



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Cuantificación de citocinas en cultivos linfocitarios de
corderos Columbia inoculados con un extracto de *Taenia*
hydatigena e infectados con *Haemonchus contortus*.

Tesis

Que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Gabriel Alejandro Ramírez Salvatierra

ASESOR: Dr. Fernando Alba Hurtado

COASESOR: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales 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 La Tesis:

Cuantificación de citocinas en cultivos linfocitarios de corderos Columbia inoculados con un extracto de Taenia hydatigena e infectados con Haemonchus contortus

Que presenta el pasante: GABRIEL ALEJANDRO RAMÍREZ SALVATIERRA
Con número de cuenta: 30026520-2 para obtener el Título de: Médico Veterinario 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 HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de junio de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
VOCAL	M.V.Z. Blanca Rosa Moreno Cardenti	
SECRETARIO	Dr. Fernando Alba Hurtado	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Rocío Silva Mendoza	
2do SUPLENTE	Dra. Cynthia González Ruiz	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
HHA/Vc

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco la culminación de éste trabajo:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir sus puertas y brindarme las herramientas para dar un paso más en la vida.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por ser la institución que me ha permitido crecer como persona, y realizar un sueño más.

A mi asesor, el Dr. Fernando Alba Hurtado, por apoyarme con sus conocimientos y sus consejos. Y que tal vez sin intención me dio un gran consejo de vida: “Lo que paso ya fue... Ahora sólo tienes que ver hacia adelante”.

A mi coasesor, el Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán. Por su gran paciencia, y su disposición en todo momento.

Al M. en C. César Cuenca Verde, por su apoyo técnico y su incondicionalidad.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez; por su apoyo técnico en la realización del trabajo.

Al proyecto PAPIIT, UNAM IN-221515 y IN-222316, que financiaron parcialmente éste trabajo, haciéndolo posible.

DEDICATORIAS:

Dedico éste trabajo:

A mis padres, Luciano Ramírez Rodríguez, y María del Carmen Salvatierra Ruiz; que siempre creyeron en mí, y en ningún momento me soltaron. Por darme la fuerza para llegar hasta aquí.

A mi esposa, Rosalina Adriana Orozco León, por su paciencia y tolerancia. Por ser una excelente compañera en esto, y por siempre creer en mí, por ser una mujer auténtica y amorosa, hasta el día de hoy.

A mi tío Gerónimo Bautista (QEPD) y su familia, por haberme abierto las puertas de su negocio, y haberme apoyado con la obtención de muestras para el proyecto.

A mi hermano Luciano (QEPD), que me enseñó que siempre puedes disfrutar lo que haces.

A mi hermano Armando, Que me mostró que cuando te intencionas, haces las cosas excelentes.

A mis hermanos Norberto y Aurora. Para ser fuente de inspiración a que logren sus sueños.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
CUADRO DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 GENERALIDADES DE <i>Haemonchus contortus</i>	1
1.2 CICLO BIOLÓGICO.....	1
1.3 PATOGENIA DE LA HEMONCOSIS OVINA.....	2
1.4 CONTROL.....	3
1.5 INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	4
1.5.1 Respuesta tipo Th1.....	4
1.5.2 Respuesta tipo Th2.....	4
1.5.3 Citocinas.....	5
1.5.4 Interferón gamma (IFN γ).....	6
1.5.5 Interleucina 4 (IL-4).....	7
1.6 RESPUESTA INNATA A <i>H. contortus</i>	8
1.7 RESPUESTA ESPECÍFICA A <i>H. contortus</i>	9
1.8 PROTECCIÓN INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE <i>Taenia hydatigena</i>	11
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. GENERAL.....	14
3.2. PARTICULARES.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. UBICACIÓN.....	15
4.2. ANIMALES.....	15
4.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE METACESTODO DE <i>Taenia hydatigena</i>	15

4.4. OBTENCIÓN DE INÓCULOS DE L3 DE <i>H. contortus</i>	16
4.5. CULTIVO CELULAR.....	16
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
4.7. MEDICIÓN DE IFN γ	17
4.8. MEDICIÓN DE IL-4.....	18
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	23
7. CONCLUSIONES.....	26
8. REFERENCIAS.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de eliminación de huevos en materia fecal de corderos únicamente inoculados con L3 de *H. contortus* (L3) el día cero del experimento y corderos que previo a la inoculación con larvas de *H. Contortus* se les administró un extracto vesicular de larvas de *Taenia hydatigena* (EXMTh+L3). Se observaron diferencias estadísticas ($p<0.05$) únicamente la semana 7 del experimento.....25

Figura 2: Cantidad de IL-4 (medida por ELISA) producida por linfocitos de linfonodo abomasal de corderos con diferentes tratamientos. Grupo 1 corderos no tratados. Grupo 2 corderos infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 3 corderos tratados con un EXMTh e infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 4 corderos tratados con un EXMTh. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p<0.05$).....26

Figura 3: Cantidad de INF γ (medida por ELISA) producida por linfocitos de linfonodo abomasal de corderos con diferentes tratamientos. Grupo 1 corderos no tratados. Grupo 2 corderos infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 3 corderos tratados con un EXMTh e infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 4 corderos tratados con un EXMTh. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p<0.05$).....27

ABREVIATURAS

Ag: Antígeno

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (inmunoensayo ligado a enzima)

EXMTh: Extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena*.

hgh: Huevos por gramo de heces

IFN γ : Interferón gamma

IL-13: Interleucina 13

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

L3. Larva 3 de *Haemonchus contortus*.

L4: Larva 4

p.i: pos-infección

PHA: fitohemaglutinina

UIMSA: Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal

RESUMEN

Haemonchus contortus es el nematodo gastrointestinal más importante en ovinos, deteriora el estado de salud de los animales y causa importantes pérdidas económicas. Se ha demostrado que la inoculación de un extracto de *Taenia hydatigena* en corderos induce protección contra la hemoncosis. En el presente estudio se evaluó la relación del interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) y la interleucina 4 (IL-4) producidas *in vitro*, con la protección inducida contra *H. contortus* en corderos susceptibles a la hemoncosis (raza Columbia). Veinte corderos Columbia fueron divididos en cuatro grupos ($n=5$); el grupo 1 no recibió tratamiento; el grupo 2 fue inoculado con 5000 L3 de *H. contortus*; el grupo 3 fue inoculado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* y posteriormente infectado con 5000 L3 de *H. contortus* y el grupo 4 fue inoculado solo con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (EXMTh). Semanalmente se contó el número de huevos de *H. contortus* por gramo de heces (hgh) en los grupos experimentales infectados con *H. contortus*. Los corderos fueron sacrificados a la semana 7 p.i., se obtuvieron los linfonodos abomasales y se realizaron cultivos celulares, los cuales fueron estimulados con antígenos de L3 de *H. contortus* y con fitohemaglutinina. En los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinó por ELISA en sándwich la concentración de cada citocina. Los resultados mostraron un menor conteo ($p<0.05$) de hgh en los corderos infectados con *H. contortus* y que recibieron el EXMTh comparados con los que no lo recibieron y sólo fueron inoculados con Larvas 3 del nematodo. La producción de IL-4 fue mayor ($p<0.05$) en los corderos solamente infectados con *H. contortus* y estimulados con Ag de L3 y la concentración de esta citocina correlacionó positivamente ($p<0.06$) con la cantidad de hgh en los animales infectados con *H. contortus*. Los resultados de este trabajo mostraron que el EXMTh puede modular la producción de IL-4 en los linfocitos de linfonodos abomasales, pero no de $\text{IFN}\gamma$ y que la infección con L3 de *H. contortus* modula la producción $\text{IFN}\gamma$ pero no de IL-4.

