



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Identificación de un posible receptor para la
hormona de crecimiento en larvas 3 de *Haemonchus*
contortus”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

VERÓNICA AGUILAR BARRERA

ASESOR:

DR. FERNANDO ALBA HURTADO

CO-ASESOR

DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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
AVENIDA DE
MEXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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:**

Identificación de un posible receptor para la hormona de crecimiento en larvas 3 de Haemonchus contortus

Que presenta la pasante: VERÓNICA AGUILAR BARRERA

Con número de cuenta: 30610225-9 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 HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de septiembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
SECRETARIO	Dr. Fernando Alba Hurtado	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
2do SUPLENTE	M. en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez	

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)

IHM/ntm*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme sus puertas para recibir la educación y preparación necesaria para hacerme una buena profesionista.

Al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria por brindarme la oportunidad de realizar mi servicios social y tesis.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por la disponibilidad, conocimientos, dedicación y tiempo que me brindo para revisar este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por su tiempo y consejos durante este estudio.

Al M. en C. Cesar Cuenca Verde por su apoyo y por sus consejos en las diferentes técnicas.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN:222316, cuyos fondos permitieron llevar a cabo este proyecto.

.

DEDICATORIAS

A MAMÁ Y PAPÁ

Gracias por todo lo que me han brindado, por el amor y regaños (la mayoría de las veces innecesarios) pero que al final me hicieron cumplir una de mis metas. Esto es parte de ustedes y para ustedes; espero estén orgullosos. Los quiero.

A ALEJANDRO

Gracias por tu amorcito, comprensión, apoyo para continuar cuando parecía que me iba a rendir y pensaba que no podría. También por quedarte hasta la noche en esas veces de experimentos y por estar presente en mi vida. Te amo.

A RICARDO

Gracias por tenerme la paciencia de enseñarme tantas cosas en el laboratorio y en la vida; por todos los momentos divertidos, difíciles, estresantes pero que al final dejaron huella en mí. Gracias por convertirte en parte de mi familia. Te quiero.

A MIS AMIGOS

Chicharo, Mayra, Chucho, Felipe, Mari, Bere, Omar, Taby, Carlitos. Gracias por ser unas personas extraordinarias conmigo y por dejarme ser parte de su vida, por convivir conmigo durante todo este proceso y por ser mis amigos. Los quiero.

ÍNDICE

1. ÍNDICE	I
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	II
3. RESUMEN	1
4. INTRODUCCIÓN	2
4.1. Generalidades	2
4.2. Biología de <i>Haemonchus contortus</i>	2
4.3. Ciclo biológico de <i>H. contortus</i>	3
4.4. Patogenia	5
4.5. Factores que influyen en la hemoncosis	6
4.6. Hipobiosis y alza postparto.....	6
4.7. Hormonas	7
4.8. Receptores	8
4.9. Hormona del crecimiento	8
4.10. Receptores para la hormona del crecimiento.....	10
4.11. Interacción hormona-parásito	10
4.12. Susceptibilidad y hormonas	12
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. OBJETIVOS.....	15
7. HIPOTESIS.....	16
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
8.1 Ubicación	17
8.2 Material biológico.....	17
8.3 Infestación	17
8.4 Obtención de L3 de <i>H. contortus</i>	17
8.5 Citometría de flujo	18
8.6 Inmunofluorescencia.....	19
9. RESULTADOS	20
9.1 Citometría de flujo	20
9.2 Inmunofluorescencia	23
10. DISCUSIÓN	26
11. CONCLUSIÓN.....	28
12. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

1. Figura 1. Ciclo Biológico de <i>H.contortus</i>	4
2. Figura 2. Plot celular. Muestra el tamaño y la complejidad de las células de <i>H. contortus</i>	20
3. Figura 3. Plot celular e histogramas por región	22
4. Figura 4. Comparación del porcentaje de positividad de las tres regiones de células incubadas con GHR	23
5. Figura 5. Control negativo larva 3 de <i>H. contortus</i>	24
6. Figura 6. Larva 3 de <i>H. contortus</i> fluorescente	24
7. Figura 7. Esquema de la larva infectante (L3) de nematodos gastrointestinales de ovinos	25
8. Figura 8. Larva 3 de <i>Haemonchus contortus</i> sin cutícula.....	25
9. Figura 9. Larva 3 de <i>Haemonchus contortus</i> fluorescente	25
10. Tabla 1. Interacción de parásito-hormona y consecuencias	13

RESUMEN

La susceptibilidad a las parasitosis ha sido asociada a algunos factores del hospedero como: sexo, edad, estado nutricional y factores endocrinos (hormonas) del mismo. Estudios recientes demostraron la presencia de receptores para prolactina y progesterona en larvas 3 de *Haemonchus contortus*. Se ha demostrado que la hemoncosis es más severa en los corderos que en los adultos, sin embargo, no existen estudios sobre la relación que existe entre las hormonas más importantes en corderos y *H. contortus*. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar por citometría de flujo e inmunofluorescencia posibles receptores para la hormona del crecimiento (GHR) en larvas 3 de *H. contortus*. Por macerado de larvas de *H. contortus* se obtuvieron células, se marcaron con un anticuerpo primario anti-GHR (Santa Cruz, Biotechnology, USA) y con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (eBioscience, USA) acoplado a Alexa 647. El conteo de células marcadas se realizó con un citómetro FACScalibur y el software FlowJo. La inmunofluorescencia se realizó con larvas permeabilizadas para permitir la entrada de proteínas, como anticuerpo primario se utilizó un anti-GHR (Santa Cruz, Biotechnology, USA) y como secundario un anti-IgG de ratón acoplado a FITC (Molecular, Probes®, USA), las muestras se analizaron por microscopía confocal. Por citometría se determinó que solo el 0.845% del total de células obtenidas fueron reconocidas por el anticuerpo anti-GHR, pero cuando se analizaron por regiones, las células de mayor tamaño y granularidad, el 3.34% de las células fueron reconocidas por el anticuerpo anti-GHR. Por inmunofluorescencia se observó fluorescencia en las células del intestino de las larvas. Por lo anterior, se puede concluir que las larvas 3 de *H. contortus* tienen células que expresan posibles receptores para la hormona del crecimiento y que estas células se encuentran a nivel intestinal.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

La ovinocultura es una actividad agropecuaria que tiene un gran impacto económico en el mundo. En México se tienen registradas alrededor de 53,000 unidades de producción, las cuales por lo general se desarrollan bajo el sistema de pastoreo (SAGARPA, 2013).

El sistema de producción en pastoreo constituye una gran ventaja por el ahorro en los costos de producción, sin embargo, favorece la infección por nematodos gastroentéricos ocasionando pérdidas económicas provocando trastornos digestivos que interfieren en la nutrición y desarrollo de los ovinos (Cuéllar, 1986; SAGARPA, 2013).

Los principales géneros de nematodos gastroentéricos son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia sp*, *Trichostrongylus sp*, *Cooperia sp*, *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus sp*, *Oesophagostomum sp*, *Trichuris ovis*, *Bunostomum sp* y *Skrjabinema ovis*; los cuales tienen diferente afinidad por ciertas partes del tracto digestivo (Cuéllar, 1986).

Debido a su alta incidencia, patogenicidad y distribución geográfica, *Haemonchus contortus* se considera el nematodo mas importante en este síndrome. Se caracteriza por generar disminución de los parámetros productivos, anemia y ocasionalmente la muerte. Provocando infecciones de curso agudo, hiperagudo y crónico (Cuéllar, 1986; Quiróz, 2003).

BIOLOGÍA DE *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus es un nematodo hematófago que habita en el abomaso de ovinos y caprinos, sin embargo, se le puede encontrar en bovinos y otros rumiantes silvestres (Quiroz, 2003).

También es conocido como gusano del cuajar, gusano contorneado y gusano palo de barbería; esta última sinonimia es debido a que los ovarios

blanquecinos de la hembra se encuentran alrededor del intestino y cuando se alimenta, el intestino se ve rojo dando la apariencia de palo de barbería (Lapage, 1968; Borchert, 1981; Soulsby, 1987).

H. contortus posee una capsula bucal, con un fino diente o lanceta con la cual perfora la mucosa abomasal. El macho tiene una longitud de 10 a 20 mm y terminan con una bolsa copulatrix bien desarrollada; mientras que la hembra llega a medir de 18 a 30 mm con una terminación en forma de punta roma con la vulva localizada al final del segundo tercio del cuerpo (Alba, 2007).

