



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Antígenos de larva 3 de *Haemonchus contortus* reconocidos por
IgG sérica de corderos inmunizados con mimótopos del parásito**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

KAREN JAQUELINE VAZQUEZ HERNANDEZ

ASESOR: Dr. Fernando Alba Hurtado

COASESOR: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

COASESOR: Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Cuatitlán Izcalli, Estado de México.

2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Antígenos de larva 3 de Haemonchus contortus reconocidos por IgG sérica de corderos inmunizados con mimótopos del parásito.

Que presenta la pasante: **Karen Jaqueline Vazquez Hernandez**
Con número de cuenta: **411077679** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de julio de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M.V.Z. Raúl García Tinajero | |
| VOCAL | Dr. José Francisco Morales Álvarez | |
| SECRETARIO | Dr. Fernando Alba Hurtado | |
| 1er. SUPLENTE | Dr. Hugo Ramírez Álvarez | |
| 2do. SUPLENTE | M. en M.V.Z. Silvia Angélica Campos Marmolejo | |

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de pertenecer a la comunidad de la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haber sido mi segunda casa y por la formación académica que recibí.

Dr. Fernando Alba Hurtado por haberme apoyado, ser guía, dedicarme tiempo y haberme dado la oportunidad de unirme a su laboratorio, por su asesoría y ayudarme a concluir esta tesis.

Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, por sus enseñanzas, el tiempo invertido en este trabajo y por su paciencia al ayudarme a sacar adelante este trabajo y al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, por su apoyo en la realización de esta tesis.

M. en C. César Cuenca Verde, por su enorme apoyo como técnico en el laboratorio, también por ayudarme con el manejo de los ovinos, por sentarse conmigo a explicarme desde cero las técnicas que se emplearon en este trabajo.

Este estudio fue financiado por los proyectos PAPIIT/UNAM No. IN210322 y PAPIIT/UNAM No. IN211222.

A todos mis profesores de carrera que contribuyeron a alcanzar esta meta, a los que también me brindaron su amistad y apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres, por llevarme hasta este punto, por los sacrificios que llevaron a cabo para ayudarme a ser una mejor persona. En especial a mi querida madre Guadalupe Hernández Sánchez, gracias por tu apoyo incondicional durante todo mi camino, por tu infinito amor, por todas sus enseñanzas, por enseñarme a cumplir mis metas y perseguir mis sueños y por estar a cada paso a lado mío y nunca rendirse conmigo a pesar de todo, este logro no habría sido posible sin ti, ninguna palabra es suficiente para expresar la gratitud y admiración que te tengo.

A mis hermanos, Yazmín a ti que nunca me has dejado olvidar mi meta, por estar siempre a mi lado y ser una confidente.

A mi hermanito RAFITA por el inmenso amor y por acompañarme en todo, mi pequeño confidente y gran amigo, recuerda no dejar de soñar y luchar por conseguir todo lo que te propongas en la vida, siempre contarás conmigo.

A mi sobrina Emily mi segundo motor gracias por aportar tanto a mi vida y hacerla más feliz con tu presencia.

A mi tío favorito Emilio Sánchez Mejía (†) aunque no alcanzó a ver este logro, siempre creyó en mí, hasta donde estés, te quiero mucho y agradezco que me hayas escuchado y que hayamos compartido sueños, gracias por esas largas

pláticas en la madrugada, por tus consejos y por quererme desde que tengo memoria.

A mi abuelito Emilio Sánchez (†) por tu cariño y por brindarme esas largas pláticas sobre vacas y demás animales, fue un gusto haber coincidido en este mundo y que comprendieras lo que amo.

A mis demás abuelos: Meche, Elvira, Úrsula, Salvador, Alfonsina, Beatriz y Paco, gracias por ser los abuelos más cariñosos del mundo, por sus historias y enseñanzas.

A mis amigos que me acompañaron a lo largo de esta bella carrera y con quienes compartimos la misma pasión, Xóchitl Donají Martínez Guzmán que me acompañaste casi desde el principio de la carrera y nuestra amistad creció y creció hasta el punto en que te convertiste mi mejor amiga, mi persona favorita, te amo y te agradezco el estar conmigo incondicionalmente dándome aliento y ánimo para lograr mis metas y sueños, comparto esto contigo porque me has acompañado en todo momento y no me has soltado a pesar de la distancia. Brenda por el apoyo y tu amistad brindada.

A mis compañeros y amigos que encontré en la UIM en el laboratorio 1 Y 3, p.MVZ Omar Espiritusanto, M. en C. Adolfo Sánchez Paredes, Dra. Sandra Iturbe Requena, por sus consejos. A los que estuvieron realizando servicio social y que también me estuvieron apoyando en algún momento de este trabajo; Nathaly, Valeria, Carlitos, María y Alma.

M. en C. César Cuenca Verde, no sólo por brindarme su apoyo profesional, si no también su amistad, gracias por tu infinita paciencia y comprensión, por transmitir todos tus conocimientos,

vivencias y hacer más llevadero el trabajo y claro por creer en mí. Mi más grande guía en esta etapa.

A quienes también formaron parte importante sin saberlo, Laura Cisneros. Arturo Elizalde, tu apoyo y ese gran cariño fue muy importante en esta etapa, el que siempre me estuvieras recordando que yo podía con todo y no dejarme caer, por ser uno de mis más grandes soportes.

A mis mascotas que también me acompañaron y me brindaron felicidad en este largo camino: Kiara, Camila, Laika, Lunita y Salemito.

A todos los que en algún momento me han ayudado y alentado a continuar y no darme por vencida ante nada.

"La vida no es fácil para nadie, pero hay que tener perseverancia y, sobre todo, confianza en uno mismo. Es necesario creer que se está dotado para alguna cosa y que hay que alcanzarla, cueste lo que cueste". *Marie Curie*

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| PORTADA | 1 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 2 |
| DEDICATORIAS | 3 |
| ÍNDICE | 6 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 8 |
| ABREVIATURAS | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| Ciclo biológico de <i>H. contortus</i> | 13 |
| Patogenia | 14 |
| Epidemiología | 15 |
| Estrategias de control..... | 16 |
| Respuesta inmune en la hemoncosis ovina | 17 |
| Inmunización contra la hemoncosis | 21 |
| JUSTIFICACIÓN | 22 |
| HIPOTESIS..... | 23 |
| OBJETIVO | 23 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 23 |
| Lugar de realización..... | 23 |
| Animales | 23 |
| Clonas..... | 24 |
| Diseño experimental para inmunización con mimótopos | 24 |
| Toma de muestras..... | 25 |
| Parásitos..... | 25 |
| Obtención de antígenos de L3 de <i>H. contortus</i> | 25 |
| ELISA | 26 |
| Western blot | 27 |
| Análisis estadístico | 27 |
| RESULTADOS | 27 |
| DISCUSIÓN | 31 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| CONCLUSIONES | 33 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 34 |

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Número de identificación y secuencia peptídica de los mimótopos de *H. contortus* utilizados en el presente estudio. ----- 23

Cuadro 2.- Número de corderos que reconocieron antígenos de larva 3 de *H. contortus* en la semana 6 del experimento en los diferentes grupos experimentales. ----- 27

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| VGE | Verminosis gastroentérica |
| H. contortus | <i>Haemonchus contortus</i> |
| L3 | larva de tercer estadio |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IgE | Inmunoglobulina E |
| IL5 | Interleucina 5 |
| IL4 | Interleucina 4 |
| IL10 | Interleucina 10 |
| INFγ | Interferón gamma |
| kDa | kilodaltones |
| rpm | revoluciones por minuto |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| SDS-PAGE | Gel de SDS-poliacrilamida |
| PBS | buffer fosfato salino |
| D.O | densidad óptica |
| AbsE | Absorbancia específica |
| %Abs | porcentaje de absorbancia |

RESUMEN

La hemoncosis es una enfermedad de gran importancia económica en los rebaños ovinos. La presencia de cada vez más cepas de *H. contortus* resistentes a los fármacos antihelmínticos hace necesario buscar otras alternativas de control. La vacunación es una de ellas y es por eso que se requiere buscar e identificar proteínas inmunogénicas de *H. contortus* que puedan ser utilizadas como blanco de la respuesta inmune y de esta forma hacer un mejor control de esta importante enfermedad.