1. INTRODUCCION

La verminosis gastroentérica es una infestación debida a la presencia y acción de varias especies de nematodos de la familia *Trichostrongylidae*, que se localizan en el tracto digestivo de los rumiantes (Quiroz, 1984; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

Haemonchus contortus es el nematodo gastroentérico más importante de los ovinos (Soulsby, 1987; Quiroz, 1984) afecta principalmente animales jóvenes causándoles anemia, malnutrición, bajo consumo de alimento, baja conversión alimenticia, retraso en el crecimiento, y en ocasiones puede causar la muerte. En los animales adultos puede verse afectada la producción de carne y leche y se puede observar una disminución del índice de fertilidad (Quiroz, 2011; Miller, 2012).

1.1 GENERALIDADES DE *Haemonchus contortus*

El gusano adulto de *Haemonchus contortus* posee un extremo cefálico muy delgado, con una pequeña cápsula bucal y un delgado diente o lanceta. Las papilas cervicales son prominentes y con forma de espinas. En las hembras, la vulva se encuentra en el tercio posterior del cuerpo, cubierta por dos labios prominentes y mide de 18 a 30 mm. Los machos miden de 10 a 20 mm, presentan la bolsa copulatriz bien desarrollada y con forma de Y invertida, en estado fresco dan el aspecto de un palo de peluquería debido al color rojo del intestino con sangre y al color blanco del aparato genital enrollado en espiral en torno al intestino (Quiroz, 1984; Meana y Rojo, 1999).

1.2 CICLO BIOLÓGICO.

Los gusanos adultos se localizan en el abomaso del animal. Las hembras eliminan de 5,000 a 10,000 huevos al día. Estos bajan por el tubo digestivo y caen al suelo junto con las heces (Quiroz, 2011). Se requiere humedad (96%), temperatura (26-27°C) y oxígeno óptimos para el desarrollo de la larva 1 dentro del huevo. En uno a dos días la larva muda a

larva 2, y en una semana alcanza el estado de larva tres (L3). Esta es la fase infestante, la cual es ingerida por los animales. El desenvainamiento de la larva tres ocurre en rumen, pasan al abomaso donde mudan y penetran la mucosa, donde madura la larva cuatro (L4). Posteriormente salen a la luz del abomaso y alcanzan su madurez sexual en un período de 15 a 21 días (Quiroz, 2011; Meana y Rojo, 1999).

1.3 PATOGENIA DE LA HEMONCOSIS OVINA

Al ingresar al abomaso las larvas producen lesiones sobre la superficie de la mucosa abomasal debido a su penetración en las glándulas de la misma y a su crecimiento dentro de éstas, generando dilatación y una marcada protrusión sobre la superficie. Las células de las glándulas afectadas son reemplazadas por un gran número de células no diferenciadas. Al salir las larvas de las glándulas abomasales (14 al 21 pos-infección), se produce lisis de las células epiteliales, edema submucoso y aumento de células plasmáticas. En infecciones severas, en esta etapa los corderos pueden morir en forma súbita por una abomasitis hemorrágica severa. Después del día 35 post-infección hay un retorno a la normalidad estructural y funcional de la mucosa, quedando restablecida aproximadamente el día 70 post-infección (Meana y Rojo, 1999).

Los daños más graves causados por *H. contortus* se deben a su acción hematófaga, cada gusano adulto consume en promedio 0.05 mL de sangre del hospedador por día lo que produce un estado anémico en los corderos, además, las pequeñas úlceras con hemorragias capilares producidas cuando los gusanos cambian de sitio de alimentación, contribuye a la pérdida de sangre (Meana y Rojo, 1999; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

Otra consecuencia de la presencia de *H. contortus* es la pérdida de algunas uniones celulares debido a una dilatación de los espacios intercelulares. Esto incrementa la permeabilidad de la mucosa, ocasionando salida de proteínas séricas a la luz abomasal, un desbalance en la concentración intraluminal de iones (hay incremento de bicarbonato), lo que junto con la disminución de la secreción de HCl incrementa el pH abomasal (Meana y Rojo, 1999). Por otro lado, la disminución de la secreción de ácido clorhídrico produce deficiencia en la digestión protéica debido a una inhibición de la transformación del

pepsinógeno en pepsina, ocasionado por el incremento del pH abomasal. Lo anterior se refleja en una pérdida importante de proteínas endógenas en abomaso y deficiencias en la absorción de proteínas dando como resultado hipoproteïnemia. En los animales muy jóvenes se desarrolla edema en algunas zonas, principalmente en la región submandibular como consecuencia de la hipoproteïnemia (Meana y Rojo, 1999; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán 2013).

1.4 CONTROL

Tradicionalmente, el control de la hemoncosis se realiza con antihelmínticos; siendo los más utilizados los bencimidazoles (albendazol, fenbendazol, oxfendazol, febantel, sulfóxido de albendazol.), el levamizol y las lactonas macrocíclicas. (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006; Miller and Horohov, 2006; Quiroz, 2011). Debido al mal uso de los antihelmínticos, han aparecido cepas resistentes del parásito a los mismos, generando la demanda de otras estrategias de control que no dependan del uso de fármacos (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006; Miller and Horohov, 2006).

Entre las principales alternativas al uso de antihelmínticos, se han implementado técnicas de pastoreo rotativo, pastoreo mixto o alternante (bovinos/ovinos), se han utilizado depredadores naturales de larvas en el pasto como hongos y nematodos. Sin embargo, tal vez la estrategia alternativa más relevante en el control de la hemoncosis, es la utilización de razas ovinas con resistencia natural al parásito.

Se ha demostrado que algunas razas nativas o autóctonas como la Pelibuey, Blackbelly, Nativa de Florida o la Criolla nativa del altiplano de México, entre otras, presentan una resistencia mayor a la hemoncosis que razas seleccionadas para alta producción como Columbia, Suffolk, Merino y Dorper, entre otras (Alba-Hurtado *et al.*, 2010; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). Esto presenta un dilema para los productores, que tienen que buscar buenos parámetros productivos y al mismo tiempo, menos pérdidas por efecto de la hemoncosis (Alba-Hurtado *et al.*, 2010). Se ha propuesto que la resistencia a la hemoncosis tiene una base inmunológica y participan elementos de la respuesta innata como elementos de la respuesta adquirida específica.

1.5 INMUNIDAD ADAPTATIVA

Las subpoblaciones mejor definidas de linfocitos T efectores del linaje cooperador CD4 son los linfocitos Th1 y Th2. El interferon gamma (IFN γ) e interleucina 2 (IL-2) son las citocinas características de los linfocitos Th1, la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 5 (IL-5) son las citocinas características de los linfocitos Th2 (Abbas *et al.*, 2008).

Estas respuestas se desarrollan a partir de los linfocitos T CD4 vírgenes, el patrón de diferenciación está determinado por los estímulos antigénicos presentes en la primeras fases de la respuesta (Abbas *et al.*, 2008).

1.5.1 Respuesta tipo Th1

La diferenciación de linfocitos Th1 se produce en respuesta a microorganismos que infectan o activan los macrófagos y los que activan los linfocitos NK. Su principal función es la defensa mediada por fagocitos contra infecciones, principalmente por microorganismos intracelulares, tales como *Listeria* sp. y micobacterias, y por algunos parásitos como *Leishmania* sp., los cuales infectan a los macrófagos (Abbas *et al.*, 2008; Tizard, 2009). Si una célula Th1 reconoce antígenos bacterianos expuestos en la superficie de un macrófago infectado, interactúa con éste, estimulando su actividad microbicida, con el fin de capacitarlo para destruir las bacterias intracelulares (Murphy *et al.*, 2008).

