OVA produjeron mayores cantidades de IgG anti-OVA que las ratas que recibieron solo OVA. Las ratas a las que solo se les administró OVA mostraron un fuerte aumento de ES que se correlacionó significativamente ($r=0.72$, $p < 0,001$) con un aumento de IL-5 en la sangre. Sin embargo, las ratas que recibieron cualquiera de las fracciones de CVMTh antes de la administración de OVA no mostraron estos aumentos. En general, la administración de CVMTh 30-100 kDa antes de la administración de OVA aumentó ($p < 0.05$) el porcentaje de linfocitos B, CD4 y CD8 en el bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos. Las ratas que recibieron fracción total de CVMTh y OVA mostraron un aumento ($p < 0.05$) en IL-2, IL-17F e IL-22. Los resultados de este estudio muestran que CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa modifican la respuesta inmune de las ratas de forma difstinta. Las observaciones sugieren que ambas fracciones de CVMTh tienen el potencial de usarse como adyuvantes.

Introducción

Algunos componentes somáticos o antígenos de secreción-excreción de los helmintos pueden modificar la respuesta inmune de sus hospedadores (Peón et al., 2016). Se ha propuesto que los cestodos modulan la respuesta inmune del huésped para generar un ambiente más permisivo para su establecimiento (Terrazas et al., 2011). La infección con metacestodos de *Taenia crassiceps* en ratones induce un aumento de los estrógenos séricos y una disminución de la testosterona sérica (Larralde et al., 1995). Previamente, se estudiaron los efectos de la testosterona, la dihidrotestosterona y el 17β -estradiol en ratones castrados de ambos sexos infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* (Morales-Montor et al., 2002). Estos autores demostraron que la castración y el tratamiento con testosterona o dihidrotestosterona antes de la infección disminuyeron la carga parasitaria en un 50 y un 70%, respectivamente, mientras que el tratamiento con 17β -estradiol la aumentó tres veces en ambos sexos, en comparación con los ratones testigo. La proliferación específica de esplenocitos y la producción de IL-2 e IFN- γ se redujeron en ratones infectados castrados de ambos sexos, mientras que el tratamiento con testosterona o dihidrotestosterona produjo un aumento en la proliferación de esplenocitos y una mayor producción de IL-2 e IFN- γ . Por otro lado, la respuesta humoral no se vio afectada con la restitución de testosterona o dihidrotestosterona, mientras que el tratamiento con estradiol en ambos sexos aumentó los niveles de IgG anticisticerco, así como la producción de IL-6 e IL-10. Esto sugiere que la modulación de la respuesta inmune del huésped por parte de algunos cestodos podría modificar intensificando o disminuyendo la respuesta a otros patógenos concomitantes.

En estudios previos realizados se demostró que el CVMTh induce eosinofilia y disminuye la implantación de *Haemonchus contortus* en el abomaso de ovejas (Cuenca-Verde et al., 2011). Posteriormente, esta disminución de la implantación se asoció con un aumento en el número de células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF γ detectadas por inmunohistoquímica en el abomaso de corderos infectados con *H. contortus* (Buendía-Jiménez et al., 2015), y una fuerte sobreexpresión de citocinas que representan los perfiles Th1 (IFN γ e IL-2) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), enzimas del estrés oxidativo (SOD1 y PRDX6) y receptor IgE en la pared de la región fúndica abomasal (Muñoz-Guzmán et al., 2021). Otros autores observaron que algunas fracciones de *Taenia crassiceps* tienen efectos diferenciados sobre la activación de células de respuesta inmune *in vitro* (Terrazas et al.,

2010). Estas observaciones sugieren que el CVMTh completo o algunas de sus fracciones podrían modificar la respuesta inmune frente a antígenos heterólogos como la OVA, lo que confirmaría su efecto inmunomodulador.

Por lo tanto, en este estudio se separaron y caracterizaron electroforéticamente en geles SDS-PAGE las bandas proteicas presentes en tres diferentes fracciones (de alto, medio o bajo peso molecular) de un CVMTh, posteriormente, evaluaron los efectos de las fracciones sobre la producción de anticuerpos, eosinófilos en sangre, subpoblaciones celulares y la producción de algunas citocinas en ratas inoculadas con OVA.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 70 ratas machos Wistar (*Rattus norvegicus*), de 9-10 semanas de edad, con un peso entre 200 y 250 g. Las ratas se alojaron en el bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán. Estas ratas se mantuvieron en jaulas de polipropileno con capacidad para 5 ratas, la temperatura ambiental se mantuvo a 22 ± 2 °C, la humedad relativa se mantuvo entre 30 y 70 % y se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Las ratas fueron alimentadas con alimento comercial para roedores (LabDiet 5001) y agua ad libitum. Este estudio fue aprobado por el Comité Interno de Cuidado de Animales de Experimentación del Programa de Posgrado en Producción y Sanidad Animal de la UNAM, México (aprobación número CICUAE-FESC C18_12).

Fracciones CVMTh

El CVMTh completo (CVMTh total) se obtuvo modificando la técnica descrita por Cuenca-Verde et al. (2011). Se colectaron metacestodos de *T. hydatigena* de ovejas de un rastro cercano. Se obtuvo el líquido vesicular por punción de los metacestodos. Se adicionaron 100 µL de una mezcla de inhibidores de proteasa (AEBSF a 23 mM, EDTA a 100 mM, Bestatina a 2 mM, Pepstatina A a 0.3 mM y E-64 a 0.3 mM, Sigma-Aldrich, P8465) por cada 20 mL de líquido vesicular. La mezcla se filtró con papel Whatman 1 y Millipore 0.22 µm.

El CVMTh total se colocó en una unidad de filtración con poro de exclusión de 100 kDa (Ultracell-100K Amicon®) y se centrifugó a 2500 gravedades (g) durante una hora a 4 °C. El concentrado obtenido de la parte superior de la unidad de filtración se identificó como CVMTh >100 kDa. El filtrado previamente obtenido se colocó en una segunda unidad de filtración con poro de exclusión de 30 kDa (Ultracell-30K Amicon®) y se centrifugó a 2500 g durante una hora a 4 °C. De la parte superior de esta segunda unidad de filtración se obtuvo una segunda fracción, que se identificó como CVMTh 30-100 kDa. El filtrado obtenido de la segunda unidad se concentró usando una tercera unidad de filtro con un poro de exclusión de 10 kDa (Ultracell-10K Amicon®) y se identificó como la fracción CVMTh 10-30 kDa. La integridad de las fracciones CVMTh se evaluó mediante SDS-PAGE utilizando una cámara de celda de electroforesis Mini-PROTEAN II (Bio-Rad®) y geles de acrilamida al 12 % a 100 V y 120 mA durante 2 h (Figura 2). La cantidad de proteína de cada concentrado o fracción se midió por el método de Bradford (1976).

Conteo de eosinófilos en sangre (ES)

El conteo se realizó según la técnica de Hohenhaus et al. (1998) y modificada por Cuenca-Verde et al. (2011). Se tomaron muestras de sangre con jeringas insulínicas de la vena caudal de las ratas y se transfirieron inmediatamente a viales con EDTA. Se utilizó una dilución de sangre de 1:10 con una solución de Carpentier (formaldehído al 40% y eosina Y al 1%). Los ES se contaron en una cámara de Neubauer y los resultados se expresaron como número de ES por mm³ de sangre.

Anticuerpos Anti-OVA

Se realizó una ELISA-IgG usando OVA (Difco Labs, No cat. 0255-7) modificando la técnica descrita por González-García et al. (2017). Brevemente, previamente a los ELISA se estandarizó la concentración de OVA (10 µg de proteína/mL), la dilución de suero de rata (1:100) y la dilución de anticuerpo IgG de cabra anti-rata conjugado con peroxidasa (1:7500) (Serotec, No. 250612). Los valores de absorbancia se leyeron a una longitud de onda de 492 nm. Simultáneamente, se analizaron dos pozos de control sin OVA para cada suero. El valor obtenido de estos pocillos de control se sustrajo del valor de los pocillos con OVA para

eliminar la reacción colorimétrica inespecífica. Se promediaron los resultados de los dos pocillos y se expresaron como porcentaje de absorbancia específica (% Abs).

Cuantificación de subpoblaciones celulares

Las subpoblaciones celulares se midieron por citometría de flujo según la técnica descrita por Del-Rio-Araiza et al. (2018). Se obtuvieron células de bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), y se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: AF 488 anti-rata CD3 (Biolegend®, clon 1F4), APC anti-rata CD4 (Biolegend®, clon W3/25), PE anti-rata CD8a (Biolegend®, clon OX-8), PE anti-rata CD45RA (Biolegend®, clon OX-33) y biotina anti-rata CD11b/c (Biolegend®, clon OX-42). CD11b/c se reveló con PE/CY5 estreptavidina (Biolegend®). Todas las muestras se analizaron con un FACS Calibur (BD, Biosciences, EE. UU.) y los datos se analizaron con el software FlowJo v10.0. Este proceso se realizó en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Cuantificación de citocinas

Las citocinas se cuantificaron en suero de rata utilizando inmunoensayos basados en perlas y perlas codificadas por fluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un FACS Aria Fusion (BD®). El kit LEGENDplex™ Rat Th Panel (Biolegend®), que incluye la cuantificación de IL-2, IL-4, INF γ , IL-5, TNF α , GM-CSF, IL-17F, IL-17A, IL-13, IL- 22 e IL-6. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante y los datos se expresan como la intensidad media de fluorescencia (IMF). El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo vx (tree star). Este proceso se realizó en el Laboratorio Nacional en Salud, Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas, de la FES-Iztacala de la UNAM.

Diseño experimental

Las ratas se distribuyeron en 7 grupos (n=10/grupo). Los tratamientos realizados en cada grupo se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Tratamientos aplicados a las ratas de los diferentes grupos.

Grupo (n=10)	Días antes del desafío ^a		Día de desafío ^b	Día de la Eutanasia (n=5)
	-6	-2		
1	-----	-----	-----	5
				30
2	-----	-----	OVA	5
				30
3	CVMTh total	CVMTh total	-----	5
				30
4	CVMTh total	CVMTh total	OVA	5
				30
5	CVMTh >100 kDa	CVMTh >100 kDa	OVA	5
				30
6	CVMTh 30-100 kDa	CVMTh 30-100 kDa	OVA	5
				30
7	CVMTh 10-30 kDa	CVMTh 10-30 kDa	OVA	5
				30

CVMTh: Concentrado vesicular de metacestodos de *T. hydatigena*.

^a Cada rata recibió intraperitonealmente 14 µg de la fracción de CVMTh respectiva.

^b Cada rata recibió intraperitonealmente 30 µg of ovalbumina (OVA).

Las muestras de sangre se colectaron directamente de la vena caudal. En los días -7, 0 (desafío con OVA), 5, 15, 20 y 30 del experimento, en estos se contaron los ES en todas las ratas. El día 30, se midieron los anticuerpos IgG anti-OVA mediante ELISA. Se sacrificaron cinco ratas de cada grupo los días 5 y 30 del experimento, y del total se recogieron el bazo y el NLM para medir los porcentajes de células CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD45RA+ y CD11b/c+ mediante citometría de flujo.

En los días 0, 5 y 30, se midió IMF mediante los inmunoensayos basados en perlas de IL-2, IL-4, INFγ, IL-5, TNFα, GM-CSF, IL-17F, IL-17a, IL-13, IL -22 e IL-6 en suero. Por el número de muestras que se podían evaluar con el kit LEGENDplex™ Rat Th Panel solo se evaluó la IMF en los grupos 1, 2, 4 y 6. El criterio para seleccionar estos grupos fue que los grupos 1 y 2 fueron testigos, y los grupos 4 y 6 presentaron una respuesta tipo para la producción de anticuerpos anti-OVA.

Análisis estadístico

Todos los datos se informan como media \pm error estándar. La media de datos de %Abs, AUC de ES, porcentajes de subpoblaciones celulares así como el IMF de citocinas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y prueba de Fisher para comparaciones entre las medias. Se calculó la correlación entre %Abs, ES, porcentajes de subpoblaciones celulares y IMF de citocinas. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistics for Windows 7.0.

Resultados

En la figura 1 se muestran los patrones de bandas proteicas de las diferentes fracciones de CVMTh observadas en geles SDS-PAGE y en el cuadro 1. El peso molecular calculado de estas bandas. En el CVMTh total se observaron 11 bandas (141, 103, 79, 68, 60, 41, 28, 20, 12, 10 y 9 kDa), en el CVMTh >100 kDa 3 bandas (140, 79 y 68 kDa), CVMTh 30-100 kDa 3 bandas (103, 79 y 68) y en el CVMTh 10-30 kDa 4 bandas (20, 12, 10 y 9 kDa).

Debido a que los Grupos 3, 5 y 7 no mostrarán diferencias significativas ($p>0.05$) en ninguna de las medias de ES, porcentaje de absorbancia (%Abs), subpoblaciones celulares o IMF de citocinas en comparación con las obtenidas de las ratas del Grupo 2 (desafío control OVA), en esta tesis solo se muestran los resultados obtenidos en las ratas de los grupos 1, 2, 4 y 6.

En la figura 2, se muestra el %Abs de anticuerpos anti-OVA en las ratas de los grupos 1, 2, 4 y 6, 30 días después del desafío con OVA. Las ratas del grupo 6 presentaron mayor %Abs que las ratas de los grupos 1 ($p<0.01$), 2 ($p<0.01$) y 4 ($p<0.05$). Las ratas de grupo 4 presentaron mayor %Abs que las ratas de los grupos 1 y 2 ($p<0.06$). No se observaron diferencias ($p>0.05$) entre el resto de los grupos.

En la figura 3 se muestran las cinéticas de ES de las ratas con diferente tipo de tratamiento. En el cuadro 2 se presenta el AUC de ES de las ratas en los diferentes grupos. El AUC de los grupos 1, 2, 4 y 6 presentaron diferencias significativas entre ellos ($p<0.01$).

Las ratas del Grupo 6, sacrificadas los días 5 y 30 del experimento, mostraron un mayor porcentaje ($p<0.05$) de células CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ (linfocitos T CD4) y células CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ (linfocitos T CD8) en el bazo y NLM que el resto del grupo (Figura 4). Las ratas del Grupo 6, sacrificadas el día 30 del experimento, mostraron un mayor porcentaje ($p<0.05$) de células

CD3-/CD45RA+ (linfocitos B) en el NLM que el resto de los grupos, no se observaron diferencias ($p>0.05$) en células de bazo. No se observaron diferencias ($p>0.05$) de células CD3-/CD45RA+ (linfocitos B) en el bazo y NLM entre los diferentes grupos el día 5 del experimento. En bazo y NLM no se observaron diferencias ($p>0.05$) en el porcentaje de células CD11bc+ (macrófagos) entre los diferentes grupos que fueron sacrificados los Días 5 y 30 del experimento.

En el Día 5 del experimento, las ratas del Grupo 2 mostraron un IMF más alto ($p<0.03$) de IL-5 sérica en comparación con las ratas de los Grupos 1, 4 y 6 (Figura 5A). No se observaron diferencias entre el IMF de IL-5 sérica media entre las ratas de los diferentes grupos el día 30 del experimento.

Las ratas del Grupo 4 sacrificadas el día 30 del experimento mostraron un IMF más alto de IL-2 sérica ($p<0.01$), IL-17 ($p<0.05$) e IL-22 ($p<0.05$) en comparación con los grupos 1, 2 y 6 (Figuras 5C, 5E y 5F, respectivamente). Las ratas del Grupo 4 que fueron sacrificadas el día 30 del experimento mostraron un IMF de IL-4 sérica más alto ($p<0.04$) que los Grupos 1 y 2 (Figura 5B). No se observaron diferencias ($p>0.05$) en el IMF de IL-4 sérica entre los diferentes grupos el día 5 del experimento.

Las ratas del Grupo 4 sacrificadas el día 30 del experimento mostraron un IMF superior ($p<0.04$) de IL-6 sérica en comparación con las ratas del Grupo 1 (Figura 5D). No se observaron diferencias ($p>0.05$) entre las medias de IMF de IL-2, IL-22, IL-17, IL-4 o IL-6 en suero entre las ratas de los diferentes grupos en el día 5 del experimento.

Las correlaciones más importantes fueron ES con IL-5 ($r=0.72$, $p<0.001$); %Abs de IgG anti-OVA con células B ($r=0.59$, $p<0.03$); %Abs de IgG anti-OVA con IMF de IL-4 ($r=0.6$, $p<0.01$) y %Abs de IgG anti-OVA con IMF de IL-6 ($r=0.55$, $p<0.03$).

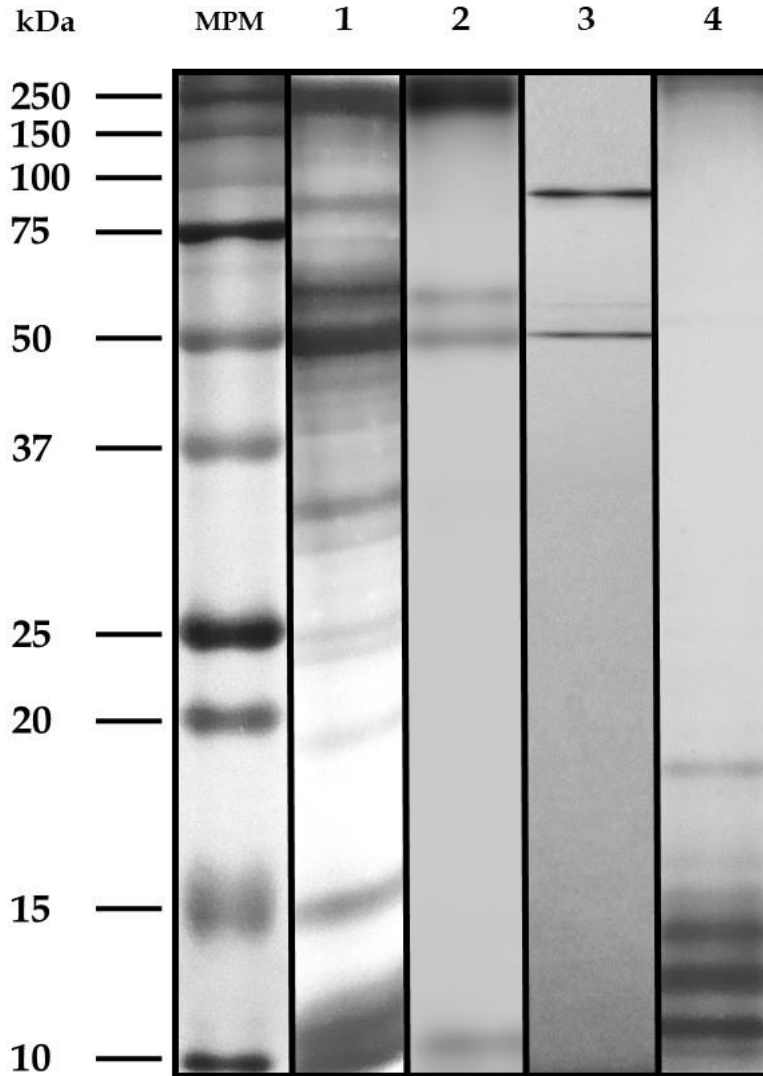


Figura 2. Patrones de bandas proteicas contenidas en: la fracción (1) Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* total (CVMTh total); (2) fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 100 kDa (CVMTh >100 kDa); (3) fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 30 y menor de 100 kDa (CVMTh 30-100 kDa); y (4) fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 10, menor de 30 kDa (CVMTh 10-30 kDa). (MPM) marcador de peso molecular en SDS-PAGE teñido con nitrato de plata.

Peso molecular (kDa) calculado de las bandas proteicas contenidas en las fracciones del concentrado vesicular de metacestodos de *Taenia hydatigena* (CVMTh)

CVMTh total	CVMTh>100kDa	CVMTh 30-100kDa	CVMTh 10-30 kDa
141	140		
103		103	
79	79	79	
68	68	68	
60			
41			
28			
20			20
12			12
10			10
9			9

Cuadro 2. Peso molecular calculado de las proteínas contenidas en: la fracción Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* total (CVMTh total); la fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 100 kDa (CVMTh >100 kDa); la fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 30 y menor de 100 kDa (CVMTh 30-100 kDa); y la fracción del Concentrado Vesicular de Metacestodos de *Taenia hydatigena* mayor de 10 y menor de 30 kDa (CVMTh 10-30 kDa).

