

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL Y FUNCIONAL DE
LAS PROTEÍNAS DE SECRECIÓN DE 70 KDA DERIVADAS DE
LARVAS L₄ DEL NEMATODO *Haemonchus placei***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JOCELYN MAZA LOPEZ

Tutor principal: Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Co Tutor: Dra. María Eugenia López Arellano

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Centro en Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos** y al **Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria** por mi formación y las herramientas necesarias para la conclusión de este proyecto de investigación.

Agradezco especialmente a mis Directoras de Tesis, la **Dra. Irene de la Concepción Perea Arango** y **Dra. Maria Eugenia López Arellano**, quienes me han brindado su apoyo incondicional, enseñanzas, consejos y palabras de aliento.

Especial agradecimiento a la **Dra. Carla Olbia Contreras Ochoa** por su amistad, consejos y enseñanzas en el laboratorio.

Al **Dr. Fernando Martínez Morales** y al **Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez** por su todo su apoyo, asesoramiento y paciencia brindada a lo largo de la realización de este trabajo.

Al **IBT. David Emanuel Reyes Guerrero** y al **Biól. Gabriel Ramírez Vargas** por su amistad, consejos y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Marilem, Génesis, Angélica, Eleazar, Itzayana, Luis Alfredo, Marilyn, Valeria, Alan, Jennifer** y **Lucero**, por todos esos momentos de alegría esfuerzo y diversión.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada con número (CVU/Becario): 786221/607302. Gracias

Agradezco al proyecto **CONACYT SEP 287598** con título: Caracterización Proteómica, búsqueda de péptidos bioactivos y análisis de la expresión génica a partir de productos de secreción del nematodo *Haemonchus placei*.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño les dedico todo mi esfuerzo:

A mi madre **Cecilia Lopez Landa** y a mi padre **Jose Rigoberto Maza Herrera**, quienes han sido mi apoyo y por ser el mejor de ejemplo de superación de vida. Los amo

A mis queridos hermanos **Janía Maza Lopez** y **Rene Maza Lopez** quienes han sido mi aliento e impulso. Los amo

A mi pollito **Emanuel Yañez Meléndez** quien siempre me ha dado amor, seguridad y alegría. Te amo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Producción pecuaria: México	3
2.2 Problemas en el sector ganadero: NGI	4
2.3 Diagnóstico parasitológico	4
2.4 <i>Haemonchus</i> spp.	5
2.4.1 Morfología	6
2.4.2 Ciclo biológico.....	7
2.4.3 Patogenia.....	8
2.5 Inmunología de los bovinos	9
2.5.1 Mecanismos de defensa natural	10
2.5.2 Mecanismos de defensa de la inmunidad adquirida	11
2.5.3 Reconocimiento y procesamiento de antígeno	12
2.5.4 Activación de células T	13
2.5.5 Inmunidad de barreras epiteliales y mucosas.....	16
2.6 Métodos de control.....	17
2.6.1 Control antihelmíntico	17
2.6.2 Métodos de control alternativo	17
2.7 Desarrollo de Vacunas.....	19
2.7.1 Antígenos ocultos	19
2.7.2 Antígenos convencionales	20
2.8 Uso de gerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>) en el estudio de <i>Haemonchus</i> spp.	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23

5. OBJETIVO GENERAL.....	23
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7. METODOLOGÍA.....	24
7.1 Localización	25
7.2 Obtención de <i>H. placei</i>	25
7.2.1 Larvas infectantes.....	25
7.2.2 Eliminación de detritus y de la segunda vaina de L ₃	25
7.3 Genotipificación de NGI	25
7.3.1 Extracción de DNA.....	25
7.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
7.4 Productos de secreción de <i>H. placei</i>	27
7.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de L ₃ y L ₄	27
7.4.2 Productos de secreción colectados de gerbos infectados	27
7.5 SDS-PAGE y Zimograma.....	28
7.6 Proliferación celular.....	29
7.6.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica de bovinos (PBMC's).....	29
7.6.2 Titulación de control positivo (ConA) y ESP	29
7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en tiempo real (qRT-PCR)	31
7.7.1 RNA total	31
7.7.2 Transcriptasa reversa	31
7.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
7.8 Citometría de flujo	34
7.9 Análisis estadístico.....	35
8. RESULTADOS	36