CICLO BIOLÓGICO DE *H. contortus*

H. contortus tiene un ciclo biológico directo (Figura 1), el cual fue descrito originalmente por Veglia en 1915. Este se constituye por una fase no parásita que consta de huevo, larva 1, larva 2 y larva 3. Además, otra parásita con los estadios de larva 4, larva 5 y adultos (Nikolaou y Gasser, 2006).

FASE NO PARÁSITA

La fase no parasita comienza cuando los adultos copulan y la hembra libera huevos (5,000 a 10,000 huevos por día), los cuales son expulsados en las heces (Quiróz, 2003). En el piso, se desarrolla la larva 1 (L1) sale del huevo y posteriormente se alimenta de bacterias presentes en la materia fecal para evolucionar a larva 2 (L2) y después a larva 3 (L3). La L3 conserva la cuticula de la L2; protegiéndola de condiciones climatológicas desfavorables, sin embargo, en este estadio no se puede alimentar (Lapage, 1968); esta fase es considerada como la larva infestante.

La L3 es muy activa y presenta diferentes tropismos: hidrotropismo positivo, fototropismo negativo, termotropismo positivo (temperatura ideal de 15 a 30 °C) y geotropismo negativo; lo que favorece que la larva infestante se desplace hasta la parte más alta de los pastos donde podrá ser ingerida por el hospedador (Cordero *et al.*, 1999; Nikolaou y Gasser, 2006).

FASE PARÁSITA

Esta fase comienza cuando la larva infestante es ingerida por el rumiante; la L3 pierde la cutícula en el tracto digestivo por la enzima leucinoaminopeptidasa, la cual es activada por CO₂ y anhidrasa carbónica presentes en el rumen. La L3 tiene afinidad por la región fúndica abomasal donde penetra las glándulas abomasales y muda a larva cuatro (L4) (Maena y Rojo, 1999).

La L4 se alimenta por 15 días aproximadamente, sale a la luz del abomaso y muda a larva cinco (L5), también llamada pre-adulto. La L5 se desarrolla y se diferencia sexualmente hasta transformarse en adulto. Los adultos copulan y las hembras ovipositan; de esta forma el ciclo se cierra. La duración promedio del ciclo biológico es de 21 días (Jacobs *et al.*, 1995; Bush *et al.*, 2001).

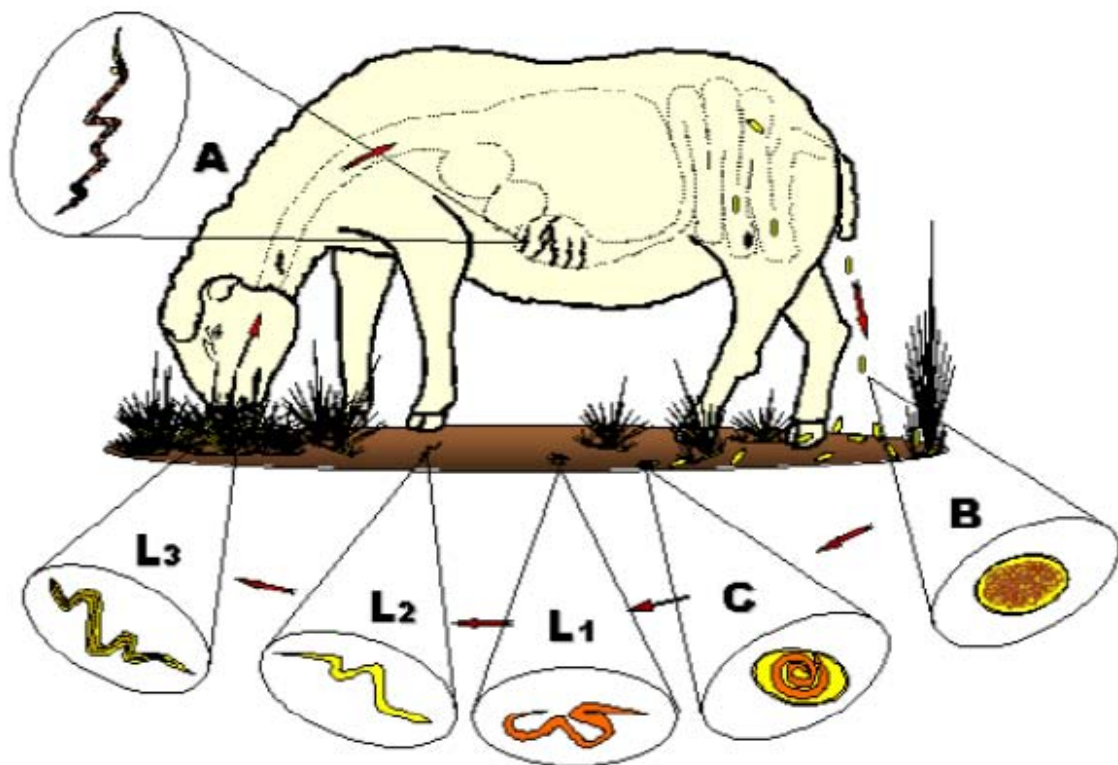


Figura1. Ciclo biológico de *H. contortus*. A) Adultos en la mucosa abomasal, B) Huevo eliminado en heces, C) Huevo larvado, L₁) Larva 1 libre en suelo, L₂) Larva 2, L₃) Larva 3 (fase infectante). Tomado de Cuenca, 2010.

PATOGENIA

La patogenicidad de la hemoncrosis depende de las fases del ciclo evolutivo; a grandes rasgos, la L4 tisular e hipobiótica ejercen acción obstructiva y mecánica por compresión, además de una acción traumática al penetrar las criptas abomasales permitiendo que se alimente de pequeños coágulos formados; la secreción y excreción de proteínas provenientes de las larvas ocasiona una acción antigénica provocando necrosis inmunomediada del tejido circunvecino y respuesta inmune local y humoral (Radostis, 2002).

La presencia de las larvas en las criptas abomasales provoca una hiperplasia y sustitución de células parietales secretoras de HCl por células inmaduras; las cuales al no secretar HCl producen un aumento de pH lo que disminuye la conversión de pepsinógeno a pepsina, lo cual disminuye la digestión proteica (Quiróz, 2003; Alba, 2014).

Los adultos al alimentarse en la luz abomasal, producen un efecto traumático al romper mucosa abomasal con su lanceta, una acción tóxica por causa de sustancias anticoagulantes que se infiltran en el tejido, provocando una pequeña úlcera favoreciendo la pérdida de pequeñas cantidades de sangre. El consumo de sangre por gusano adulto es de aproximadamente 0.05 mL por día, lo que provoca anemia e hipoproteïnemia al hospedador por la pérdida de eritrocitos y proteínas plasmáticas (Quiróz, 2003; Alba, 2014).

La hemoncrosis puede cursar con tres cuadros clínicos. El primero es un cuadro hiperagudo, que afecta a animales susceptibles expuestos a una repentina infección masiva, lo que provoca una gastritis hemorrágica, dolor en el hipocondrio derecho, anemia y heces oscuras, ocasionalmente muerte súbita. El segundo es un cuadro agudo donde los animales jóvenes son los más afectados, se debe a la ingestión de grandes cantidades de larvas pero en forma diferida, lo que ocasiona diarrea intermitente (café oscuro), pérdida de peso, retraso en el crecimiento, emaciación, mucosas pálidas y edema submandibular. El último cuadro es el crónico, se debe a la presencia de pequeñas cantidades de gusanos adultos, que se mantienen por largos periodos, se produce baja de parámetros

productivos, la gravedad depende de la carga parasitaria (Dunn, 1983; Blood *et al.*, 1986; Cuéllar, 1986; Soulsby, 1987).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HEMONCOSIS

La presencia de la hemoncosis va ligada a diferentes factores del hospedero, por ejemplo la raza, el sexo, la edad, el estado hormonal y nutricional. Muñoz-Guzmán *et al.* (2006) reportó que los ovinos de raza Columbia eran más susceptibles en comparación a los de raza Blackbelly, debido a que estos últimos montaban una respuesta inmunológica más rápida. Kassai (1999) menciona que las hembras son más resistentes que los machos arrojando una menor cantidad de huevos por gramo de heces, sin embargo, el estado hormonal juega un papel importante ya que las altas concentraciones de hormonas en las diferentes etapas fisiológicas han sido relacionadas con la susceptibilidad; Fleming (1993) observó que las hembras tratadas con prolactina tenían una mayor eliminación de huevos por gramo de heces en comparación con las que no fueron tratadas.