1.5.2 Respuesta tipo Th2

La diferenciación Th2 se produce en respuesta a los helmintos y alérgenos, que producen estimulación crónica de linfocitos T. Su principal función es favorecer reacciones inmunitarias mediadas por inmunoglobulinas; entre ellas IgE y eosinófilos/mastocitos, que protegen contra infecciones por helmintos (Abbas, *et al.*, 2008). Las células de la respuesta tipo Th2 son necesarias en particular para hacer que las células

B cambien a la producción de inmunoglobulinas de la clase IgE, cuya función principal es combatir las infestaciones por parásitos (Murphy *et al.*, 2008).

1.5.3 Citocinas

Las citocinas son polipéptidos solubles sintetizados por las células, capaces de modificar el comportamiento de las mismas, así como también el de otras células en respuesta a microorganismos y otros antígenos, que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Son secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa que median muchas de las funciones de las mismas (Abbas, *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2008).

Las citocinas son pleiotrópicas y redundantes; el pleiotropismo se refiere a la capacidad de una citocina de actuar sobre diferentes tipos celulares, esta propiedad permite que una citocina medie diversos efectos biológicos. Redundancia se refiere a la propiedad de que múltiples citocinas tienen los mismos efectos funcionales (Abbas *et al.*, 2008; Kindt *et al.*, 2007). Otra característica de las citocinas es que una misma citocina puede ser secretada por distintos tipos celulares (Tizard, 2009).

Las citocinas se dividen en tres categorías funcionales principales según su acción biológica:

- Mediadores y reguladores de la inmunidad innata. Son sintetizados principalmente por fagocitos mononucleares en respuesta a microorganismos infecciosos (Abbas *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2008).
- Mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa. Sintetizados principalmente por linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños (Abbas *et al.*, 2008).
- Estimuladores de la hematopoyesis. Sintetizadas por células de estroma de la médula ósea, leucocitos y otras células, estimulando crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros (Abbas *et al.*, 2008)

1.5.4 Interferón gamma (IFN γ).

El IFN γ es la citocina característica de la subpoblación Th1 de los linfocitos T cooperadores en respuesta a los ligandos activadores sobre la superficie de las células infectadas o sometidas a agresiones.

Es una proteína homodimérica sintetizada por los linfocitos NK, los linfocitos CD4⁺ Th1 y los linfocitos TCD8⁺. Es la principal citocina activadora de los macrófagos. También induce el cambio a la clase de anticuerpos IgG que apoyan la fagocitosis y la fijación del complemento (Kindt *et al.*, 2007), estimula las actividades microbicidas de los fagocitos, Abbas *et al.*, 2008).

Las acciones biológicas del IFN γ son:

- Activación de los macrófagos para destruir los microorganismos fagocitados. Estimula la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno y del óxido nítrico del macrófago mediante la activación de transcripción de genes que codifican las enzimas oxidasa y óxido nítrico sintasa de los fagocitos (Abbas *et al.*, 2008).
- Favorece la diferenciación de linfocitos TCD4⁺ vírgenes en la subpoblación Th1 e inhibe la diferenciación de los linfocitos Th2 (Abbas *et al.*, 2008; Kindt *et al.*, 2007).
- Actúa sobre linfocitos B favoreciendo el cambio a las clases de IgG.
- Activa las células endoteliales vasculares, favoreciendo la adhesión de linfocitos T y su extravasación hacia el foco de infección.

En resumen, el efecto de las actividades del IFN γ es favorecer reacciones inflamatorias ricas en macrófagos, a la vez que inhibe la respuesta de eosinófilos dependientes de IgE.

1.5.5 Interleucina 4 (IL-4)

La secreción de IL-4 estimula la síntesis de anticuerpos IgE e interviene en la respuesta mediada por eosinófilos contra los helmintos (Kindt *et al.*, 2007). Esta citocina es producida principalmente por los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo los mastocitos también son fuertes productores de esta citocina después de su estimulación, por lo que pueden estar relacionados con una respuesta temprana de IL-4 (Murphy *et al.*, 2008).

La IL-4 es capaz de activar los macrófagos para que expresen receptores de manosa y para que expresen enzimas que favorecen la síntesis de colágeno y, por lo tanto, la reparación por fibrosis; proceso denominado activación alternativa de los macrófagos. Estos macrófagos contribuyen a la formación de granulomas y la reestructuración hística en el contexto de las infecciones parasitarias crónicas y de las enfermedades alérgicas, respectivamente (Abbas *et al.*, 2008).

Las citocinas de la respuesta Th2 también participan en el bloqueo de la entrada y favorecen la expulsión de microorganismos de la mucosa. La IL-4 puede estimular la peristalsis en el tubo digestivo (Abbas *et al.*, 2008).

Las acciones biológicas de la IL-4 son:

- Estimula el cambio de clase de la cadena pesada de la Ig de los linfocitos B, al isotipo IgE (Abbas *et al.*, 2008; Kindt, 2007; Murphy *et al.*, 2008; Tizard, 2009) Estos anticuerpos participan en la respuesta mediada por eosinófilos frente a infecciones por helmintos o artrópodos y es el principal mediador de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (alergias), siendo la principal función de los linfocitos Th2 en la defensa del huésped (Abbas *et al.*, 2008).
- Estimula desarrollo de linfocitos Th2 a partir de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y actúa como factor de crecimiento autócrino para los linfocitos Th2 diferenciados. Asimismo, inhibe el desarrollo de los linfocitos Th1 (Abbas *et al.*, 2008).
- Junto con la IL-13, contribuye a una forma alternativa de activación de los macrófagos, diferente a la respuesta mediada por IFN γ . Los efectos de la IL-4 sobre el macrófago incluyen la inducción de arginasa, que da lugar a síntesis de colágeno

y al aumento del receptor de manosa, que favorece la fagocitosis de los microorganismos (Abbas *et al.*, 2008).

1.6 RESPUESTA INNATA A *H. contortus*.

La colonización del parásito en abomaso depende de la motilidad de la larva y la carga parasitaria. Las primeras barreras del hospedador para evitar la colonización consisten en movimientos peristálticos (mecánica) y la presencia del moco abomasal (química).

Se ha encontrado que las razas resistentes exhiben una expresión de genes asociados a una respuesta no específica contra el parásito. Al tercer día postinfección, se reduce la expresión de genes asociados con la coagulación sanguínea e incrementan aquellos involucrados en su inhibición. Al día 27 postinfección se muestra una expresión de genes asociados con la motilidad intestinal, respuesta inflamatoria, diferenciación y proliferación celular y reducción de la apoptosis (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

Una de las primeras respuestas de la inmunidad innata a *H. contortus* es la fijación del complemento. Derivado de esta activación, se generan péptidos vasoactivos y quimioactivos (C3^a y C5^a), los cuales movilizan eosinófilos al área de infección independientemente de mecanismos específicos como células CD4⁺ e IL-5. Al mismo tiempo el parásito secreta sustancias quimioatrayentes para eosinófilos y neutrófilos, potenciando la respuesta inflamatoria. (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). La activación del complemento favorece una respuesta citotóxica de eosinófilos en infecciones tempranas, en ausencia de anticuerpos específicos (Klion *et al.*, 2004)

Las larvas también son atacadas por los mastocitos tisulares e intraepiteliales antes de que logre ingresar a la glándula abomasal, favoreciendo una expulsión más rápida de las mismas. (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

Las larvas de *H. contortus* son demasiado grandes para ser engullidas por fagocitos y sus tegumentos son relativamente resistentes a los productos microbicidas de los neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, las larvas pueden morir por la acción de la proteína catiónica tóxica, conocida como la proteína básica principal, presente en los gránulos de los eosinófilos (Abbas *et al.*, 2008; Klion *et al.*, 2004).