8.1 Identificación molecular de <i>H. placei</i>	36
8.2 Identificación y caracterización parcial de ESP de <i>H. placei</i>	37
8.2.1 Antígeno de 15 kDa de <i>H. placei</i>	37
8.2.2 Antígeno de 70 kDa de <i>H. placei</i>	38
8.3 Titulación de los ESP <i>H. placei</i>	39
8.3.1 Antígeno de 15 kDa de <i>H. placei</i>	40
8.3.2 Antígeno de 70 kDa de <i>H. placei</i>	41
8.4 Expresión de factores inmunes activados por los ESP de <i>H. placei</i>	41
8.4.1 Antígeno de 15 kDa de <i>H. placei</i>	41
8.4.2 Antígeno de 70 kDa de <i>H. placei</i>	43
8.5 Identificación de poblaciones celulares activadas en respuesta al antígeno mediante citometría de flujo	45
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES.....	52
11. LITERATURA CITADA.....	53
12. ANEXOS	63
A. Técnica de McMaster (Henriksen y Aagaard, 1976).....	63
B. Coprocultivos y técnica de migración larvaria (Liébano, 2004).....	63
C. Extracción de DNAg a partir de L ₃ (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen®).....	63
D. Componentes de la PCR.....	64
E. Preparación de solución Buffer TAE 50X (1L)	65
F. Preparación de 1 X PBS para 1 L.....	65
G. Medio de cultivo Hank's Balanced Salts (Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA)	65
H. SDS-PAGE	65
I. Método de cuantificación de proteínas, Bradford.....	66

J. Electroforesis bidimensional.....	68
K. Obtención y cuantificación de células mononucleares por Lymphoprep™ (Axis-Shield).....	69
L. Medio RPMI suplementado para cultivo de linfocitos.....	71
M. Extracción de RNA con TRizol® Reagent Max™ Bacterial Isolation kit.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del estadio infectante de <i>H. placei</i>	6
Figura 2. Ciclo Biológico de <i>Haemonchus</i> spp.	7
Figura 3. Ciclo biológico del estadio L ₃ a adulto.....	8
Figura 4. Mecanismos de la respuesta inmune en contra NGL.....	15
Figura 5. Diagrama de flujo general mostrando el proceso metodológico para el presente proyecto.....	24
Figura 6. Procedimiento para la obtención de larvas del primer estadio endoparásito de <i>H. placei</i>	28
Figura 7. Separación de PBMC´s por gradiente de densidad.....	29
Figura 8. Identificación molecular de <i>Haemonchus</i> de las L ₃ utilizadas para la obtención de los ESP.	36
Figura 9. Larva del cuarto estadio larvario a los 16 días del desarrollo <i>in vitro</i> de L ₃ a L ₄	37
Figura 10. Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%) de los productos de secreción de 15 kDa.....	38
Figura 11. Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%) de los productos de secreción de 70 kDa.....	38
Figura 12 Gel de Segunda dimensión del ESP de 70 kDa de <i>H. placei</i>	39
Figura 14. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FCεR1A activados por productos secretados de <i>H. placei</i> de 15 kDa durante ensayos <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	42
Figura 15. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FCεR1A activados por productos secretados de <i>H. placei</i> de 15 kDa durante ensayos <i>in vitro</i> a las 48 horas.....	43
Figura 16. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FCεR1A activados por productos secretados de <i>H. placei</i> de 70 kDa durante ensayos <i>in vitro</i> a las 16 horas.....	44
Figura 17. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FCεR1A activados por productos secretados de <i>H. placei</i> de 70 kDa durante ensayos <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	44