El estado nutricional es un factor que también influye en la presentación de esta enfermedad, siendo los animales subnutridos por lo regular los que presentan cargas parasitarias mayores en relación a aquellos que mantienen óptimas condiciones nutricionales; de igual forma la edad está relacionada con la susceptibilidad, debido a que los corderos menores de un año de edad son más afectados que los adultos, esto pudiera relacionarse con la deficiencia en el desarrollo de la inmunidad celular o por consecuencia de una baja calidad inmunológica en el calostro (Cuéllar, 1992; Kassai, 1999).

HIPOBIOSIS Y ALZA POSTPARTO

La hipobiosis es un fenómeno parasitario en el cual la L4 detiene su desarrollo y se mantiene en un estado de latencia en las glándulas del abomaso (Gibbs, 1982; Schmidt y Roberts, 2000). Gantogi *et al.* (1998) asociaron que la inhibición del desarrollo de las larvas está relacionada con bajas temperaturas y la co-existencia de adultos.

Otro fenómeno conocido en el ciclo de *H. contortus* es el alza post parto o alza de primavera (spring rise), en el cual existe un incremento en la eliminación

de huevos en heces alrededor del parto. Las causas que se han asociado a este fenómeno son: la reactivación de larvas en estado de hipobiosis y una relajación de la respuesta inmune (Rimbaud, 2005).

Debido a que este fenómeno empieza poco antes del parto y llega a su punto más alto cuatro a ocho semanas después (lactancia) se ha propuesto que la prolactina podría tener efecto en este fenómeno modificando el metabolismo de los gusanos (Fleming, 1993 y 1997; Gutiérrez, 2015).

HORMONAS

Una hormona es una sustancia química secretada por una célula o grupo de células, la cual va a ejercer efectos fisiológicos sobre otras células del organismo. Existen hormonas locales que actúan en células diana próximas a su lugar de liberación y hormonas generales o circulantes las cuales se difunden desde el espacio extracelular al interior de los capilares y son transportadas en la sangre a todos los tejidos del organismo donde solamente actuarán en células diana con receptores específicos para la hormona (Fox, 2003; Guyton, 2006)

Cabe mencionar que existen varios tipos de hormonas, entre las que podemos encontrar las esteroides que son derivados del colesterol por lo que poseen una estructura similar y sintetizadas en el retículo endoplasmático liso de las células endocrinas; algunos ejemplos son la aldosterona, cortisol, estrógenos, progesterona y testosterona. Las aminas son otro tipo de hormonas, siendo moléculas más simples derivadas de la histidina (histamina) y de la tirosina (tiroxina, triyodotironina, adrenalina, noradrenalina y melatonina). Por último las hormonas proteicas o péptidicas, están formadas por cadenas de aminoácidos y son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso de las células endocrinas; ejemplos de este tipo hormonal son la tirotropina, corticotropina, gonadotropinas, prolactina, hormona del crecimiento, hormona antidiuretica, oxitocina, somatostatina, entre otras (Greenspan, 1998; Ganong, 2000; Guyton, 2006).

Para que una hormona pueda efectuar su acción biológica es necesaria la presencia de su receptor en la célula. La interacción hormona-receptor es fundamental para aseverar que un organismo es capaz de tener respuestas dado los efectos hormonales (Ganong, 2000).

RECEPTORES

La actividad biológica de las hormonas depende de sus interacciones con receptores específicos de gran afinidad en la superficie de las células blanco. Los receptores a su vez, se vinculan a sistemas efectores de señalización que se encargan de generar la respuesta biológica observable. Por tanto, los receptores transmiten no solo la especificidad de la respuesta (por ejemplo, las células carentes de receptores no poseen reactividad a la hormona), sino también los medios para activar el mecanismo efector (Ganong, 2000).

Los receptores de hormonas proteicas (membranales) tienen diferentes formas de inserción en la membrana plasmática. Estos receptores pueden ser cadenas polipeptídicas únicas o pueden tener múltiples inserciones transmembrana. Dependiendo del receptor, la activación de la cascada de señalización puede ser intrínseca o por proteínas acopladas al receptor (Greennspar, 1998; Ganong, 2000).

En este sentido, los receptores de insulina, factor de crecimiento tipo insulina (IGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) tienen uno o dos dominios transmembrana con actividad intrínseca de tirosin cinasa, la cual se activa (fosforilación) en presencia del ligando. Por el contrario, el receptor de prolactina y hormona de crecimiento se caracterizan por un gran dominio extracelular, seguido de un segmento único de inserción de membrana y un apéndice citoplásmico; estos receptores no poseen actividad intrínseca de tirosin cinasa, pero tienen complejos proteicos acoplados que si presentan dicha actividad. (Greennspar, 1998; Guyton, 2006).

HORMONA DEL CRECIMIENTO

La hormona del crecimiento (GH) es un polipéptido de 191 aminoácidos y una cadena única con dos puentes disulfuro y un peso molecular de 22,000 kD; se sintetiza y secreta por las células somatotropas de la adenohipófisis; teniendo una amplia relación con la prolactina (McDonald, 1986; Carroll *et al.*, 1998; Ganong, 2000).

El control de la secreción es bastante complejo siendo ejercida básicamente por un perfecto equilibrio entre dos péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de GH (GHRH), que tiene un efecto estimulador, y la hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (somatostatina).

La concentración de GH circulante en plasma es de 0 a 3 ng/mL; esta se encuentra bajo control de una retroalimentación negativa, donde la concentración de hormona circulante es dependiente de la cantidad de receptores presentes en las células. (Carroll *et al.*, 1998; Ganong, 2000).

La GH tiene efecto anabólico sobre las proteínas, favorece el balance nitrógeno/fosforo incrementando el fosforo plasmático y disminuyendo las concentraciones sanguíneas del nitrógeno ureico y aminoácidos. También se incrementa la absorción gastrointestinal del Ca^{2+} y disminuye la excreción de Na^+ y K^+ por acción independiente de las glándulas suprarrenales (Carroll *et al.*, 1998; Ganong, 2000). De igual manera la GH es diabetógena incrementando la salida de glucosa hepática y teniendo un efecto antiinsulínico en músculo.

Incrementa la concentración de los ácidos grasos libres (AGL) plasmáticos, el cual proporciona una fuente rápida de energía para los tejidos durante la hipoglucemia; sin estimular directamente las células β del páncreas, sin embargo, aumenta la capacidad para responder a los estímulos de insulínógenos como la arginina y la glucosa. Aumenta la masa magra corporal y disminuye la grasa en el cuerpo (Carroll *et al.*, 1998).

Los efectos de GH sobre el crecimiento, el cartílago y el metabolismo proteínico son dependientes de las somatomedinas. Estas consisten en factores de crecimiento polipeptídicos secretados por el hígado y otros tejidos por efecto de esta hormona. Las principales somatomedinas circulantes son el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y al factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (IGF-II); estos factores se ven afectados por la GH y participan en el crecimiento del feto y aumentando sus concentraciones circulantes durante la infancia, alcanzando el máximo en la pubertad y disminuyendo hasta la vejez (McDonald, 1986; Carroll *et al.*, 1998; Guyton, 2006).

RECEPTOR PARA HORMONA DEL CRECIMIENTO

El receptor para la hormona del crecimiento (GHR) es una proteína de 620 aminoácidos y está dentro de los receptores citocina tipo I; los cuales utilizan JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators). Este receptor está constituido por un dominio extracelular (ECD) con dos sitios de enlaces y un dominio intracelular (ICD) con box 1 y box 2 que se unen a JAK2 (Greennspar, 1998; Ganong, 2000).

Los JAK2 están formados por dos estructuras, JH1 y JH2; esta última inhibe la JH1 cuando no hay interacción de hormona-receptor, por el contrario, cuando existe una unión de la GH al GHR, la JH2 permite la fosforilación de las tirosinas mediante la vía de la JH1. La fosforilación permite la unión de las STAT5 que se dirigen al núcleo para activar los elementos responsables de la transcripción (Brooks *et al.*; 2008).

INTERACCIÓN HORMONA-PARÁSITO

Los parásitos han desarrollado diferentes mecanismos de supervivencia generalmente asociados a la evasión de la respuesta inmune, sin embargo, se ha demostrado que existen interacciones entre hormonas y parásitos, las cuales pueden modificar la relación hospedero-parásito. Este fenómeno conocido como regulación cruzada, establece que el parásito puede aprovechar las hormonas del hospedero a través de moléculas semejantes a receptores hormonales y obtener beneficios a través de estas. (Cervantes y Carrero, 2009).