Se ha propuesto que algunos mimótopos (molécula que imita la estructura de un epítipo, por lo que estimula la producción de anticuerpos) podrían ser utilizados como inmunógenos. Una serie de mimótopos de *H. contortus* fueron obtenidos a partir de una biblioteca de fagos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (Vázquez, 2016). Estos mimótopos demostraron ser inmunogénicos y producir anticuerpos que reaccionaron con antígenos del parásito en conejos. Sin embargo, antes de plantear ensayos de protección en ovinos es necesario evaluar si estos mimótopos son capaces de inducirles una respuesta inmune contra antígenos de larva 3 de *H. contortus*.

En el presente trabajo se evaluó el potencial inmunogénico de estos mimótopos de *H. contortus* en ovinos (hospedador natural). Se utilizaron corderos de la raza Columbia, los cuales fueron distribuidos en 4 grupos (n=5). En las semanas cero, dos y cuatro del experimento, los corderos del grupo 1 recibieron subcutáneamente 200 µg de un *pool* de las clonas de mimótopos identificadas como 7, 8, 13 y 14. Los corderos del grupo 2 recibieron subcutáneamente 200 µg de un *pool* de las clonas de mimótopos identificadas como 13 y 14. Los corderos del grupo 3 recibieron subcutáneamente 200 µg de la clona original (no seleccionada) M13mp19. Los corderos del grupo 4 solo recibieron un placebo y fueron utilizados como grupo control negativo. Semanalmente se obtuvo suero de todos los corderos, durante las 6 semanas que duró el experimento. Se midieron por ELISA los niveles de IgG anti-antígenos de L3 de *H. contortus* en las semanas -2, 0, 2, 4 y 6 del experimento. En la semana 6 del experimento se determinó por Western Blot los antígenos de L3 de *H. contortus* reconocidos por los sueros de los corderos experimentales.

Por ELISA se observaron algunas diferencias numéricas entre los grupos durante los diferentes días del experimento, sin embargo, no fueron significativas en ningún momento

del mismo ($p > 0.05$) y por Western Blot solo algunos corderos reconocieron en la semana 6 post-infección antígenos de 33 y 37 kDa. Por otro lado, algunos corderos de los grupos testigos reconocieron estos mismos antígenos (grupos C y D), lo que sugiere que el reconocimiento fue inespecífico. Estos resultados indican que si bien, los mimótopos utilizados fueron capaces de inducir respuesta específica contra L3 de *H. contortus* en conejos, estas clonas bajo las condiciones de este experimento no produjeron una respuesta específica por anticuerpos contra L3 de *H. contortus* en los corderos evaluados.

INTRODUCCIÓN

La verminosis gastroentérica (VGE) en ovinos es una de las principales causas de pérdidas económicas en los ovinos de México y muchas otras partes del mundo. Su impacto económico se refleja en el retraso del crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, disminución del apetito y muertes esporádicas. La VGE se presenta con mayor frecuencia en lugares húmedos y zonas templadas, en especial en sistemas de pastoreo (Quiroz, 1984).

La VGE es una enfermedad multietiológica, en donde participan dos o más géneros y especies de nematodos. Los géneros más frecuentemente involucrados son: *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Mecistocirrus*, *Teladorsagia*, *Bunostomum*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum*, *Chabertia*, *Trichuris* y *Skrjabinema*. Por su virulencia y frecuencia, *Haemonchus contortus* es el nematodo gastroentérico de mayor importancia en los ovinos de México y el mundo (Quiroz, 1984; Meana y Rojo, 1999).

Haemonchus contortus es un nematodo al que comúnmente se le conoce como gusano en palo de barbería, se localiza en el abomaso de ovinos, bovinos, caprinos y otros ruminantes silvestres. Los machos miden entre 10 y 20 mm de largo y son de color rojo uniforme. La hembra mide de 18 a 30 mm de largo, su cutícula es transparente, se pueden observar los ovarios de color blanco enrollados en espiral sobre el intestino, que es de color rojo, lo que le da el aspecto de palo de barbería (Alba-Hurtado, 2007).

La parte anterior de machos y hembras presenta un orificio bucal con una lanceta en posición dorsal. Presentan dos papilas que tienen forma de espigas. Los machos tienen en el extremo posterior una bolsa copulatriz formada por dos lóbulos laterales grandes y un lóbulo central o dorsal más pequeño, poseen dos espículas iguales que no sobresalen del cuerpo. En las hembras, el extremo posterior termina en punta roma, la vulva se encuentra al finalizar el segundo tercio del cuerpo y está cubierta por una prolongación de la cutícula llamada labio vulvar (Alba-Hurtado, 2007; Quiroz, 1984). Los huevos del parásito miden 64-95 X 40-50 μm , son ovalados con doble pared y contienen de 8 a 16 estructuras redondas llamadas blastómeros.

Ciclo biológico de *H. contortus*.

Su ciclo biológico es directo y se divide en dos fases: fase parásita que se desarrolla dentro del hospedador y la fase no parásita que se desarrolla fuera del hospedador. El ciclo inicia con la eliminación de huevos en las heces, si las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, se desarrolla una larva 1 en el interior del huevo (durante las primeras 24-30 horas). La larva 1 sale del huevo y muda a larva 2, ambos estadios larvarios carecen de vaina por lo que son muy sensibles a las condiciones ambientales. Posteriormente muda a larva 3 (L3), la cual no se alimenta ni muda, se mantiene de las reservas nutricionales obtenidas durante los dos primeros estadios larvarios y posee una vaina que la protege de factores ambientales (frio, calor y radiación solar). La L3 es la fase infectante y tiene capacidad para migrar por el pasto, donde puede ser ingerida por el hospedador durante el pastoreo. La L3 ingerida elimina la vaina en el rumen, migra al abomaso y penetra a glándulas abomasales en donde muda a larva 4 (L4). Posteriormente la L4 sale a la luz del abomaso y muda a larva 5 para finalmente transformarse en adultos. En la luz del abomaso, machos y hembras copulan y las hembras inician la eliminación de huevos alrededor de 20 días después de la infección. Cada hembra elimina de 5,000 a 10,000 huevos al día, estos recorren el tracto digestivo y caen al suelo junto con las heces (Quiroz, 1984; Meana y Rojo, 1999).

Una característica que presentan algunas larvas de *H. contortus* durante el ciclo biológico, es el arresto larvario o hipobiosis; en este fenómeno reversible, las larvas son capaces de detener su desarrollo manteniéndose en la mucosa abomasal como L4 en un estado de latencia. No todas las larvas entran en estado de hipobiosis, aunque los rangos pueden variar de 25 a 95% dependiendo de las condiciones ambientales (Blitz y Gibbs, 1972). Los factores que se han asociado a la hipobiosis son: condiciones ambientales desfavorables para la supervivencia de la larva (generalmente temperaturas extremas), estacionalidad, estado inmunológico del huésped y presencia de una población de gusanos adultos preexistentes, entre otros. Las larvas que entran en arresto larvario tienen la capacidad de reactivar su desarrollo dependiendo de factores como: baja de la inmunidad, aumento de algunas hormonas (prolactina, entre otras), eliminación de la población de

gusanos adultos preexistentes, cambio de condiciones climáticas, entre otros (Soulsby, 1988).

Patogenia

El daño que produce el parásito depende de la fase evolutiva (larva o adulto). Las larvas ejercen una acción traumática obstructiva en las glándulas de la mucosa abomasal. En este proceso se dañan las células epiteliales que cubren el tracto gastrointestinal y vasos linfáticos, las larvas rompen células para establecerse en la mucosa, la invasión la realiza mediante un estilete oral y enzimas que producen, esto ocasiona que se formen coágulos. La presencia de las larvas en las glándulas abomasaes ocasiona cambios histopatológicos del tejido glandular como son la hiperplasia de la mucosa abomasal y la infiltración de células inflamatorias. La sustitución de células parietales secretoras de ácido clorhídrico (HCl) por células jóvenes no secretoras, producen un aumento en el pH en la luz abomasal e impiden la transformación de pepsinógeno a pepsina incidiendo negativamente en la digestión de las proteínas. La unión intercelular de la glándula también se ve afectada, lo que favorece la pérdida de proteínas endógenas de la sangre por el lumen gástrico y la entrada de pepsinógeno a la sangre (Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).