La degranulación de los eosinófilos libera también diversas sustancias tóxicas, como la peroxidasa. Asimismo, se secretan leucotrienos, prostaglandina E2, factor de agregación plaquetaria y lipoxinas. Esto favorece un incremento en la permeabilidad, secreción de moco, quimiotaxis y coagulación (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

1.7 RESPUESTA ESPECIFICA A *H. contortus*.

La respuesta retardada a la infección actúa contra la larva en las glándulas abomasales. Esto es regulado por los linfocitos T CD4⁺, IgA e IgE, además de la citotoxicidad de eosinófilos dependiente de anticuerpos y la activación de la vía clásica del complemento (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

La infección natural y artificial con *H. contortus* induce la producción de anticuerpos específicos. Algunos estudios asocian la presencia de IgG con la resistencia a la hemoncosis (Meeusen *et al.*, 2005). Sin embargo, otros han relacionado su presencia con la infección, pero no con la resistencia (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013),

Los anticuerpos IgG e IgA que recubren a los helmintos se pueden unir a los receptores de los eosinófilos y producir su degranulación. La presencia de altos niveles de IgA en la mucosa abomasal ha demostrado tener una correlación negativa con la carga parasitaria en la infección (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). Los anticuerpos IgE que reconocen los antígenos sobre la superficie de los helmintos pueden iniciar la degranulación local de los mastocitos. Los mediadores de los mastocitos pueden contribuir a la broncoconstricción y aumento de motilidad local que contribuye a la expulsión del parásito del tubo digestivo. Las citocinas liberadas por los mastocitos activados pueden atraer eosinófilos y producir también su degranulación. Los eosinófilos también se pueden

unir a la IgE adherida a los parásitos (Abbas *et al.* 2008). Esto sugiere una respuesta adaptativa tipo Th2 (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013).

Un análisis realizado por Shakya *et al.* (2009), mostró que los niveles séricos de IgE se incrementaron significativamente en razas nativas a partir del día 10 post-infección y se mantuvieron altos hasta por 42 días, mientras que esto no se observó en la raza Suffolk, que es considerada como susceptible.

La inoculación de larvas de *H. contortus* induce un incremento de linfocitos T CD4⁺ en la pared abomasal y sangre periférica, así como un crecimiento de los linfonodos abomasales. Estas células favorecen una respuesta tipo Th1 en las razas susceptibles o cuando se trata de una primoinfección (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013; Balic *et al.*, 2000).

En algunas razas ovinas con cierto grado de resistencia a la hemoncosis, la infección por *H. contortus* induce un incremento de la cantidad de eosinófilos sanguíneos y tisulares, mastocitos abomasales, niveles de anticuerpos sistémicos y linfocitos CD4⁺ en el abomaso, relacionados a un perfil Th2 (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006 y 2012), lo cual tiene una correlación negativa con la concentración de huevos en heces y la presencia de gusanos adultos de *H. contortus* en el abomaso.

Muñoz-Guzmán *et al.* (2006), demostraron la mayor susceptibilidad a la hemoncosis de la raza Columbia en comparación con la raza Blackbelly. Se encontró un incremento de eosinófilos en sangre, pero después de la semana nueve pos-infección estos presentaron un descenso en los mismos en la raza Columbia. Este incremento de eosinófilos y el mantenimiento del nivel de los mismos en la raza Blackbelly sugieren una respuesta inmunológica de tipo Th2 en las razas resistentes, mientras que en las razas susceptibles sugiere una respuesta tipo Th2 inicial que subsecuentemente cambia a una respuesta tipo Th1.

Shakya *et al.* (2011), realizaron una comparación de la respuesta inmune a la hemoncosis entre razas Nativa del Golfo y la raza Suffolk, encontrando en la primera raza una mayor concentración de eosinófilos sanguíneos post infección, mientras que en la raza Suffolk la cantidad de eosinófilos se mantuvo constante y cercana a los niveles basales.

Asimismo se ha observado la presencia de linfocitos T gamma delta en la respuesta a la hemoncosis (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). Esto fue demostrado por Balic *et al.* (2002), en un experimento en el cual se observa la presencia de éstas células en los distintos grupos experimentales desafiados con *H. contortus*.

En una infección por *H. contortus* en corderos normales se observa un incremento de la producción de IFN γ , IL-13 e IL-5 los primeros tres días pos-infección, mientras que la IL-4 alcanza su máximo nivel el día 5 pos-infección. En comparación, se ha demostrado en corderos inmunizados la eliminación de larvas antes de que penetren la mucosa abomasal, en una respuesta mediada por células cebadas, que se ha asociado a un incremento temprano de la expresión de RNAm para IL-4. Lo anterior, parece indicar que la IL-4 y las células cebadas son importantes para una rápida expulsión de larvas, mientras que IL-5 e IL-13 pueden ser críticos en un rechazo tardío al parásito (Meeusen *et al.*, 2005).

Balic *et al.* (2006), encontraron que los niveles de RNAm para IL-4 en el tejido de la mucosa abomasal presentaban una diferencia notable entre animales sacrificados a la semana nueve post infección y a la semana 22, siendo mayor en el primer grupo y en contraste, casi indetectable o indetectable en el segundo.

1.8 PROTECCIÓN INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE *Taenia hydatigena*

Cuenca-Verde *et al.* (2011) indujeron protección parcial contra la hemoncosis experimental a través de la inoculación de un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* en corderos Columbia susceptibles a la hemoncosis. Esta protección estuvo relacionada a un incremento de eosinófilos sanguíneos y tisulares, así como de linfocitos CD4+, que sugieren una modulación del extracto sobre la respuesta inmune de que dirige la respuesta hacia un perfil Th2, sin embargo, esto no fue establecido. En dicho estudio, los corderos que fueron inoculados con un extracto del metacestodo de *Taenia hydatigena* presentaron un mayor conteo de eosinófilos en sangre que los corderos no inoculados. Por otro lado, corderos que solo fueron inoculados con larva 3 de *H. contortus* presentaron una mayor cantidad de huevos en heces y fases adultas que los corderos que fueron infectados con *H. contortus* con una previa administración del extracto. La protección observada

estuvo relacionada a eosinofilia y al aumento en la pared abomasal de eosinófilos, mastocitos, linfocitos CD4 y linfocitos gamma-delta. Sin embargo, esta respuesta no puede ser atribuida solamente a los eosinófilos, ya que la inoculación del extracto puede estimular otro tipo de respuestas inmunes, como la de linfocitos T, que contribuyen a prevenir la presencia de gusanos (Cuenca-Verde et al., 2011). El objetivo del presente estudio fue medir la cantidad de citocinas indicadoras de la respuesta Th1 (IFN γ) y Th2 (IL-4) en corderos Columbia, infectados con *H. contortus*, previa inoculación de un extracto de *T. hydatigena*, con el fin de conocer su relación con la protección inducida contra la hemoncosis.

2. HIPÓTESIS

La inoculación de un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* influye en el perfil de producción de citocinas linfocitarias en corderos Columbia, lo cual está relacionado con una menor susceptibilidad a la infección experimental con *H. contortus*.

3. OBJETIVOS:

3.1 GENERAL:

Evaluar el efecto de la inoculación de un extracto de metacestodo de *T. hydatigena* sobre la cantidad de IFN γ e IL-4 producidos *in vitro* por linfocitos de corderos Columbia infectados con *H. contortus*.

3.2 PARTICULARES:

1. Cuantificar por ELISA la producción de IFN γ producido *in vitro* por linfocitos de linfonodo abomasal de corderos Columbia infectados con larvas de *H. contortus*, corderos inoculados únicamente con un extracto de *T. hydatigena* y corderos inoculados con el extracto e infectados con *H. contortus*.