Los nematodos poseen un alto número de receptores nucleares (NR), los cuales en vertebrados e insectos son reguladores de la transcripción y señalización hormonal. La primera evidencia de la regulación endocrina en nematodos fue la presencia de células neurosecretoras en *Phocanema decipiens* (parásito del bacalao); afectando de manera anatómica de la muda de este (Höss y Weltje, 2007).

En algunos parásitos como *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis* y *Dirofilaria immitis* se han identificado receptores nucleares (NR) para testosterona y progesterona, cuya función es colaborar en la regulación de

homeostasis, diferenciación y reproducción. También se identificó la presencia de receptores de hormonas tiroideas en el trematodo *Schistosoma mansoni*. En este mismo parásito, se observó que al ser expuestos con dehidroepiandrosterona (DHEA) las cercarías, esquistosomulas y gusanos adultos inhiben hasta en un 100% su viabilidad y oviposición; mientras que el tratamiento con cortisol solo afecta a los gusanos adultos (Wu y LoVerde, 2011).

Ibarra *et al.* (2011) demostró que *Taenia crassiceps* presenta un receptor de estrógenos, el cual al unirse al 17 β -estradiol favorece la capacidad reproductiva y aumenta su implantación (incrementando el número de yemas producidas), mientras que la testosterona o dihidrotestosterona (DHT) abate estas funciones. Esta misma hormona (DHT) genera un efecto inverso en *Trichinella spiralis*, debido a que favorece su implantación, por lo cual afecta principalmente a machos (Klein, 2004).

En *Plasmodium falciparum*, el tratamiento *in vitro* de merozoitos con cortisol aumenta el número y tamaño de gametocitos de este parásito. De manera semejante merozoitos tratados con estradiol, progesterona y testosterona, incrementan considerablemente el número de gametocitos producidos *in vitro*, aumentando en los dos casos el crecimiento y la reproducción del parásito en este estadio (Maswoswe *et al.*, 1985).

Los trofozoítos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* al ser expuestos constantemente al estradiol, progesterona y testosterona no se ve afectada ninguna función del parásito; sin embargo, al ser tratados con cortisol se incrementa la síntesis de ADN y la proliferación de los trofozoítos (Escobedo y Morales, 2004).

En este sentido, se ha demostrado experimentalmente un aumento en la concentración de huevos de *H. contortus* en heces de ovejas después de ser inyectadas con prolactina (Fleming, 1993). De igual forma se reportó un aumento en la concentración de número de huevos en heces, un aumento en la longitud en machos y una disminución en hembras de *H. contortus* encontradas en borregas ovariectomizadas y tratadas con prolactina (Fleming, 1997).

Aunque la prolactina es la principal hormona asociada con la hemoncosis y su biología (alza postparto), otras hormonas podrían tener efectos en este nematodo; se ha demostrado la presencia de posibles receptores para progesterona, prolactina e insulina en *H. contortus* (Facai, 2014; Gutiérrez, 2014 y 2015).

SUSCEPTIBILIDAD Y HORMONAS

Algunos autores mencionan que existe cierta predilección de los parásitos por infestar a un hospedero (susceptibilidad), dependiendo del sexo, estado de desarrollo, estado inmunológico, factores inmunoendócrinos, raza, estado nutricional, estado reproductivo, entre otras (Tabla 1).

Ejemplificando el estado reproductivo y la susceptibilidad a la parasitosis, se tiene que *S. mansoni* y *Taenia solium*, parasitan en mayor grado a hembras gestantes (Hu, *et al.*, 2006). La gestación y el parto también se han relacionado a la susceptibilidad con parásitos gastroentéricos de ovinos (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* y *Oesophagostomum*), en el fenómeno conocido como alza post-parto (Fleming, 1997; Chartier, 1998).

La susceptibilidad de infecciones con base en el género de la especie se puede observar con *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Taenia sp*, los cuales tienen un mayor grado de infestación hacia las hembras, debido a su afinidad por los estrógenos. Por el contrario, *Leishmania mexicana* y *major*, así como *Schistosoma mansoni*, tienen predilección por los machos (Mock B. y Nacy C., 1988; Escobedo G. y Morales J., 2004).

Aunque en la mayoría de las ocasiones los animales jóvenes se ven más afectados, en algunas ocasiones son resistentes a ciertas parasitosis. Freilich *et al.* (2000) demostró que la hormona precursora de andrógenos (DHEA), con una alta concentración en animales jóvenes disminuye la proliferación de *P. falciparum* y *P. berghei*.

La susceptibilidad de animales jóvenes generalmente se asocia a un sistema inmunológico con un desarrollo insuficiente para modular infecciones, sin

embargo, las hormonas presentes en etapas juveniles (GH, IGF, EGF) podrían tener efectos sobre la presentación de algunas parasitosis.

PARÁSITO	SUSCEPTIBILIDAD	HORMONA	EFEECTO	REFERENCIA
<i>Leishmania major</i>	Machos	Testosterona	↑ De crecimiento	Mock <i>et al.</i> , 1988
<i>Haemonchus contortus</i>	Hembras	Prolactina	↑ De longitud en hembras y huevos por gramo de heces	Fleming, 1997 Chartier, 1998
<i>Plasmodium falciparum</i>	Hembras	Estradiol, Progesterona, Testosterona	↑ De número de gametocitos	Maswoswe <i>et al.</i> , 1985
<i>Schistosoma mansoni</i>	Hembras gestantes	Progesterona	↑ De fecundidad y viabilidad	Hu <i>et al.</i> , 2006
<i>Taenia solium</i>	Hembras gestantes	Progesterona	↑ De fecundidad y viabilidad	Escobedo y Morales, 2004
<i>Taenia crassiceps</i>	Hembras	17-β-estradiol, Progesterona	↑ De la capacidad reproductiva, viabilidad	Escobedo y Morales, 2004

Tabla1. Interacción de parásito-hormona y consecuencias.

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han relacionado que existen interacciones entre hormonas y parásitos; proponiendo que estos últimos son influenciados con las hormonas y factores de crecimiento presentes en el hospedero.

Se ha demostrado experimentalmente un aumento en la concentración de huevos en heces de ovejas después de ser inyectadas con prolactina previamente inoculadas con *H. contortus* (Fleming, 1993). Sin embargo, otras hormonas podrían participar estimulando este fenómeno, recientemente, se ha demostrado la presencia de posibles receptores para la progesterona y prolactina en larvas 3 de *H. contortus* (Gutiérrez-Amezquita *et al.*, 2014 y 2015).

La hemoncosis se presenta más en animales jóvenes, esta susceptibilidad generalmente se asocia a un sistema inmunológico con un desarrollo insuficiente para modular infecciones, sin embargo, las hormonas presentes en etapas juveniles (GH, IGF, EGF) podrían tener efectos sobre la susceptibilidad.

Hasta el momento, la mayor parte de los trabajos de endocrinología parasitaria se han enfocado a las hormonas presentes en animales adultos las cuales se han asociado a susceptibilidad, sin embargo, poco se sabe de las hormonas presentes en animales jóvenes que pudieran tener efecto sobre los parásitos, entre éstas se encuentra la hormona de crecimiento la cual tiene una amplia relación con la prolactina (Escobedo y Morales, 2004).

El primer paso para demostrar que alguna hormona pudiera tener un efecto biológico sobre el parásito es demostrar la presencia de un receptor para dicha hormona en el parásito. Por lo anterior, en el presente estudio, se pretendió identificar la presencia de posibles receptores para la hormona del crecimiento en L3 de *H. contortus* mediante la técnica de Citometría de flujo e Inmunofluorescencia.

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar la presencia de un posible receptor para la hormona del crecimiento en larvas 3 de *Haemonchus contortus*.

PARTICULARES

- Identificación de la población celular en el cuerpo de larvas de *H. contortus* positivas a un posible receptor para GHR.
- Inmunolocalización de los posibles receptores de la hormona del crecimiento en larvas 3 de *H. contortus*.

HIPÓTESIS

Las larvas 3 de *Haemonchus contortus* tienen moléculas semejantes a receptores para la hormona del crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

UBICACIÓN

La obtención de larvas de *H. contortus*, se realizó en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán UNAM, campo 4. Las pruebas de citometría de flujo e inmunofluorescencia se realizaron en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Laboratorio del Dr. Jorge Morales Montor y la Dra. Norma Moreno respectivamente.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó un cordero calostrado ,raza Columbia de tres meses de edad, con un peso aproximado de 10 kg, se alojó en un corral de 5x5 m², se le proporcionó agua *ad libitum* y como alimento base se le proporcionó heno de alfalfa y concentrado.