Los gusanos adultos de *H. contortus* son hematófagos, en mucosa del abomaso provocan abomasitis catarral y pérdida de sangre que, si el hospedero no es capaz de remplazar con suficiente rapidez, se desarrolla anemia e hipoproteïnemia (Cuéllar, 1986). La anemia se manifiesta por la palidez de la conjuntiva y de las encías. También aparece edema en diferentes partes, producto de la baja concentración de proteínas en la sangre. La necropsia puede revelar la presencia de líquido peritoneal (ascitis) en la bolsa pericárdica (hidropericardio) y en la cavidad pleural (Soulsby, 1988; Le Jambre, 1995). La mucosa del abomaso está hiperémica e inflamada y muestra coágulos en los puntos donde los gusanos han succionado sangre, así como grados variables de ulceración (Soulsby, 1988). Se ha demostrado que un gusano adulto succiona hasta 0.05 mL de sangre por día, hecho que les toma doce minutos aproximadamente y al retirarse dejan sangrando la zona por varios minutos debido a las sustancias anticoagulantes que introduce junto con la saliva (Quiroz, 1984). La cantidad de sangre extraída del hospedero por *H. contortus* depende del número

de gusanos presentes en el abomaso (Soulsby, 1987). Los efectos de los gusanos sobre la salud de los individuos de algunos rebaños variarán de acuerdo con la edad del individuo, el grado de inmunidad que haya adquirido, el número de parásitos, el estado nutricional y la salud de cada individuo (Meana y Rojo, 1999). Los corderos sufren más severamente la hemoncosis. Entre el ganado de más edad, los mayores efectos se observan en individuos que, por alguna razón, están débiles o sufren de estrés. Las hembras durante la gestación o lactancia presentan cuadros más severos, al igual que los individuos que padecen otras enfermedades, disminuyen su resistencia a la hemoncosis (Quiroz, 1984).

La severidad del cuadro clínico depende de la carga parasitaria, edad de los ovinos, estado nutricional y raza de los ovinos. En general, la hemoncosis produce diferentes grados de anemia, hipoproteinemia, mucosas pálidas, retraso en el crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, edema submandibular, pérdida de apetito, reducción de fertilidad y en algunos casos, muertes en animales jóvenes (Quiroz, 1984; Notter et al., 2003).

Epidemiología

La magnitud de la hemoncosis en un rebaño está determinada por varios aspectos como:

- **Contaminación ambiental con huevos de *H. contortus*.** Aunque las larvas infectantes pueden sobrevivir en condiciones de humedad y temperatura ambientales adecuadas, el hospedador es quien perpetúa la infección año tras año. La infección puede mantenerse como una carga parasitaria baja o como una población latente de larvas hipobióticas, o como ambas situaciones. En la primavera se observa un aumento sustancial en la eliminación de huevos en materia fecal llamado "alza de primavera". Un aumento más pronunciado ocurre comúnmente en ovejas gestantes dos semanas antes del parto y hasta ocho semanas después del mismo, en cualquier época del año este fenómeno es llamado "alza periparto". En ambos fenómenos el número de huevos eliminados por gramo de heces está relacionado principalmente con la maduración de las larvas hipobióticas arrestadas en

ovejas adultas, lo que asegura que nuevas generaciones de L3 estén disponibles en grandes cantidades al momento en que los hospederos estén pastando (Taylor et al., 2016; Bowman, 2014).

- **Desarrollo y supervivencia del estadio infectante.** Con una parte del ciclo de vida desarrollado fuera del hospedador, los factores ambientales juegan un papel muy importante en el éxito del desarrollo embrionario y en la supervivencia de las fases larvianas de vida libre. El desarrollo de los huevos embrionados tiene como factores limitantes la temperatura y la humedad. El rango para el desarrollo de larvas en el ambiente es de 10 a 30 °C. Por otra parte la humedad, es el factor más importante para la supervivencia de los huevos y las larvas, una humedad relativa por debajo del 96% retarda el desarrollo larvario (Meana y Rojo, 1999).
- **Resistencia del hospedador.** En condiciones climáticas adecuadas el número de fases infectantes en la pradera aumenta exponencialmente, por lo menos al inicio de la temporada de pastoreo. Sin embargo, los hospederos comienzan a desarrollar resistencia a *H. contortus* con cada reinfección, produciendo un descenso drástico en la eliminación de huevos en heces en animales expuestos a infecciones y reinfecciones, debido a la expulsión masiva de adultos (Meana y Rojo, 1999). La edad de los hospederos juega un papel importante en la resistencia, ya que los animales jóvenes son más propensos a padecer hemoncosis debido a que su sistema inmune tarda en montar una respuesta efectiva contra los nematodos, mientras que ovinos mayores a un año son más resistentes debido al contacto previo con los parásitos, además de que su sistema inmune ya ha madurado. Por otro lado la comparación de la respuesta inmunológica de diferentes razas de ovinos frente a *H. contortus* ha demostrado que algunas son mucho más resistentes que otras. Estas suelen ser razas autóctonas y rústicas, de regiones tropicales o subtropicales, capaces de tolerar o resistir las enfermedades más habituales en su ambiente. Probablemente esto refleja que estas razas han estado sometidas durante siglos a un proceso de selección natural para la resistencia frente a los parásitos en ausencia de tratamientos antihelmínticos (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013).

Estrategias de control

El control de esta parasitosis se basa casi exclusivamente en la administración de compuestos químicos con actividad antihelmíntica. Sin embargo, el uso masivo e indiscriminado de los antihelmínticos (benzimidazoles, entre otros) ha provocado la aparición de cepas de *H. contortus* resistentes a los mismos, situación que es un problema de grandes dimensiones en aquellos países donde la producción ovina es una de las principales actividades económicas (Van Wyk et al., 1999; Cezar et al., 2010, Torres-Acosta et al., 2012). Aunado al problema de resistencia a los antihelmínticos, se ha incrementado la necesidad de disminuir los residuos de medicamentos en los alimentos para los humanos y el ambiente, lo que obliga a que se generen otras estrategias de control antiparasitario que no dependan del empleo de sustancias químicas. Entre estas estrategias están: el manejo de pastizales, uso de enemigos naturales como hongos nematófagos (*Duddingtonia flagrans*), uso de plantas nutraceuticas, crianza de razas ovinas resistentes, mejora de la nutrición y aplicación de vacunas (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2016).

Respuesta inmune en la hemoncosis ovina

La infección primaria con *H. contortus* en algunos corderos, resulta en una carga parasitaria elevada que puede persistir por meses sin que se lleve a cabo la expulsión de los gusanos. En otros corderos, cuando hay una exposición previa al parásito, se registra una notable reducción de la carga parasitaria en un posterior desafío e incluso hay corderos que desde la primoinfección muestran cargas parasitarias bajas (Balic et al., 2000).

En la protección a la hemoncosis, participan e interactúan tanto factores inespecíficos como específicos del sistema inmune del hospedero. El proceso de expulsión del nematodo por los ovinos inmunizados es la culminación de varios eventos que incluyen: la activación de mecanismos inespecíficos de defensa, el reconocimiento de moléculas del parásito (antígenos somáticos y de excreción/secreción) y la inducción del tipo de respuesta adquirida adecuada (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2016).

En muchos estudios se ha comprobado la capacidad de los helmintos para activar el complemento por la vía alterna y fijar algunas moléculas en su superficie (Meeusen y Balic, 2000). Los péptidos vasoactivos y quimiotácticos (C3a y C5a) que se generan de la

activación del complemento por la larva, movilizan eosinófilos a la zona de infección de manera independiente de los mecanismos específicos (linfocitos CD4+ e IL-5).

La expulsión de las larvas de *H. contortus* en ovinos, puede ser inmediata o tardía. La expulsión inmediata se da cuando la larva antes de internarse en su nicho (glándula abomasal), es atacada por mastocitos tisulares y un tipo especial de mastocitos intraepiteliales, conocidos como leucocitos globulosos. Otros mecanismos importantes en esta expulsión inmediata son: la hipermotilidad, la hipersecreción gástrica y la hiperplasia de células caliciformes con el consecuente aumento en la producción de moco (Balic et al., 2002; Miller, 1996).