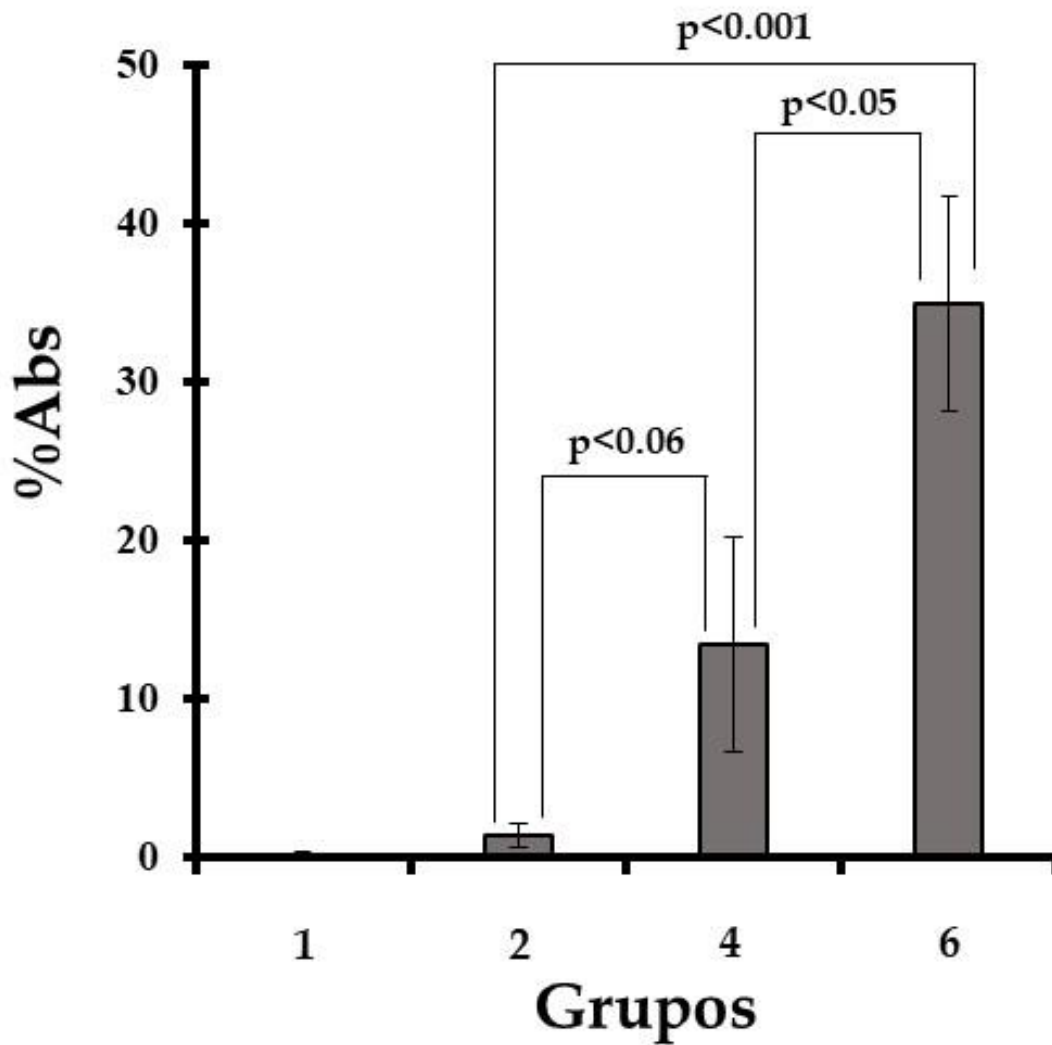


Figura 3. Porcentaje de absorbancia (%Abs), (\pm EE) de la IgG sérica anti-OVA. Grupo 1: ratas de testigo; Grupo 2: ratas inmunizadas con una sola dosis de ovoalbúmina (OVA); Grupo 4: ratas inoculadas con CVMTh total antes de la inmunización con OVA y Grupo 6: ratas inoculadas con CVMTh 30-100 KD antes de la inmunización con OVA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($P < 0.05$).

Grupo	AUC \pm DS
1	3433 \pm 770 ^a
2	10638 \pm 2896 ^b
4	7476 \pm 1715 ^c
6	4439 \pm 656 ^d

Cuadro 3. Promedio (\pm DS) del AUC de eosinófilos sanguíneos. Grupo 1: ratas trestigo; Grupo 2: ratas inmunizadas con una sola dosis de ovoalbúmina (OVA); Grupo 4: ratas inoculadas con CVMTh total antes de la inmunización con OVA y Grupo 6: ratas inoculadas con CVMTh 30-100 KD antes de la inmunización con OVA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0.01$).

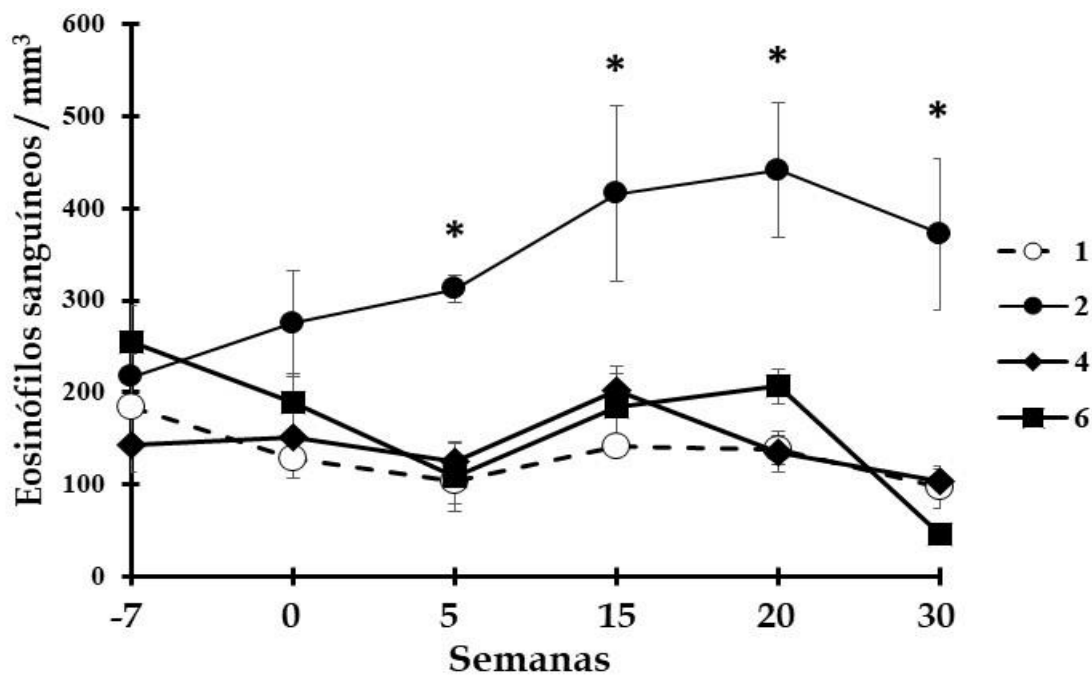


Figura 4. Promedio del conteo semanal de eosinófilos sanguíneos (\pm EE) en ratas del Grupo 1: ratas testigo; Grupo 2: ratas inmunizadas con una sola dosis de ovoalbúmina (OVA); Grupo 4: ratas inoculadas con CVMTh total antes de la inmunización con OVA y Grupo 6: ratas inoculadas con CVMTh 30-100 KD antes de la inmunización con OVA. Todos los grupos con $n=5$. *indica diferencias ($p < 0.05$) entre el Grupo 2 y los demás grupos.

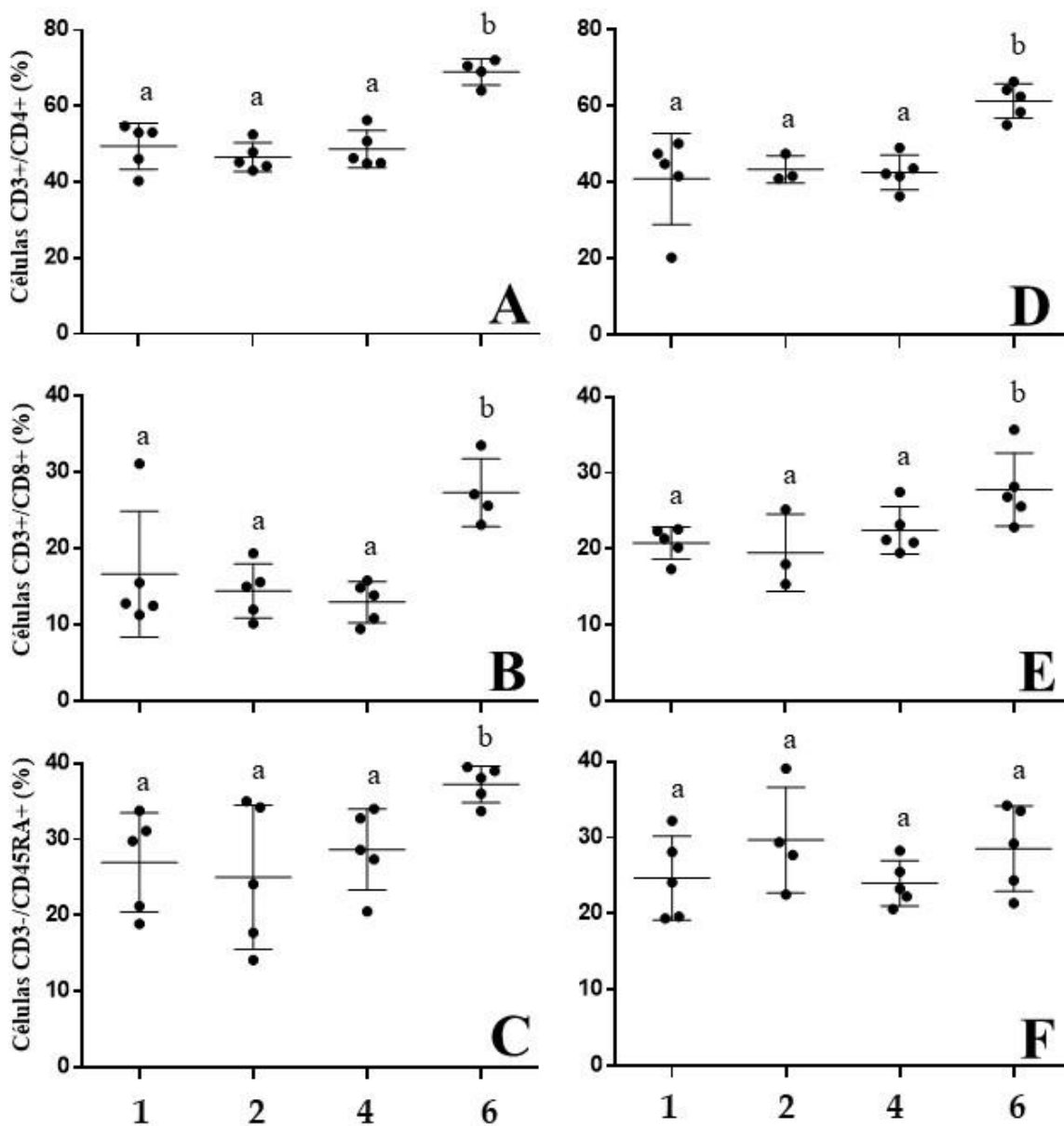


Figura 5. Porcentaje (\pm EE) de linfocitos T CD4 (CD3+/CD4+), T CD8 (CD3+/CD8+) o B (CD3-/CD45RA+) en nódulo linfático mesentérico (a, b y c) y bazo (d, e y f). Grupo 1: ratas testigo; Grupo 2: ratas inmunizadas con una sola dosis de ovoalbúmina (OVA); Grupo 4: ratas inoculadas con CVMTh total antes de la inmunización con OVA; y Grupo 6: ratas inoculadas con CVMTh 30-100 KD antes de la inmunización con OVA. Las mediciones se realizaron el día 30 del experimento. Todas las ratas fueron sacrificadas el día 30 del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$).

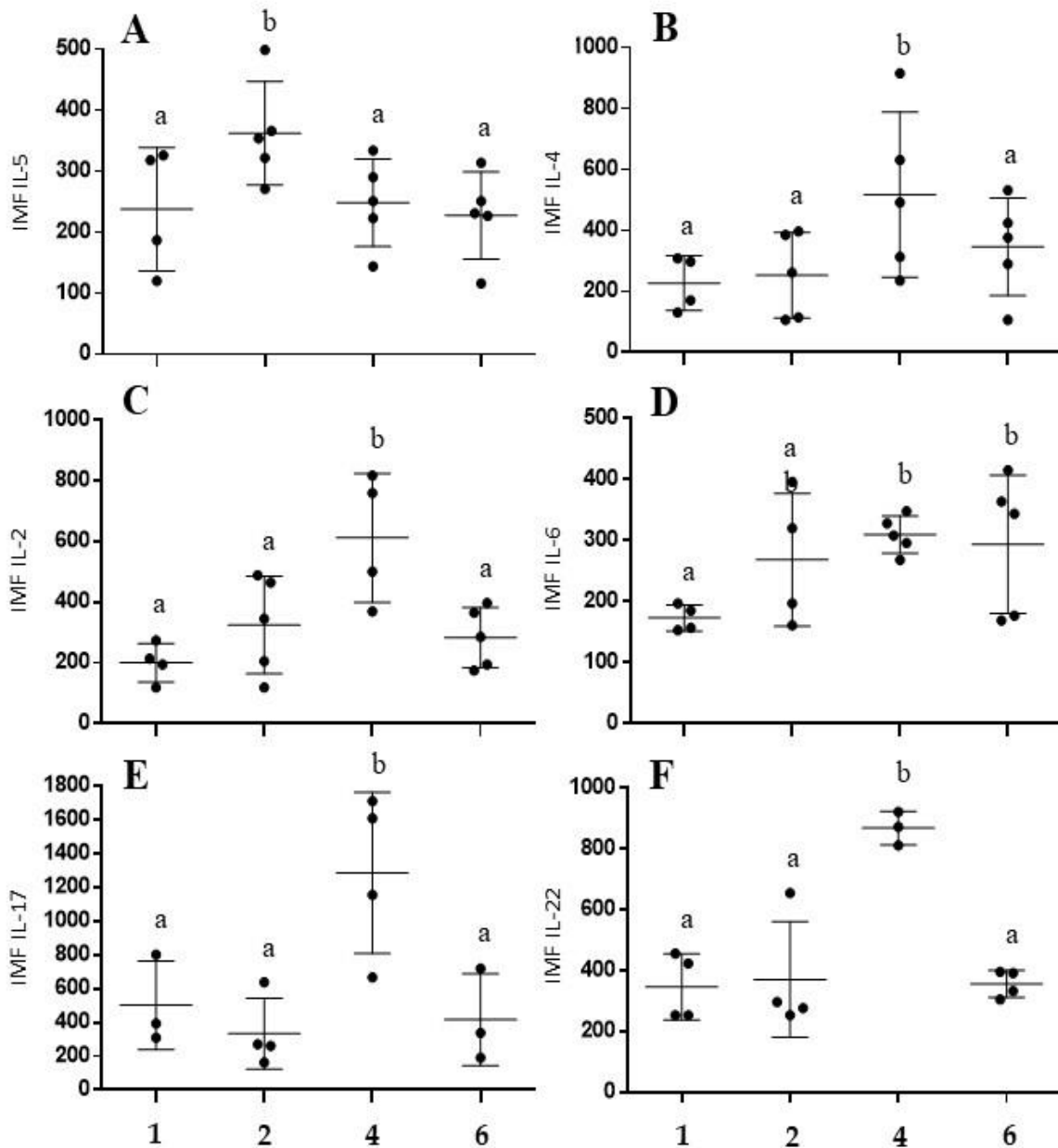


Figura 6. Porcentajes (\pm EE) de IMF de IL-5 (A), IL-4 (B), IL-2 (C), IL-6 (D), IL-17 (E) e IL-22 (F) en suero. Grupo 1: ratas testigo; Grupo 2: ratas inmunizadas con una sola dosis de ovoalbúmina (OVA); Grupo 4: ratas inoculadas con CVMTh total antes de la inmunización con OVA, y Grupo 6: ratas inoculadas con CVMTh 30-100 KD antes de la inmunización con OVA. Las mediciones se realizaron en los días 5 (a) o 30 (b-f) del experimento.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$).

Discusión

Se ha demostrado que algunos parásitos pueden regular el establecimiento de otros parásitos dentro del huésped, probablemente modulando la respuesta inmunitaria (Yacob et al., 2008). En este contexto, se ha demostrado que algunos cestodos modulan la respuesta inmune del huésped para generar un ambiente más favorable para su establecimiento y/o mantenimiento (Larralde et al., 1995). Esto podría modificar los microambientes del huésped para el establecimiento de otros parásitos. En tres estudios anteriores, hemos demostrado que la administración de CVMTh reduce la implantación de gusanos *H. contortus* adultos en el abomaso de los corderos, lo que se asoció con cambios en algunos tipos de células y la expresión de algunas citocinas en el abomaso (Cuenca-Verde et al., 2011; Buendía-Jiménez et al., 2015; Muñoz-Guzmán et al., 2021). Por lo tanto, se propuso que CVMTh podría ser un potenciador de la respuesta a través de la modulación de la respuesta inmunitaria. Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que la CVMTh total y la fracción CVMTh 30-100 kDa potencian la producción de anticuerpos anti-OVA así como algunas citocinas y modifican diferentes subpoblaciones celulares.

La OVA es un antígeno proteico inmunogénico débil, y la administración de una dosis única en ratas induce la producción de bajas cantidades de IgG anti-OVA, pero cuando se administra junto con algunos compuestos químicos que actúan como adyuvantes, induce un fuerte aumento de IgG -anti-OVA específico. Por lo tanto, ha sido ampliamente utilizado como modelo en la evaluación de posibles adyuvantes de la respuesta inmune (Chandrashekar y Venkatesh, 2012; Wusiman et al., 2019; Alqahtani et al., 2020). En este trabajo, se observó que la administración de dos dosis de CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa antes de la inmunización con OVA indujo una producción de IgG anti-OVA mucho mayor que la inmunización con una sola dosis de OVA en ratas. Estos resultados muestran claramente el efecto potenciador del CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa para la producción de anticuerpos y su probable efecto adyuvante.

El CVMTh total es una mezcla compleja de proteínas y otras moléculas. En este estudio, separamos diferentes fracciones de esta mezcla y cada fracción tuvo un comportamiento diferente. El efecto estimulante de la producción de anticuerpos solo estaba presente en CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa, por lo que se puede decir que este efecto

lo producen algunas de las moléculas que se encuentran en estas fracciones. El CVMTh 30-100 kDa produjo una mayor cantidad de anticuerpos que el ThLVC total; por lo tanto, las moléculas que están en el rango de 30-100 kDa son probablemente las principales moléculas responsables de este efecto inmunoestimulador.

Se ha demostrado que muchas infecciones parasitarias inducen eosinofilia en sus huéspedes (Mitre y Klion, 2021). En estudios previos realizados se observó que la administración del CVMTh total en corderos, induce una fuerte eosinofilia que se prolonga durante varias semanas (Cuenca-Verde et al., 2011; Buendía-Jiménez et al., 2015; Muñoz-Guzmán et al., 2021). La OVA es una glicoproteína de 385 aminoácidos de ≈ 45 kDa y aproximadamente 3% de carbohidratos (Mine y Yang, 2007).

Esta glicoproteína es un potente alérgeno (Adamko et al., 1999; Saldanha et al., 2004). La administración por vía aérea o sistémica induce un aumento de eosinófilos en sangre y pulmones, por lo que ha sido ampliamente utilizado en modelos experimentales de asma (Hogan et al., 2003; Kumar et al., 2008). En este estudio, se observó que la administración de OVA por vía intraperitoneal indujo un fuerte aumento de ES que se correlacionó significativamente con un aumento de IL-5 en sangre; sin embargo, la administración previa de CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa inhibió ambos aumentos, lo que indica claramente que ambas fracciones tienen efectos reguladores a la baja en algunos elementos de la respuesta inmune. Esto contrasta fuertemente con el modelo experimental de ovejas, donde la administración de CVMTh total produjo eosinofilia y aumento de la expresión de IL-5 (Cuenca-Verde et al., 2011; Muñoz-Guzmán et al., 2021). El aumento de la producción de anticuerpos anti-OVA específicos, al mismo tiempo que la inhibición de la eosinofilia y la IL-5 en sangre, en ratas previamente tratadas con CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa, no es consistente con una respuesta clásica de Th2 observada en otros modelos parasitarios.

En general, se considera que los linfocitos CD4 (CD3+/CD4+) tienen una función reguladora basada en la producción de citoquinas y dirigen la respuesta inmune a través de diferentes vías: Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos CD8 (CD3+/CD8+) son células efectoras cuya acción principal es el ataque citotóxico a los patógenos intracelulares mediante la inducción de la apoptosis y, en menor medida, la regulación mediante la producción de algunas citocinas (Janeway et al., 2008). En este estudio se observó que la administración de CVMTh 30-100 kDa previa a la administración de OVA aumentó el porcentaje de linfocitos

CD4 y CD8 en bazo y NLM respecto al resto de grupos. Este hallazgo indica que las moléculas de esta fracción inducen una amplia activación de los linfocitos T.

Los linfocitos B (CD3-/CD45RA+) son precursores de las células plasmáticas productoras de anticuerpos (Jensen et al., 1992). La administración de CVMTh 30-100 kDa antes de la administración de OVA aumentó la proporción de linfocitos B, lo que se correlacionó significativamente con una mayor producción de IgG anti-OVA; sin embargo, en el grupo de ratas que recibieron CVMTh 30-100 kDa, estos aumentos no se relacionaron con una mayor producción de IL4 e IL6, lo que sugiere que esta fracción indujo la producción de anticuerpos independiente a estas citocinas o que se produjo el aumento de estas citocinas antes del día 30, por lo que no se detectó en este estudio.

En la respuesta Th17, hay un aumento de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. IL-17A e IL-17F forman un homodímero o heterodímero que activa el receptor de IL-17 (Korn et al., 2009). La respuesta Th17 se ha asociado con una fuerte activación de los neutrófilos, lo que la hace más eficiente para matar patógenos invasores extracelulares, principalmente hongos y bacterias. En las infecciones virales y parasitarias, el papel de las respuestas Th17 es menos claro, e incluso se ha informado que la IL-17 es dañina para el huésped. Además, la respuesta Th17 se ha asociado con enfermedades autoinmunes y aumento de la inflamación crónica (Van De Veerdonk et al., 2009; Deng et al., 2019). En este estudio, la administración de CVMTh total y OVA indujo un aumento en IL-17F e IL-22 el día 30 del experimento, pero no el día 5, por lo que probablemente indujeron una activación tardía de la respuesta Th17. Aunque no se pueden determinar las posibles implicaciones de esta activación, está claro que la combinación de CVMTh total y OVA modifica la respuesta inmune hacia una respuesta Th17.

Los resultados de este estudio muestran que CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa modifican la respuesta inmune de forma diferenciada en las ratas. Ambas fracciones inhibieron la eosinofilia y la producción de IL-5 producida por la administración de OVA en ratas. El CVMTh 30-100 kDa activó fuertemente la producción de anticuerpos anti-OVA específicos y la proliferación de linfocitos T y B. El CVMTh total aumentó moderadamente los anticuerpos anti-OVA específicos y la activación de una respuesta Th17. Aunque se requieren más estudios para confirmar dichas observaciones, los resultados sugieren que ambas fracciones de CVMTh tienen potencial para usarse como adyuvantes.

Referencias

Adamko, D. J., Yost, B. L., Gleich, G. J., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. 1999. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection: eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M2 muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *The J. of exp. Med.* 190(10), 1465-1478.

Alqahtani, M.S., Kazi, M., Ahmad, M.Z., Syed, R., Alsenaidy, M.A., Albraiki, S.A., 2020. Lignin nanoparticles as a promising vaccine adjuvant and delivery system for ovalbumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 163, 1314-1322.

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

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.