INFESTACIÓN

El cordero se desparasitó con la finalidad de eliminar la carga parasitaria presente, posteriormente se realizaron exámenes coproparasitoscópicos para comprobar la ausencia de parásitos gastroentéricos. Para la obtención de larvas de *H. contortus* se infestó el cordero vía oral con 5000 L3 activas de la cepa del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos.

OBTENCIÓN DE L3 DE *H. contortus*

Se realizó un cultivo larvario (Alba, 2007) para la obtención de L3 de *H. contortus*; las heces se tomaron directamente del recto del animal previamente infestado; estas se llevaron al laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la FES-Cuautitlán, UNAM para proceder al cultivo.

Se colocaron las heces en cajas de Petri chicas y se les agrego un poco de agua corriente, estas cajas se colocaron en cajas de Petri grandes con más agua,

se taparon y se introdujeron en la estufa de cultivo (26 a 28°C) durante siete días, pasado este tiempo se recolectaron las larvas mediante la técnica de Baermann.

Obtención de L3 sin cutícula

Para recuperar L3 sin cutícula se tomaron 10 mL del cultivo larvario obtenido por la técnica de Baermann, se centrifugo a 55 g durante 5 min, se decantó y se aforo a 10 mL con agua destilada, se repitió este procedimiento tres veces para enjuagar las larvas.

Se quitó la cutícula de las larvas agregando Hipoclorito comercial (Cloralex) al 5%, se aforó a 10 mL y se centrifugó a 700 g por 7 min; posterior al centrifugado se eliminó el sobrenadante y se colocaron 50 µL en un portaobjetos con la finalidad de observar el desprendimiento de la cutícula; una vez que se verificó el desprendimiento de la cutícula se realizaron 4 enjuagues con PBS 1x centrifugando (55 g / 5 min), aforando y decantando hasta obtener larvas limpias.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar la citometría se obtuvieron células de larvas 3 de *H. contortus* sin cutícula. Las células fueron disgregadas con un micropestle, hasta no ver grumos; se centrifugaron a 600 g por cinco minutos, se decantó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de paraformaldehído al 4% por quince minutos a 37°C para fijar las células disgregadas; pasado este tiempo las células se permeabilizaron con metanol al 70% por 30 minutos a una temperatura de 37°C y después se enjuagó con PBS 1x y centrifugó a 600 g durante cinco minutos.

Las células se incubaron con el anticuerpo anti-GHR 1:30 (Santa Cruz, Biotechnology, USA) por quince minutos a 37°C y se volvieron a centrifugar con PBS1x para eliminar el exceso de anticuerpo primario; después se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón en una dilución 1:200 (eBioscience, USA) acoplados al fluorocromo Alexa 647 , durante treinta minutos a 4°C (Nava-Castro *et. al.* 2011). Después se pasaron por el citómetro de flujo FACScalibur y el software FlowJo del Laboratorio del Dr. Jorge Morales Montor en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se utilizarón aproximadamente 10,000 larvas 3 enjuagadas sin cutícula en PBS 1x. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min a temperatura ambiente (1 mL aproximadamente). Después de la fijación las larvas se centrifugaron y se realizaron 2 enjuagues con PBS 1x (5 min cada uno).

Posterior al enjuague, las larvas se embebieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS por 24 horas. Pasado este tiempo se enjuagarón con PBS 1x por 5 minutos (2 veces).

Las larvas embebidas en sacarosa se permeabilizaron con Triton 1% en PBS 1x durante una hora, después se realizaron dos enjuagues con PBS 1x por 5 minutos y se bloqueó toda la noche con albumina al 1% a 4°C. Se alicuotaron las larvas en 6 tubos, 3 se utilizarón para la detección del receptor de hormona del crecimiento (GHR) de la marca Santa Cruz Biotechnology; los 3 tubos restantes como respectivos controles negativos. La incubación del Ac se dejó por 24 horas a 4°C con una concentración 1:300 diluido en albumina al 1%. Las larvas obtenidas se incubaron se enjuagaron 4 veces con PBS 1x y se bloqueo con albumina al 1% por 5 minutos. Posteriormente, todos los tubos se incubaron con el anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo FITC (Molecular, Probes®, USA) a una concentración 1:100 incubándose por 24 hrs a 4°C.

Para finalizar las larvas se enjuagaron 2 veces con PBS 1x y se montaron en portaobjetos excavados. Como medio de montaje se utilizó DAKO®. Las laminillas se dejaron por 24 horas a 4°C antes de analizarlas. Las muestras se observaron en un microscopio confocal (Pascal Zeiss LSM5).

RESULTADOS

CITOMETRÍA DE FLUJO

En la figura 2 se observa toda la población celular (plot celular) de los disgregados de larvas 3 de *H. contortus* dividido en cuatro cuadrantes, los cuales indican el tamaño y granularidad de las células. El primer disgregado (Q1) se localiza en la parte superior izquierda, representan el 4.31% de células pequeñas y de una gran granularidad del total de células. El 29.4% del plot celular se encontró en el disgregado Q2, donde la población fue representada por células grandes y muy complejas. El siguiente disgregado (Q3) ubicado en la parte inferior derecha y con un porcentaje de 12.2 tuvo una celularidad de gran tamaño pero poca granularidad; por último dentro del cuarto cuadrante (Q4) encontramos que el 54.2% de las células son de poca complejidad y tamaño reducido. El total de células analizadas en cada disgregado fue de 10,000 eventos.

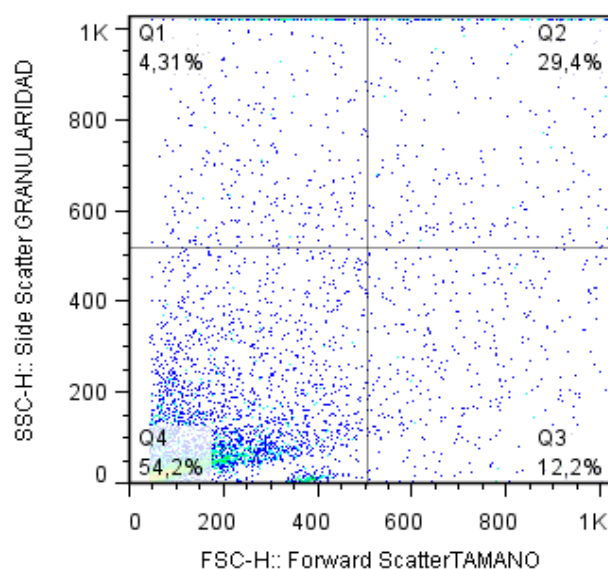


Figura 2. Plot Celular. Muestra el tamaño y la complejidad de las células de *H. contortus*; Q1 células pequeñas y complejas; Q2 células pequeñas y muy complejas; Q3 células grandes y poco complejas; Q4 células pequeñas y poco complejas.

Se analizaron tres regiones del plot celular obtenido. En la figura 3 se muestran las regiones y sus respectivos histogramas comparando células sin teñir, células incubadas con el anticuerpo secundario y células incubadas con el anticuerpo dirigido a GHR. A-1) muestra la primera región, incluye células de diferente tamaño y granularidad (20.2% de las células del plot); A-2) representa el histograma de la misma región, mostrando el 0.933% de células positivas. B-1) muestra la segunda región, incluye células de baja granularidad y tamaño (12.9 % de las células del plot); B-2) el histograma de esta región muestra un porcentaje de células positivas de 0.718. C-1) muestra la región 3 que incluye células de gran tamaño y granularidad (2.39% de las células del plot); C-2) en este histograma el porcentaje de positividad es de 3.81%.

En la figura 4 representa la comparación de medias de las tres regiones, en la región 1 el porcentaje de células positivas fue de 0.845, en la región 2 el porcentaje de células positivas fue de 0.748 y en la región 3 el porcentaje de células positivas fue de 3.34. Observando que en la última región el porcentaje de células positivas fue mayor en comparación a las otras dos regiones.