La expulsión inmediata del parásito, también está asociada a la presencia en el moco abomasal de histamina y leucotrienos, que inhiben la motilidad de las larvas de nematodos *in vitro*. La histamina ha sido encontrada en mayor concentración en el moco abomasal de ovinos resistentes a la hemoncosis, coadyuva directamente a la expulsión del parásito promoviendo la hipersecreción e hipermotilidad del abomaso, afecta negativamente la fecundidad del gusano y su actividad motriz (Hohenhasus y Outteridge, 1995).

La expulsión tardía de larvas de *H. contortus*, es producida cuando se monta una respuesta inmune específica que ataca a la larva en las glándulas abomasales. Esta acción es regulada por linfocitos T CD4+ y producida por anticuerpos de los isotipos IgA e IgE principalmente, citotoxicidad de eosinófilos dependiente de anticuerpos y activación de la vía clásica del complemento (Balic et al., 2002).

Se ha observado un aumento de eosinófilos tisulares y sanguíneos asociados a la respuesta específica e inespecífica contra nematodos gastrointestinales. La activación de la vía alterna del complemento y la degranulación de mastocitos, son los responsables del aumento y degranulación inespecífica de eosinófilos tisulares que es independiente de IL-5. Durante la degranulación de los eosinófilos se liberan algunos mediadores químicos que promueven el aumento de la permeabilidad, la secreción de moco, la quimiotaxis y la coagulación. La capacidad de los eosinófilos para producir algunas citocinas como IL-4 o IL-10, sugieren una función reguladora de la respuesta inmune (Behm y Ovingon, 2000).

Las infecciones naturales y experimentales con *H. contortus* inducen la producción de anticuerpos específicos. La respuesta por anticuerpos séricos ha sido ampliamente estudiada y los resultados obtenidos han sido variables. Algunos estudios han asociado los niveles de anticuerpos séricos anti-*H. contortus* con la resistencia (Muñoz-Guzmán et al., 2006). Otros estudios solamente han encontrado una asociación de los niveles de anticuerpos con la infección, pero no con la resistencia (Gómez-Muñoz et al., 1999; Amarante et al., 2005). Los anticuerpos abomasales posiblemente son más importantes para la protección contra nematodos gastroentéricos que los anticuerpos séricos. Se ha demostrado que niveles altos de IgA específica en moco abomasal, disminuyen la fertilidad y la longitud promedio de *Teladorsagia circumcincta*, que es otro nematodo abomasal de los ovinos (Martínez-Valladares et al., 2005). También se ha observado una correlación negativa entre la cantidad de IgA específica en moco abomasal y la carga parasitaria en infecciones con *H. contortus* (Amarante et al., 2005).

Una característica típica de las infecciones helmínticas es la inducción de IgE específica, lo cual es el resultado directo de una respuesta tipo Th2. Entre las funciones de la IgE está su participación en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, llevada a cabo por eosinófilos, células cebadas y macrófagos. En ensayos *in vitro*, se ha demostrado la capacidad de esta inmunoglobulina para reconocer alérgenos en la superficie de nematodos y de mediar el ataque de eosinófilos y células cebadas directo a la cutícula del parásito (Van Die et al., 1999). Se ha encontrado un incremento de los niveles de IgE locales asociados a la resistencia a nematodos gastroentéricos en ovinos y caprinos (Pernthaner et al., 2005; Pernthaner 2006; Chevrotière et al., 2012)

La inoculación de larvas de *H. contortus* induce la proliferación de linfocitos T en linfonodos del abomaso, lo que produce el agrandamiento de los mismos y un incremento de linfocitos CD4+ en pared abomasal y en sangre periférica (Gill, 1994; Jacobs et al., 1995; Muñoz-Guzmán, 2007).

Se ha establecido en infecciones experimentales, que los linfocitos CD4+ son requeridos para la inducción de inmunidad en la hemoncosis ovina. La reducción de linfocitos CD4+ a través de anticuerpos monoclonales, abate el estado de inmunidad a *H. contortus* e incrementa la carga parasitaria en ovinos resistentes a la infección. Esto

también suprime la hiperplasia de los mastocitos mucosales, la infiltración por eosinófilos en el tejido abomasal y el desarrollo de la respuesta humoral de memoria (Gill et al., 1993; Peña et al., 2006). En contraparte, la disminución o la presencia de linfocitos CD8+ parece no tener ningún efecto sobre el estado de resistencia en los animales (Balic et al., 2002; Muñoz-Guzmán et al., 2012).

Algunos estudios parecen indicar que la diferencia entre los ovinos susceptibles y resistentes a la hemoncosis depende del tipo de respuesta inmune que montan en contra del parásito. Se ha demostrado un aumento de linfocitos CD4+ después de una infección experimental, tanto en ovinos susceptibles como en ovinos resistentes. Lo anterior indica que ambos grupos responden a la presencia del parásito, sin embargo lo hacen en forma diferenciada. Los ovinos susceptibles producen una mayor cantidad de INF γ , presentan menor cantidad de anticuerpos séricos específicos, eosinófilos sanguíneos y eosinófilos abomasales que los ovinos resistentes, por lo que probablemente presentan una respuesta tipo Th1 (Gill et al., 2000; Muñoz-Guzmán et al., 2006; Shakya et al., 2011). Mientras que los ovinos resistentes montan una respuesta tipo Th2. Además, se ha observado una respuesta diferenciada en distintas regiones abomasales. Muñoz-Guzmán et al., (2012) demostraron en una infección experimental con *H. contortus* que los corderos de una raza resistente presentaron en la región pilórica abomasal una respuesta tipo Th2 (aumento de eosinófilos y linfocitos CD4+) asociada a resistencia, que no fue observada en la región fúndica de estos corderos ni en la mucosa abomasal de los corderos susceptibles.

En una primera infección con *H. contortus*, los linfocitos abomasales de ovinos de razas susceptibles, no son capaces de producir las citocinas asociadas a una respuesta tipo Th2, pero en infecciones posteriores la producción de estas citocinas aumenta. Si bien estos ovinos, no alcanzan los niveles de resistencia que los ovinos genéticamente resistentes, si explica porque los ovinos adultos de razas susceptibles resisten mejor la infección por *H. contortus* (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013).

Por último, se ha demostrado que la nutrición modifica la respuesta inmune a las infecciones por *H. contortus*. Dietas altas en proteínas (superiores a 129 g/kg de materia seca) o la suplementación con algunos microminerales como selenio y cobre parecen

mejorar la respuesta inmune de los ovinos y reducir las cargas parasitarias (Bricarello et al., 2005; Valderrábano et al., 2006; Rocha et al., 2011).

Inmunización contra la hemoncosis

Se han utilizado antígenos ocultos del intestino de adultos de *H. contortus* para inducir inmunidad. Estos antígenos inducen a través de una respuesta tipo Th2 la producción de anticuerpos séricos de los ovinos, los cuales son ingeridos junto con el resto de los componentes sanguíneos por los nematodos en el momento de alimentarse. Los anticuerpos ingeridos reconocen los antígenos intestinales y alteran el funcionamiento digestivo (Knox et al., 2003). Los antígenos intestinales mejor caracterizados y más efectivos son los complejos enzimáticos conocidos como H11 y H-gal-GP. La combinación de estos antígenos que han sido obtenidos directamente de gusanos adultos, produce una protección sustancial contra la infección natural por *H. contortus* en ovinos (Smith et al., 2001; LeJambre et al., 2008; Cachat et al., 2010). Sin embargo, la corta duración de la protección inducida y la dificultad para la producción de los inmunógenos a gran escala, son las principales limitantes que han dificultado su uso comercial. Los intentos de inmunización con estos mismos antígenos expresados en forma recombinante en *Escherichia coli* y células intestinales de insectos, han sido infructuosos (Smith y Zerlenga, 2006; Cachat et al., 2010).

Se han evaluado otras fracciones antigénicas como inmunógenos. Molina et al. (2012), inmunizando con fracción enriquecida con una cistein proteasa obtenida a partir de gusanos adultos de *H. contortus* y Fawzi et al., (2014) inmunizando con la proteína somática Hc23, protegieron ovejas y cabras en una infección experimental con el parásito. Los antígenos de 70-83 kDa obtenidos de la superficie de larvas desnudas y los antígenos de excreción/secreción de 15 y 24 kDa han demostrado producir algún grado de protección (Schalling et al., 1997; Jacobs et al., 1999).