Chandrashekar, P.M., Venkatesh, Y.P., 2012. Fructans from aged garlic extract produce a delayed immunoadjuvant response to ovalbumin antigen in BALB/c mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34, 174-180.

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

Del Río-Araiza, V.H., Nava-Castro, K.E., Alba-Hurtado, F., Quintanar-Stephano, A., Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Micò, O., Morales-Montor, J., 2018. Endocrine immune interactions during chronic toxocaríasis caused by *Toxocara canis* in a murine model: new insights into the pathophysiology of an old infection. *Vet. Parasitol.* 252, 173-179.

Deng, J., Yu, X.Q., Wang, P.H., 2019. Inflammasome activation and Th17 responses. *Mol. Immunol.* 107, 142-164.

González-García, T., Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Arroyo, H., Prado-Ochoa, M.G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2017. Experimental transmission of *Toxocara canis* from *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* cockroaches to a paratenic host. *Vet. Parasitol.* 246, 5-10.

Hogan, M.B., Weissman, D.N., Hubbs, A.F., Gibson, L.F., Piktel, D., Landreth, K.S., 2003. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 171, 2644-2651.

Hohenhaus M.A., Josey, M.J., Dobson, C., Outteridge P.M. 1998. The eosinophil leukocyte, a fenotypic marker of resistance to nematode parasites, is associated with calm behaviour in sheep. *Immunol. Cell Biol.* 76: 153-158.

Janeway, C., Murphy, K. P., Travers, P., & Walport, M. 2008. *Janeway's immuno biology*.

Jensen, G.S., Mant, M.J., Pilarski, L.M., 1992. Sequential maturation stages of monoclonal B lineage cells from blood, spleen, lymph node, and bone marrow from a terminal myeloma patient. *Am. J. Hematol.* 41, 199-208.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Ann. Rev. Immunol.* 27, 485-517.

Kumar, R.K., Herbert, C., Foster, P.S., 2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets.* 9, 485-494.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575-580.

Mine, Y., & Yang, M. 2007. Epitope characterization of ovalbumin in BALB/c mice using different entry routes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 1774(2), 200-212.

Mitre, E., & Klion, A. D. (2021, June). Eosinophils and helminth infection: protective or pathogenic? In *Seminars in Immunopathology* 43, 3, 363-381). Springer Berlin Heidelberg.

Morales-Montor, J., Baig, S., Hallal-Calleros, C., Damian, R.T. 2002. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.* 100, 209-216.

Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Paredes, A., Cuenca-Verde, C., López-Arellano, M.E., Alba-Hurtado, F., 2021. *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate reduces the egg shedding of *Haemonchus contortus* associated with the overexpression of abomasal cytokines in lambs. *Vet. Parasitol.* 292, 109390.

Peón, A.N., Ledesma-Soto, Y., Terrazas, L.I., 2016. Regulation of immunity by Taeniids: lessons from animal models and in vitro studies. *Parasite Immunol.* 38, 124-135.

Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., ... & Cara, D. C. 2004. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian J. of Medic. and Biol. Res.* 37, 809-816.

Terrazas, C.A., Gómez-García, L., Terrazas, L.I., 2010. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int. J. Parasitol.* 40, 1051-1062.

Terrazas, C.A., Sánchez-Muñoz, F., Mejía-Domínguez, A.M., Amezcua-Guerra, L.M., Terrazas, L.I., Bojalil, R., Gómez-García, L., 2011. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1391.

Van De Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Kullberg, B.J., Van Der Meer, J.W., Joosten, L.A., Netea, M.G., 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports* 42, 776-787.

Wusiman, A., Gu, P., Liu, Z., Xu, S., Zhang, Y., Hu, Y., Liu, J., Wang, D., Huang, X., 2019. Cationic polymer modified PLGA nanoparticles encapsulating Alhagi honey polysaccharides as a vaccine delivery system for ovalbumin to improve immune responses. *Int. J. Nanomed.* 14, 3221.

Yacob, H.T., Basazine, B.K. and Basu, A.K. Experimental concurrent infection of Afar breed goats with *Oestrus ovis* (L1) and *Haemonchus contortus* (L3): Interaction between parasite populations, changes in parasitological and haematological parameters. 2008. *Experimntal Parasitology.* 120,180-184.

Pérdidas productivas asociadas a infección experimental subclínica con *Taenia hydatigena* en ovinos

Resumen

Se evaluó el efecto de la infección experimental por metacestodos de *Taenia hydatigena* sobre diferentes parámetros productivos en ovinos. Se utilizaron diecisiete corderos machos Columbia distribuidos en tres grupos. Los corderos del primer grupo (n=5) fueron inoculados por vía oral con 1000 huevos de *T. hydatigena* (dosis baja). Los corderos del segundo grupo (n=5) fueron inoculados por vía oral con todos los huevos (50000 aproximadamente) contenidos en el último proglótido de un cestodo adulto (dosis alta). Los corderos del tercer grupo (n=7) solo recibieron un placebo y se usaron como grupo testigo. Todos los corderos fueron sacrificados humanitariamente en la semana 13 después de la infección y se evaluaron el rendimiento y la conformación de la canal.

Las tasas de infección de los corderos del grupo infectado con dosis alta y del grupo infectado con dosis baja fueron del 100 % y 40 %, respectivamente, con una media de 2.4 ± 0.6 y 1 ± 0.7 metacestodos de *T. hydatigena* en la cavidad abdominal, respectivamente. El área bajo la curva (AUC) de la puntuación de la condición corporal ($p < 0.001$), la ganancia de peso ($p < 0.1$) y el rendimiento de la canal ($p < 0.1$) fueron menores en los corderos del grupo infectado con dosis alta que en los corderos del grupo testigo. El consumo de alimento ($p < 0.1$), la conversión alimenticia final ($p < 0.1$), el AUC del recuento de eosinófilos ($p < 0.001$) y los niveles de fosfatasa alcalina (FA) sérica ($p < 0.001$) fueron mayores en los corderos de la dosis alta que en los corderos del grupo control. Se describieron las lesiones observadas en el hígado de corderos infectados. El estudio multivariado (MANOVA) considerando las variables productivas mostró un efecto altamente significativo de la infección

($p < 0.0001$). El aumento de la FA sérica es consecuencia del daño hepático que tuvo una fuerte correlación negativa ($r = -0.63$, $p < 0.007$) con la condición corporal de los corderos. A pesar de estos hallazgos, no se presentaron manifestaciones clínicas obvias en ninguno de los corderos infectados. En general, no se observaron diferencias entre los corderos del grupo control y los corderos del grupo infectado con dosis baja en los parámetros evaluados.

Los resultados de este estudio, muestran que la infección de metacestodos de *T. hydatigena*, produce de forma subclínica una disminución de la eficiencia productiva, alteraciones de algunos valores hematológicos y bioquímicos, y un ligero deterioro en el aspecto general de los corderos infectados. Los aspectos anteriores rara vez son detectados por la mayoría de los ganaderos, pero tienen un impacto negativo en la productividad de los corderos infectados.

Introducción

Los perros son los hospedadores definitivos más frecuentes de *Taenia hydatigena*, los rumiantes, cerdos y equinos son los hospedadores intermediarios más importantes. Los perros se infectan cuando ingieren tejidos con metacestodos de *T. hydatigena*, los cuales se desarrollan a cestodos adultos en su intestino delgado. Los perros infectados eliminan proglótidos grávidos o huevos en heces, en el ambiente, los proglótidos liberan una gran cantidad de huevos que contaminan los pastizales (Cordero del Campillo M et al, 1999). Los ovinos se infectan por la ingestión de huevos junto con el pasto. En los ovinos, los metacestodos se localizan principalmente en cavidad abdominal adheridos al omento, mesenterio, peritoneo y cápsula hepática.

En el desarrollo cada vez más especializado de la producción ovina, se han identificado enfermedades subclínicas que producen un impacto negativo para la producción, que, por ser difícilmente medibles o detectables, no son consideradas por los productores como causa de pérdidas económicas. Tal es el caso por ejemplo de las micotoxicosis, paratuberculosis, linfadenitis caseosa y la presencia de moscas en los corrales, en las que se comprendió su verdadero impacto económico hasta que se midió en estudios ex profeso su

efecto en la producción (Whittington and Sergeant, 2001; Ruiz et al., 2007; Malik et al., 2007; Zain, 2011).

En la metacestodosis producida por larvas de *T. hydatigena*, es muy complicado calcular las pérdidas económicas debido a que en la mayoría de los casos, no produce signos clínicos evidentes (Desplazes et al., 2016). La presencia de los metacestodos en los ovinos, convencionalmente solo se considera como un hallazgo al momento del sacrificio en el matadero y la mayoría de los productores piensan que no tiene ninguna repercusión en la salud de los ovinos.

La mayoría de los estudios publicados hasta el momento son observacionales y en algunos se ha intentado calcular en forma indirecta el impacto económico de la infección por metacestodos de *T. hydatigena* (Scala et al., 2015; Anteneh et al., 2011; Jahed Khaniki et al., 2013; Mohammed and Kadir, 2020), sin embargo, existen muy pocos estudios donde se haga una infección experimental con este parásito y ninguno de ellos ha sido diseñado para medir el impacto de la infección crónica por metacestodos de *T. hydatigena* sobre diversos parámetros de la producción ovina. Recientemente, se reportó que los ovinos con infección experimental crónica desarrollaron eosinofilia y aumento significativo de los niveles séricos de la aspartato amino transferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA) que evidenciaron un compromiso hepático (Cuenca-Verde et al., 2019). Lo anterior sugiere que esta metacestodosis puede producir pérdidas sutiles y continuas en la productividad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la infección experimental de *T. hydatigena* sobre diferentes parámetros productivos en ovinos.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 17 corderos machos de la raza Columbia de aproximadamente seis meses de edad y con un promedio de 30 kg de peso. Todos los corderos se mantuvieron en corraletas con piso de concreto (3.5 X 3.5 metros) en los corrales de posgrado de la FES-Cuautitlán. El alimento se ofreció en comederos metálicos y consistió en una mezcla con 50% de concentrado comercial para borregos de engorda intensiva “San Mateo” (15% proteína cruda, humedad máxima 10%, grasa 3%, ceniza 5%, fibra cruda 10% y extracto libre

de nitrógeno 57%) y 50% de alfalfa achicalada molida. El agua se ofreció *ad libitum* en bebederos automáticos de pivote.

Para la obtención de huevos de *T. hydatigena* se utilizó un perro macho de 6 meses de edad de raza no definida. El perro se desparasitó y se verificó por pruebas coproparasitoscópica de Faust que estuviera libre de parásitos intestinales (Alba-Hurtado, 2020). Se mantuvo en una corraleta individual (3 X 3.2 m), en contacto visual con otros perros. La alimentación consistió en alimento comercial balanceado para cachorro con 23% de proteína cruda y agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Interno de Cuidado de Animales de Experimentación del Programa de Posgrado en Producción y Sanidad Animal de la UNAM, México (aprobación número pC21_05).

Parásitos

La cepa de *T. hydatigena* utilizada en este estudio se ha mantenido por pases sucesivos perro-ovino en la FES-Cuautitlán. Los metacestodos originales se obtuvieron a partir de ovinos sacrificados en un rastro cercano (Tlalnepantla, edo México). A partir de ovinos infectados con esta cepa, se seleccionaron metacestodos con movimiento en el escólex, con tamaño de 4-6 cm y que estuvieran adheridos al omento mayor o a la capsula hepática. Se infectó por vía oral un perro de 4 meses de edad con 6 metacestodos. El periodo de prepatencia fue de 74 días. El perro fue eutanasiado en forma humanitaria el día 90 posinfección (PI) y se recuperaron 6 cestodos adultos. Los gusanos adultos se midieron, se verificaron las características morfológicas del escólex y número de ramificaciones uterinas de los proglótidos grávidos, en todos los casos correspondieron a los descritos para *T. hydatigena* (Edwards and Herbert, 1981).

Preparación del Inóculo

Para la obtención del inóculo en los corderos, el último proglótido grávido de cada cestodo adulto fue separado e inmediatamente colocado sobre 10 gramos de alimento comercial balanceado para ovino, se verificó la expulsión de huevos del proglótido sobre el alimento. Cada inóculo fue administrado oralmente a cada cordero del grupo inoculado con alta dosis. El último proglótido del sexto cestodo adulto, se colocó en una caja Petri con PBS con pH 7.4, se verificó la expulsión de huevos, se contaron y se diluyeron para obtener una

concentración de 1000 huevos en 5 mL de PBS, los cuales fueron administrados oralmente a cada cordero del grupo inoculado con dosis baja.

Diseño experimental

Los corderos fueron distribuidos en tres grupos. Los corderos del primer grupo (n=5) fueron inoculados oralmente con 1000 huevos de *T. hydatigena* (dosis baja). Los corderos del segundo grupo (n=5) fueron inoculados oralmente con el total de huevos del último proglótido de cada cestodo adulto (dosis alta). Los corderos del tercer grupo (n=7), solo recibieron un placebo y fueron utilizados como grupo control.

Semanalmente, se colectaron muestras de sangre con/sin EDTA, se registró el peso y se evaluó la condición corporal de cada cordero siguiendo la escala de Russel et al (1969), además, se calculó el consumo promedio de alimento. De la muestra de sangre con EDTA, se determinó el número de eosinófilos por mm^3 y el hematocrito. A partir del suero obtenido de la muestra de sangre sin EDTA se midieron los niveles de enzimas hepáticas.

Todos los corderos fueron eutanasiados en forma humanitaria en la semana 13 PI. Se inspeccionaron las vísceras y la canal de cada cordero para localizar y contar el número de metacestodos. Se separó el hígado y se buscaron lesiones macroscópicas y microscópicas en el parénquima. Se calculó el porcentaje de rendimiento, calidad de la canal y conversión alimenticia final.

Consumo diario y conversión alimenticia

Diariamente se ofreció una cantidad conocida de alimento (7% del peso vivo de cada grupo de corderos), al día siguiente se recolectó y pesó el alimento sobrante de los comederos (rechazado), el consumo de alimento diario grupal se calculó restando el peso del alimento rechazado del peso del alimento ofrecido. El tamaño de los comederos era suficientemente amplio para evitar la competencia por el espacio entre los corderos de cada grupo. El consumo total de alimento de cada cordero se calculó dividiendo el consumo total de alimento entre el número de corderos de cada grupo. La conversión alimenticia total de cada cordero, se calculó dividiendo su consumo total de alimento entre su ganancia total de peso corporal.

Conteo de eosinofilos en sangre

El conteo se realizó según la técnica de Hohenhaus et al. (1998) y modificada por Cuenca-Verde et al. (2011). Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular con aguja para toma múltiple color amarillo de 20G x 38mm en tubos vacutainer EDTA-K2 (color lila). Se utilizó una dilución de sangre de 1:10 con una solución de Carpentier (formaldehído al 40% y eosina Y al 1%). Los ES se contaron en una cámara de Neubauer y los resultados se expresaron como número de ES por mm³ de sangre.

Rendimiento y calidad de la canal

El porcentaje de rendimiento de la canal se calculó multiplicando el peso de la canal obtenida por 100 entre el peso vivo en el momento de la eutanasia. Por manejo de las canales, solo se compararon los corderos del grupo testigo, con los del grupo infectado con dosis alta.

La conformación de las canales de los corderos del grupo control y del grupo de dosis alta se evaluó de acuerdo a los criterios de la norma mexicana NMX-FF-106-SCFI-2006 livestock products - sheep carcass – classification y se les asignó un valor numérico: 3 a la conformación excelente, 2 a la conformación buena y 1 a la conformación deficiente. La conformación fue medida en forma ciega por un técnico especialista en calidad de la carne. En estas canales también se midió el perímetro a nivel de los trocánteres femorales (perímetro de la grupa), ancho máximo de grupa, ancho máximo de tórax y la longitud de la pierna.

Enzimas hepáticas

El suero se obtuvo a partir de la centrifugación de muestras de sangre tomada de la vena yugular de los corderos en tubos vacutainer con un gel separador y un activador de la coagulación (color dorado). El suero obtenido se congeló a -20°C hasta su procesamiento. Los niveles plasmáticos de aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamyl transferasa (GGT) se midieron utilizando kits de Wiener Lab (REF 17522360, 1361402 y 1421404), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Lesiones

Posterior a la eutanasia se buscaron lesiones macroscópicas en el parénquima hepático de todos los corderos. En los corderos infectados, se colectaron muestras de

aproximadamente un cm³ de parénquima hepático de zonas con lesiones. Las muestras de tejido hepático se fijaron en formol al 10%, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 µm y se tiñeron con hematoxilina/eosina (Luna, 1968).

Análisis estadístico

La cantidad acumulada del número de ES, puntaje de la condición corporal, ganancia de peso y niveles de enzimas hepáticas fueron estimados utilizando un método trapezoidal para determinar el área bajo la curva (AUC). Se evaluó el efecto de la infección sobre la productividad mediante un MANOVA (multivariate analysis of variance) tomando en conjunto las variables dependientes: el AUC de la condición corporal, consumo de alimento y ganancia final de peso, así como la conversión alimenticia. Los efectos individuales de cada variable se compararon por ANOVA de una vía y pos-hoc análisis de Fisher.

En un segundo MANOVA se evaluó el efecto de la infección sobre el AUC de ES, hematocrito y FA. Los efectos individuales de cada variable se compararon por ANOVA de una vía y pos-hoc análisis de Fisher.

El porcentaje de rendimiento de la canal, conformación de la canal y los datos morfométricos de los corderos del grupo control y del grupo con alta dosis se compararon por t de Student de una cola.

Se realizó una correlación simple de Pearson para las variables productivas y hematológicas. Los análisis antes mencionados se realizaron mediante el procedimiento del modelo lineal general (GLM) utilizando el software Statistica 7.0.

Resultados

El porcentaje de infección del grupo de corderos con infección alta y con infección baja fue del 100% y 40% respectivamente, con un promedio de 2.4 ± 0.6 y 1 ± 0.7 metacestodos de *T. hydatigena* bien desarrollados en cavidad abdominal, respectivamente. Ningún cordero del grupo testigo presentó metacestodos a la revisión exhaustiva posterior a la eutanasia.

Los datos de la condición corporal, ganancia de peso acumulado, consumo de alimento y conversión alimenticia final, se presentan en la figura 1. El estudio multivariado (MANOVA) considerando los valores AUC de la condición corporal, ganancia de peso y consumo de alimento, así como los valores de conversión alimenticia final, mostró un efecto

grupo (dosis alta/dosis baja/no infectado) altamente significativo ($p < 0.0001$). Individualmente, el AUC de la condición corporal y la ganancia de peso, fue menor en los corderos del grupo infectado con dosis alta en comparación con los corderos del grupo testigo ($p < 0.001$ and $p < 0.1$, respectivamente). El consumo de alimento y la conversión alimenticia final fue mayor ($p < 0.1$) en los corderos del grupo infectado con dosis alta en comparación a los corderos del grupo testigo. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre los corderos del grupo testigo y los corderos del grupo infectado con dosis baja.

Los corderos del grupo testigo presentaron mayor ($p < 0.1$) rendimiento de la canal ($50.2\% \pm 0.7$) que los del grupo infectado ($48.8\% \pm 0.8$). Según los criterios de la norma mexicana (NMX-FF-106-SCFI-2006), todas las canales (grupo testigo y del grupo infectado con dosis alta) fueron categorizadas como canales de conformación buena, sin embargo, las canales de los corderos del grupo testigo, estaban más cerca de ser excelentes, mientras que las canales de los corderos del grupo infectado con dosis altas estaban más cerca de ser deficiente (figura 2). Los corderos del grupo testigo presentaron valores ligeramente mayores ($p > 0.1$) de ancho de grupa (25.2 ± 0.4 and 25.2 ± 0.6), perímetro de grupa (68.8 ± 1 and 67.7 ± 1.4) y ancho de tórax (27.1 ± 1.7 and 26.7 ± 0.5) que los del grupo infectado con dosis alta.

Los datos de las cinéticas del número de ES, FA y hematocrito se presentan en la figura 3. El estudio multivariado (MANOVA) considerando los valores de AUC de eosinófilos, hematocrito y FA, mostró un efecto grupo (dosis alta/dosis baja/no infectado) altamente significativo ($p < 0.0001$). Individualmente, el AUC del número de ES y FA, fue mayor en los corderos del grupo infectado con dosis alta en comparación con los corderos del grupo testigo ($p < 0.001$). El AUC de AST y GGT no mostraron diferencias ($p > 0.1$) entre los grupos. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre los corderos del grupo testigo y los corderos del grupo infectado con dosis baja. Las correlaciones más importantes entre las variables se presentan en el cuadro 1.

A la inspección post-mortem los corderos del grupo infectado con dosis alta presentaron 2.2 ± 1.9 lesiones macroscópicas en hígado y los corderos del grupo infectado con dosis bajas presentaron 1 ± 0.54 . Las lesiones macroscópicas se observaron como puntos blancos ligeramente protuberantes de 2-3 mm sobre la superficie del hígado, estos se continuaban con un cordón de fibrosis en la superficie o hacia el parénquima hepático (figura

4a). Las lesiones microscópicas que se observaron más frecuentemente se presentan en las figuras 4 b, c y d. En estas, se observaron cerca de conductos biliares y espacio porta, zonas de edema, necrosis, fibrosis e infiltrado de mononucleares con presencia de eosinófilos. Los corderos del grupo testigo no presentaron lesiones macroscópicas ni microscópicas en el hígado.