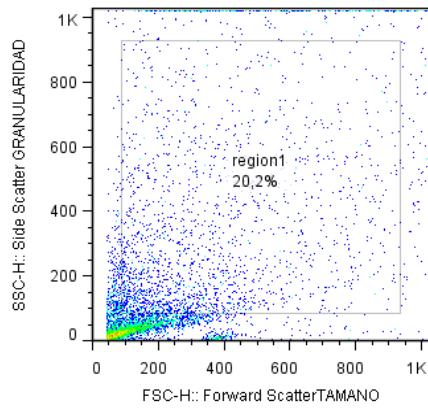
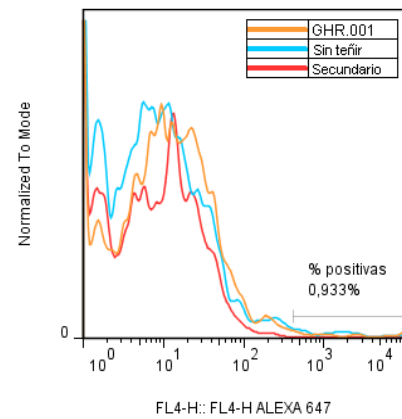
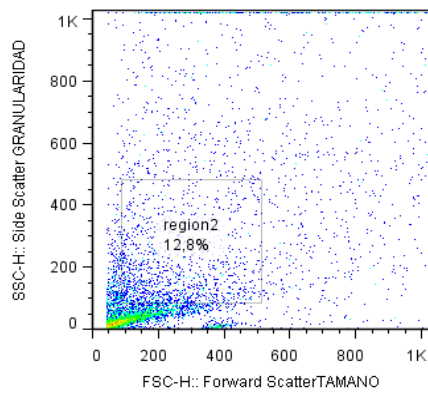
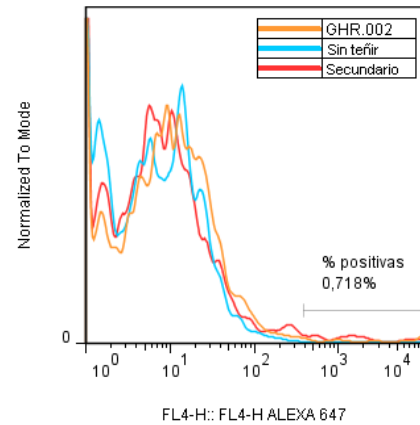
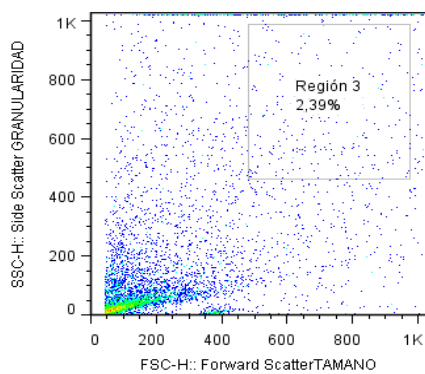
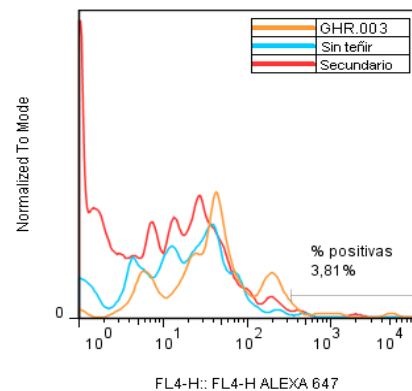
A1**A2****B1****B2****C1****C2**

Figura 3. Ejemplos de Plot celular e histogramas por región. A1) Plot celular de la región 1. A2) Histograma representativo de la región 1. B1) Plot celular de la región 2. B2) Histograma representativo de la región 2. C1) Plot celular de la región 3. C2) Histograma representativo de la región 3.

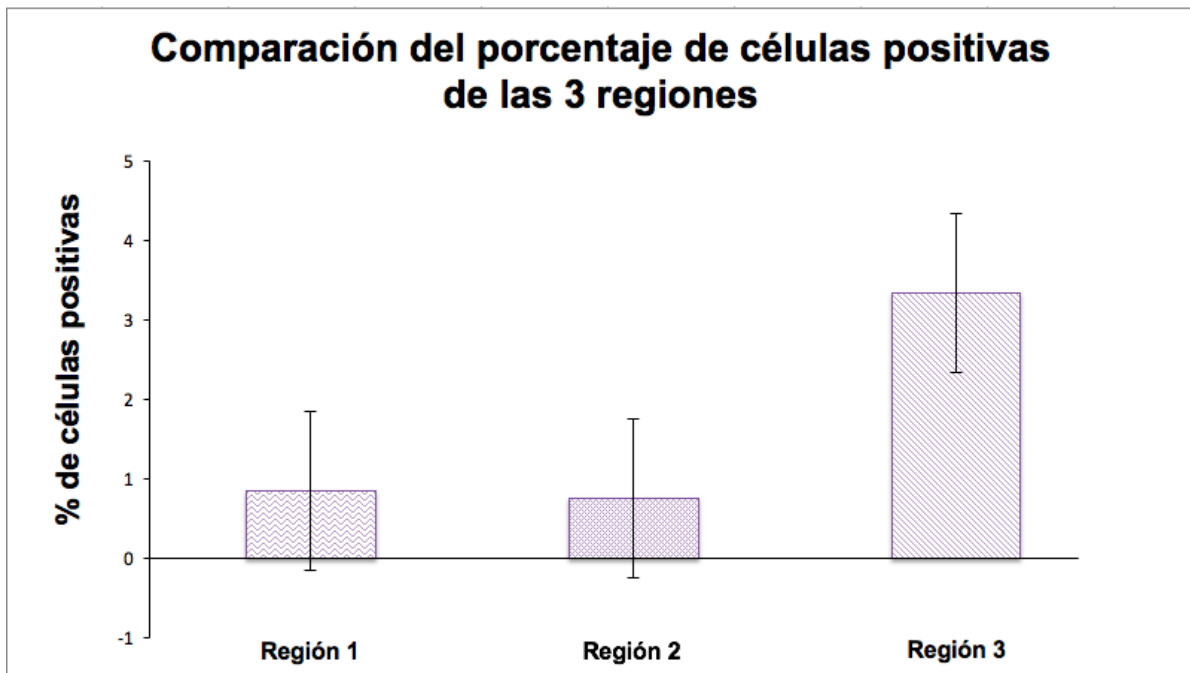


Figura 4. Comparación del porcentaje de positividad de las tres regiones de células incubadas con GHR. Region 1: 0.845%, Region 2: 0.748%, Region 3: 3.34%

INMUNOFLOURESCENCIA

Los resultados que se obtuvieron de la inmunofluorescencia, mostraron la localización de las células positivas para el posible receptor de la GH dentro de una larva 3 de *H. contortus*. En la figura 5 se presenta una larva permeabilizada e incubada únicamente con el anticuerpo secundario (control negativo). 5-A) Larva en un campo oscuro (estimada con fluorescencia), 5-B) La misma larva en un campo claro (microscopia convencional), 5-C) Transposición de las imágenes A y B, no se observa fluorescencia.

En la figura 6 se presenta una larva permeabilizada e incubada con el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario. 6-A) Larva en un campo oscuro (estimada con fluorescencia), 6-B) La misma larva en un campo claro (microscopia convencional), 6-C) Transposición de las imágenes A y B, se observan células con fluorescencia en la región intestinal de la larva.

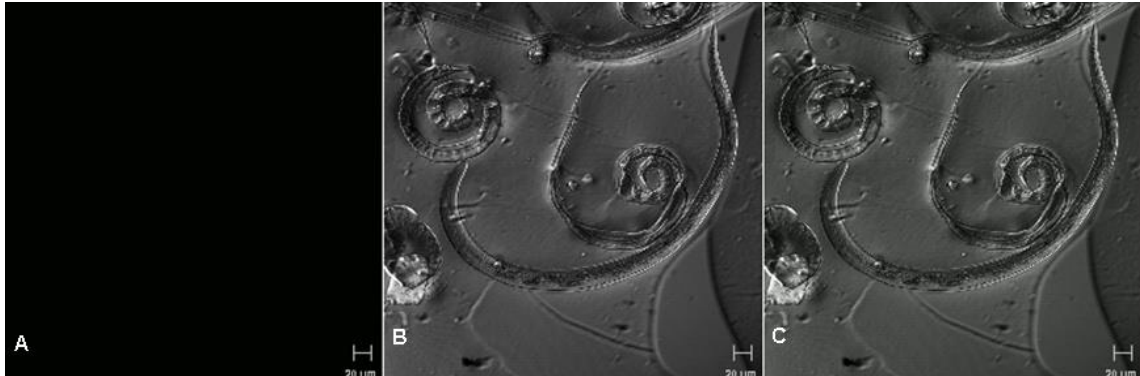


Figura 5. Control negativo larva 3 de *H. contortus*. A): Muestra el campo oscuro observado para el filtro de fluorescencia. B): Larva con campo claro, C): Larva con transposición de ambos campos A y B.