Debido a la dificultad para obtener suficiente cantidad de antígenos de *H. contortus*, se ha intentado recurrir a otras estrategias de inmunización, como el uso de mimótopos del parásito. En este sentido, Vázquez (2016) obtuvo, identificó y caracterizó epítomos inmunodominantes de la L3 de *H. contortus*, seleccionados con anticuerpos heterólogos, a

partir de bibliotecas combinatorias de *Phage Display*, para esto, primero se obtuvieron sueros hiperinmunes en conejos contra antígenos de L3 de *H. contortus*, después con ellos se seleccionaron clonas a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos en *Phage Display*, una vez obtenidas se realizó la caracterización genética y peptídica. Posteriormente, seleccionó 5 clonas para ser inoculadas en conejos y obtener anticuerpos. Los sueros de estos conejos se emplearon en ensayos de ELISA e inmunotransferencia para evaluar su reactividad contra antígenos nativos del parásito adulto y L3. La mayoría de los antisueros de los conejos inoculados con las clonas seleccionadas reaccionaron contra antígenos de L3 y adulto, indicando que los péptidos seleccionados mimetizan antígenos naturales del parásito, conservados en diferentes fases de desarrollo. En este trabajo se evaluó el potencial inmunogénico de estos mimótopos de *H. contortus* en ovinos (hospedador natural).

JUSTIFICACIÓN

La hemoncosis es una enfermedad de gran importancia económica en los rebaños ovinos. La presencia de cada vez más cepas de *H. contortus* resistentes a los fármacos antihelmínticos hace necesario buscar otras alternativas de control. La vacunación es una de ellas y es por eso que se requiere buscar e identificar proteínas inmunogénicas de *H. contortus* que puedan ser utilizadas como blanco de la respuesta inmune y de esta forma hacer un mejor control de esta importante enfermedad.

Se ha propuesto que algunos mimótopos podrían ser utilizados como inmunógenos. Una serie de mimótopos de *H. contortus* fue obtenida a partir de una biblioteca de fagos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (Vázquez, 2016). Estos mimótopos demostraron ser inmunogénicos y producir anticuerpos que reaccionan contra antígenos del parásito en conejos. Sin embargo, antes de plantear ensayos de protección en ovinos es necesario evaluar si estos mimótopos son capaces de inducir una respuesta inmune contra antígenos de larva 3 de *H. contortus* en el hospedador definitivo.

HIPÓTESIS

Si se administran a ovinos mimótomos de *H. contortus* obtenidos a partir de una biblioteca de fagos, estos ovinos producirán anticuerpos séricos capaces de reconocer antígenos naturales obtenidos de la L3 del parásito.

OBJETIVO

Identificar por la técnica de Western blot y ELISA antígenos de la larva 3 de *H. contortus* que son reconocidos por anticuerpos séricos de la clase IgG de ovinos inoculados experimentalmente con mimótopos del parásito desarrollados en una biblioteca de fagos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de realización

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos (laboratorio 1) de la Unidad de investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. Los animales se mantuvieron en los corrales de posgrado de la misma facultad.

Animales

Se usaron 20 ovinos machos, de la raza Columbia de aproximadamente seis meses de edad, criados desde su nacimiento en condiciones libres de la infección por nematodos gastroentéricos y sin eliminación de huevos en heces al inicio del experimento. Estos, fueron distribuidos en cuatro grupos conformados por cinco animales cada uno y se mantuvieron en confinamiento total en una corraleta por grupo. La alimentación fue a base de alfalfa achicalada (4% de su peso vivo) y agua *ad libitum*.

Clonas

Las clonas (mimótopos) expresadas en fagos M13mp19 utilizadas en este trabajo, fueron seleccionadas y caracterizadas en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Estas clonas fueron donadas por el Dr. Rogelio Alonso Morales para el presente estudio. El número de identificación y la secuencia peptídica de cada mimótopo se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Número de identificación y secuencia peptídica de los mimótopos de *H. contortus* utilizados en el presente estudio.

| Clona | Secuencia de aminoácidos |
|--------------|---------------------------------|
| 7 | EPNNGDGSWRWL |
| 8 | TFPMTYQSLSN |
| 13 | LFAYWWNGVRGP |
| 14 | CTNANHYFC |

Diseño experimental para inmunización con mimótopos

La selección de las combinaciones de clonas utilizadas en este estudio, se realizó con base a las combinaciones de clonas más inmunogénicas observadas en un estudio previo en conejos (Vázquez, 2016) y a la disponibilidad de corderos.

Los corderos fueron distribuidos en 4 grupos (n=5). En las semanas cero, dos y cuatro del experimento, los corderos del grupo 1 recibieron subcutáneamente 200 µg de un *pool* de las clonas de mimótopos identificadas como 7, 8, 13 y 14. Los corderos del grupo 2 recibieron subcutáneamente 200 µg de un *pool* las clonas de mimótopos identificadas como 13 y 14. Los corderos del grupo 3 recibieron subcutáneamente 200 µg de la clona original (no seleccionada) M13mp19. Los corderos del grupo 4 solo recibieron un placebo y fueron utilizados como grupo control negativo. Semanalmente se obtuvo suero de todos los corderos, durante las 6 semanas que duro el experimento. Se midieron por ELISA los

niveles de IgG anti-antígenos de L3 de *H. contortus* en las semanas -2, 0, 2, 4 y 6 del experimento. En la semana 6 del experimento se determinó por Western Blot los antígenos de L3 de *H. contortus* reconocidos por los sueros de los corderos experimentales.

Toma de muestras

Las muestras de sangre se tomaron semanalmente de la yugular de los animales en tubos vacutainer sin anticoagulante, posteriormente fueron centrifugadas para obtener el suero. Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

Parásitos

Las L3 de *H. contortus* se obtuvieron a partir de las heces de un cordero donador infectado con una cepa pura de *H. contortus*, aislada y mantenida en la FES Cuautitlán (Valdez-Ramírez, 2004). Directamente del recto se tomaron heces del ovino infectado, estas fueron colocadas en la base de cajas de Petri chicas (10 cm diámetro), las cuales fueron colocadas en cajas de Petri grandes (15 cm diámetro) y en el espacio restante se agregó agua, los cultivos se taparon e incubaron a 26-28 °C durante 7 días. Finalmente, las larvas se colectaron a partir del líquido presente entre las dos cajas o por medio de la técnica de Baermann (Alba, 2007).

Obtención de antígenos de L3 de *H. contortus*

La suspensión con L3 recuperadas se centrifugó en un gradiente de sacarosa (8 mL de solución de sacarosa al 40% mas 2 mL de suspensión de larvas) a 2000 g durante 5 minutos. Se recuperaron cuidadosamente las larvas de la interfase y se lavaron tres veces con agua destilada por centrifugación a 640 g durante 5 minutos (Gutiérrez-Amézquita, 2018). Por último, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de solución de lisis (inhibidor de proteasas 1 mg, Tritón 100X 10 µl agua desionizada cbp 1 mL). La suspensión se congeló en un mortero a -80 °C y posteriormente se maceró, este

proceso se repitió 3 veces. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 12,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante (donde se encuentran las proteínas) fue separado y filtrado a través de membranas de 0.22 μm . Finalmente, se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford y fue mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Muñoz-Guzmán, 2007).

ELISA

Se utilizó la técnica estandarizada y descrita por Muñoz-Guzmán, et al. (2006). Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con 50 μL de una solución de 2.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno de L3 de *H. contortus* en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6, incubando la placa durante toda la noche a 4°C . Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1% y se bloquearon con albúmina sérica bovina al 5% a 4°C durante toda la noche. Al otro día las placas se volvieron a lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1% y una vez con agua desionizada, se secaron y se almacenaron en congelación hasta su uso. En las placas sensibilizadas se agregaron 5 μL de suero problema (1:400) por pozo y se incubaron durante dos horas a 37°C . Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.1%, por pozo se agregaron 50 μL de un conjugado de conejo anti-IgG de ovino marcado con peroxidasa (1:5000) y se incubaron durante una hora a 37°C . Se lavaron las placas con PBS-Tween 0.1% y se agregaron 100 μL de una solución de OPD al 5% y peróxido de hidrógeno 0.01% en buffer de citrato. La reacción se paró a los 15 minutos con una solución de ácido orto-fosfórico 6% y finalmente las placas fueron leídas a 492 nm en un lector de ELISA.