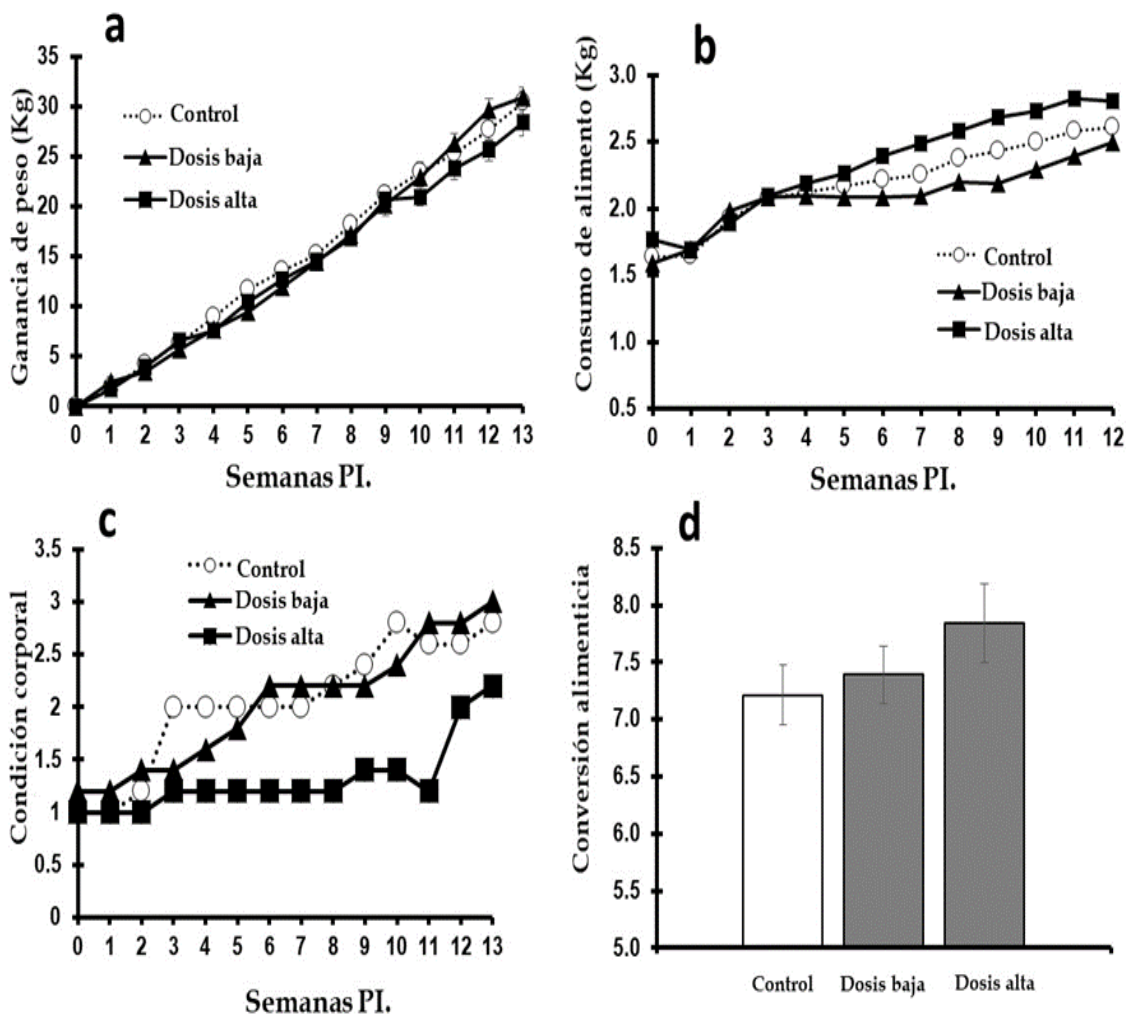


Figura 1. Media (\pm EE) de ganancia de peso (a), consumo de alimento (b), puntaje de condición corporal (c) y conversión alimenticia final (d) en corderos infectados oralmente con 1000 huevos de *T. hydatigena* (dosis baja), corderos infectados por vía oral con el número total de huevos de un proglótido grávido de *T. hydatigena* (dosis alta) y corderos no infectados (control).



Figura 2. Conformación de canales. a) Cordero del grupo control; b) Cordero infectado con dosis alta.

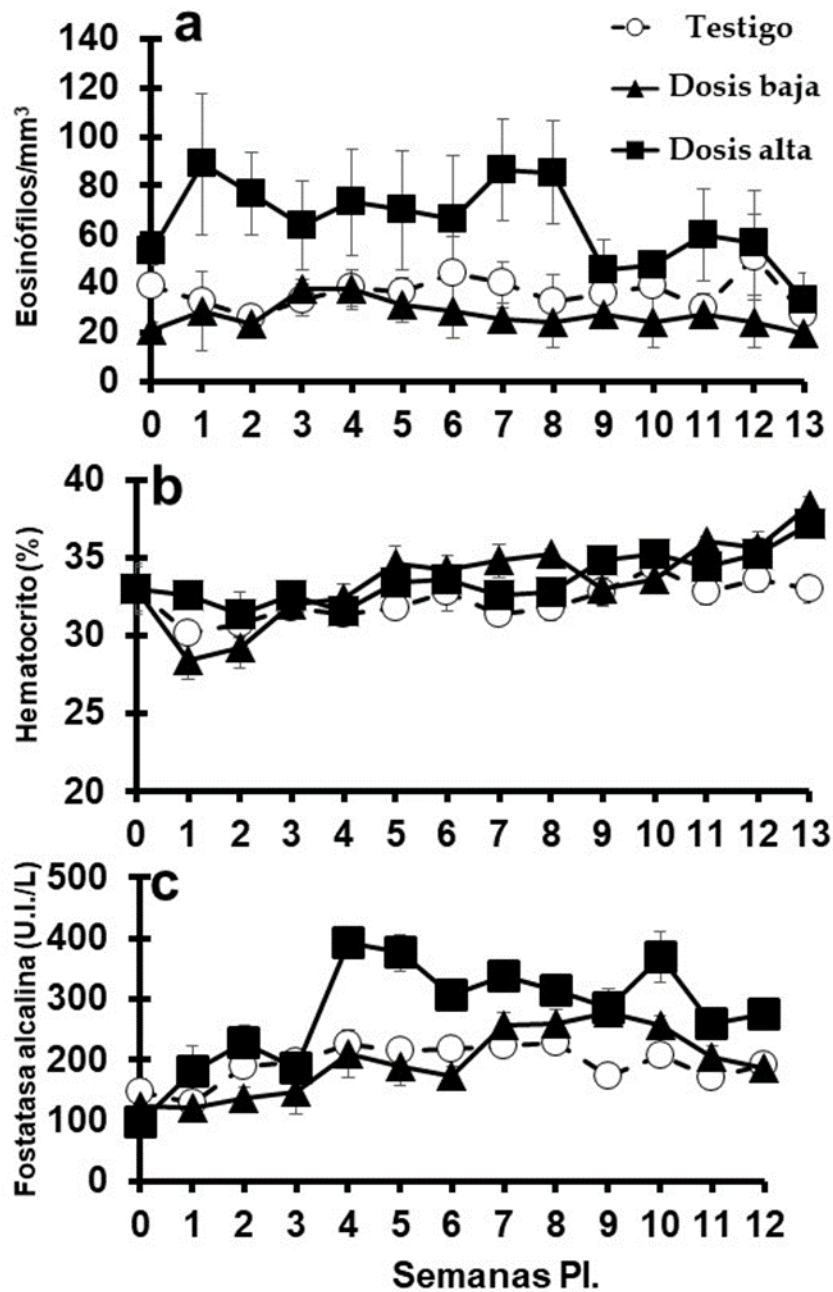


Figura 3. Media (\pm EE) de eosinófilos en sangre (a), hematocrito (b) y fosfatasa alcalina (c) en corderos infectados por vía oral con 1000 huevos de *T. hydatigena* (dosis baja), corderos infectados por vía oral con el número total de huevos de un proglótido grávido de *T. hydatigena* (dosis alta) y corderos no infectados (testigo).

Cuadro 1. Correlaciones entre el AUC de la puntuación de la condición corporal (AUC-CC), el AUC de la ganancia de peso (AUC-GP), la conversión alimenticia final (CAF), el consumo final de alimento (CFA), el AUC de hematocrito (AUC-Hto), AUC de eosinófilos sanguíneos (AUC-ES) y AUC de fosfatasa alcalina sérica (AUC-FA).

	AUC-CC	AUC-GP	CAF	CFA	AUC-Hto	AUC-ES	AUC-FA
AUC-CC	1.00						
AUC-GP	0.57**	1.00					
CAF	-0.59**	-0.95**	1.00				
CFA	-0.24	-0.27	0.10	1.00			
AUC-Hto	-0.1738	0.46	-0.40	-0.22	1.00		
AUC-ES	-0.76**	-0.43	0.50*	0.47*	0.01	1.00	
AUC-FA	-0.63**	-0.21	0.27	0.26	0.05	0.73**	1.00

**P<0.01

*P<0.05

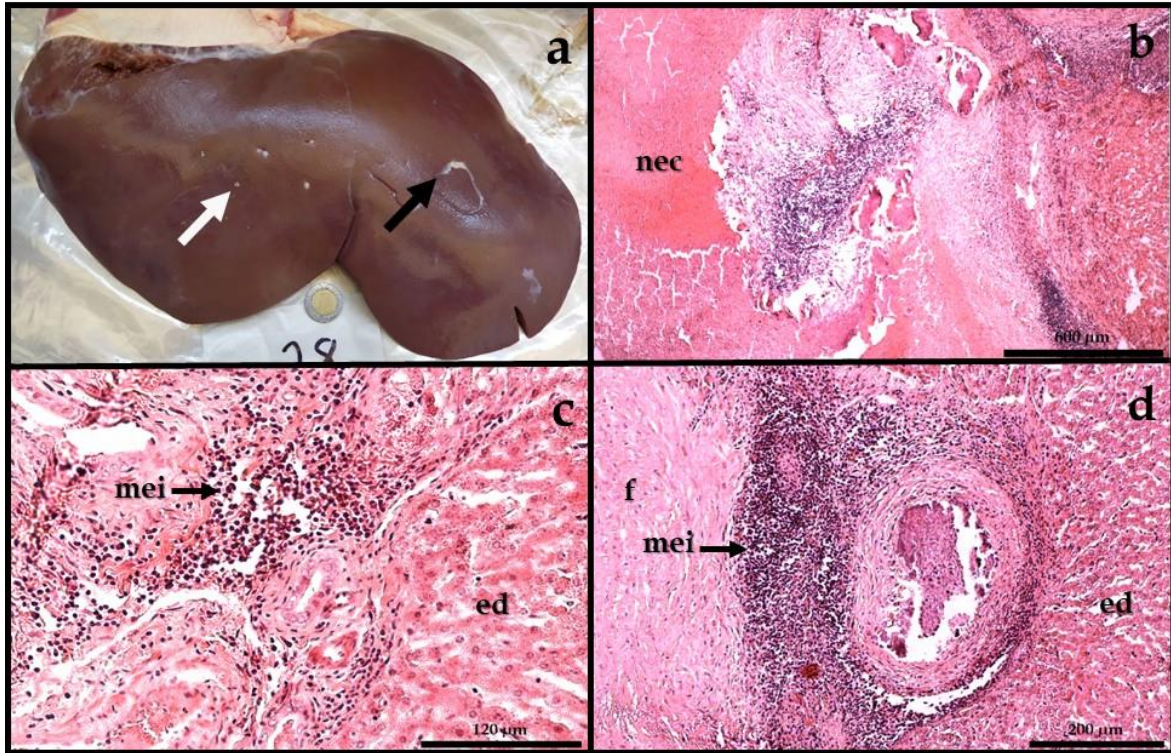


Figura 4. Lesiones macroscópicas y microscópicas en el hígado de corderos infectados con *T. hydatigena*. a) Puntos blancos macroscópicos ligeramente sobresalientes en la superficie del hígado (flecha blanca) y cordón de fibrosis en la superficie (flecha negra). b) Zona de necrosis (nec) e infiltrado mononuclear. c) Infiltrados mononucleares y eosinófilos (mei) en el espacio porta, edema (ed). d) Infiltrados mononucleares y eosinófilos (mei) alrededor de una arteria, edema (ed) y fibrosis (f).

Discusión

Muchos factores influyen en la eficiencia de las unidades de producción ovina. Algunos factores como la alimentación, la genética, el manejo reproductivo y enfermedades infecciosas, entre otros, fácilmente son reconocidos por los productores como factores que impactan la productividad de las unidades de producción (Cruz, 2010). En este contexto, se reconoce el impacto negativo en la producción ovina que tienen algunas enfermedades parasitarias como la coccidiosis, fasciolosis o la hemoncosis (Fthenakis et al., 2015; Naeem et al., 2021), sin embargo, otras enfermedades parasitarias como la infección por metacestodos de *T. hydatigena*, que no presentan un cuadro clínico característico, no son consideradas comúnmente como causa de pérdida de la eficiencia productiva de los rebaños ovinos. En este estudio, se encontró que la infección con huevos de *T. hydatigena* y el desarrollo posterior de metacestodos fue subclínica, sin embargo, produjo una baja significativa de algunos parámetros productivos, asociado a alteraciones hepáticas en los corderos.

La ingestión de huevos de *T. hydatigena* eliminados por perros es la única forma de infección natural en los ovinos (Cordero del Campillo et al., 1999). En este estudio, se infectaron ovinos con huevos de una cepa de *T. hydatigena* que se ha mantenido por pasajes perros/ovinos. La tasa de infección en los corderos del grupo con dosis alta fue del 100%, sin embargo, la tasa de implantación fue baja, este efecto se ha observado en varias infecciones previas (datos no publicados) y probablemente es efecto de particularidades propias de la cepa. El número de metacestodos desarrollados en los corderos usados en este trabajo, está dentro del rango que se ha reportado en algunas infecciones naturales, por lo que podría ser representativo de estas infecciones (Garijo et al., 2005; Christodoulopoulos et al., 2008; Scala et al., 2015).

El MANOVA es una prueba que analiza más de una variable dependiente afectada por un factor (en este caso infección/no infección), algunas respuestas de estas variables por sí solas podrían no ser significativas, pero la interacción entre ellas puede ser aditiva en un efecto general y mostrar si existen diferencias más claras entre los grupos. En este estudio algunas variables dependientes relacionadas a la producción, como la condición corporal fue claramente mayor ($p < 0.001$) en los corderos del grupo testigo que en los corderos del grupo infectado con dosis altas de huevos de *T. hydatigena*, sin embargo, la diferencia entre los grupos fue moderada en la conversión alimenticia, consumo de alimento y ganancia de peso

($p < 0.1$). Analizando individualmente estos parámetros, las diferencias encontradas son suficientes para mostrar un efecto negativo de la infección de *T. hydatigena* sobre la producción en ovinos, sin embargo, cuando estas variables se agruparon en un MANOVA, el efecto negativo sobre la producción fue altamente significativo ($p < 0.0001$), no obstante lo anterior, no se observaron manifestaciones clínicas obvias en los corderos infectados.

Los corderos del grupo infectado con dosis alta presentaron una menor ($p < 0.001$) condición corporal, un menor ($p < 0.1$) rendimiento de la canal y apreciativamente una menor conformación de la canal que los corderos del grupo testigo. Estos indicadores en conjunto, tienen un impacto directo sobre el valor de los animales y en algún momento podrían influir negativamente en la selección para la compra de corderos vivos o de sus canales. Sin embargo, el peso final alcanzado por los corderos y los valores morfométricos de sus canales no mostraron diferencias ($p > 0.1$), lo que podría hacer que las diferencias sutiles encontradas en este estudio no sean notadas por los productores.

El daño producido por la presencia y migración de helmintos, comúnmente se ve reflejado en la modificación de algunos parámetros hematológicos y bioquímicos. La eosinofilia es comúnmente observada en infecciones por helmintos, incluyendo la infección por metacestodos (Huang and Appleton, 2016; Arias-Hernández et al., 2020; Muñoz-Guzmán et al., 2021). El aumento de eosinófilos y FA en sangre de los corderos infectados con dosis altas de huevos de *T. hydatigena* es claramente una consecuencia de la presencia y migración de las fases larvianas con un consecuente daño hepático. El aumento de FA sérica es un reflejo del daño hepático que tuvo una fuerte correlación negativa ($r = 0.63$, $p < 0.007$) con la condición corporal de los corderos, por lo que podemos suponer que la afectación de la productividad en los corderos infectados es consecuencia de la migración y daño producido por el parásito en el tejido hepático.

Se considera que el aumento de FA sérica es un indicador entre otras alteraciones hepáticas de daño u obstrucción de los conductos biliares (Pike et al., 2013), en la histopatología se observó infiltrado de células mononucleares y eosinófilos en el espacio porta, principalmente alrededor de vasos sanguíneos y ductos biliares, lo que probablemente indica que la migración de oncósferas desde la sangre al parénquima hepático produce inflamación y algún grado de obstrucción de la circulación biliar. Adicionalmente también se observaron zonas de necrosis coagulativa y fibrosis en el parénquima hepático, aunque

esto no se vio reflejado en un aumento de otras enzimas del perfil hepático como AST and GGT.

Muchos productores por no observar manifestaciones clínicas evidentes y no contar con las herramientas metodológicas para evaluar el impacto de la metacestodosis de *T. hydatigena* sobre la producción, consideran que este parásito es inocuo. Los resultados de este estudio, muestran una disminución en la eficiencia productiva, alteraciones de algunos valores hematológicos y bioquímicos, además de y un ligero deterioro en el aspecto general de los corderos infectados, factores que sólo pueden ser detectados en este tipo de estudios, pero que, aunque son imperceptibles para la mayoría de los productores repercuten en la productividad de los animales infectados.

Referencias

Alba-Hurtado, F. 2020. *Parasitología veterinaria*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Anteneh, W., Daniel, A., Yacob, H., 2011. A study on the prevalence, distribution and economic importance of *Cysticercus tenuicollis* in visceral organs of small ruminants slaughtered at an abattoir in Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 3, 67-74.

Arias-Hernández, D., García-Jiménez, S., Domínguez-Roldan, R., Murcia-Mejía, C., Báez-Saldaña, A., Hallal-Calleros, C., Flores-Pérez, I., 2020. Effects of *Taenia Pisiformis* infection and obesity on clinical parameters, organometry and fat distribution in male rabbits. *Pathogens*, 9, 861.

Christodouloupoulos, G., Theodoropoulos, G., Petrakos, G., 2008. Epidemiological survey of cestode-larva disease in Greek sheep flocks. *Vet. Parasitol.* 153, 368-373.

Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martínez Fernández A. R., Sánchez Acedo C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Diez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M. 1999. *Parasitología Veterinaria*, McGraw-Hill, Madrid, España, 1999.

Cruz, R., 2010. Manual de producción ovina. Publicación de ATTRA, Linda Coffey y Margo Hale, NCAT 2008, EEUU, 102, 1-22.

Cuenca-Verde, C., Jimarez-Vega, G., Prado-Ochoa, M.G., Iturbe-Requena, S.L., Buendía-Jiménez, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F., 2019. Evidencia de daño hepático producido por la infección experimental de corderos con *Taenia hydatigena*. *Memorias XI*

Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en pequeños Rumiantes y Camelidos Sudamericanos (ALEPRyCS), 471. <https://aleprycs.wixsite.com/aleprycs/memorias>

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

Deplazes P., Eckert, J., Mathis, A., Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2016. Parasitology in Veterinary Medicine. Wageningen Academic Publishers. Wageningen, Netherlands.

Edwards, G.T., Herbert, I.V., 1981. Some quantitative characters used in the identification of *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. multiceps* adult worms, and *T. multiceps* metacestodes. J. Helminthol. 55, 1-8.

Fthenakis, G.C., Mavrogianni, V.S., Gallidis, E., Papadopoulos, E., 2015. Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. Vet. Parasitol. 208, 56-66.

Garijo, M.M., Alonso, F.D., Martínez-Carrasco, C., Ruiz de Ibañez, M.R., 2005. Cestodosis larvarias en el ganado ovino de la región de Murcia (sureste de España). Rev. Iber. Parasitol. 65, 43-47.

Hohenhaus, M.A., Josey, M.J., Dobson, C., Outteridge, P.M., 1998. The eosinophil leucocyte, a phenotypic marker of resistance to nematode parasites, is associated with calm behaviour in sheep. Immunol. Cell Biol. 76, 153-158.

Huang, L., Appleton, J.A., 2016. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. Trends Parasitol. 32, 798-807.

Jahed Khaniki, G.R., Kia, E.B., Raei, M., 2013. Liver condemnation and economic losses due to parasitic infections in slaughtered animals in Iran. J. Parasit. Dis. 37, 240-244.

Luna, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces of pathology. Third edition. ED McGraw-Hill Inc. USA.

Malik, A., Singh, N., Satya, S., 2007. House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. J. Environ. Sci. Health. 42, 453-469.

Mohammed, A.A., Kadir, M.A., 2020. Estimation of some biochemical parameters and trace elements in sheep infested with *Taenia hydatigena* cysts in Sulaymaniyah province/Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. 34, 39-44.

Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Paredes, A., Cuenca-Verde, C., López-Arellano, M.E., Alba-Hurtado, F., 2021. *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate reduces the egg shedding of *Haemonchus contortus* associated with the overexpression of abomasal cytokines in lambs. Vet. Parasitol. 292, 109390.

Naeem, M., Iqbal, Z., Roohi, N. 2021. Ovine haemonchosis: a review. Trop. Anim. Health Prod. 53, 1-11.

NMX-FF-106-SCFI-2006. Productos pecuarios -carne de ovino en canal- clasificación <https://comecarne.org/normas-2/>.

Pike, A.F., Kramer, N.I., Blaauboer, B.J., Seinen, W., Brands, R., 2013. A novel hypothesis for an alkaline phosphatase 'rescue' mechanism in the hepatic acute phase immune response. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis. 1832, 2044-2056.

Ruiz, L., Jerónimo, R., Barrera Valle, M., Frias, M.T., 2007. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. Rev. Elec. Clín. Vet. 2, 1-22.

Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. J. Agric. Sci. 72, 451-454.

Scala, A., Pipia, A.P., Dore, F., Sanna, G., Tamponi, C., Marrosu, R., Bandino, E., Carmona, C., Boufana, B., Varcasia, A., 2015. Epidemiological updates and economic losses due to *Taenia hydatigena* in sheep from Sardinia, Italy. Parasitol. Res. 114, 3137-3143.

Whittington, R.J., Sergeant, E.S.G., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp para-tuberculosis in animal populations. Aust. Vet. J. 79, 267-278.

Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15, 129-144.

Estudio del establecimiento de *Taenia hydatigena* en perros y ovinos

Introducción

El hospedador definitivo de *Taenia hydatigena* son los perros y los principales hospedadores intermediarios son los rumiantes (Bowman, 2020; Desplazes et al., 2016; Taylor, 2016). Los perros se contaminan por ingerir metacestodos de *T. hydatigena* presentes en las serosas de vísceras y omentos de los hospedadores intermediarios. Los hospedadores intermediarios se infectan por ingerir huevos de *T. hydatigena* eliminados en la materia fecal de perros. En unidades de producción ovinas en pastoreo, la presencia de perros es frecuentemente indispensable y comúnmente podría encontrarse un ciclo doméstico de *T. hydatigena* entre los perros y los ovinos de la unidad.