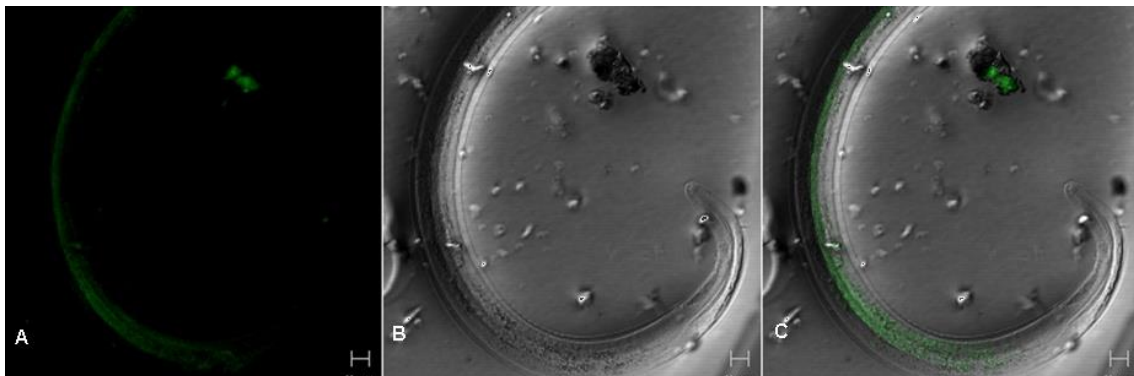


Figura 6. Larva 3 de *H. contortus* fluorescente. A): Muestra el campo oscuro observado para el filtro de fluorescencia. B): Larva con campo claro, C): Larva con transposición de ambos campos A y B.

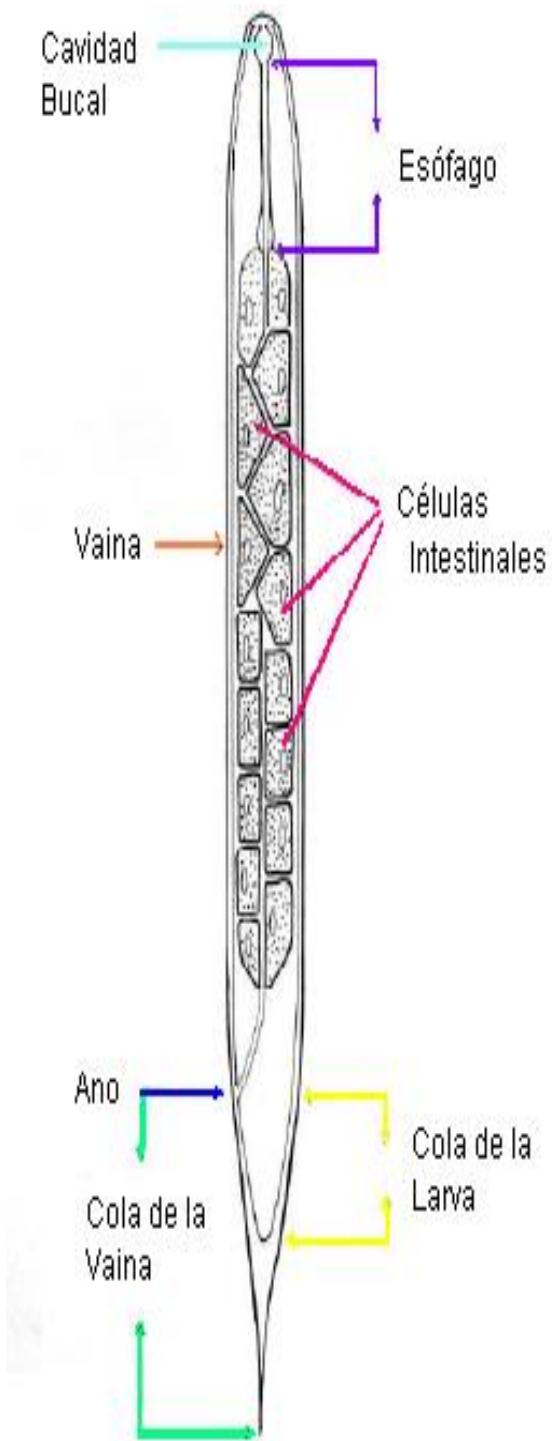


Figura 7. Esquema de la larva infectante (L3) de nematodos gastrointestinales de ovinos. Tomado de Niec, 1968.



Figura 8. Larva 3 de *H. contortus* sin cutícula.



Figura 9. Larva 3 de *H. contortus* fluorescente.

DISCUSIÓN

La presencia de hormonas en el hospedero y los efectos de estas en los parásitos ha sido un tema estudiado ampliamente en los últimos años. Se ha demostrado que existe una interacción entre hormonas y parásitos; proponiendo que estos últimos podrían beneficiarse con las hormonas y factores de crecimiento presentes en el hospedero. Las hormonas necesitan fijarse a un receptor específico para tener un efecto sobre la célula. La presencia de este receptor en una célula es una prueba indirecta de que esta hormona tiene efecto en dicha célula. En este trabajo se demostró la presencia de un posible receptor para la GH en larvas 3 de *H. contortus* mediante las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia.

La citometría es una técnica que permite determinar en forma rápida y confiable el porcentaje de células a las que se fija un anticuerpo marcado contra una molécula específica (Nava-Castro *et al.*, 2011). En este trabajo se observó que las larvas de *H. contortus* tienen células a las que se fijó un anticuerpo anti-GHR, lo que indirectamente indica la presencia del receptor. Esto sugiere que las larvas de *H. contortus* pueden utilizar la GH del hospedador en su beneficio.

Un plot obtenido en una citometría, muestra la distribución de las células evaluadas de acuerdo a su tamaño y granularidad (indirectamente mide complejidad). Los resultados obtenidos, muestran que el mayor porcentaje de células evaluadas fueron células pequeñas y poco complejas. Esta distribución es similar a la obtenida cuando se evaluaron células de *Toxocara canis* (Chávez-Güitrón *et al.*, 2016), *Taenia solium*, *Taenia crassiceps* y *Trichinella spiralis* (Nava-Castro *et al.*, 2011).

En el contexto anterior, la región con mayor porcentaje de positividad fue la región con células de gran tamaño y granularidad (región 3), en donde un 3.34% de células presentaron moléculas semejantes al receptor de GH, lo que nos hace suponer que son células intestinales debido a su complejidad y localización. Se verificó con la inmunofluorescencia en donde se observó que las

células marcadas (posible receptor de GH) se localizarón en el intestino. Lo anterior sugiere que al estimular las células del intestino, este sería más eficiente en la conversión de alimento y produciría un mejor desarrollo de la larva. Futuros estudios en donde se evalúe el efecto directo de la hormona sobre el metabolismo y crecimiento del parásito, permitirán determinar si esta hipótesis es correcta.

La presencia de diferentes receptores hormonales en otros parásitos, ha sido estudiada, recientemente se demostró la presencia y expresión de receptores para prolactina en *Toxocara canis* (Chávez-Güitrón *et al.*, 2016) y *Toxoplasma gondii* (Dzitko *et al.*, 2013); en *H. contortus* se demostraron receptores para progesterona, estrógenos y prolactina (Gutierrez-Amezquita *et al.*, 2014 y 2015); *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis*, *Dirofilaria immitis* presentaban receptores para testosterona y progesterona (Wu y LoVerde, 2011), en *Taenia crassiceps* se encontró receptores para estrógenos (Ibarra *et al.*, 2011). Sin embargo, este es el primer estudio que ha demostrado la presencia de receptores de GH en algún nematodo parásito.