Figura 19. Gradiente de Lymphoprep con sangre periférica de ovinos	70
Figura 20. Distribución de las células sanguíneas.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Panorama del mercado mundial de la carne	3
Cuadro 2. Principales entidades productoras de carne y leche.....	4
Cuadro 3. Oligonucleótidos específicos utilizados para la genotipificación de nematodos gastrointestinales de rumiantes	26
Cuadro 4. Titulación y estandarización de PBMC's de bovinos y ConA	30
Cuadro 5. Titulación de los ESP de <i>H. placei in vitro</i>	30
Cuadro 6. Componentes de la mezcla para la reacción de síntesis de cDNA.....	32
Cuadro 7. Periodos de incubación para la síntesis de cDNA	32
Cuadro 8. Oligos para la amplificación de genes específicos en RT-PCR tiempo real.	33
Cuadro 9. Mezcla de Reacción de qPCR	33
Cuadro 10. Condiciones de qPCR para amplificación de los genes.....	34
Cuadro 11. Evaluación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones ConA.....	40
Cuadro 12. Estimación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones del ESP de 15 kDa.	40
Cuadro 13. Estimación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones del ESP de 70 kDa.	41
Cuadro 15. Componentes para la preparación de gel de poliacrilamida	66
Cuadro 16. Preparación de la curva estándar de BSA.....	67
Cuadro 17. Concentraciones finales de la curva estándar	67
Cuadro 18. Amortiguador de equilibrado.....	69

ABREVIATURAS

β -2micro: β -2 microglobulina

TNF: Factor de necrosis tumoral

Th: Celulas T colaboradoras

TGF β 1: *Factor de crecimiento transformante β 1*

TCR: Receptor de células T

Tc: Celulas citotóxicas

seg: segundos

RNA: Ácido ribonucleico

PMN: Células polimorfonucleares

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PBM \acute{C} : Células mononucleares de sangre periférica