La mayoría de los estudios en perros es sobre la frecuencia de gusanos adultos en intestino delgado (Díaz-Castrellon, 1997; Trasviña-Muñoz, 2015). Los estudios sobre infecciones experimentales en perros son pocos e incompletos (Featherston, 1969; Coman and Rickard, 1975; Gemmell et al., 1987). Recientemente, Kanchev (2015) infectó un perro con 5 metacestodos y otro con 14 metacestodos de *T. hydatigena* y observó diferencias en los periodos de prepatencia y en el número de cestodos adultos obtenidos de cada perro.

En ovinos, la información disponible es similar, la mayoría de los reportes es sobre la frecuencia de metacestodos de *T. hydatigena* observada en vísceras de ovinos sacrificados en rastros (Scala et al, 2015; Christodoulopoulos et al, 2008; Mosaab, 2016; Antenenh et al, 2013; Garijo et al, 2005; Almeida et al, 2017) y existen pocos estudios experimentales recientes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de infección y el porcentaje de establecimiento de *T. hydatigena* en hospedadores definitivos (perros) y hospedadores intermediarios (ovinos), así como caracterizar una cepa de origen mexicano. Este estudio está en proceso y necesita ser completado.

Materiales y métodos

Animales

Perros

Se utilizaron 10 perros criollos machos, con una edad promedio de tres meses, procedentes de camadas obtenidas por donativos voluntarios. Al momento de ser introducidos a las instalaciones (corrales de posgrado de la FES-Cuautitlán), todos los perros fueron desparasitado con 15 mg/kg de pamoato de pirantel y 15 mg/kg de oxantel e inmunizados con dos dosis de una vacuna comercial séxtuple (Canigen[®] Puppy Extra). Antes de iniciar la fase experimental se verifico por pruebas coproparasitoscópicas de Faust (Alba-Hurtado, 2020) que los perros estuvieran libres de parásitos intestinales. Los perros fueron albergados en jaulas de 3 x 3.2 metros con piso de cemento, en las cuales mantenían contacto visual entre grupos. La alimentación consistió en alimento comercial (Hi Dog Cachorro con 25% de proteína cruda) y se ofreció diariamente a razón del 4% del peso vivo, el agua se suministró a libre acceso por medio de bebederos automáticos de nivel constante. Además, durante el experimento se colocaron juguetes dentro de las jaulas como enriquecimiento ambiental.

Ovinos

Se utilizaron 9 corderos machos de la raza Columbia de aproximadamente seis meses de edad y con un promedio de 30 kg de peso. Todos los corderos se mantuvieron en corraletas con piso de concreto (3.5 X 3.5 metros) en los corrales de posgrado de la FES-Cuautitlán. El alimento se ofreció en comederos metálicos y consistió en una mezcla con 50% de concentrado comercial para borregos de engorda intensiva “San Mateo” (15% proteína cruda, humedad máxima 10%, grasa 3%, ceniza 5%, fibra cruda 10% y extracto libre de nitrógeno 57%) y 50% de alfalfa achicalada molida. El agua se ofreció ad libitum en bebederos automáticos de pivote.

Parásitos

Metacestodos

Se colectaron metacestodos de *T. hydatigena* de ovinos sacrificados en rastros ubicados en Cuautitlán y Tlalnepantla edo. México, inmediatamente después de la colecta

los metacestodos fueron transportados en refrigeración al laboratorio donde se verifico su integridad y viabilidad antes de ser suministrados a los animales experimentales.

Huevos de *T. hydatigena*

Los huevos de *T. hydatigena* fueron obtenidos a partir del último proglótido grávido de un gusano adulto recuperado del intestino delgado de uno de los perros utilizados en el experimento realizado para verificar el desarrollo de gusanos adultos. Para obtener los huevos, el proglótido se enjuago con PBS pH 7.4 y se mantuvo en PBS pH 7.4 en una caja Petri durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se contó el número de huevos en el sobrenadante y se estandarizo para tener 50 huevos en 5 mL.

Microscopía electrónica de barrido

Algunos segmentos del extremo anterior de gusanos adultos colectados se lavaron con agua destilada y se fijaron en líquido de Karnovsky durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron en agua destilada durante 30 min para eliminar residuos del fijador y deshidrataron gradualmente en alcohol etílico del 10 al 100%. Las muestras se secaron a punto crítico, se montaron en aluminio porta muestras con adhesivo de carbono de doble cara y se les realizó un ionizado con oro. Las micrografías se obtuvieron a alta condiciones de vacío utilizando un escáner analítico de un microscopio electrónico JEOL JSM-6010LA. Este proceso se realizó en el área de microscopia electrónica de la UIM FES-Cuautitlán.

Diseño experimental

Infección en perros

Los 10 perros recibieron oralmente diferentes cantidades de metacestodos de *T. hydatigena*. Un perro recibió 1 metacestodo, otro recibió tres metacestodos, cinco perros recibieron 6 metacestodos y tres perros recibieron 12 metacestodos. En todos los perros, semanalmente se verifico por pruebas coproparasitológicas de Faust la presencia de huevos en heces y en forma macroscópica la presencia de proglótidos grávidos.

Los perros fueron eutanasiados en forma humanitaria un mes después de detectarse huevos o proglótidos grávidos en heces (periodo de prepatencia). Inmediatamente después de la eutanasia de cada perro, se disecciono el intestino delgado y se realizó cuidadosamente

un corte longitudinal a lo largo de este órgano para exponer la mucosa y así observar *in situ* la ubicación de los adultos de *T. hydatigena*, los cestodos presentes se separaron de la mucosa intestinal y se lavaron con PBS pH 7.4, se midieron, se verificaron las características morfológicas del escólex por microscopia óptica y algunos se procesaron para microscopia electrónica. Se contó el número de ramificaciones uterinas de los proglótidos grávidos.

Se calculó el porcentaje de infección (No. perros con fases adultas o proglótidos eliminados en heces / total de perros inoculados x 100) y el porcentaje de establecimiento de cestodos intestinales (No. de fases adultas recuperadas / No. total de metacestodos administrados x 100).

Infección en ovinos

Se inocularon 9 corderos con 50 huevos de *T. hydatigena* por sondeo buco ruminal. Tres fueron eutanasiados el día 30 PI, tres corderos fueron eutanasiados el día 60 y los restantes tres fueron eutanasiados el día 90 PI. Se inspecciono cuidadosamente la cavidad abdominal y torácica, en busca de metacestodos. Se registró la localización, midieron y pesaron los metacestodos encontrados. Se calculó el porcentaje de infección (No. de corderos con metacestodos/total de corderos x 100) y el porcentaje de establecimiento (No. de metacestodos recuperados/No. total de metacestodos administrados x 100).

Resultados del experimento 3

El número de metacestodos administrado a cada perro, el periodo de prepatencia, número de gusanos adultos recuperados, promedio de tamaño de cestodos recuperados y el porcentaje de establecimiento en cada perro se presenta en el cuadro 1. El porcentaje de infección fue del 100% y el porcentaje de establecimiento de cestodos intestinales, en los perros fue del 94%. La morfología de los gusanos adultos colectados en todos los casos, es semejante a los descritos para *T. hydatigena* por Edwards and Herbert (1981) su ubicación *in situ* se muestra en la figura 1a, la morfología de proglótidos maduros por microscopia óptica se muestra en la figura 1b y la morfología del escólex de dos adultos procesados para su observación por microscopia de barrido se presentan en las figura 2a y b.

El número de huevos administrados a cada cordero, el número de metacestodos recuperado de cada cordero y la localización de estos (Figura 3 a y b), se presentan en el cuadro 2. El porcentaje de infección fue del 44.4% y el porcentaje de establecimiento del 2%.

METACESTODOS INGERIDOS	PREPATENCIA (días)	No. CESTODOS RECUPERADOS	PROMEDIO DE TAMAÑO DE CESTODOS (cm)	PORCENTAJE DE ESTABLECIMIENTO EN CADA PERRO
1	55	1	177.5	100
3	53	3	145 ± 13	100
6	79	----	----	0
6	59	----	----	0
6	55	6	NO SE MIDIERON	100
6	52	5	5.6 ± 1.6	83
6	64	6	173.3	100
12	88	10	138 ± 37	83
12	67	11	117 ± 14	92
12	66	12	137 ± 17	100

Cuadro 1.- Infección experimental en perros con metacestodos de *Taenia hydatigena*.

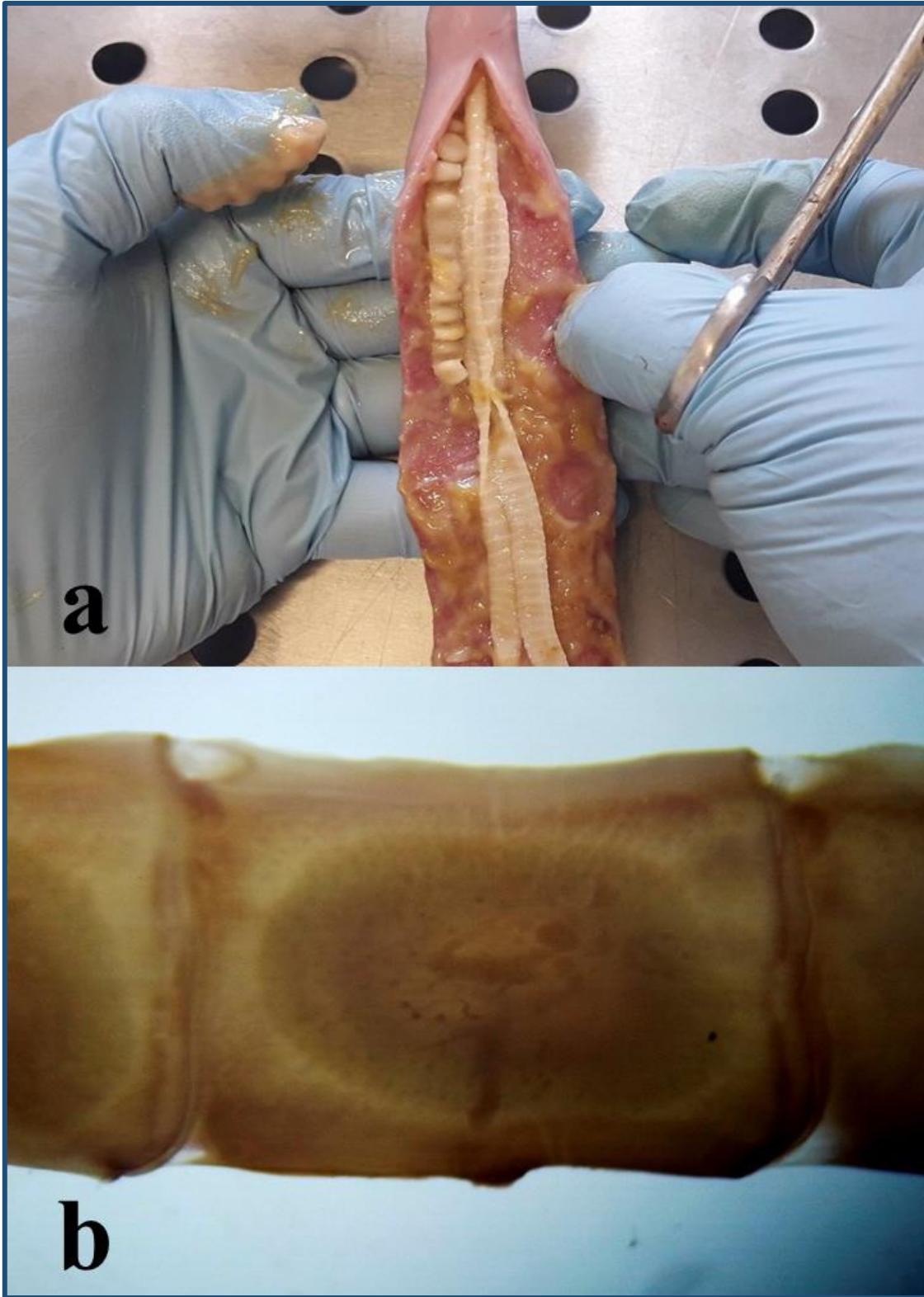


Figura 1.- a) Adultos de *Taenia hydatigena* en el intestino de perro y b) Detalle de proglótido maduro de *Taenia hydatigena*.

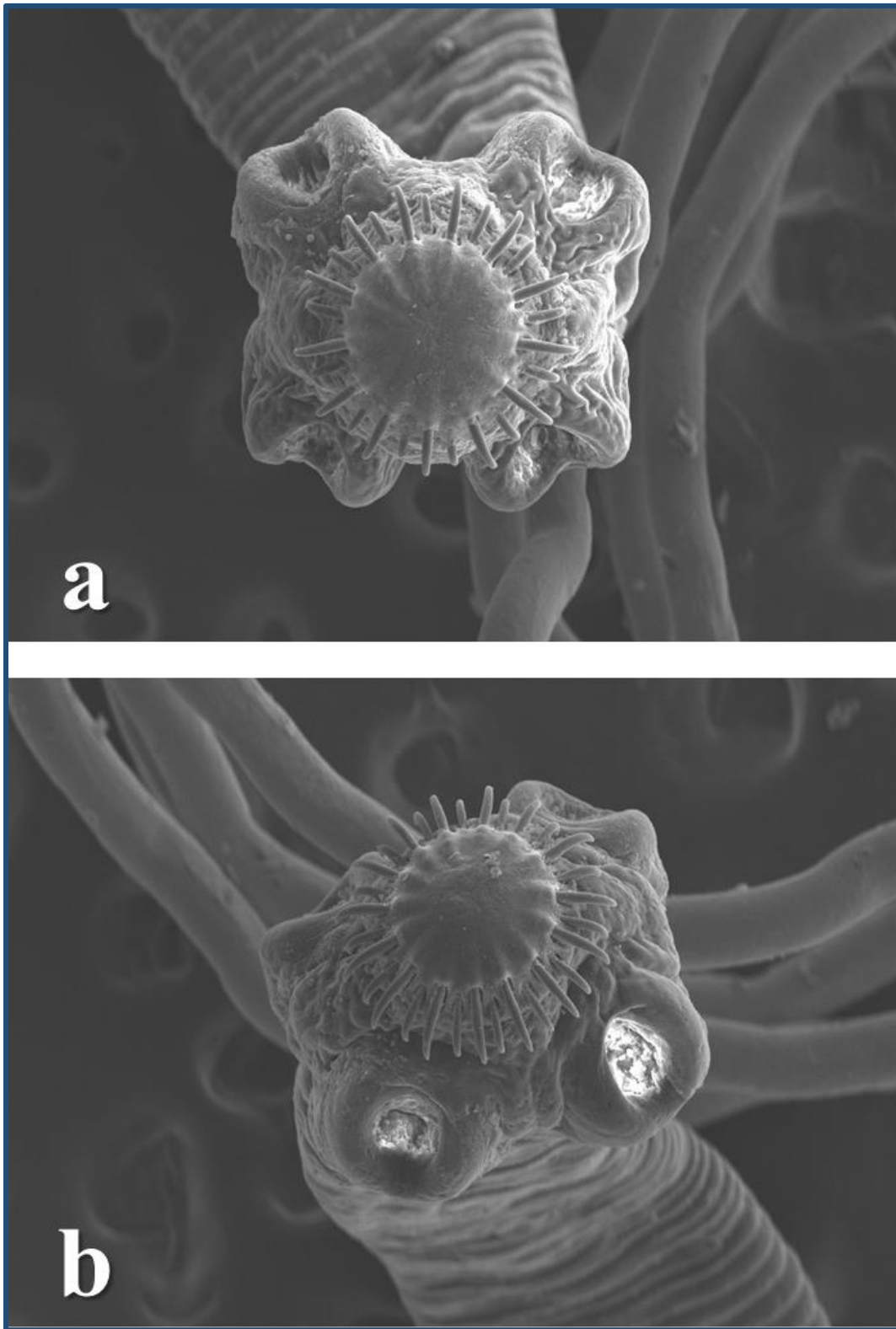


Figura 2.- Fotomicrografía electrónica de barrido a y b escólex de adultos de *Taenia hydatigena*.

Ovino	Grupo	Día de sacrificio	Metacestodos recuperados	Localización de metacestodos
1	1	30	0	-----
2	1	30	3	Región perirrenal, hígado y libre en cavidad abdominal
3	1	30	3	Omento mayor (2) y omento menor
4	2	60	0	-----
5	2	60	0	-----
6	2	60	0	-----
7	3	90	0	-----
8	3	90	1	Omento mayor
9	3	90	2	Omento menor (2)

Cuadro 2.- Ovinos infectados oralmente con 50 huevos de *Taenia hydatigena*.

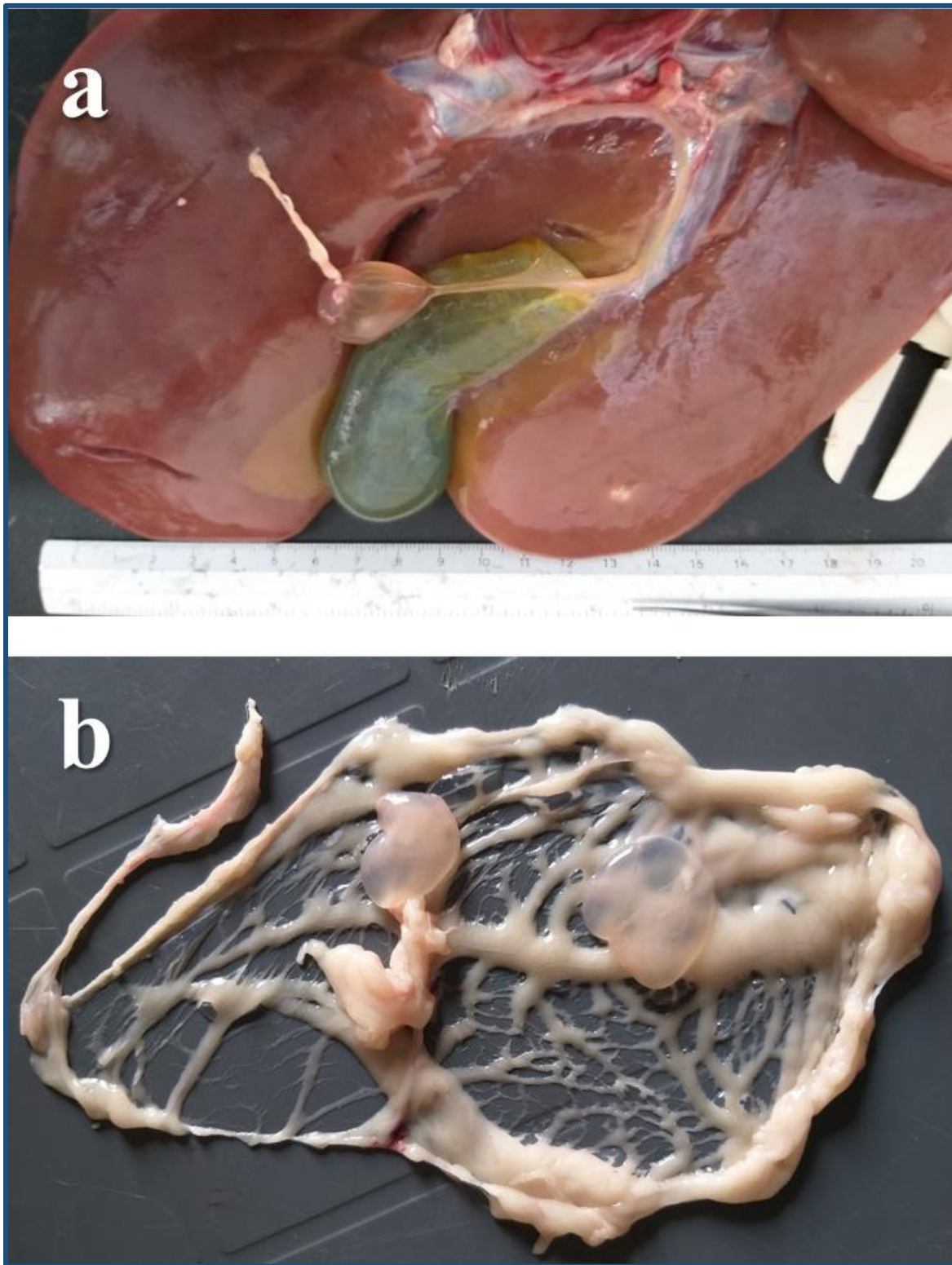


Figura 3.- a) Metacestodo de *Taenia hydatigena* en hígado de ovino. b) Metacestodos de *Taenia hydatigena* en omento menor de ovino.

Discusión

El ciclo biológico de *T. hydatigena* es conocido, sin embargo, muchos aspectos son el resultado de extrapolación de observaciones realizadas en otros gusanos de género *Taenia*. La morfología del escólex, proglótidos y tegumento están claramente descritos y permite diferenciarlos de otros gusanos (Featherston, 1969; Edwards and Herbert, 1981). Algunos parámetros como el porcentaje de infección y el porcentaje de establecimiento tanto en el hospedador definitivo como en el hospedador intermediario han sido poco estudiados. Aunque este trabajo sigue en proceso cuando se escribió esta tesis, nuestros resultados al momento muestran algunos datos específicos del ciclo de infección en los hospedadores de *T. hydatigena*.

Todos los perros infectados mostraron evidencia de infección en materia fecal (huevos o proglótidos, sin embargo, al momento del sacrificio solamente ocho presentaron gusanos adultos en el intestino. Esto indica que, aunque se estableció la infección en todos los perros, hubo una eliminación espontánea de las fases adultas intestinales en un periodo relativamente corto (menos de un mes), posiblemente debido a mecanismos inmunomediados. Se observaron en este período, que los perros que no presentaron gusanos adultos y el perro que tenía algunos adultos anormalmente pequeños (5.6 ± 1.6 cm) eliminaron grandes segmentos de proglótidos, sin embargo, los datos específicos no fueron registrados.