2. Cuantificar por ELISA la producción de IL-4 producido *in vitro* por linfocitos de linfonodo abomasal de corderos infectados con larvas de *H. contortus*, corderos inoculados únicamente con un extracto de *T. hydatigena* y corderos inoculados con el extracto e infectados con *H. contortus*.

3. Correlacionar las cantidades de las citocinas evaluadas con la eliminación de huevos en la materia fecal de los corderos infectados con larvas de *H. contortus* y corderos inoculados con el extracto de *T. hydatigena* e infectados con *H. contortus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN

Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la unidad de posgrado de esta misma Facultad.

4.2 ANIMALES

Se utilizaron 20 corderos machos de la raza Columbia, menores de 6 meses de edad procedentes de una explotación ovina dedicada a la producción de animales para pie de cría, lo cual garantizó su homogeneidad y pureza racial. Se les realizó una valoración clínica para confirmar su estado de salud y como medida preventiva se desparasitaron con 5 mg/Kg pv de albendazol. Así mismo, se verificó la ausencia de huevos de nematodos gastroentéricos en la materia fecal por medio de exámenes coproparasitoscópicos. Los corderos tuvieron un periodo de adaptación a las nuevas condiciones de manejo. Todos los corderos se mantuvieron en condiciones de confinamiento total en corraletas con capacidad para cinco corderos. La alimentación consistió en forraje seco molido y concentrado comercial a razón de un 4% del peso vivo. El agua se ofreció *ad libitum*.

4.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE METACESTODO DE *T. hydatigena*

Se recolectaron metacestodos de *T. hydatigena* de ovinos sacrificados en el municipio de Villa de Tezontepec, en el estado de Hidalgo. Las larvas que se recolectaron fueron trasladadas en refrigeración al Laboratorio 1 de la UIM-FESC, donde se mantuvieron en congelación hasta su utilización. Para obtener los extractos, se descongelaron los metacestodos y se rompieron las membranas colectando el líquido vesicular, al cual se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/mL,

leupeptina 10 µg/mL, iodoacetamida 1.8 mg/mL y PMSF 1mM, SIGMA Labs), las proteínas del líquido vesicular fueron precipitadas mediante la adición de sulfato de sodio a razón de 0.42 g por mL y se centrifugaron por una hora a 2500g (gravidades) a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en PBS. El extracto fue filtrado a través de membrana millipore de 0.22 µm, alicuotado y almacenado a -20°C, hasta su utilización. (Cuenca-Verde et al., 2011). La cantidad de proteína contenida en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976).

4.4 OBTENCIÓN DE INÓCULOS DE L3 DE *H. contortus*

Los inóculos fueron obtenidos mediante la técnica de Corticelli-Lai (Alba Hurtado, 2003) realizada a partir de materia fecal de corderos infectados monoespecíficamente con una cepa de *H. contortus* (Cuenca-Verde, 2008). Cada inóculo consistió en una suspensión de 5000 L3 de *H. contortus* y estas fueron suministrados por sondeo bucoesofágico directamente en el rumen de los corderos experimentales (Muñoz-Guzmán et al., 2006).

4.5 CULTIVO CELULAR.

Se obtuvieron los linfonodos abomasales inmediatamente después del sacrificio de los corderos. Fueron lavados con solución salina fisiológica y se limpiaron de todo rastro de tejido adiposo. Se colocaron en medio de lavado, que contiene medio de cultivo más antibiótico y se seccionaron finamente con tijeras, posteriormente fueron macerados en organza fina y la suspensión celular obtenida, se centrifugó a 350g por 5 minutos. Las células recuperadas se lavaron tres veces en el mismo medio. Se realizó una dilución 1:100, se realizó una tinción con azul tripán y se contaron células vivas y muertas. Se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/mL y se colocaron 2 mL de la suspensión en placas de 24 pozos. Se estimularon por triplicado células con fitohemaglutinina, antígenos somáticos de larva 3 de *H. contortus* y tres pozos se mantuvieron sin estimular como testigos, los cultivos se mantuvieron por 24 horas. Finalmente, los sobrenadantes de cada pozo fueron

obtenidos por separado y almacenados a -20 °C hasta su utilización para la cuantificación de las citocinas.

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los corderos fueron divididos en 4 grupos (n=5/cada uno). Las características y tratamientos de cada grupo se muestran en el cuadro 1.

Semanalmente se tomaron muestras de materia fecal de todos los corderos para el conteo de huevos de *H. contortus*. Todos los corderos fueron sacrificados en la semana 7 pos-infección y se tomó de cada cordero un linfonodo abomasal para la realización de cultivos celulares (Cuenca-Verde *et al.*, 2011). Los cultivos celulares fueron estimulados con antígenos de larvas de *H. contortus*, se utilizaron cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina como testigos positivos, y sin estimular como testigos negativos. Después de 24 horas de estimulación, los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante fue almacenado para la cuantificación de IFN γ e IL-4 (Gill *et al.*, 2000.).

Cuadro 1. Tratamiento de los grupos experimentales de corderos de la raza Columbia.

Grupos (n=5)	Días antes de la infección			Día de la infección
	-10	-6	-2	0
1		---	---	---
2				5000 L3 de <i>H. contortus</i> ^b
3	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	5000 L3 de <i>H. contortus</i> ^b
4	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	

i.m. inoculación intramuscular

i.p. inoculación intraperitoneal

^a Inoculación con extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena*

^b Infección intraruminal

4.7 MEDICIÓN DE IFN γ .

La medición de IFN γ se realizó por medio de la prueba de ELISA en sándwich utilizando un kit comercial (Cusabio, número de catálogo: CSB-E14018Sh). Se añadieron 100 μ l de muestra a cada pozo presensibilizado con un anticuerpo anti- IFN γ . Posteriormente se añadieron 50 μ l de la sol. HRP- conjugate a cada pozo y se incubaron las muestras durante

un periodo de 2 horas a 37 °C. Se realizaron tres lavados con 200 µl de solución de lavado wash buffer (incluida en el kit). Posteriormente se agregaron 50 µl de sustrato A y 50 µl de sustrato B a cada pozo y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, manteniéndolo en oscuridad. Se agregaron 50 µl de stop solution y se procedió a la lectura en un rango de tiempo no mayor a 5 minutos en un lector de ELISA (MultiscanAscent, Labsystems) a una densidad óptica de 450 nm.

4.8 MEDICIÓN DE IL-4

La medición de IL-4 se hizo por ELISA en sándwich utilizando un kit comercial (Cusabio, número de catalogo CSB-E15963Sh). Se agregaron 100 µl de muestra a cada pozo presensibilizado con un monoclonal anti-IL-4 y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Se removió el líquido y se agregaron 100 µl de una solución de anticuerpos biotinilados (incluida en el kit) y se incubó nuevamente por una hora a 37 °C. Se realizaron tres lavados con 200 µl de buffer de lavado (incluido en el kit), dejando pasar dos minutos entre cada lavado. Posteriormente se agregaron 100 µl de una solución HRP avidin (incluida en el kit) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron nuevamente tres lavados y se agregaron 90 µl del sustrato TMB. Se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad. Se agregaron 50 µl de stop solution y se realizó la lectura en un rango de tiempo no mayor a 5 minutos. Se realizaron dos lecturas; a una densidad óptica de 450 nm y de 540 nm. La diferencia entre las dos lecturas fue tomada como dato para cada muestra.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de huevos por gramo de heces y de concentración (D.O.) de IFN γ e IL4 fueron analizados mediante ANDEVA de una vía y las diferencias entre medias se obtuvieron mediante prueba de Tukey utilizando un software estadístico (STATISTICA 7.0 StatSoftInc).