Todos los sueros se probaron en dos pozos con antígeno y dos pozos sin antígeno, el promedio del valor en D.O. resultado de estos pozos sin antígeno fue sustraído al resultado de los pozos probados con el mismo suero en presencia del antígeno, lo anterior fue realizado para restar la reacción inespecífica y obtener la absorbancia específica (AbsE). Como control positivo, en cada placa se obtuvo la AbsE del suero de un cordero infectado experimentalmente con *H. contortus*. Los datos por duplicado de los sueros fueron promediados y posteriormente transformados a valores de porcentaje de absorbancia (% Abs) tomando como referencia el control positivo utilizado en cada placa mediante la siguiente fórmula (Muñoz-Guzmán et al., 2010; Alvarez-Guerrero et al., 2011).

$$\% \text{ Abs} = \frac{\text{AbsE del suero problema}}{\text{AbsE del suero control positivo}} \times 100$$

Western blot

Los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), la electrotransferencia y el Western Blot (WB) se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Coligan et al. (1994) y modificada por Muñoz-Guzmán et al. (2006). Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% para la separación electroforética de las proteínas (76 µg por gel) de L3 de *H. contortus*. Las proteínas se transfirieron pasivamente a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con leche descremada al 5% y cortó en tiras de 5 mm. Cada tira se incubó con una dilución 1:10 de suero de ovinos durante toda la noche. El día siguiente las tiras se lavaron 5 veces con PBS Tween al 0.3% y se incubaron en agitación con un mL de conjugado anti IgG ovino (1:500) durante 2 horas. Posteriormente se lavaron 7 veces con PBS Tween al 0.3%. Finalmente se incubaron con 1 mL de solución reveladora (peróxido de hidrogeno 0.01%, 4-cloro-naftol 0.05%, metanol 40% en solución tris-base pH 7.5) hasta la aparición de las bandas.

Análisis estadístico

Los % Abs de los niveles de IgG en la prueba de ELISA fueron comparados mediante ANOVA para muestras repetidas usando el programa Statistica for Windows®.

RESULTADOS

Los promedios de los % Abs contra antígenos de L3 de *H. contortus* obtenidos de los sueros de los corderos de los diferentes grupos, se muestra en las figuras 1, 2 y 3. Se observaron algunas diferencias numéricas entre los grupos durante los diferentes días del

experimento, sin embargo, no fueron significativas en ningún momento del experimento ($p > 0.05$).

Figura 1.- Promedio % Absorbancia específica de producción de IgG anti-L3 de *Haemonchus contortus* en los corderos Columbia de los cuatro grupos (n=5) al inicio del experimento (semana cero). No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre los cuatro grupos.

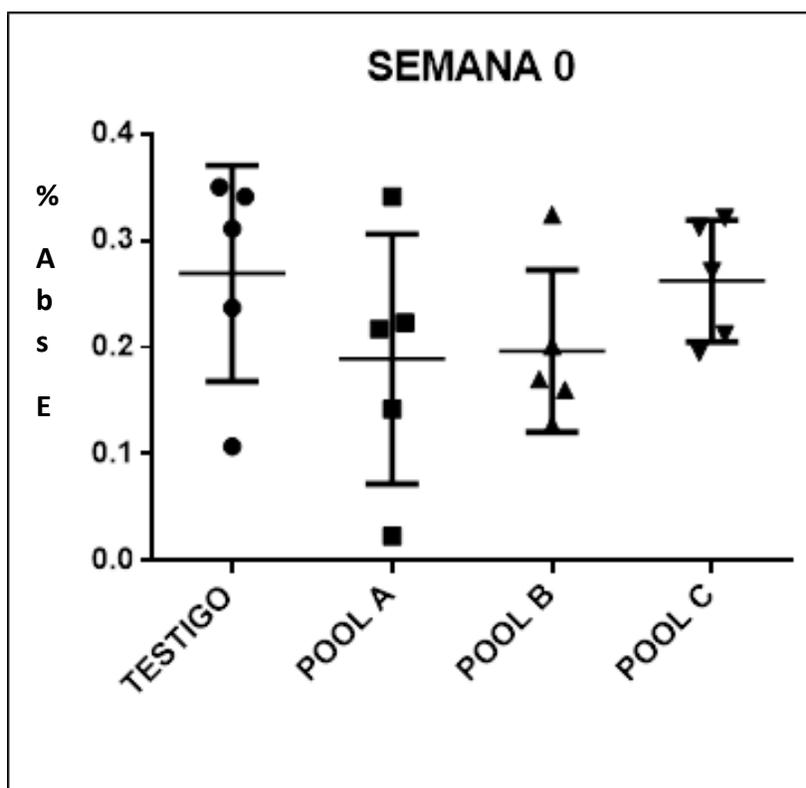


Figura 2.- Promedio del % Absorbancia específica de producción de IgG anti-L3 de *Haemonchus contortus* en diferentes grupos corderos Columbia (n=5), seis semanas después de la administración subcutánea de diferentes clonas de mimótopos de L3 de *Haemonchus contortus*. Los corderos del grupo 1 recibieron un pool de las clonas identificadas como 7, 8, 13 y 14. Los corderos del grupo 2 recibieron un pool las clonas de mimótopos identificadas como 13 y 14. Los corderos del grupo 3 recibieron la clona original (no seleccionada) M13mp19. Los corderos del grupo 4 solo recibieron un placebo y fueron utilizados como grupo control negativo. No se observaron diferencias ($p>0.05$) entre los cuatro grupos.

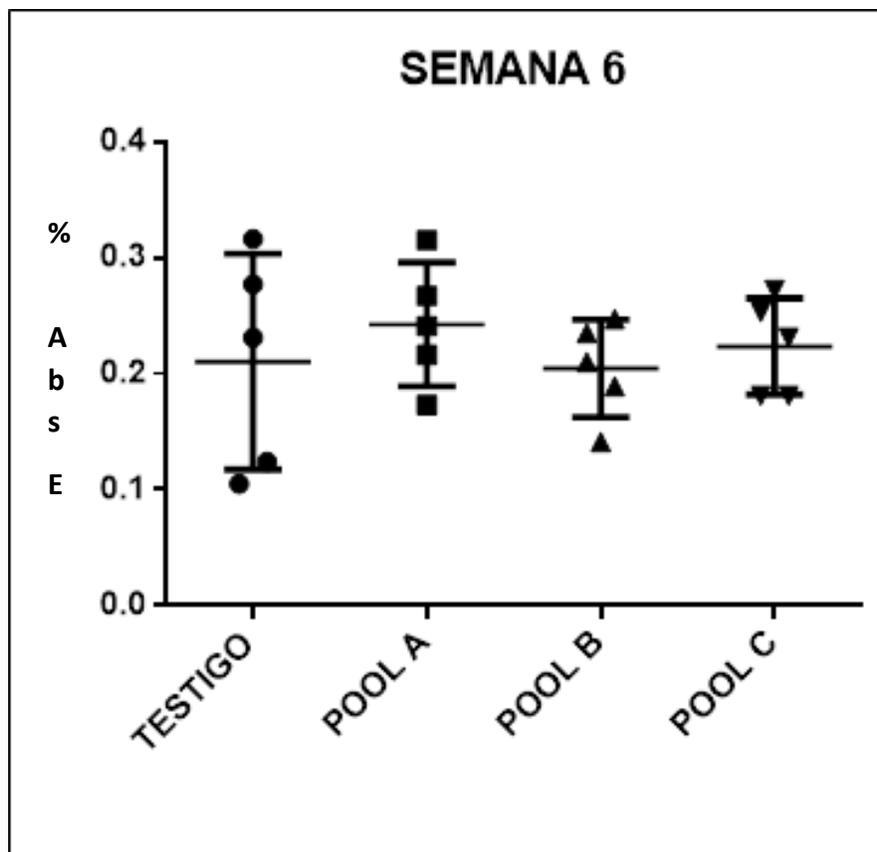
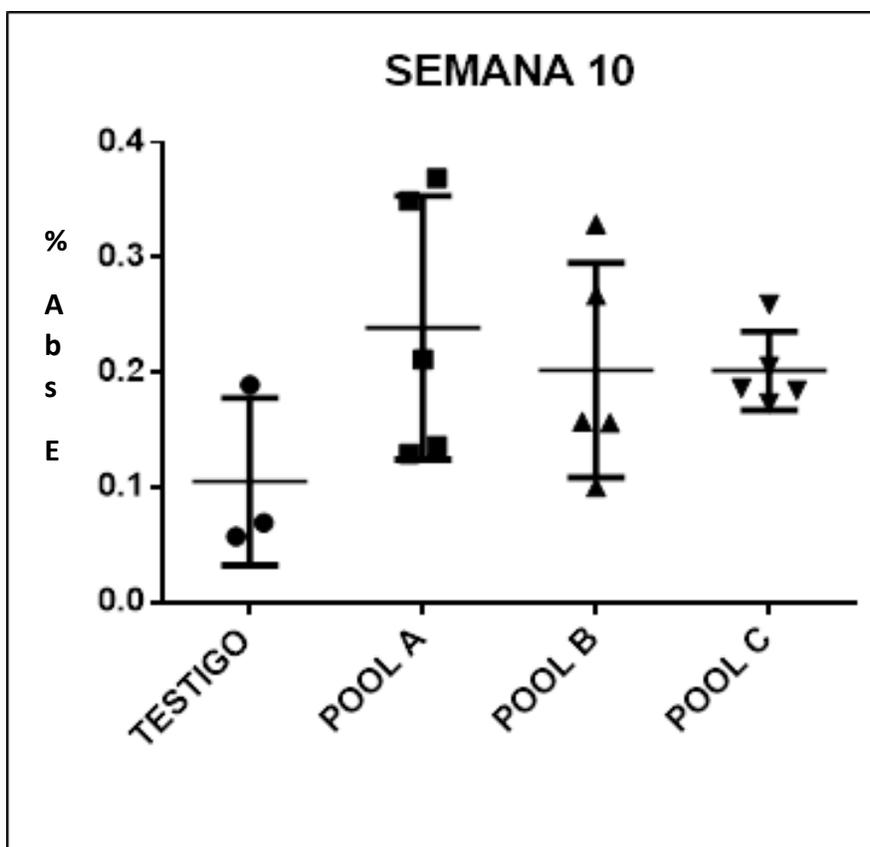