Kanchev (2015), reportó periodos de prepatencia de 47 y 69 días en dos perros infectados con 5 y 14 metacestodos de *T. hydatigena* respectivamente, sin embargo, por tratarse de observaciones individuales, estos datos carecen de sustento estadístico. En el presente estudio, el periodo de prepatencia varió entre los 53 a los 88 días.

Si no consideramos los perros sin gusanos adultos o en los que solamente se observaron escólex y cuello, el tamaño promedio de los gusanos adultos fue de 147.8 ± 8.6 cm (43 gusanos). Se observó numéricamente un mayor tamaño de los cestodos recuperados en el intestino de un perro inoculado con tres metacestodos en comparación a los recuperados de tres perros infectados con 12 metacestodos, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas en el tamaño de los gusanos adultos asociadas a la carga parasitaria en los perros

($p > 0.05$), por lo que aparentemente el tamaño de los cestodos no fue afectado en función a un microambiente de mayor competencia.

En ningún perro infectado, aun en aquellos con mayores cargas de gusanos adultos (10, 11 y 12 respectivamente) se observaron alteraciones en el comportamiento o estado de salud evidentes, lo que parece indicar una baja virulencia asociada a la presencia de cestodos adultos en el intestino de su hospedero definitivo. Otros autores han realizado observaciones similares tanto para *T. hydatigena* como para *T. solium* y *T. saginata*, aunque en estos parásitos, la carga parasitaria siempre es más baja (uno o dos) en comparación a *T. hydatigena* (Cordero et al., 1999; Kanchev, 2015; Desplazes et al., 2016).

En los hospedadores intermediarios (ovinos) el porcentaje de infección (44.4%) es mucho menor que en los hospedadores definitivos (perros) y el porcentaje de establecimiento (2%) todavía es menor. El porcentaje de infección es muy bajo, este efecto lo hemos observado en varias infecciones previas (borregos infectados del experimento 2) y probablemente es efecto de particularidades propias de la cepa que usamos o que estos huevos necesiten algún tipo de maduración. El número de metacestodos desarrollados en los corderos usados en este trabajo, está dentro del rango que se ha reportado en algunas infecciones naturales, por lo que podría ser representativo de estas infecciones (Silverman, 1954, Garijo et al., 2005; Christodoulopoulos et al., 2008; Scala et al., 2015).

Actualmente se trabaja con la administración de diferentes cantidades de huevos a corderos y con la activación de oncosferas. Los resultados de estos estudios nos permitirán completar este estudio.

Referencias

- Alba-Hurtado, F. 2020. *Parasitología veterinaria*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Almeida-Secaira, R. I., Núñez-Torres, O. P., Cuadrado-Guevara, C. A., & Vargas-Secaira, C. J. 2017. Índices de *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena* cysts) en cavidad abdominal de ovinos faenados en el camales frigoríficos municipales. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(2), 104-115.
- Anteneh, W., Daniel, A., & Yacob, H. 2011. A study on the prevalence, distribution and economic importance of *Cysticercus tenuicollis* in visceral organs of small ruminants

slaughtered at an abattoir in Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 3(5), 67-74.

Bowman, D. D. (2020). *Georgis' Parasitology for Veterinarians E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Coman, B. J., & Rickard, M. D. 1975. The location of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis* and *Taenia hydatigena* in the gut of the dog and its effect on net environmental contamination with ova. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 47(4), 237-248.

Cordero Del Campillo, M., Rojo Vázquez, F. A., Martínez Fernández, A. R., Sánchez Acedo, M. C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, I., Diez Baños, P., Quiroz Romero, H. & Carvalho Varela, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU.

Christodouloupoulos, G., Theodoropoulos, G., & Petrakos, G. 2008. Epidemiological survey of cestode-larva disease in Greek sheep flocks. *Veterinary parasitology*, 153(3-4), 368-373.

Deplazes, P., Eckert, J., Mathis, A., Samson-Himmelstjerna, G. V., & Zahner H. 2016. *Parasitology in veterinary medicine*. Wageningen Academic Publishers.

Diaz Castellon Rafael. 1996. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en perros adultos en la zona metropolitana de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.

Edwards, G. T., & Herbert, I. V. 1981. Some quantitative characters used in the identification of *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. multiceps* adult worms, and *T. multiceps* metacestodes. *Journal of Helminthology*, 55(1), 1-8.

Featherston, D. W. 1969. *Taenia hydatigena*: I. Growth and development of adult stage in the dog. *Experimental parasitology*, 25, 329-338.

Garijo, M. M.; Alonso, F. D.; Martínez-Carrasco, C.; Ruiz de Ibañez, M. R. 2005. Cestodosis larvarias en el ganado ovino de la región de Murcia (sureste de España). Murcia, España. *Revista Ibérica de Parasitología*. Vol. 65. (1-4): 43-47.

Gemmell, M. A., Lawson, J. R., & Roberts, M. G. 1987. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 94(1), 161-180.

Kanchev, K. 2015. On *Taenia hydatigena* (pallas, 1766) biological characteristics, important for the tenuicol cysticercosis epizootology. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21,1080-1085.

Mosaab, A. E. O., Elmajdoub, L. O., Al-Aboody, M. S., Elsify, A. M., Elkhtam, A. O., & Hussien, A. A. 2016. Molecular characterization of *Cysticercus tenuicollis* of slaughtered

livestock in Upper Egypt governorates. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 6(8), 706-708.

Scala, A., Pipia, A. P., Dore F., Sanna, G., Tamponi, C., Marrosu, R., Bandino, E., Carmona, C., Boufana, B., & Varcasia, A. 2015. Epidemiological updates and economic losses due to *Taenia hydatigena* in sheep from Sardinia, Italy. *Parasitology Research*, 114(8), 3137-3143.

Silverman, P. H. 1954 Studies on the Biology of Some Tapeworms of the Genus *Teania*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 48:4. 356-366.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall R.L. 2016. *Veterinary parasitology* Fourth edition Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.

Trasviña-Muñoz, E., López-Valencia, G., Monge-Navarro, F. J., Herrera-Ramírez, J. C., Haro, P., Gómez-Gómez, S. D., Mercado Rodríguez J. A., Flores-Dueñas C. A., Cueto-Gonzalez S. A., & Burquez-Escobedo, M. 2020. Detection of intestinal parasites in stray dogs from a farming and cattle region of northwestern Mexico. *Pathogens*, 9(7), 516.

DISCUSIÓN GENERAL

El género *Taenia* sp. incluye un grupo de cestodos que guardan muchas similitudes entre sí. Las especies que afectan a humanos (*T. solium* y *T. saginata*) han sido las más ampliamente estudiadas y muchos de estos estudios se ha extrapolado a otras especies de este género (Sarti et al., 1992; Pawlowski, 2002; Dorny y Praet, 2007). Sin embargo, aunque en muchos aspectos estas extrapolaciones son válidas, hay particularidades dentro de cada especie que la hace diferentes. Esta tesis, incluye una serie de trabajos de una línea de investigación sobre aspectos particulares de *T. hydatigena* y su relación con sus hospedadores, en la que he trabajado por más de 10 años. Esta tesis está formada por tres trabajos experimentales escritos en forma de artículos, por lo que cada trabajo presenta su discusión particular.

Se ha demostrado que algunos cestodos modulan la respuesta inmune del huésped para generar un ambiente más favorable para su establecimiento y/o mantenimiento (Larralde et al., 1995). Esto podría modificar los microambientes del huésped para el establecimiento de otros parásitos. En estudios previos, hemos demostrado que la administración de CVMTh reduce la implantación de gusanos *H. contortus* adultos en el abomaso de los corderos, lo que se asoció con cambios en algunos tipos de células y la expresión de algunas citocinas en el abomaso (Cuenca-Verde et al., 2011; Buendía-Jiménez et al., 2015; Muñoz-Guzmán et al., 2021). Por lo anterior, se propuso que CVMTh podría ser un potenciador de la respuesta a través de la modulación de la respuesta inmunitaria. En el trabajo experimenta 1, observamos que la administración de dos dosis de CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa antes de la inmunización con OVA indujo una producción de IgG anti-OVA mucho mayor que la inmunización con una sola dosis de OVA en ratas. Estos resultados muestran claramente el efecto potenciador del CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa para la producción de anticuerpos y su probable efecto adyuvante.

Se ha demostrado que la OVA es un potente alérgeno (Adamko et al., 1999; Saldanha et al., 2004). La administración por vía aérea o sistémica induce un aumento de eosinófilos en sangre y pulmones, por lo que ha sido ampliamente utilizado en modelos experimentales de asma (Hogan et al., 2003; Kumar et al., 2008). En este primer estudio, observamos que la

administración de OVA por vía intraperitoneal indujo un fuerte aumento de ES que se correlacionó significativamente con un aumento de IL-5 en sangre; sin embargo, la administración previa de CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa inhibió ambos aumentos, lo que indica claramente que ambas fracciones tienen efectos reguladores a la baja en algunos elementos de la respuesta inmune. El aumento de la producción de anticuerpos anti-OVA específicos, al mismo tiempo que la inhibición de la eosinofilia y la IL-5 en sangre, en ratas previamente tratadas con CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa, no es consistente con una respuesta clásica de Th2 observada en otros modelos parasitarios.

En este estudio observamos que la administración de CVMTh 30-100 kDa previa a la administración de OVA aumentó el porcentaje de linfocitos CD4 y CD8 en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos. Este hallazgo indica que las moléculas de esta fracción inducen una amplia activación de los linfocitos T. La administración de CVMTh 30-100 kDa antes de la administración de OVA aumentó la proporción de linfocitos B, lo que se correlacionó significativamente con una mayor producción de IgG anti-OVA.

Los resultados del primer trabajo experimental muestran que CVMTh total y CVMTh 30-100 kDa modifican la respuesta inmune de las ratas de formas diferenciadas. Ambas fracciones inhibieron la eosinofilia y la producción de IL-5 producida por la administración de OVA en ratas. El CVMTh 30-100 kDa activó fuertemente la producción de anticuerpos anti-OVA específicos y la proliferación de linfocitos T y B. El CVMTh total aumentó moderadamente los anticuerpos anti-OVA específicos y la activación de una respuesta Th17. Aunque se requieren más estudios para confirmar nuestras observaciones, los resultados sugieren que ambas fracciones de CVMTh tienen potencial para modificar la respuesta inmune de sus hospedadores, incluso para usarse como adyuvantes.

Se ha reconocido el impacto negativo en la producción ovina que tienen algunas enfermedades parasitarias como la coccidiosis, fasciolosis o la haemonchosis (Fthenakis et al., 2015; Naeem et al., 2021), sin embargo, otras enfermedades parasitarias como la infección por metacestodos de *T. hydatigena*, que no presentan un cuadro clínico característico, no son consideradas comúnmente como causa de pérdida de la eficiencia productiva de los rebaños ovinos. En el segundo trabajo experimental, nosotros observamos que algunas variables dependientes relacionadas a la producción, como la condición corporal fue claramente mayor ($p < 0.001$) en los corderos del grupo testigo que en los corderos del

grupo infectado con dosis altas de huevos de *T. hydatigena*, sin embargo, la diferencia entre los grupos fue moderada en la conversión alimenticia, consumo de alimento y ganancia de peso ($p < 0.1$). Analizando individualmente estos parámetros, las diferencias encontradas son suficientes para mostrar un efecto negativo de la infección de *T. hydatigena* sobre la producción en ovinos, sin embargo, cuando estas variables se agruparon en un MANOVA, el efecto negativo sobre la producción fue altamente significativo ($p < 0.0001$), no obstante lo anterior, nosotros no observamos manifestaciones clínicas obvias en los corderos infectados.

Los corderos del grupo infectado con dosis alta presentaron una menor ($p < 0.001$) condición corporal, un menor ($p < 0.1$) rendimiento de la canal y apreciativamente una menor conformación de la canal que los corderos del grupo testigo. Estos indicadores en conjunto, tienen un impacto directo sobre el valor de los animales y en algún momento podrían influir negativamente en la selección para la compra de corderos vivos o de sus canales.

Muchos productores por no observar manifestaciones clínicas evidentes y no contar con las herramientas metodológicas para evaluar el impacto de la metacestodosis de *T. hydatigena* sobre la producción, consideran que este parásito es inocuo. Los resultados de este estudio, muestran una disminución en la eficiencia productiva, alteraciones de algunos valores hematológicos y bioquímicos, además de un ligero deterioro en el aspecto general de los corderos infectados, factores que sólo pueden ser detectados en este tipo de estudios, pero que, aunque son imperceptibles para la mayoría de los productores repercuten en la productividad de los animales infectados.

El tercer trabajo experimental está en proceso en el momento en el que se escribió esta tesis, por lo que los datos con los que contamos son preliminares, sin embargo, nuestros resultados al momento muestran algunos datos específicos del ciclo de infección en los hospedadores de *Taenia hydatigena*. Todos los perros infectados mostraron evidencia de infección en materia fecal (huevos o proglótidos), sin embargo, al momento del sacrificio solamente ocho presentaron gusanos adultos en el intestino. Esto indica que, aunque se estableció la infección en todos los perros, hubo una eliminación espontánea de las fases adultas intestinales en un periodo relativamente corto (menos de un mes), posiblemente debido a mecanismos inmunomediados. En perros, el periodo de prepatencia varió entre los 53 a los 88 días, el tamaño promedio de los gusanos adultos fue de 147.8 ± 8.6 cm (43 gusanos) y no fue afectado en relación al número de gusanos presentes en el intestino. En

ningún perro infectado, aun en aquellos con mayores cargas de gusanos adultos (10, 11 y 12 respectivamente) se observaron alteraciones en el comportamiento o estado de salud evidentes, lo que parece indicar una baja virulencia asociada a la presencia de cestodos adultos en el intestino de su hospedero definitivo.

En los hospedadores intermediarios (ovinos) el porcentaje de infección (44.4%) es mucho menor que en los hospedadores definitivos (perros) y el porcentaje de establecimiento (2%) todavía es menor. El porcentaje de infección es muy bajo, este efecto lo hemos observado en varias infecciones previas (borregos infectados del experimento 2) y probablemente es efecto de particularidades propias de la cepa que usamos o que estos huevos necesiten algún tipo de maduración. El número de metacestodos desarrollados en los corderos utilizados en este trabajo, está dentro del rango que se ha reportado en algunas infecciones naturales, por lo que podría ser representativo de estas infecciones (Silverman, 1954, Garijo et al., 2005; Christodouloupoulos et al., 2008; Scala et al., 2015). Actualmente trabajamos con la administración de diferentes cantidades de huevos a corderos y con la activación de oncosferas. Los resultados de estos estudios nos permitirán completar este estudio.

Los trabajos anteriores muestran que la relación de *T. hydatigena* con sus hospedadores es más compleja de lo que se había pensado. Los metacestodos contienen moléculas capaces de modificar la respuesta inmune de sus hospedadores, ¿cómo utilizan estas moléculas dentro del hospedador?, ¿qué función que tienen estas moléculas en el establecimiento y mantenimiento de la infección? y su posible uso como adyuvantes, deben ser esclarecidas en futuros estudios. Además, se demostró que la metacestodosis por *T. hydatigena* afecta la productividad de los ovinos y aunque no produce manifestaciones clínicas evidentes y puede pasar desapercibida, tiene un impacto negativo sobre la productividad y la economía de las unidades productivas donde se presenta.

CONCLUSIONES GENERALES

En el CVMTh total se detectaron 13 bandas proteicas (145, 104, 78, 68, 58, 52, 40, 36, 26, 20, 11, 8 y 7 kDa), en el CVMTh>100kDa 3 bandas (143, 78 y 68 kDa), CVMTh 30-100 kDa 3 bandas (105, 68 y 51) y en el CVMTh 10-30 kDa 4 bandas (17, 11, 9 y 8 kDa).

La administración intraperitoneal de un CVMTh 30-100 kDa previo a la administración de OVA en ratas, aumento fuertemente la producción de anticuerpos anti-OVA específicos y la proliferación de linfocitos T y B en ratas.

La administración intraperitoneal de un CVMTh total previo a la administración de OVA en ratas, aumentó moderadamente la producción los anticuerpos anti-OVA específicos y la activación de una respuesta Th17.

La administración intraperitoneal de un CVMTh total o de un CVMTh 30-100 kDa, inhibieron la eosinofilia y la producción de IL-5 producida por la administración de OVA en ratas.

La infección experimental con *T. hydatigena* en ovinos aumenta el consumo de alimento y la conversión alimenticia final al mismo tiempo que, disminuye la ganancia de peso, condición corporal, rendimiento y calidad de la canal al sacrificio.

La infección experimental con *T. hydatigena* en ovinos, aumento los ES y la concentración sérica de FA, pero no afecto el hematocrito.

La infección experimental con *T. hydatigena* en ovinos, no produjo manifestaciones clínicas evidentes, pero afecto negativamente diferentes parámetros productivos

REFERENCIAS

Adamko, D. J., Yost, B. L., Gleich, G. J., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. 1999. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection: eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M2 muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *The J. of exp. Med.* 190(10), 1465-1478.

Alba-Hurtado, F. 2020. *Parasitología veterinaria*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Andrews, A. H. 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 110(2-3), 93-95.

Bangoura, B., & Bardsley, K. D. 2020. Ruminant coccidiosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36(1), 187-203.

Bowman, D. D. 2020. *Georgis' Parasitology for Veterinarians E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Braae, U. C., Kabululu, M., Nørmark, M. E., Nejsum, P., Ngowi, H. A., & Johansen, M. V. 2015. *Taenia hydatigena* cysticercosis in slaughtered pigs, goats, and sheep in Tanzania. *Tropical animal health and production*, 47(8), 1523-1530.

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.

Cabrera, P. A., Parietti, S., Haran, G., Benavidez, U., Lloyd, S., Perera, P., Valledor S., Gemmell M. A. & Botto, T. 1996. Rates of reinfection with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* and other cestodes in a rural dog population in Uruguay. *International journal for parasitology*, 26(1), 79-83.

Christodouloupoulos, G., Theodoropoulos, G., & Petrakos, G. 2008. Epidemiological survey of cestode-larva disease in Greek sheep flocks. *Veterinary parasitology*, 153(3-4), 368-373.

Coman, B. J., & Rickard, M. D. 1975. The location of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis* and *Taenia hydatigena* in the gut of the dog and its effect on net environmental contamination with ova. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 47(4), 237-248.

Cordero Del Campillo, M., Rojo Vázquez, F. A., Martínez Fernández, A. R., Sánchez Acedo, M. C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, I., Diez Baños, P., Quiroz Romero, H. & Carvalho Varela, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU.

Cuenca-Verde, C., Jimarez-Vega, G., Prado-Ochoa, M.G., Iturbe-Requena, S.L., Buendía-Jiménez, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F., 2019. Evidencia de daño hepático producido por la infección experimental de corderos con *Taenia hydatigena*. Memorias XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en pequeños Rumiantes y Camelidos Sudamericanos (ALEPRyCS), 471. <https://aleprycs.wixsite.com/aleprycs/memorias>

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

Deplazes, P., Gottstein, B., Stingelin, Y., & Eckert, J. 1990. Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens by ELISA in dogs. *Veterinary parasitology*, 36(1-2), 91-103.

Deplazes, P., Eckert, J., Mathis, A., Samson-Himmelstjerna, G. V., & Zahner, H. 2016. *Parasitology in veterinary medicine*. Wageningen Academic Publishers.

Diáz Castellon Rafael. 1996. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en perros adultos en la zona metropolitana de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.

Dorny, P., & Praet, N. 2007. *Taenia saginata* in Europe. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 22-24.

Edwards, G. T., Hackett F. & Herbert, I. V. 1979. *Taenia hydatigena* and *Taenia multiceps* infections in Snowdonia, U.K. I. Farm dogs as definitive hosts. *Br. vet.* 135,426.

Edwards, G. T., & Herbert, I. V. 1981. Some quantitative characters used in the identification of *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. multiceps* adult worms, and *T. multiceps* metacestodes. *Journal of Helminthology*, 55(1), 1-8.

Eguia-Aguilar, P., Cruz-Reyes, A., & Martinez-Maya, J. J. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Veterinary parasitology*, 127(2), 139-146.

Featherston, D. W. 1969. *Taenia hydatigena*: I. Growth and development of adult stage in the dog. *Experimental parasitology*, 25, 329-338.

Fthenakis, G.C., Mavrogianni, V.S., Gallidis, E., Papadopoulos, E., 2015. Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. *Vet. Parasitol.* 208, 56-66.

Garijo, M.M., Alonso, F.D., Martínez-Carrasco, C., Ruiz de Ibañez, M.R., 2005. Cestodosis larvarias en el ganado ovino de la región de Murcia (sureste de España). *Rev. Iber. Parasitol.* 65, 43-47.

Gemmell, M. A., Lawson, J. R., & Roberts, M. G. 1987. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 94(1), 161-180.

González Mendoza, C. J. M. 1976. Incidencia de *Cysticercus ovis* y *Cysticercus tenuicollis*, en ovinos y caprinos sacrificados en el rastro municipal de Ciudad Netzahualcoyotl. “tesis de licenciatura”. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hogan, M.B., Weissman, D.N., Hubbs, A.F., Gibson, L.F., Piktel, D., Landreth, K.S., 2003. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 171, 2644-2651

Kumar, R.K., Herbert, C., Foster, P.S., 2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets.* 9, 485-494.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575-580.

Mehmood, K., Zhang, H., Sabir, A. J., Abbas, R. Z., Ijaz, M., Durrani, A. Z., Sallem, M. H., Rehman, M. U., Iqbal, M. K., Wang, Y., Ahmad, H. I., Abbas, T., Hussain, R., Ghorri, M. T., Ali, S., Khan, A. U., & Li, J. 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis*, 109, 253-262.

Miran, M. B., Kasuku, A. A., & Swai, E. S. 2017. Prevalence of echinococcosis and *Taenia hydatigena* cysticercosis in slaughtered small ruminants at the livestock-wildlife interface areas of Ngorongoro, Tanzania. *Veterinary world*, 10(4), 411.

Moudgil, A. D., Nehra, A. K., Vohra, S., Thakur, S. D., & Sharma, D. 2022. Prevalence and phylogeography of *Taenia hydatigena* metacestodes from goats of India. *Parasitology*, 1-21.

Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Paredes, A., Cuenca-Verde, C., López-Arellano, M.E., Alba-Hurtado, F., 2021. *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate reduces the egg shedding of *Haemonchus contortus* associated with the overexpression of abomasal cytokines in lambs. *Vet. Parasitol.* 292, 109390.