5. RESULTADOS

Previo al experimento los resultados de las pruebas coproparasitoscópicas mostraron la presencia de *Nematodirus sp.* en dos corderos (un huevo en cada uno), los cuales fueron tratados. Al inicio del experimento los conteos de hgh de todos los animales fue cero. Los resultados de la eliminación de huevos de los corderos experimentales se muestran en la figura 1. Los corderos del grupo 2 eliminaron mayor cantidad de hgh que los corderos del grupo 3 desde la semana 4 hasta el final del experimento, sin embargo estas diferencias fueron significativas hasta la semana 7 p.i. ($p < 0.05$).

Los resultados de la medición de IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos linfocitarios de los diferentes grupos experimentales se muestran en la **figura 2**. En los corderos de los grupos 1 y 2 se observó una mayor cantidad de IL-4 en los sobrenadantes de sus linfocitos estimulados con PHA que en los sobrenadantes de linfocitos no estimulados aunque no fue significativo ($p > 0.05$). En todos los grupos se observó una mayor cantidad de IL-4 en los sobrenadantes de los linfocitos estimulados con antígenos de L3 de *H. contortus* que en los sobrenadantes de linfocitos estimulados con PHA o no estimulados ($p > 0.05$). En los corderos del grupo 2 se observó una mayor cantidad de IL-4 en los sobrenadantes de sus linfocitos estimulados con antígenos de L3 que en sus homólogos de los otros grupos ($p < 0.05$). Se observó una correlación positiva ($p < 0.06$) entre los promedios de hgh y los niveles de IL-4 en los corderos del grupo 2.

Los resultados de la medición de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos linfocitarios de los diferentes grupos experimentales se muestran en la **figura 3**. En los corderos de los grupos 2 y 3, se observaron menores ($p < 0.05$) cantidades de IFN γ en los sobrenadantes de sus linfocitos que en los corderos de los grupos 1 y 4, independientemente de si fueron o no estimulados con alguno de los mitógenos empleados (PHA y Ag de L3). No se observaron diferencias en los niveles de IFN γ entre linfocitos estimulados con PHA, antígenos de L3 de *H. contortus* o no estimulados en ninguno de los grupos experimentales. No se observaron correlaciones significativas entre los niveles de IFN γ y los promedios de hgh.

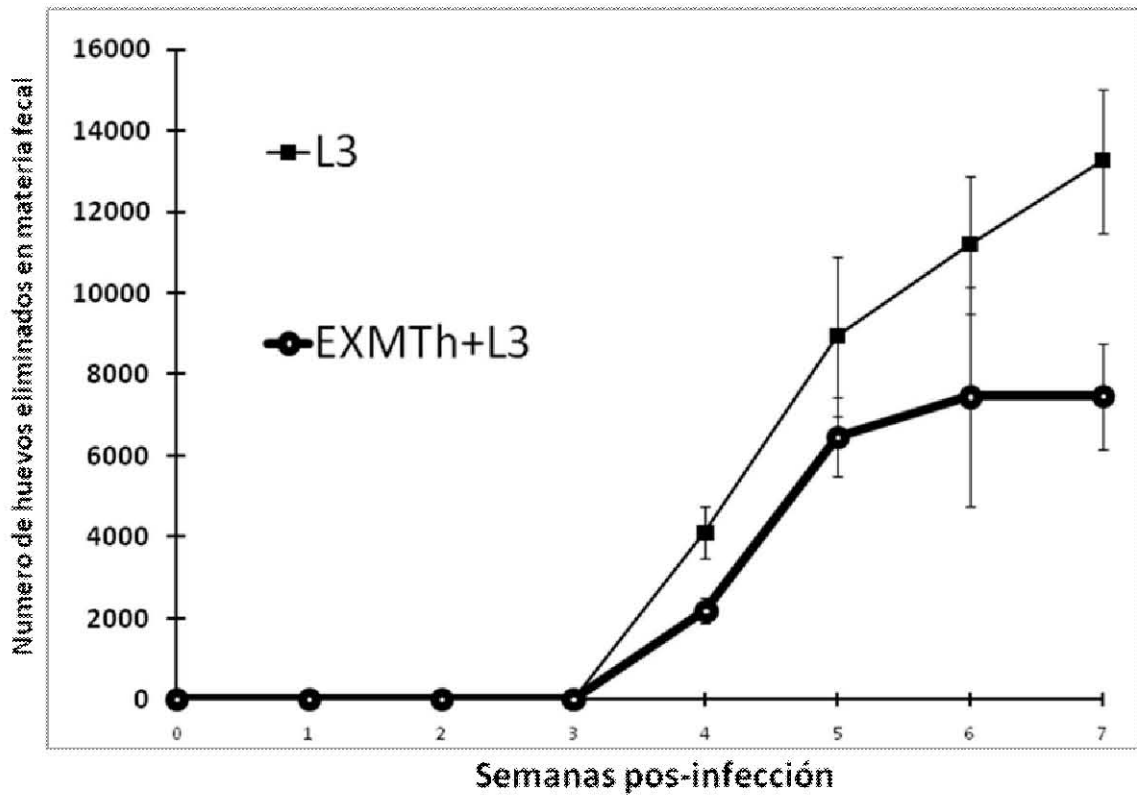


Figura 1: Comparación de la eliminación de huevos en materia fecal de corderos únicamente inoculados con L3 de *H. contortus* (L3) el día cero del experimento y corderos que previo a la inoculación con larvas de *H. contortus* se les administró un extracto vesicular de larvas de *Taenia hydatigena* (EXMTh+L3). Se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) únicamente la semana 7 del experimento.

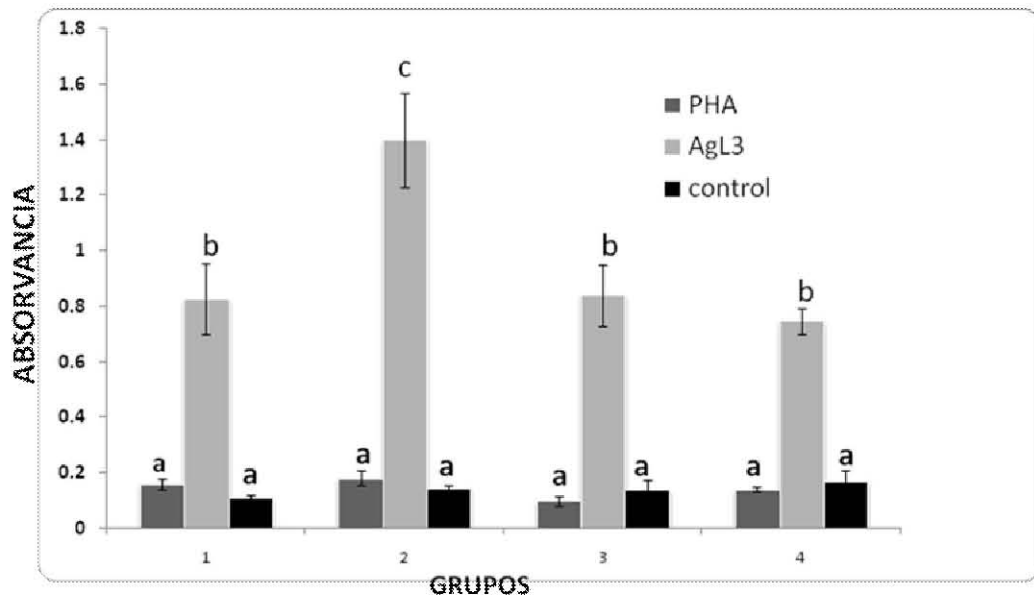


Figura 2: Cantidad de IL-4 (medida por ELISA) producida por linfocitos de linfonodo abomasal de corderos con diferentes tratamientos. Grupo 1 corderos no tratados. Grupo 2 corderos infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 3 corderos tratados con un EXMTh e infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 4 corderos tratados con un EXMTh. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