Figura 2.- Promedio del % Absorbancia específica de producción de IgG anti-L3 de *Haemonchus contortus* en diferentes grupos corderos Columbia (n=5), diez semanas después de la administración subcutánea de diferentes clonas de mimótopos de L3 de *Haemonchus contortus*. Los corderos del grupo 1 recibieron un pool de las clonas identificadas como 7, 8, 13 y 14. Los corderos del grupo 2 recibieron un pool las clonas de mimótopos identificadas como 13 y 14. Los corderos del grupo 3 recibieron la clona original (no seleccionada) M13mp19. Los corderos del grupo 4 solo recibieron un placebo y fueron utilizados como grupo control negativo. No se observaron diferencias ($p>0.05$) entre los cuatro grupos.



Abs E.- Absorbancia específica

El número de corderos de cada grupo que reconocieron los antígenos de L3 de *H. contortus* en la semana 6 del experimento se presentan en el cuadro 2. Los sueros solo reconocieron bandas de 33 y 37 kDa.

Cuadro 2.- Número de corderos que reconocieron antígenos de larva 3 de *H. contortus* en la semana 6 del experimento en los diferentes grupos experimentales.

| GRUPO | 37 kDa | 33 kDa |
|--------------|---------------|---------------|
| 1 | 2 | 1 |
| 2 | 1 | 1 |
| 3 | 2 | 1 |
| 4 | 1 | 0 |

DISCUSIÓN

La hemoncosis es una enfermedad de gran importancia económica en los rebaños ovinos de México. La presencia de cepas de *H. contortus* resistentes a los fármacos antihelmínticos hace necesario la continua búsqueda de otras alternativas de control como puede ser el desarrollo de vacunas. Por lo anterior, se requiere buscar e identificar antígenos de *H. contortus* que pudieran estimular la respuesta inmune contra la hemoncosis y lograr reducir los efectos de la enfermedad.

En un estudio previo realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (Vázquez, 2016), se identificaron y caracterizaron epítomos inmunodominantes de la L3 de *H. contortus*, seleccionados con anticuerpos heterólogos, a

partir de bibliotecas combinatorias de *Phage Display*, para esto, primero se obtuvieron sueros hiperinmunes en conejos contra antígenos de L3 de *H. contortus* y con ellos se seleccionaron 4 clonas a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos en *Phage Display*, una vez obtenidas se determinó su secuencia genética y nucleotídica. Las propiedades antigénicas de las clonas fueron evaluadas por ELISA, los antisueros de conejos inoculados con clonas seleccionadas, en su mayoría reaccionaron contra antígenos de L3 y antígenos de la fase adulta, indicando que los péptidos seleccionados corresponden a mimótopos naturales del parásito que son conservados en estas fases de desarrollo. Sin embargo, los resultados anteriores se obtuvieron en conejos que no son hospedadores naturales, por lo que en este estudio se evaluó la antigenicidad de los mismo mimótopos en ovinos, que son los hospedadores habituales de *H. contortus*. Es importante realizar este tipo de estudios antes de intentar realizar estudios de protección inducida con estos mimótopos.

Se ha asociado la presencia de anticuerpos específicos con la resistencia inducida contra la hemoncosis experimental (Gómez-Muñoz et al., 1999; Muñoz-Guzmán et al., 2006). En el presente estudio se inocularon dos grupos de corderos con dos diferentes mezclas de las clonas, la producción de anticuerpos fue variable y no se observó un aumento ($p > 0.05$) de anticuerpos específicos en ninguno de los grupos de corderos inoculados con los mimótopos. Los resultados anteriores indican que si bien, los mimótopos utilizados fueron capaces de inducir respuesta específica contra L3 de *H. contortus* en conejos, estas clonas bajo las condiciones de este experimento no produjeron una respuesta específica por anticuerpos contra L3 de *H. contortus* en los corderos evaluados.

La prueba de Western blot se utiliza para evaluar el perfil de antígenos de un agente etiológico que son reconocidos por el suero de un hospedador. Se ha demostrado que la infección experimental con *H. contortus* en corderos estimula la producción de anticuerpos contra hasta 11 diferentes antígenos (416, 298, 182, 114, 95, 78, 57, 45, 39, 29 y 19 kDa) de L3 de *H. contortus* (Muñoz-Guzmán et al., 2006). En el presente estudio, solo algunos corderos reconocieron en la semana 6 post-infección antígenos de 33 y 37 kDa que probablemente correspondan a los de 29 y 39 kDa anteriormente reportados. Por otro lado, algunos corderos de los grupos testigos reconocieron estos mismos antígenos (grupos C y D), lo que sugiere que el reconocimiento fue inespecífico.

El reconocimiento e intensidad de la respuesta contra un antígeno depende de algunos factores, entre los que se encuentran: naturaleza del antígeno, cantidad del antígeno, vía de administración, presencia de adyuvantes, especie, edad y raza del hospedador. Los mimótopos utilizados a las mismas concentraciones de este estudio, indujeron un aumento significativo de anticuerpos específicos contra L3 de *H. contortus* en conejos (Vazquez, 2016), sin embargo, esto no fue observado en ovinos. A primera vista, lo anterior, podría deberse a que son especies diferentes con sistemas diferentes de reconocimiento antigénico. Otros factores probablemente involucrados en la falta de respuesta pueden ser, el tamaño y peso del modelo animal (ovinos 40-50 kg contra conejos de 2 kg).

Si bien, la inoculación de los mimótopos no indujo un aumento de la respuesta inmune contra *H. contortus* en los corderos, esto no implica desechar esta estrategia para estimular una respuesta inmune protectora. Algunos ajustes que se pueden hacer al modelo son: aumento de la concentración de antígeno (mimótopos), uso de adyuvantes, aumento de número de aplicaciones y desarrollo de nuevos mimótopos de *H. contortus*. Por lo anterior, antes de realizar ensayos de protección contra la hemoncosis con mimótopos, es necesario desarrollar estrategias para lograr un aumento de la respuesta inmune posterior a la administración de los mimótopos.