Naeem, M., Iqbal, Z., Roohi, N. 2021. Ovine haemonchosis: a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 53, 1-11.

Ng-Nguyen, D., Van Nguyen, T., Van Nguyen, T., Nguyen, H. Q., & Nguyen, V. A. T. 2021. Prevalence and risk factors of *Taenia hydatigena* in dogs, pigs, and cattle in the Central Highlands of Vietnam. *Parasitology Research*, 120(9), 3245-3253.

Pathak, K. M. L., & Gaur, S. N. S. 1982. The incidence of adult and larval stage *Taenia hydatigena* in Uttar Pradesh (India). *Veterinary Parasitology*, 10(1), 91-95.

Pawlowski, Z. S. 2002. 1 *Taenia solium*: Basic Biology and. *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science, 1.

- Perl, S., Edery, N., Bouznach, A., Abdalla, H., & Markovics, A. 2015. Acute severe visceral cysticercosis in lambs and kids in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 70(2), 49-53.
- Pullin, J. W. 1955. Observations on liver lesions in lambs experimentally infected with the cysticercus of *Taenia hydatigena*. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 19(1), 17.
- Qamar, M. F., Maqbool, A., & Ahmad, N. 2011. Economic losses due to haemonchosis in sheep and goats. *Sci Intern*, 23(4), 321-4.
- Quiroz, R. H., "Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos," Limusa, México D.F., México, 1984.
- Radfar, M. H., Tajalli, S., & Jalalzadeh, M. 2005. Prevalence and morphological characterization of *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena* cysticerci) from sheep and goats in Iran. *Veterinarski arhiv*, 75(6), 469.
- Radfar M. H., Zarandi M. B., Bamorovat M., Kheirandish R., & Sharifi, I. 2014. Hematological, biochemical and pathological findings in goats naturally infection with *Cysticercus tenuicollis*. *Journal of parasitic diseases*, 38(1), 68-72.
- Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., Texeira, M. M. & Cara, D. C. 2004. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian J. of Medic. and Biol. Res.* 37, 809-816.
- Sarti, E., Schantz, P. M., Plancarte, A., Wilson, M., Gutierrez, I. O., Lopez, A. S., Roberts, J., & Flisser, A. 1992. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 46(6), 677-685.
- Scala, A., Urrai, G., Varcasia, A., Nicolussi, P., Mulas, M., Goddi, L., Pipia, A.P., Sanna, G., Genchi, M. and Bandino, E. 2014. Acute visceral cysticercosis by *Taenia hydatigena* in lambs and treatment with praziquantel. *J. Helminthol.*: 1-4.
- Scala, A., Pipia, A. P., Dore, F., Sanna, G., Tamponi, C., Marrosu, R., Bandino, E., Carmona, C., Boufana, B., & Varcasia, A. 2015. Epidemiological updates and economic losses due to *Taenia hydatigena* in sheep from Sardinia, Italy. *Parasitology Research*, 114(8), 3137-3143.
- Schantz, P. M., Alstine, C. V., Blacksheep, A., & Sinclair, S. 1977. Prevalence of *Echinococcus granulosus* and other cestodes in dogs on the Navajo reservation in Arizona and New Mexico. *American Journal of Veterinary Research*, 38(5), 669-670.
- Silverman P. H. 1954 Studies on the Biology of Some Tapeworms of the Genus *Taenia*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 48:4. 356-366.

Singh, B. B., Sharma, R., Gill, J. P. S., & Sharma, J. K. 2015. Prevalence and morphological characterisation of *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena* cysts) in sheep and goat from north India. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(1), 80-84.

Soulsby, E. J. L. (1982). Helminths. *Arthropods and Protozoa of domesticated animals*, 291.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall R.L. 2016. Veterinary parasitology Fourth edition Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.

Temuujin, J., Ulziijargal, G., Yeruult, C., Amarbayasgalan, Z., Mungunzaya, T., Bayarsaikhan, U., Khulan J., Wandra T., Sato M. O., Gantsetseg C., Ochirkhuyag B., Sato. M., Yamasaky H., & Narankhajid, M. 2022. Distribution and prevalence of *Taenia hydatigena*, *Taenia multiceps*, and *Mesocestoides* spp. in Mongolian sheepdogs. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 28, 100680.

Tenorio-Fuentes, F. D. 1982. Frecuencia de parásitos hepáticos en ovinos y caprinos sacrificados en el rastro de Milpa Alta, D.F. “tesis de licenciatura”. Universidad Nacional Autónoma de México.

Terrazas, C.A., Sánchez-Muñoz, F., Mejía-Domínguez, A.M., Amezcua-Guerra, L.M., Terrazas, L.I., Bojalil, R., Gómez-García, L., 2011. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1391.

Trasviña-Muñoz, E., López-Valencia, G., Monge-Navarro, F. J., Herrera-Ramírez, J. C., Haro, P., Gómez-Gómez, S. D., Mercado Rodríguez J. A., Flores-Dueñas C. A., Cueto-Gonzalez S. A., & Burquez-Escobedo, M. 2020. Detection of intestinal parasites in stray dogs from a farming and cattle region of northwestern Mexico. *Pathogens*, 9(7), 516.

Ulziijargal, G., Yeruult, C., Khulan, J., Gantsetseg, C., Wandra, T., Yamasaki, H., & Narankhajid, M. 2020. Molecular identification of *Taenia hydatigena* and *Mesocestoides* species based on copro-DNA analysis of wild carnivores in Mongolia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11, 72-82.

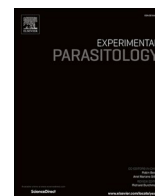
Wang, C. R., Qiu, J. H., Zhao, J. P., Xu, L. M., Yu, W. C., & Zhu, X. Q. 2006. Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the People’s Republic of China. *Parasitology Research*, 99(5), 627-630.

Zhu, G. Q., Li L., Ohiolei, J. A., Wu, Y. T., Li, W. H., Zhang, N. Z., Fu, B. Q., Yan, H. B., & Jia, W. Z. 2019. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Taenia hydatigena*, *T. multiceps*, *T. pisiformis*, and *Dipylidium caninum* infections. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-7.

ANEXO I

Artículo original publicado como resultado de esta tesis

Cuenca-Verde, C., Muñoz-Guzmán, M. A., Del Rio-Araiza, V. H., Valdivia-Anda, G., Olgún, J. E., Terrazas, L. I., Morales-Montor, J. & Alba-Hurtado, F. (2022). *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrates increase Anti-OVA IgG and the production of some cytokines in rats. *Experimental Parasitology*, 242, 108400.



Taenia hydatigena larvae vesicular concentrates increase Anti-OVA IgG and the production of some cytokines in rats

César Cuenca-Verde^{a,b}, Marco Antonio Muñoz-Guzmán^b, Víctor Hugo Del Rio-Araiza^c, Guillermo Valdivia-Anda^b, Jonadab Efraín Olguín^d, Luis I. Terrazas^d, Jorge Morales-Montor^e, Fernando Alba-Hurtado^{b,*}

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

^c Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, Ciudad de México, 04510, Mexico

^d Laboratorio Nacional en Salud, Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas, y Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Número 1, 54090, Tlalnepantla de Baz, Mexico

^e Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, Ciudad de México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Taenia hydatigena
Adjuvant
Immunomodulation
Ovalbumin
Rats

ABSTRACT

The effects of administration of four different fractions of *T. hydatigena* larvae vesicular concentrate (ThLVC) prior to immunization with ovalbumin (OVA) in rats on different parameters of the immune response were evaluated. The amount of anti-OVA IgG by ELISA, amount of blood eosinophils (BE), percentage of cell subpopulations by flow cytometry (CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD45RA+, and CD11b/c+), and production of serum cytokines by bead-based immunoassays (IL-2, IL-4, INF γ , IL-5, TNF α , GM-CSF, IL-17F, IL-17A, IL-13, IL-22, and IL-6) were measured. Rats receiving total-ThLVC ($p \leq 0.05$) and fraction ThLVC30-100 kDa ($p < 0.001$) prior to OVA administration produced higher amounts of anti-OVA IgG than rats receiving OVA alone. Rats that were only administered with OVA showed a strong increase in BE that was significantly correlated ($r = 0.72$, $p < 0.001$) with an increase in IL-5 in the blood. However, rats that received any of the ThLVC fractions prior to administration of OVA did not show these increases. In general, administration of ThLVC30-100 kDa prior to administration of OVA increased ($p < 0.05$) the percentage of B, CD4, and CD8 lymphocytes in the spleen and mesenteric lymph nodes. Rats that received ThLVC total fraction and OVA showed an increase ($p < 0.05$) in IL-2, IL17F, and IL22. The results of this study show that total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa modify the immune response of rats in differentiated ways. Our observations suggests that both fractions of ThLVC have the potential to be used as adjuvants.

1. Introduction

Some somatic components or secretion-excretion antigens of helminths can modify the immune response of their hosts (Peón et al., 2016). It has been proposed that cestodes modulate the host's immune response to generate a more permissive environment for their establishment (Terrazas et al., 2011). Infection with *Taenia crassiceps* metacystodes in mice induces increased serum estrogens and decreased serum testosterone (Larralde et al., 1995). Previously, the effects of testosterone, dihydrotestosterone, and 17 β -estradiol in castrated mice of

both sexes infected with *Taenia crassiceps* cysticerci were studied (Morales-Montor et al., 2002). These authors demonstrated that castration and treatment with either testosterone or dihydrotestosterone before infection decreased parasite loads by 50 and 70%, respectively, while the treatment with 17 β -estradiol increased it by three times in both genders, as compared with control mice. The specific splenocyte cell proliferation and IL-2 and IFN- γ production were depressed in infected-castrated mice of both genders, while treatment with testosterone or dihydrotestosterone produced a significant proliferation recovery and enhanced production of IL-2 and IFN- γ . On the other hand,

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

Table 1
Treatments of experimental groups.

Group (n = 10)	Days before of challenge ^a		Challenge day ^b	EuthanasiaDay (n = 5)
	-6	-2		
1	-	-	-	5 30
2	-	-	OVA	5 30
3	Total-ThLVC	Total-ThLVC	-	5 30
4	Total-ThLVC	Total-ThLVC	OVA	5 30
5	ThLVC>100 kDa	ThLVC>100 kDa	OVA	5 30
6	ThLVC30-100 kDa	ThLVC30-100 kDa	OVA	5 30
7	ThLVC10-30 kDa	ThLVC10-30 kDa	OVA	5 30

ThLVC: *T. hydatigena* larvae vesicular concentrate.

^a Each rat received 14 µg of the respective ThLVC fraction intraperitoneally.

^b Each rat received 30 µg of ovalbumin (OVA) intraperitoneally.

the humoral response was unaffected with testosterone or dihydrotestosterone restitution, while the treatment with estradiol in both genders augmented the levels of anticysticerci IgG, as well as IL-6 and IL-10 production. This suggests that modulation of the host immune response by some cestodes could positively or negatively modify the response to other concomitant pathogens.

Previous studies performed by our group showed that *T. hydatigena* larvae vesicular concentrate (ThLVC) induces eosinophilia and decreases implantation of *Haemonchus contortus* in the abomasum of sheep (Cuenca-Verde et al., 2011). Subsequently, this decreased implantation was associated with an increase in the numbers of IL2-, IL4-, IL6-, IL10-, and INFγ-producing cells detected by immunohistochemistry in the abomasum of lambs infected with *H. contortus* (Buendía-Jiménez et al., 2015), and a strong overexpression of cytokines representing the Th1 (INFγ and IL2) and Th2 profiles (IL4, IL5, IL6 and IL10), enzymes of the oxidative stress (SOD1 and PRDX6), and IgE receptor in the wall of the abomasal fundic region (Muñoz-Guzmán et al., 2021). Other authors observed that some fractions of *Taenia crassiceps* have differentiated effects on the activation of immune response cells in vitro (Terrazas et al., 2010). Our observations suggest that the complete ThLVC or some of its fractions could modify the immune response against heterologous antigens such as ovalbumin (OVA), which would confirm its immunomodulatory effect.

Therefore, in this study, the effects of different fractions of ThLVC (high, medium, or low molecular weight) on the production of antibodies, blood eosinophils, and cell subpopulations and the production of some cytokines in rats inoculated with OVA were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 9–10 weeks of age, weighing between 200 and 250 g were used. The rats were housed in polypropylene cages, environmental temperature was maintained at 22 ± 2 °C, relative humidity was maintained at 30–70%, and a 12/12 h light/dark cycle was maintained. The rats were fed commercial rodent feed (LabDiet 5001) and water *ad libitum*. This study was approved by the Internal Committee for Care of Experimental Animals of the Postgraduate Program of Animal Production and Health (UNAM, Mexico), adhering to Mexican regulation (NOM-062-ZOO-1999), in accordance with the recommendations from the National Institute of Health (NIH) of the United States of America (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

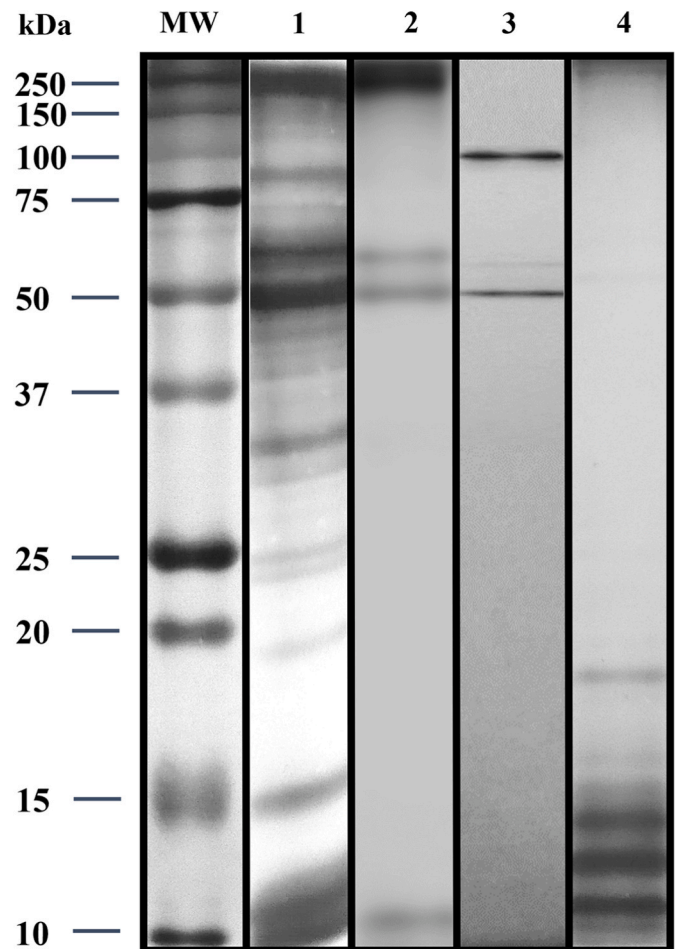


Fig. 1. Pattern of bands produced by a *Taenia hydatigena* Larvae Vesicular Concentrate (ThLVC) and their fractions, separated on 12% SDS-PAGE and silver stained. 1) Total-ThLVC; 2) ThLVC >100 kDa; 3) ThLVC 30–100 kDa; 4) ThLVC 10–30 kDa. MW = Molecular weight markers.

2.2. Experimental design

Rats were distributed into 7 groups (n = 10/group). The treatments performed in each group are shown in Table 1.

Blood samples were collected directly from the caudal vein. On days -7, 0 (OVA challenge), 5, 15, 20, and 30, BEs were counted. On Day 30, anti-OVA IgG antibodies were measured by ELISA. On Days 0, 5, and 30, MFI was measured by bead-based immunoassays of IL-2, IL-4, INFγ, IL-5, TNFα, GM-CSF, IL-17F, IL-17A IL-13, IL-22, and IL-6 in serum. Five rats from each group were euthanized on Days 5 and 30 of the experiment, and the spleen and MLN were collected to measure percentages of CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD45RA+, and CD11b/c + cells by flow cytometry.

2.3. ThLVC fractions

Complete ThLVC (total-ThLVC) was obtained by modifying the technique described by Cuenca-Verde et al. (2011). Metacystodes of *T. hydatigena* were collected from sheep in a slaughterhouse. Vesicular liquid was obtained by metacystode puncture. This was immediately followed by addition of a mixture of protease inhibitors (AEBSF at 23 mM, EDTA at 100 mM, Bestatin at 2 mM, Pepstatin A at 0.3 mM, and E-64 at 0.3 mM, Sigma-Aldrich, P8465). The mixture was filtered with Whatman 1 paper and Millipore 0.22 µm.

The total-ThLVC was placed in a filtration unit with a 100 kDa exclusion pore (Ultracell-100K Amicon®) and centrifuged at 2500 g for

1 h at 4 °C. The concentrate obtained from the upper part of the filtration unit was identified as ThLVC>100 kDa. The previously obtained filtrate was placed in a second filtration unit with an exclusion pore of 30 kDa (Ultracell-30K Amicon®) and centrifuged at 2500 g for 1 h at 4 °C. From the top of this second filtration unit, a second fraction was obtained, which was identified as ThLVC30-100 kDa. The filtrate obtained from the second unit was concentrated using a third filter unit with a 10 kDa exclusion pore (Ultracell-10K Amicon®) and was identified as the ThLVC10-30 kDa fraction. The integrity of the ThLVC fractions was evaluated by SDS-PAGE using a Mini-PROTEAN II electrophoresis cell chamber (Bio-Rad®) and 12% acrylamide gels at 100 V and 120 mA for 2 h (Fig. 1). The protein quantity of each concentrate or fraction was measured by the Bradford method.

2.4. Blood eosinophil (BE) count

The count was performed according to the technique modified by Cuenca-Verde et al. (2011). Blood samples were taken with insulin syringes from the caudal vein of rats and immediately transferred to vials with EDTA. A blood dilution of 1:10 with a Carpentier solution (formaldehyde at 40% and eosin Y at 1%) was used. The BE was counted in a Neubauer chamber, and results were expressed as BE per mm³ of blood.

2.5. Anti-OVA antibodies

Antibodies against OVA (IgG) were measured by ELISA (Difco Labs, No cat. 0255-7) by modifying the technique described by Gonzalez-García et al. (2017). Briefly, ELISAs were standardized by testing the OVA concentration (10 µg protein/mL), dilution of rat serum (1:100), and dilution of peroxidase-conjugated (1:7500) goat anti-rat IgG antibody (Serotec, No 250612). Absorbance values were read at 492 nm. Simultaneously, two control wells with no OVA were tested for each serum. The value obtained from these control wells was subtracted from the value of wells with OVA to eliminate the nonspecific colorimetric reaction. The results for the two wells were averaged and expressed as percent specific absorbance (%Abs).

2.6. Quantification of cell subpopulations

The cell subpopulations were measured by flow cytometry according to the technique described by Del Río-Araiza et al. (2018). Cells were obtained from spleen and mesenteric lymphatic nodes (MLN), and the following monoclonal antibodies were used: AF 488 anti-rat CD3 diluted 1:100 (Biolegend®, clone 1F4), APC anti-rat CD4 diluted 1:300 (Biolegend®, clone W3/25), PE anti-rat CD8a diluted 1:200 (Biolegend®, clone OX-8), PE anti-rat CD45RA diluted 1:200 (Biolegend®, clone OX-33), and biotin anti-rat CD11b/c diluted 1:200 (Biolegend®, clone OX-42). CD11b/c was revealed with PE/CY5 streptavidin diluted 1:200 (Biolegend®). All samples were analyzed with a FACS Calibur (BD, Biosciences, USA), and data analyzed using FlowJo v10.0 software.

2.7. Cytokine quantification

Cytokines were quantified in rat serum using bead-based immunoassays and fluorescence-encoded beads and analyzed by flow cytometry using a FACS Aria Fusion (BD®). The LEGENDplex™ Rat Th Panel kit (Biolegend®), which includes quantification of IL-2, IL-4, INFγ, IL-5, TNFα, GM-CSF, IL-17F, IL-17A, IL-13, IL-22, and IL-6, was used. Assays were performed following the instructions provided by the manufacturer, and data are expressed as the median fluorescence intensity (MFI). Data analysis was performed using the FlowJo vx software (tree star).

2.8. Statistical analysis

All data are reported as means ± standard error. BE data were

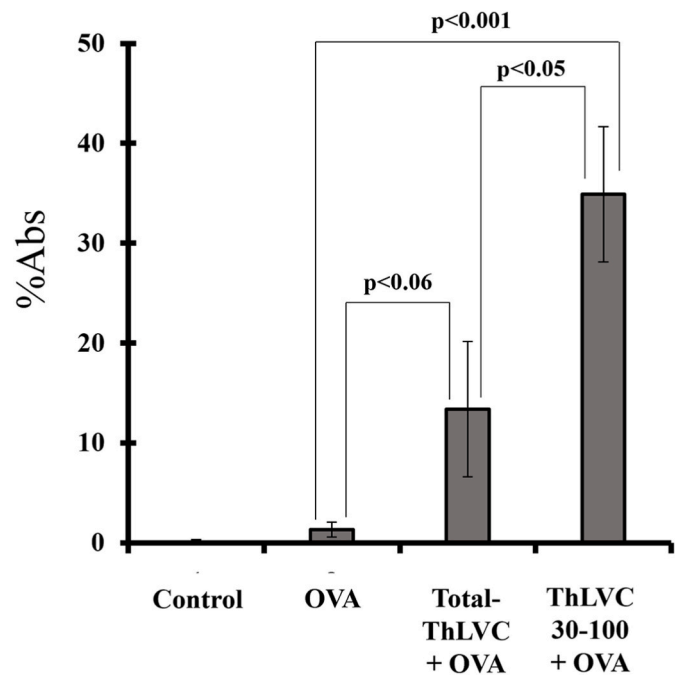


Fig. 2. Mean (\pm SE) absorbance percentage (%Abs) of the anti-OVA IgG in: control rats (Group 1); rats immunized with a single ovalbumin (OVA) dose (Group 2); rats inoculated with total-ThLVC prior to OVA immunization (Group 4) and rats inoculated with ThLVC30-100 KD prior to OVA immunization (Group 6). Measurements were made on day 30 of the experiment (all groups $n = 5$). Different letters indicate significant differences between the means ($P < 0.05$).