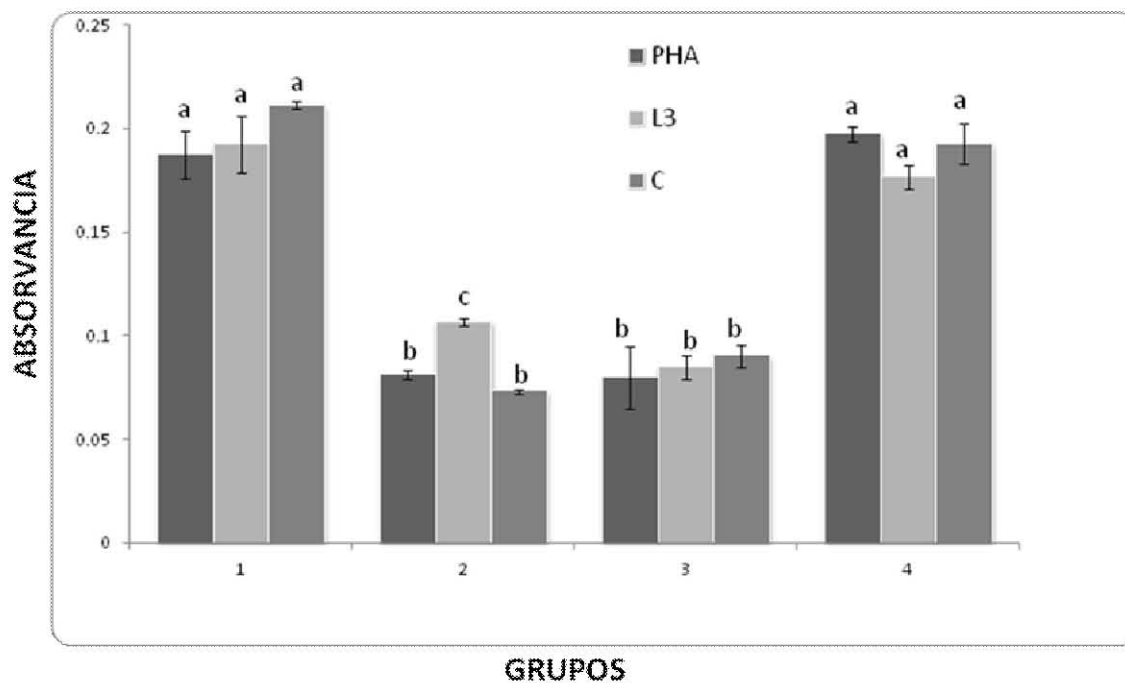


Figura 3: Cantidad de INF γ (medida por ELISA) producida por linfocitos de linfenoado abomasal de corderos con diferentes tratamientos. Grupo 1 corderos no tratados. Grupo 2 corderos infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 3 corderos tratados con un EXMTh e infectados con L3 de *H. contortus*. Grupo 4 corderos tratados con un EXMTh. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

}

6. DISCUSIÓN

En un trabajo previo realizado por este mismo grupo de investigación se observó que la administración de un extracto de metacestodo de *T. hydatigena* indujo protección

contra la hemoncosis ovina en corderos de una raza susceptible a la hemoncosis (Cuenca-Verde et al., 2011). Por otra parte, en otros estudios se ha observado que la resistencia natural de algunas razas de ovinos a la hemoncosis está asociada a algunos componentes de su respuesta inmunológica como son citocinas del perfil Th2. En este trabajo se estudió la asociación de dos de las principales citocinas marcadoras de respuesta Th1 y Th2 (IFN γ e IL-4 respectivamente) con la protección inducida por el extracto de metacestodo de *T. hydatigena*. Los resultados de este trabajo mostraron que el EXMTh puede modular la producción de IL-4 de linfocitos de linfonodos abomasales, pero no la de IFN γ y que la infección con L3 de *H. contortus* modula la producción IFN γ pero no de IL-4.

Se ha reportado que la presencia de otros parásitos (Yacob et al., 2006), o la inoculación de extractos parasitarios (Cuenca-Verde et al., 2011) pueden inducir protección contra el establecimiento de *H. contortus* en el abomaso y por lo tanto, inducir protección. En este trabajo, se observaron menores cantidades ($p < 0.05$) de hgh eliminados en los corderos a los que les fue administrado el EXMTh previo a la infección con *H. contortus* que los corderos que solo fueron infectados, por lo que dicho extracto protegió parcialmente a los corderos de la infección aunque esto ocurrió de forma significativa hasta la semana 7 p.i. Cuenca-Verde et al., (2011), observaron que la inoculación del EXMTh indujo la eliminación de menores cantidades de hgh en corderos Columbia que recibieron el EXMTh que los corderos que no lo recibieron previo a la infección. Ellos observaron diferencias entre estos dos grupos de corderos desde el día 21 p.i. Comparativamente en ambos estudios, se utilizó la misma dosis de larvas infectivas (5000 L3) de la misma cepa y la misma ruta y técnica de inoculación. La eliminación de hgh de los corderos solo infectados con *H. contortus* en ambos estudios, fue muy similar en la semana siete p.i. (aproximadamente 10,000 vs. 12,000 hgh respectivamente), sin embargo, la respuesta de los corderos que fueron inoculados con el EXMTh previo a la infección, fue menor en este estudio (4000 vs. 8000 hgh respectivamente). La menor respuesta al EXMTh observada en los corderos de este trabajo pudo ser debida a variaciones en el lote de larvas infectivas de *H. contortus* (edad de las larvas, época del año), diferencias en el EXMTh debido a que cada lote fue obtenido en su momento de utilización o diferencias en el *estatus* inmunológico de los corderos de los diferentes experimentos.

La respuesta inmunológica a *H. contortus* se ha descrito como una respuesta de tipo Th2 protectora en donde predominan eosinófilos, mastocitos y anticuerpos asociados a citocinas como IL-4 e IL-5 (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). En este sentido, es importante determinar en el ensayo de protección inducida con el EXMTh el tipo de citocinas que están siendo estimuladas por el mismo. Los resultados de la medición de IL-4 mostraron que la estimulación con antígenos de L3 indujo una mayor producción de esta citocina en los corderos únicamente infectados con *H. contortus* que en los dos grupos que recibieron el EXMTh ($p < 0.05$) o los testigos sin tratamiento y la cantidad de IL-4 tuvo una correlación positiva con la cantidad de hgh eliminados ($r = 0.64$, $p < 0.06$). Balic *et al.*, (2002), encontraron mayor expresión de IL-4 en corderos inmunizados mediante infecciones repetidas con *H. contortus*, mientras que Shakya *et al.*, (2009), midiendo los niveles de expresión de RNAm de citocinas en células de sangre periférica, también encontraron mayores niveles de expresión de IL-4 en corderos infectados con *H. contortus* de una raza resistente (criolla) que en corderos infectados de una raza susceptible (Suffolk). Los resultados de este y otros estudios muestran que la producción de IL-4 responde a la infección con *H. contortus*, particularmente en este trabajo se muestra que esta asociación es lineal con respecto a la intensidad de la infección, lo que sugiere que su papel es relevante en la respuesta contra el parásito. Por otra parte, la administración del EXMTh disminuyó la intensidad de la respuesta de IL-4 al estímulo antigénico de la L3, lo cual sugiere un efecto modulador del EXMTh a la respuesta al parásito.