CONCLUSIONES

- La administración de los mimótopos utilizados no indujo un aumento significativo de anticuerpos específicos contra *H. contortus* en corderos.
- La administración de los mimótopos utilizados no indujo un reconocimiento específico de antígenos de L3 de *H. contortus*.
- Se deben mejorar la estrategia de administración de los mimótopos para tratar de inducir una respuesta inmune específica antes de intentar ensayos de protección.

BIBLIOGRAFIA

1. Alba F. 2007. Parasitología veterinaria, Manual de laboratorio. FES-Cuautitlán, UNAM.
2. Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A. 2013. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *BioMed research international*, 2013.
3. Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A. 2016. Diferencias inmunológicas entre ovinos susceptibles y resistentes a la hemoncosis ovina. En: C. Hallal-Calleros; FI Flores-Pérez; J.A. Orihuela; J. Morales Montor (Editores). *Regulación Neuroinmunoendocrina Hospedero-Parásito*. Redes Editores, México. Pp 303-318.
4. Alvarez-Guerrero, C., Muñoz-Guzmán, M.A., Buendía-Jiménez, J.A., Alba-Hurtado, F. 2011. *Gnathostoma binucleatum*: Pathological and parasitological aspects in experimentally infected dogs. *Experimental Parasitology*, 127, 84-89.
5. Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A. Huntley, J.F. Mazzolin, L.P., Gomes J.C., 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology*, 128, 99-107.
6. Angulo-Cubillán, F.J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., Fuente, C.D.L., Alunda, J.M. 2007. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Revista Científica*, 17, 577-587.
7. Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T. 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infection in ruminants. *Advances in Parasitology*, 45,181-241.
8. Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology*, 24,39-46.
9. Behm, C.A., Ovington, K.S., 2000. The role of eosinophils in parasitic helminthes infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitology Today*, 16, 202-209.

10. Blitz, N., Gibbs, H., 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-I; The induction of arrested development. *International Journal for Parasitology*, 2, 5-12.
11. Bowman, D., 2014. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 10ed., Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
12. Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdijk, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M. 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Veterinary Parasitology*, 134, 99-109.
13. Buzatti, A., Fernandez, A.D., Arenal, A., Pereira, E., Monteiro, A.L.G., Molento, M.B., 2018. Sheep polyclonal antibody to map *Haemonchus contortus* mimotopes using phage display library. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27, 183-190.
14. Cachat, E., Newlands, G.F.J., Ekoja, S.E., McAllister, H., Smith, W.D., 2010. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunology*, 32, 414-419.
15. Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 173, 157-160.
16. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W., 1994. *Current protocols in immunology*. Vol. 2. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
17. Cuéllar, O.J.A. 1986. Nematodiasis gastroentérica. En: Pijoan P, Tórtora-Pérez J. *Principales enfermedades de los ovinos y caprinos*. México.
18. Chevrotière, C., Bambou, J.C., Arquet, R., Jacquiet, P., Mandonnet, N., 2011. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. *Veterinary Parasitology*, 186, 337-343.
19. Fawzi, E.M., González-Sánchez, M.E., Corral, M.J., Cuquerella, M., Alunda, J.M., 2014. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *International Journal for Parasitology*, 44, 429-36.

20. Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J., 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology*, 99, 458-463.
21. Gill, H.S., 1994. Cell-mediated immunity in Merino lambs with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 24, 749-756.
22. Gill, H.S. Watson, D.L., Brandon, M.R., 1993. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology*, 78, 43-49.
23. Gómez-Muñoz, M.T., Cuquerella, M., Gómez-Iglesias, L.A., Méndez, S., Fernández-Pérez, F.J., De La Fuente, C., Alunda, J.M., 1999. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Veterinary Parasitology*, 81, 281-293.
24. Gutiérrez-Amézquita, R.A., Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Nava-Castro, K.E., Ramírez-Álvarez, H., Cuenca-Verde, C., Morales-Montor, J., Alba-Hurtado, F., 2017. Progesterone inhibits the in vitro L3/L4 molting process in *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 248, 48-53.
25. Hohenhaus, M.A., Outteridge, P.M., 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *British Veterinary Journal*, 151, 119-140.
26. Jacobs, H. J., Ashman, K., Meeusen, E.N.T., 1995. Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48, 323-332,.
27. Jacobs, H. J., Wiltshire, C., Ashman, K., Meeusen, E.N.T., 1999. Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine*, 17, 362-368.
28. Knox, D.P., Redmond, D.L., Newlands, G.F., Skuce, P.J., Pettit, D., Smith, W.D., 2003. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*, 33, 1129-1137.
29. Le Jambre, L.F., 1995. Relationship of Blood loss to Worm numbers, biomasa and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. *International Journal for Parasitology*, 25, 269-273.

30. Le Jambre, L.F., Windon, R.G., Smith, W.D., 2008. Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Veterinary Parasitology*, 153, 302-312.
31. Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, M.P., Cruz-Rojo, M.A., Rojo-Vázquez, F.A., 2005. Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunology*, 27, 213-218.
32. Meana, M.A., Rojo-Vázquez, F.A. 1999. Tricostrogilosis y otras nematodiasis. En: Cordero del Campillo M., Rojo-Vázquez F.A. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
33. Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. *Parasitology Today*, 16, 95-101.
34. Miller, H.R.P., 1996. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, Can it be harnessed?. *International Journal for Parasitology*, 26, 801-811.
35. Molina, J.M., Martín, S., Hernández, Y.I., González, J.F., Ferrer, O., Ruiz, A., 2012. Immunoprotective effect of cysteine proteinase fractions from two *Haemonchus contortus* strains adapted to sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 188, 53-59.
36. Muñoz-Guzmán, M.A., 2007. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Haemonchus contortus* en razas ovinas de alta y baja susceptibilidad. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México.
37. Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F., 2010. Antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* reconocidos por cachorros del área metropolitana de la Ciudad de México. *Veterinaria México*, 41, 59-64.
38. Muñoz-Guzmán, M.A., Cuéllar-Ordaz, J.A., Valdivia-Anda, A.G., Buendía-Jiménez, J.A., Alba-Hurtado, F., 2006. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. *Canadian Journal of Animal Science*, 86, 363-371.
39. Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2012. Differential immune response between fundic and pyloric

abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 185, 175-180.

40. Notter, D.R., Andrew, S.A., Zajac, A.M., 2003. Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose of infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, 47, 221-225.
41. Peña, M.T., Miller, J.E., Horohov, D.W. 2006. Effect of CD4+ lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 138, 240-246,
42. Pernthaner, A.S., Cole, A., Morrison, L., Hein, W.R., 2005. Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infection and Immunity*, 73, 2175-2183.
43. Pernthaner, A.S., Cole, A., Morrison, L., Green, R., Shaw R.J., Hein, W.R., 2006. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114, 135-148.
44. Quiroz, R.H., 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. LIMUSA, México D.F.
45. Rocha, R.A., Bricarello, P.A., Silva M.B., et al, 2011. Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 181, 229-238.
46. Schallig, H.D.F., Van Leeuwen, M.A.W., Verstrepen, B.E., Cornelissen, A.W.C., 1997. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88, 203-213.
47. Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D., 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Veterinary Parasitology*, 181, 239-247.
48. Smith, W.D., Van Wyk, J.A., Van Strijp, M.F., 2001. Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture," *Veterinary Parasitology*, 98, 285-297.

49. Smith, W.D., Zarlenga, D.S., 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139, 347-359.
50. Soulsby, E.J.L., 1988. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 7ª edición. Interamericana, México D.F.
51. Sutherland, I., Scott, I., 2010. *Gastrointestinal nematodes in sheep and cattle*. Waley-Blackwell, India.
52. Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2016. *Veterinary parasitology*. 4th ed. Blackwell, London.
53. Torres-Acosta, J. F. J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A. J., Cuéllar-Ordaz, J. A. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary parasitology*, 189(1), 89-96.
54. Valderrábano, J., Gomez-Rincón, C., Uriarte, J., 2006. Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 141,122-131.
55. Valdez-Ramírez, L., 2004. Aislamiento de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
56. Van Wyk, J.A., Van der Merwe, J.S., Vorster, R.J., Viljoen, P.G., 1999. Antihemintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66, 273-284.
57. Vázquez, B.J.E., 2016. Selección y caracterización de clonas inmunodominantes obtenidas por *Phage Display* como mimótopos candidatos de larva 3 de *Haemonchus contortus*. Tesis Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México.