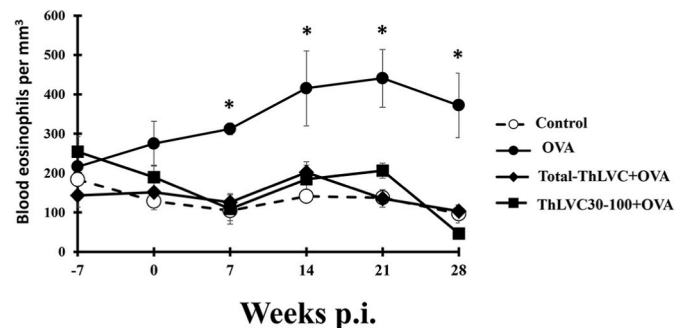


Fig. 3. Weekly blood eosinophil (BE) count mean (\pm SE) in rats from in: control rats (Group 1); rats immunized with a single ovalbumin (OVA) dose (Group 2); rats inoculated with total-ThLVC prior to OVA immunization (Group 4) and rats inoculated with ThLVC30-100 KD prior to OVA immunization (Group 6), all groups $n = 5$. *indicates differences ($p < 0.05$) between Group 2 and the other groups.

analyzed by repeated-measures ANOVA; subsequently, weekly averages were compared by Fisher's test. Mean of data from %Abs, percentages of cell subpopulations, and MFI from cytokines were analyzed by one-way ANOVA and Fisher's test for comparisons between the means. Pearson's correlation between %Abs, BE, percentages of cell subpopulations, and MFI from cytokines were calculated. All statistical analyses were performed using Statistics for Windows 7.0 software.

3. Results

Given that the treatment of Groups 3, 5, and 7 did not show significant differences ($p > 0.05$) in any of the means of BE, %Abs, cell subpopulations, or MFI from cytokines compared to those obtained from

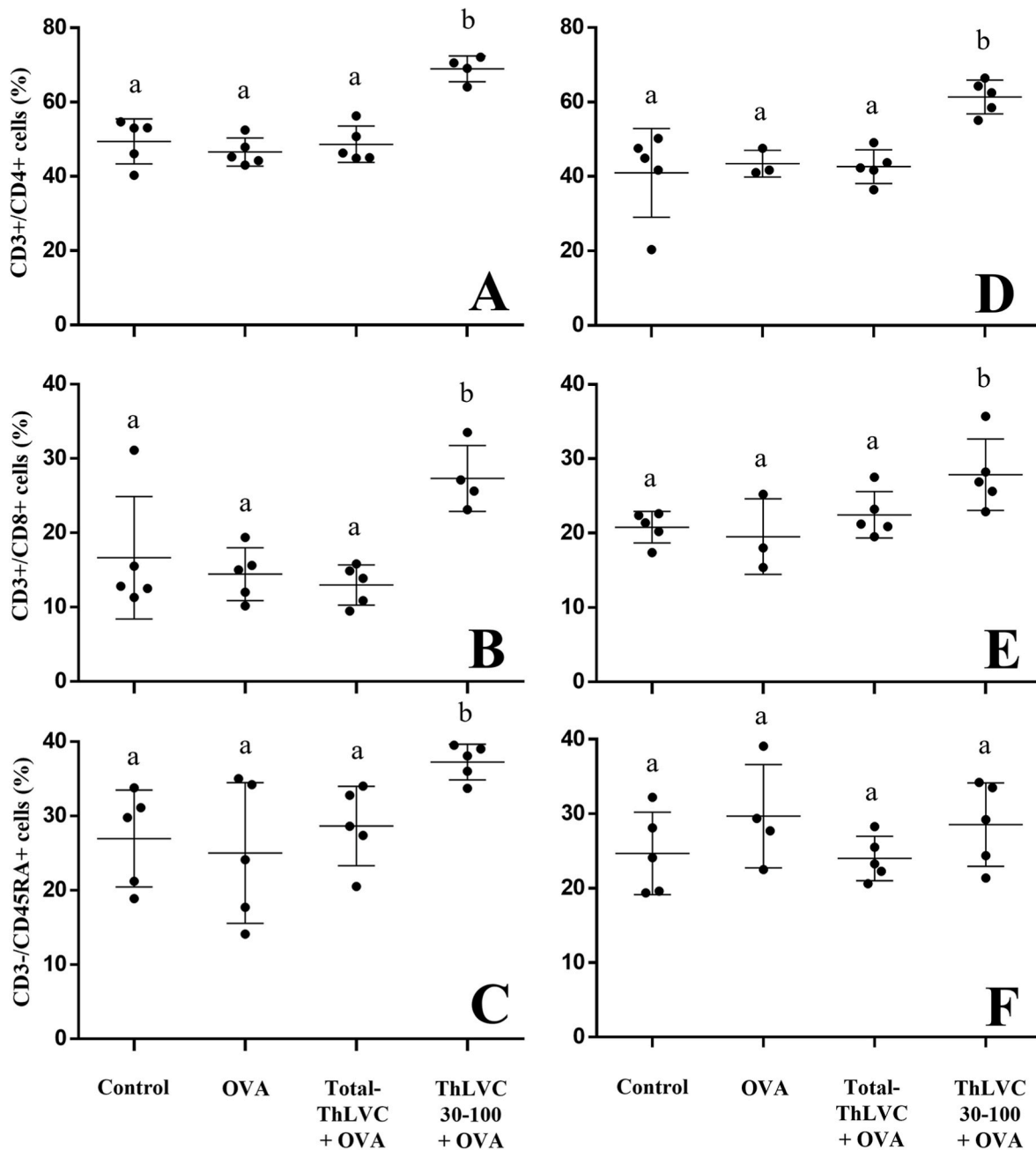


Fig. 4. Mean (\pm SE) percentage of T CD4 (CD3+/CD4+), T CD8 (CD3+/CD8+), or B (CD3-/CD45RA+) lymphocytes in mesenteric lymph node (a, b and c) and spleen (d, e and f) in: control rats (Group 1); rats immunized with a single ovalbumin (OVA) dose (Group 2); rats inoculated with total-ThLVC prior to OVA immunization (Group 4) and rats inoculated with ThLVC30-100 KD prior to OVA immunization (Group 6). Measurements were made on day 30 of the experiment. Different letters indicate significant differences between the means ($p < 0.05$).

Group 2 rats (control challenge OVA), we focused on rats from Groups 1, 2, 4, and 6.

The rats from Groups 4 ($p \leq 0.05$) and 6 ($p < 0.001$) presented higher %Abs than the rats from Groups 1 and 2 (Fig. 2). The BE kinetics are shown in Fig. 3. The rats of Group 2 showed more BE than the rats of Groups 1, 4, and 6 ($p < 0.01$) between Days 5 and 30 of the experiment.

The rats from Group 6, euthanized on Days 5 and 30 of the experiment, showed a higher percentage ($p < 0.05$) of CD3+/CD4+ cells (CD4 T lymphocytes) and CD3+/CD8+ cells (CD8 T lymphocytes) in the spleen and MLN than the rest of the group (Fig. 4). The rats from Group 6, euthanized on Day 30 of the experiment, showed a higher percentage ($p < 0.05$) of CD3-/CD45RA+ cells (B lymphocytes) in the MLN than the rest of the groups. In the spleen and MLN, no differences were observed

($p > 0.05$) in the percentage of CD11bc+ cells (macrophages) between the different groups that were euthanized on Days 5 and 30 of the experiment. On Day 5 of the experiment, rats from Group 2 showed a higher ($p < 0.03$) mean MFI of serum IL-5 compared to rats from Groups 1, 4, and 6 (Fig. 5a). No differences were observed between mean serum IL-5 MFI between the rats of the different groups on Day 30 of the experiment.

The rats from Group 4 euthanized on Day 30 of the experiment showed higher mean MFI of serum IL-2 ($p < 0.01$), IL-17 ($p < 0.05$), and IL-22 ($p < 0.05$) compared to Groups 1, 2, and 6 (Fig. 5c, e and 5f, respectively). The rats from Group 4 that were euthanized on Day 30 of the experiment showed a higher ($p < 0.04$) mean MFI of serum IL-4 than Groups 1 and 2 (Fig. 5b). The rats from Group 4 euthanized on Day 30 of

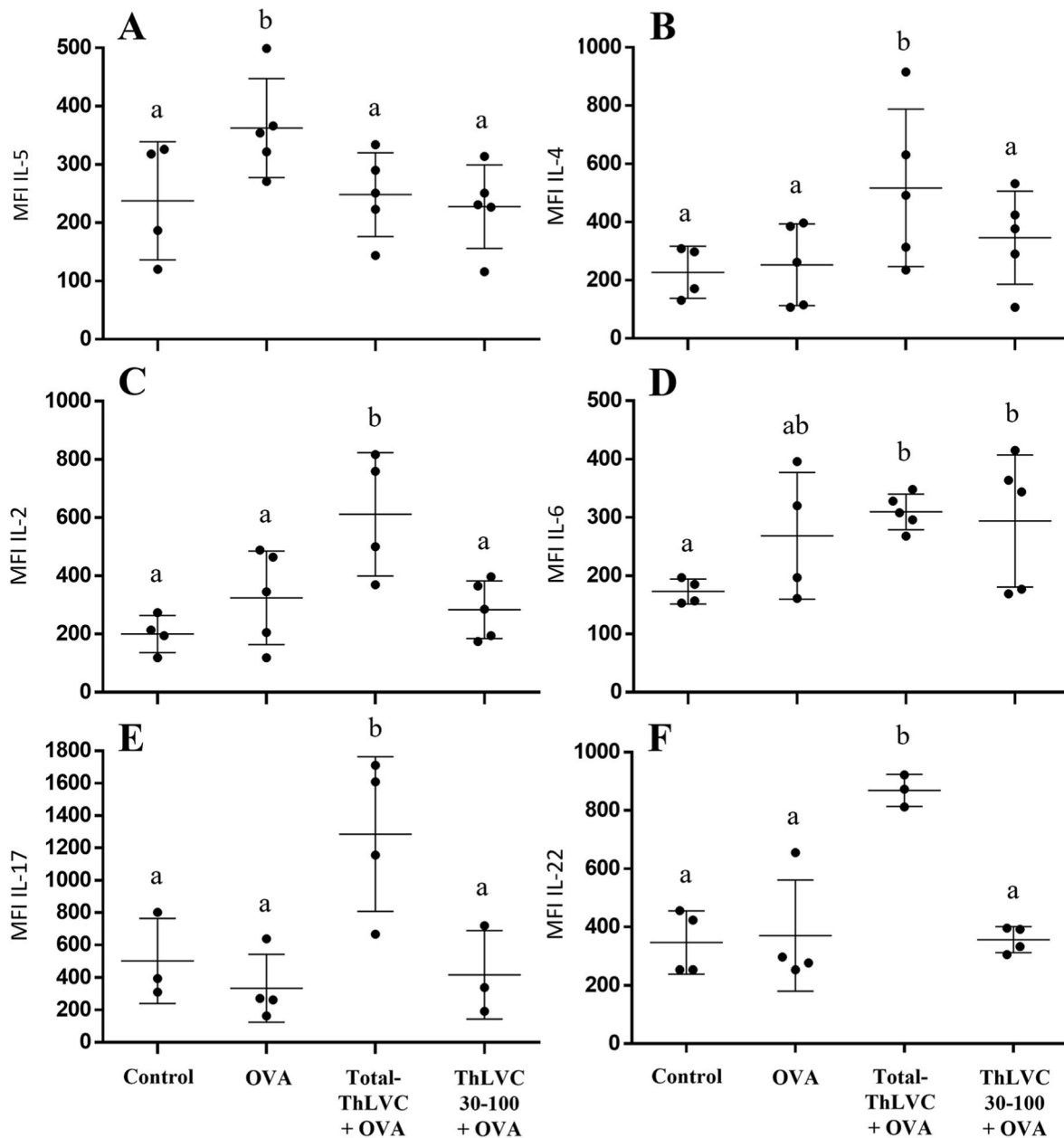


Fig. 5. Mean (\pm SE) MFI percentages of serum IL-5 (a), IL-4 (b), IL-2 (c), IL-6 (d), IL-17 (e), and IL-22 (f) in: control rats (Group 1); rats immunized with a single ovalbumin (OVA) dose (Group 2); rats inoculated with total-ThLVC prior to OVA immunization (Group 4) and rats inoculated with ThLVC30-100 KD prior to OVA immunization (Group 6). Measurements were made on Days 5 (a) or 30 (b–f) of the experiment. Different letters indicate significant differences between the means ($p < 0.05$).

the experiment showed a higher ($p < 0.04$) mean MFI of serum IL-6 compared to rats from Group 1 (Fig. 5d). No differences ($p > 0.05$) were observed between the MFI means of serum IL-2, IL-22, IL-17, IL-4, or IL-6 among the rats of the different groups on Day 5 of the experiment. The most important correlations were BE with IL-5 ($r = 0.72$, $p < 0.001$); %Abs from anti-OVA IgG with B cells ($r = 0.59$, $p < 0.03$); %Abs from anti-OVA IgG with MFI from IL-4 ($r = 0.6$, $p < 0.01$), and %Abs from anti-OVA IgG with MFI from IL-6 ($r = 0.55$, $p < 0.03$).

4. Discussion

It has been shown that some cestodes modulate the host's immune response to generate a more favorable environment for their establishment and/or maintenance (Larralde et al., 1995). This could modify the microenvironments of the host for establishment of other parasites. In

three previous studies, we have shown that administration of ThLVC reduces implantation of adult *H. contortus* worms in the abomasum of lambs, which was associated with changes in some cell types and expression of some cytokines in the abomasum (Cuenca-Verde et al., 2011; Buendía-Jiménez et al., 2015; Muñoz-Guzmán et al., 2021). Therefore, it was proposed that ThLVC may be a response enhancer through modulation of the immune response. The results obtained in this study clearly show that total-ThLVC and the ThLVC30-100 kDa fraction potentiate production of anti-OVA antibodies as well as some cytokines and modify different cell subpopulations.

OVA is a weak immunogenic protein antigen, and administration of a single dose of in rats induces production of low amounts of anti-OVA IgG, but when it is administered together with some chemical compounds that act as adjuvants, it induces a strong increase in IgG-specific anti-OVA. Therefore, it has been widely used as a model in the

evaluation of possible immune response adjuvants (Chandrashekar and Venkatesh, 2012; Wusiman et al., 2019; Alqahtani et al., 2020). In this work, we observed that administration of two doses of total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa (groups 4 and 6 respectively) prior to immunization with OVA induced a much higher production of anti-OVA IgG at day 30 of experiment than immunization with a single dose of OVA (group 2) in rats. These results clearly show the potentiating effect of total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa antibody production and its probable adjuvant effect.

Total-ThLVC is a complex mixture of proteins and other molecules. In this study, we separated different fractions of this mixture, and each fraction had a different behavior. The stimulating effect of antibody production was only present in total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa, so we deduced that this effect is produced by some of the molecules found in these fractions, therefore, molecules that are in the range of 30–100 kDa are probably the main molecules responsible for this immunostimulatory effect.

In studies carried out by our group, we observed that administration of total-ThLVC in lambs induces strong eosinophilia that lasts for several weeks (Cuenca-Verde et al., 2011; Buendía-Jiménez et al., 2015; Muñoz-Guzmán et al., 2021). On the other hand, airborne or systemic administration of OVA induces an increase in eosinophils in the blood and lungs, which is why it has been widely used in experimental models of asthma (Hogan et al., 2003; Kumar et al., 2008). In this study, we observed that administration of OVA intraperitoneally induced a strong increase in BE that correlated significantly with an increase in IL-5 in the blood (group 2); however, previous administration of total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa inhibited both increases (groups 4 and 6 respectively), which clearly indicates that both fractions have down regulatory effects on some elements of the immune response. The increase in production of specific anti-OVA antibodies, at the same time as inhibition of eosinophilia and IL-5 in blood, in rats previously treated with total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa, is not consistent with a classic response of Th2 observed in other parasitic models.

In general, it is considered that CD4 lymphocytes (CD3+/CD4+) have a regulatory function based on production of cytokines and direct the immune response through different pathways: Th1, Th2, and Th17. CD8 lymphocytes (CD3+/CD8+) are effector cells whose main action is cytotoxic attack on intracellular pathogens by inducing apoptosis and, to a lesser extent, regulation through production of some cytokines (Murphy and Weaver, 2017). In this study, we observed that administration of ThLVC30-100 kDa prior to administration of OVA (group 6) increased the percentage of CD4 and CD8 lymphocytes in the spleen and MLN compared to the rest of the groups. This finding suggests that the molecules of this fraction induce a broad activation of T lymphocytes, however, interventional studies are needed to assess their function.

B lymphocytes (CD3-/CD45RA+) are precursors of antibody-producing plasma cells (Jensen et al., 1992). Administration of ThLVC30-100 kDa prior to administration of OVA (group 6) increased the proportion of B lymphocytes, which was significantly correlated with a higher production of anti-OVA IgG; however, these increases were not related to a higher production of IL4 and IL6, which suggests that this fraction induced the production of antibodies independently of these cytokines or that the increase in these cytokines occurred before Day 30, so it was not detected in this study.

In the Th17 response, there is an increase in IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 (Korn et al., 2009). The Th17 response has been associated with a strong activation of neutrophils, making it more efficient for the killing of extracellular invading pathogens, mainly fungi and bacteria. In viral and parasitic infections, the role of Th17 responses is less clear, and IL-17 has even been reported to be harmful to the host (Van De Veerdonk et al., 2009; Deng et al., 2019). In this study, administration of total-ThLVC and OVA (group 4) induced an increase in IL17F and IL22 on Day 30. Although we cannot determine the possible implications of these increases, it is clear that the combination of total-ThLVC and OVA modifies the immune response toward a Th17 response.

The results of this study show that total-ThLVC and ThLVC30-100 kDa modify the immune response of rats in differentiated ways. Although more studies are required to confirm our observations, the results suggest that both fractions of ThLVC have potential to be used as adjuvants.

CRediT authorship contribution statement

César Cuenca-Verde: Investigation, Formal analysis, and, Writing – original draft. **Marco Antonio Muñoz-Guzmán:** Investigation. **Víctor Hugo Del Rio-Araiza:** Investigation. **Guillermo Valdivia-Anda:** Investigation. **Jonadab Efraín Olgún:** Investigation. **Luis I. Terrazas:** Formal analysis, and, Writing – original draft. **Jorge Morales-Montor:** Resources, and, Formal analysis. **Fernando Alba-Hurtado:** Project administration, Funding acquisition, and, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This study was funded by a grant from PAPIIT/UNAM, Mexico (No. IN210322 and IN211222). We deeply thank Crisóforo Mercado-Márquez from FESC-UNAM for their technical assistance.

References

- Alqahtani, M.S., Kazi, M., Ahmad, M.Z., Syed, R., Alsenaidy, M.A., Albraiki, S.A., 2020. Lignin nanoparticles as a promising vaccine adjuvant and delivery system for ovalbumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 163, 1314–1322.
- 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.
- Chandrashekar, P.M., Venkatesh, Y.P., 2012. Fructans from aged garlic extract produce a delayed immunoadjuvant response to ovalbumin antigen in BALB/c mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34, 174–180.
- Cuenca-Verde, C., Buendía-Jiménez, J.A., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F., 2011. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. *Vet. Parasitol.* 177, 332–338.
- Del Rio-Araiza, V.H., Nava-Castro, K.E., Alba-Hurtado, F., Quintanar-Stephano, A., Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Micó, O., Morales-Montor, J., 2018. Endocrine immune interactions during chronic toxocarosis caused by *Toxocara canis* in a murine model: new insights into the pathophysiology of an old infection. *Vet. Parasitol.* 252, 173–179.
- Deng, J., Yu, X.Q., Wang, P.H., 2019. Inflammasome activation and Th17 responses. *Mol. Immunol.* 107, 142–164.
- González-García, T., Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Arroyo, H., Prado-Ochoa, M.G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2017. Experimental transmission of *Toxocara canis* from *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* cockroaches to a paratenic host. *Vet. Parasitol.* 246, 5–10.
- Hogan, M.B., Weissman, D.N., Hubbs, A.F., Gibson, L.F., Piktel, D., Landreth, K.S., 2003. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 171, 2644–2651.
- Jensen, G.S., Mant, M.J., Pilarski, L.M., 1992. Sequential maturation stages of monoclonal B lineage cells from blood, spleen, lymph node, and bone marrow from a terminal myeloma patient. *Am. J. Hematol.* 41, 199–208.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
- Kumar, R.K., Herbert, C., Foster, P.S., 2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets* 9, 485–494.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, L., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575–580.
- Morales-Montor, J., Baig, S., Hallal-Calleros, C., Damian, R.T., 2002. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.* 100, 209–216.

- Murphy, K., Weaver, C. (Eds.), 2017. *Janeway's Immunobiology*. Garland science, New York, p. 855.
- Muñoz-Guzmán, M.A., Sánchez-Paredes, A., Cuenca-Verde, C., López-Arellano, M.E., Alba-Hurtado, F., 2021. *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate reduces the egg shedding of *Haemonchus contortus* associated with the overexpression of abomasal cytokines in lambs. *Vet. Parasitol.* 292, 109390.
- Peón, A.N., Ledesma-Soto, Y., Terrazas, L.I., 2016. Regulation of immunity by Taeniids: lessons from animal models and in vitro studies. *Parasite Immunol.* 38, 124–135.
- Terrazas, C.A., Gómez-García, L., Terrazas, L.I., 2010. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int. J. Parasitol.* 40, 1051–1062.
- Terrazas, C.A., Sánchez-Muñoz, F., Mejía-Domínguez, A.M., Amezcua-Guerra, L.M., Terrazas, L.I., Bojalil, R., Gómez-García, L., 2011. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1391.
- Van De Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Kullberg, B.J., Van Der Meer, J.W., Joosten, L.A., Netea, M.G., 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports* 42, 776–787.
- Wusiman, A., Gu, P., Liu, Z., Xu, S., Zhang, Y., Hu, Y., Liu, J., Wang, D., Huang, X., 2019. Cationic polymer modified PLGA nanoparticles encapsulating Alhagi honey polysaccharides as a vaccine delivery system for ovalbumin to improve immune responses. *Int. J. Nanomed.* 14, 3221.