Sin embargo cabe mencionar que los linfocitos del grupo testigo que no fueron infectados y no recibieron el EXMTh, también respondieron al estímulo con antígeno de L3, adicionalmente en las pruebas coproparasitoscópicas previas al experimento se encontró en algunos corderos la presencia de *Nematodirus sp.* lo cual sugiere que los corderos pudieron tener contacto previo con el parásito o con antígenos cruzados de otros helmintos. Lo ideal para obtener resultados más exactos del papel del extracto es contar con corderos sin ningún contacto previo con nematodos, sin embargo en la práctica esto solo es posible manteniendo desde el nacimiento a los corderos en condiciones de confinamiento.

Con respecto al $IFN\gamma$, Gill *et al.* (2000), observaron menores cantidades de $IFN\gamma$ producido por células de linfonodos de corderos infectados con *H. contortus*, que en células

de corderos no infectados, utilizando antígenos del parásito. Esta observación fue similar en corderos de una línea resistente de la raza Merino en comparación a corderos de una línea susceptible a la hemoncosis. En el presente estudio en los corderos infectados con *H. contortus*, se observaron menores ($p < 0.05$) cantidades de IFN γ en los sobrenadantes de sus linfocitos que en los corderos solo inoculados con el EXMTh y testigos negativos, esta diferencia fue mayor en los corderos que recibieron el EXMTh previo a la infección (figura 3). Lo anterior confirma las observaciones de Gill *et al.*, (2000) con respecto a que la infección con *H. contortus* regula a la baja la producción de IFN γ y sugiere que la presencia del EXMTh contribuye a una menor producción de esta citocina en estos corderos.

Los resultados de este estudio sugieren que el EXMTh modula la producción tanto de IL-4 como de IFN γ en los corderos que lo reciben antes de la infección con *H. contortus*. En un trabajo paralelo a éste, se midieron las cantidades de anticuerpos séricos contra antígenos somáticos de L3 de *H. contortus* (Casas, 2014, en escritura), en ese estudio, se observó que los corderos que solo recibieron extracto presentaron tempranamente mayores niveles de anticuerpos contra la L3 que los corderos que solo fueron infectados (semana 1 p.i.) lo que sugiere la presencia de antígenos de reacción cruzada. Los resultados de ambos estudios sugieren que el EXMTh modifica la respuesta inmune de los corderos contra *H. contortus* limitando su presencia. El uso que se le pueden dar al EXMTh bajo esta perspectiva es profiláctico, posiblemente como adyuvante en vacunas.

En el presente estudio no se evaluó si la aplicación del EXMTh tiene algún efecto si se administra en corderos que ya presenten una infección activa con *H. contortus*. Para esto podrían realizarse estudios en los cuales se infecte previamente a los corderos con *H. contortus* y después se les administre el EXMTh, a fin de determinar su potencial para el control de la infección.

7. CONCLUSIONES

Los corderos inoculados con EXMTh previo a la infección con *H. contortus* presentaron un conteo menor de hgh que los corderos que sólo fueron infectados con L3 de *H. contortus*, lo cual indica su efecto protector.

La producción en cultivos linfocitarios de IL-4 fue mayor en los corderos solo infectados con *H. contortus* y estimulados con Ag de L3, la cantidad de esta citocina tuvo una correlación positiva con la cantidad de hgh en los animales infectados con *H. contortus*.

La administración del EXMTh disminuyó la intensidad de la respuesta de IL-4 al estímulo con Ag de L3 y disminuyó en general la cantidad de IFN en los corderos infectados con *H. contortus*.

Las dos observaciones anteriores sugieren un efecto modulador del EXMTh sobre la respuesta inmune por citosinas contra *H. contortus*.

8. REFERENCIAS

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. Pillai, S. Inmunología celular y molecular. España. Elsevier 6ª. Ed. 2008.
2. Alba-Hurtado, F. Muñoz-Guzmán, M. A. Immune responses associated with resistance to Haemonchosis in Sheep. BioMed Research International. 2013.
3. Alba-Hurtado, F. Manual de prácticas de parasitología veterinaria. Cuautitlán, Mexico. UNAM. 2003.
4. Alba-Hurtado, F., Romero-Escobedo, E., Muñoz-Guzmán, M.A., Torres-Hernandez, G., Becerril-Perez C. Comparison of parasitological and productive traits of criollo lambs native to the central Mexican plateau and Suffolk lambs. Veterinary Parasitology, 2010;172:277-282.
5. Balic, A; Bowles, V. M; Meeusen, E. N. T., Mechanism of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunology. 2002; 24: 39-46
6. Balic, A; Bowles, V.M; Meeusen, E.N.T. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Veterinary immunology and Immunopathology. 2000;75:109-120.
7. Balic, A; Cunningham, C. P; Meeusen, E.N.T. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. Parasite Immunology. 2006;28:107-115.
8. Bradford. M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-254.
9. Cuenca-Verde, C. Efecto del aumento de eosinófilos sanguíneos inducido con Ag. de metacestodo de *Taenia hydatigena* sobre el establecimiento de larvas de *Haemonchus contortus* en ovinos inoculados experimentalmente. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México, 2008.
10. Cuenca-Verde, C., Buendia-Jimenez, J. A., Valdivia-Anda, G., Cuellar-Ordaz, J.A., Muñoz-Guzman, M.A., Alba-Hurtado, F. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. Veterinary Parasitology 2011;177:332-338.

11. Gill, H. S., Altmann, K., Cross, M. L., Husband, A. J. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology*. 2000;99:458-463.
12. Kidnt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A. *Inmunología de Kuby*. Sexta edición. México. Mc. Graw Hill. 2007.
13. Klion, D; Amy, M.D; Nutman, B, Thomas, M.D. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113:30-37
14. Meana M. A.; Rojo V. F. A. Tricostrogilidosis y otras nematodosis. En. Cordero del Campillo, M; Rojo-Vazquez, F. A; Martínez-Fernandez, A. R., autores. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España. McGraw-Hill. 1999: 237-253.
15. Meeusen, E. N.T; Balic, A; Bowles, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005;108:121-125.
16. Meeusen, E.N.T, Balic, A. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites?. *Trends in Parasitology*. 2000;16:95-101.
17. Miller, J. E; Horohov, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science*. 2006;84:124-132.
18. Miller, J.E., Kaplan, R.M., Pugh, D, G. Internal parasites. In: Pugh, D, G., Baird, A. N., autors. *Sheep and goat medicine*. Missouri. Elsevier Saunders, 2nd. Ed. 2012: 106-125.
19. Muñoz-Guzmán, M. A., Cuéllar-Ordaz, J. A., Valdivia-Anda, A. G., Buendía-Jiménez, J. A., Alba-Hurtado, F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. *Canadian Journal of Animal Science*. 2006;86:363-371.
20. Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G. Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 2012; 185:175-180.
21. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. Séptima edición. México. Mc. Graw Hill. 2008.

22. Quiroz-Romero, H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Edit. Limusa. México, 1984.
23. Quiroz-Romero, H; Figueroa-Castillo, J A; Ibarra-Velarde, F. López-Arellano, M. E. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Sin ed. Formato digital. México, 2011.
24. Shakya, K.P; Miller, J. E.; Lomax, L.G; Burnett, D. D. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Veterinary Parasitology*. 2011;181:239-247
25. Shakya, K.P; Miller, J.E; Horohov, D.W. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Veterinary Parasitology*. 2009;163:57-66.
26. Soulsby, E. J. L. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Edit. Interamericana. México, 1987.
27. Tizard, I. R. *Veterinary immunology, an introduction*. 8 ed. China. Saunders Elsevier. 2009.
28. Yacob, H. T., Terefe, G., Jaquiet, P., Hoste, H., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J. P., Dorchies, P. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus columbiformis*: effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. *Veterinary Parasitology*. 2006;137:181-184.