Se ha asociado los niveles de prolactina al fenómeno de alza postparto de huevos de *H. contortus* en ovinos. Gutierrez-Amezquita *et al.* (2015) demostró que existen moléculas semejantes a los receptores de prolactina en larvas de *H. contortus*, dada la similitud que existe entre la prolactina y la hormona del crecimiento, se podría pensar que esta podría tener efectos parecidos afectando a otra etapa fisiológica del hospedador. La GH es una hormona presente en animales jóvenes los cuales a su vez presentan un sistema inmunológico inmaduro; la asociación de la hormona y sus posibles efectos en el parásito, así como la inmadurez inmunológica podrían estar asociados a la susceptibilidad de animales jóvenes a esta infección.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que las células de larvas 3 de *H. contortus* expresan posibles receptores para la hormona del crecimiento y que estas células se encuentran a nivel intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alba F. Parasitología veterinaria, Manual de laboratorio. UNAM: 2007.
2. Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA. Respuesta inmune asociada a la resistencia de la hemoncosis ovina. En: Avances recientes en el estudio de helmintos parásitos. Ortega-Pierres MG, Morales-Montor J, editores. Programa universitario de investigaciones en salud, UNAM. 2014.
3. Blood DC, Radostis OM, Henderson JA, Arundel JH. Medicina veterinaria. 7° Edición, Nueva Editorial Interamericana, México, 1986.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1993; 72: 248-254.
5. Brooks AJ, Wer JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1984-1989.
6. Borchert A. Superfamilia Trichostrongyloidea, Parasitología veterinaria. 3° Edición, Acribia. Zaragoza España, 1981.
7. Bush A. Fernández J, Esch G, Seed R. Parasitism; The diversity and ecology of animal parasites. Reino Unido: Cambridge Univ Press, 2001.
8. Carroll PV, Christ ER. Growth hormone deficiency in adult hood and the effects of growth hormone replacement: A Review. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 382-392.
9. Chartier C, Hoste H, Bouquet W, Malpoux B. Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats. *Parasitol Res.* 1998; 84: 806-810.
10. Chávez-Güitrón LE, Morales-Montor J, Muñoz-Guzman MA, Nava-Castro KE, Ramírez-Álvarez H, Moreno-Méndoza NA, Hernández-Cervantes R, Alba-Hurtado F. The in vitro effect prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Vet Parasitol.* 2016; 224: 33-38.
11. Coligan JE, Strober W. Current protocols in Immunology. Ed. John Wiley & Sons Inc, 1994.

12. Cordero CM, Rojo VFA, Martínez FAR. Parasitosis de los rumiantes. En: Parasitología veterinaria. Mc Graw Hill- Interamericana, Madrid España, 1999.
13. Cuéllar OJA. Nematodiasis gastroentérica. En: Principales enfermedades de los ovino y caprino. Edit. Piojan P, Tortora J, editores. México, 1986.
14. Cuéllar OJA. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo en ovinos y caprinos. Mem. Curso: Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo. Morelia (Michoacán), 1992.
15. Cuenca-Verde C, Buendía-Jiménez JA, Valdivia-Anda G, Cuéllar-Ordaz JA, Muñoz-Guzmán MA, Alba-Hurtado F. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesículas concéntrate. Vet Parasitol. 2011; 332-338.
16. Dunn AA. Helmintología veterinaria. Editorial El Manual Moderno, México, 1983.
17. Dzitko K, Dziadek B, Gatkowska J, Długowska H. *Toxoplasma gondii* binds sheep prolactin. Exp Parasitol. 2013; 134: 216-219.
18. Escobedo-González, Morales-Montor. Trans-Regularización por hormonas del hospedero de la fisiología parasitaria. Una nueva visión de la regularización hospedero-parásito. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigación Biomédicas, UNAM REB. 2004; 23 (1): 12-17.
19. Facai L, James BL, Robin BG, Pasi KK, Sandeman MR, Shi D, Zhou R, Li X, Zhou Y, Zhao J, Hu M. Hc-daf-2 encodes an insulin-like receptor kinase in the barber's pole worm, *Haemonchus contortus*, and restores partial dauer regulation. Int J Parasitol, 2014; 44: 485-496.
20. Fleming MW. Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol, 1993; 50: 109-115.
21. Fleming MW. Effects of exogenous reproductive hormones on *Haemonchus contortus* populations in lambs. J Helminthol, 1997; 64 (2): 269-274.
22. Freilich D, Ferris S, Wallace M, Leach L, Kallen A, Frincke J. 16-alpha-bromoepiandrosterone a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. Amer J Trop Med Hyg, 2000; 63: 280-283.

23. Fox SI. Fisiología Humana. 7ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2003.
24. Ganong. Fisiología médica. México: El Manual Moderno, 2000.
25. Gantogi PM, Prichard RK, Ranjan S, Gathuma JM, Munyua WK, Cherviyot H, *et al.* Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet Parasitol.* 1998; 77: 49-61.
26. Gibbs HC. Mechanisms of survival of nematode parasites with emphasis on hypobiosis. *VetParasitol*, 1982; 11: 25-48.
27. Gutierrez-Amezquita R, Nava-Castro K, Muñoz-Guzmán MA, Morales-Montor J y Alba-Hurtado F. Progesterone-like receptors in *Haemonchus contortus* larvae-3 cells. 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases. 2014 Diciembre; Bangkok, Tailandia.
28. Gutierrez-Amezquita R, Nava-Castro K, Muñoz-Guzmán MA, Morales-Montor J y Alba-Hurtado F. Prolactin-like receptors in *Haemonchus contortus* larvae-3 cells. 15th World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2015. Agosto; Liverpool, United Kingdom.
29. Guyton CG, HALL JE. Tratado de Fisiología Médica. 11ª Edición. Elsevier, 2006.
30. Höss S, Weltje L. Endocrine disruption in nematodes: effects and mechanisms. *Ecotoxicol.* 2007; 16: 15-28.
31. Hu R, Wu W, Niles EG, LoVerde PT. Isolation and characterization of *Schistosoma mansoni* constitutive androstane receptor. *Biochem Parasitol.* 2006; 148: 31-43.
32. Ibarra-Coronado, Escobedo-González, Nava-Castro, Chávez-Rios, Hernández-Bello, García-Varela, *et al.* A helminth cestode parasite express an estrogen-binding protein resembling a classic nuclear estrogen receptor. *Steroids.* 2011; 76: 1149-1159.
33. Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashmam K. Humoral and cellular responses following local immunization with parasite *Haemonchus contortus*. *Vet Immunol*, 1995; 48: 323-332.
34. Kassai T. Veterinary Helminthology. Oxford. Butterworth-Heinemann, 1999.
35. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol*, 2004; 26: 247-364.

36. Lapage G. Parasitología veterinaria. Edit. Continental. México, 1968.
37. Maena MA, Rojo VFA. Tricostongilosis y otras nematodiasis. En: Parasitología veterinaria. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. México, 1999.
38. Maswoswe SM, Peters W, Warhurst DC. Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. Ann Trop Med Parasitol. 1985; 79: 607-616.
39. McDonald LE. Veterinaria: Reproducción y endocrinología. México: Interamericana, 1986.
40. Mock BA, Nacy CA. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major*. Systemic Infections and Immunity. 1988; 52 (12): 3316-3319.
41. Muñoz-Guzmán MA, Cuéllar-Ordaz JA, Valdivia-Anda AG, Buendía-Jimenez JA, Alba-Hurtado F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to *Haemonchus contortus*. Can J Anim. 2006; 86: 363-371.
42. Nava-Castro K, Hernández-Bello R, Muñiz-Hernández S, Morales-Montor J. New method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: proof of concept. A Review. J Biomed Biotech. I.D. 257060, 2011.
43. Niec R. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INTA Argentina, 1968.
44. Nikolaou S, Gasser RB. Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol. 2006; 36: 859-868.
45. Phares K. An unusual host-parasite relationship: the growth hormone-like factor from plerocercoids of Spirometrid tapeworms. Int J Parasitol. 1996; 26 (6): 575-588.
46. Quintanar JL, Salinas E, Guerrero R, Gómez R, Vidal S, Aranda J, Clapp C. Prolactin-like hormone in the nematode *Trichinella spiralis* larvae. Exp Parasitol. 2007; 116: 137-141.
47. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domesticos. 1° Edición. Edit. LIMUSA, México, 2003.

48. Radostis OM, Gray CC, Blood DC. Medicina veterinaria, Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9° Edición. Edit. Mc Graw-Hill, España, 2002.
49. Rimbaud E, Pineda N, Luna L, Morales X, Rivera G, Olivares A, Mejía M, Ortega S, Robles JL, Flores H, Robletto S, Sandoval ML. Primera comprobación del alza postparto en el contaje de huevos de nematodos en materia fecal de ovinos en Nicaragua. REDVET, 2005; 6 (11): 1695-7504.
50. SAGARPA. Producción de carne ovina. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Fisiología y Mejoramiento Animal. Libro Técnico 5. México (DF), 2013.
51. Schmidt G, Larry R. Foundations of Parasitology. USA: McGraw Hill, 2000.
52. Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domesticos. 7° Edición. Interamericana, México, 1987.
53. Wu W, LoVerde PT. Nuclear hormone receptors in parasitic helminthes. Mol Cell Endocrinol. Elsevier. 2011; 334: 56–66.