pb: pares de bases

nm: nanómetros

NGI: Nematodos gastrointestinales

NAg: Antigenos convencionales

Mr: monómeros

MM: Marcador de peso molecular

mL: Mililitros

min: minutos

MHC I ó II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad I ó II

LT: Linfocito T

LB: Linfocito B

L (1, 2, 3, 4, 5) = Larva 1, 2, 3, 4, 5

KDa: Kilodaltones

IL's= Interleucinas

Ig: Inmunoglobulina

IFN α , β , γ : *Interferon α , β , γ*

HPG: No. De huevos por gramo de heces

HA: Antigenos ocultos

h: Horas

g: Gravedades

FC ϵ R1A: *Receptor de inmunoglobulina E*

ESP: Productos de secreción

cDNA: Ácido desoxirribonucleico codificante

C $_T$: Threshold cycle

ConA: Conavalina A

CD: Clusster de diferenciación

μ L: Microlitros

RESUMEN

La producción pecuaria bajo sistemas de pastoreo en clima tropical, favorece las infecciones por nematodos como *Haemonchus placei*. Por esta razón, se ha buscado el desarrollo de otras alternativas de control, como es el uso de agentes inmunizantes involucrados en la inducción de una respuesta inmune madura frente a infecciones parasitarias. El objetivo del presente estudio fue analizar el perfil de proteínas de los productos de secreción (ESP) derivados del primer estadio endoparásito de *H. placei* y su efecto en diferentes factores inmunes, así como de las poblaciones de linfocitos TCD4⁺ y Tγδ⁺. Se realizó la obtención e identificación molecular de *H. placei* para la preparación de los ESP del cuarto estadio (L₄) a las 24 h de cultivo *in vitro*. Se determinaron características bioquímicas de los productos por peso molecular, punto isoelectrico y actividad de proteasas. Asimismo, se evaluó su función en diferentes factores inmunes por expresión relativa (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFNγ*, *TGFβ*, *FCεR1A*, *β-2 microglobulina*) y citometría de flujo (CD4⁺, Tγδ⁺ e IL-4). La cuantificación de la expresión se realizó por Retro Transcripción y PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) en células sanguíneas mononucleares (PBMC's) activadas con ESP. El análisis del efecto de los ESP de *H. placei* sobre el porcentaje de linfocitos TCD4⁺, Tγδ⁺ e IL-4 se realizó por citometria de flujo a las 24 y 48 h post estimulación. Los resultados del perfil de proteínas de los ESP muestran dos bandas de 15 y 70 kDa. La banda de 70 kDa presentó actividad enzimática, contrariamente a la banda de 15 kDa. El análisis de expresión relativa de *IL-5*, *IL-6*, *IL-13*, *IL-4* y *FCεR1A* sugiere que las proteínas de 15 kDa tienen una activa participación en la respuesta inmune tipo T_H2. En contraste, las proteínas de 70 kDa parecen activar mecanismos inmunes regularios relacionados a procesos inflamatorios a través de *IL-8*, *TGFβ1* e *IFNγ*, y por la estimulación de linfocitos TCD4⁺ a las 24 h y de Tγδ⁺ a las 24 y 48 h. Cabe mencionar que ambos tipos de linfocitos están relacionados a la funcionalidad de la respuesta inmune tipo T_H2 a nivel de la mucosa gastrointestinal, situación que es relevante en este tipo de parasitosis y que podría estar asociada a los ESP de la L₄ de *H. placei* indicando su posible actividad biológica durante la interacción hospedero-parásito

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo y constituyen uno de los principales problemas que afecta al sector pecuario en regiones tropicales y templadas (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008). Dentro de este complejo de NGI, la hemoncosis es una enfermedad parasitaria generada por el nematodo de abomaso de rumiantes, *Haemonchus placei* de hábitos hematófagos que afecta severamente a bovinos jóvenes (Vázquez, *et al.*, 2004).

El ciclo de vida de *H. placei* es directo, presenta estadios que evolucionan en el ambiente y estadios endoparásitos (López-Arellano, *et al.*, 2011). Los estadios endoparásitos se alimentan de sangre causando anemia, disminución en la ganancia de peso, diarrea que, en casos agudos provoca la mortalidad en bovinos jóvenes (Bowman, 2008). El manejo sanitario para el control de NGI se realiza con base en el uso de fármacos antihelmínticos (Coles *et al.*, 2006; Lozano y Arias, 2008). Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos ha generado problemas de resistencia antihelmíntica y de toxicidad ambiental. Por éstas razones, se busca la integración de otras estrategias de control con apoyo en el conocimiento de la respuesta inmune que incluye la selección genética de individuos tolerantes a la infección y métodos preventivos como es la aplicación de vacunas (Halliday *et al.*, 2009)

Los Productos de Secreción (ESP) liberados por estadios endoparásitos de nemátodos como *Haemonchus placei* (parasito de rumiantes) favorecen la invasión a tejidos y la adquisición de nutrientes; mecanismos de la interacción hospedero-parasito que al ser identificados podrían ser posibles potenciales agentes inmunizantes en las estrategias de prevención (Newton y Meeusen, 2003). Previos estudios realizados a partir de los ESP han notificado la relevancia de éstos antígenos para la regulación de la respuesta inmune, incluso algunos de ellos identificados como glicoproteínas tiene actividad de proteasas, cuya función biológica contribuye a la invasión del hospedero en la especie *H. contortus*

(Miranda, *et al.*, 2007). Durante la infección diversos mecanismos inmunes regulan el daño causado por NGI, principalmente la inflamación. Estos mecanismos se caracterizan por el incremento de linfocitos tipo T_H2 (respuesta inmune adquirida) con la presencia de glicoproteínas de membrana tipo CD4⁺ específicas en el reconocimiento péptidos grandes unidos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II (Borkog *et al.*, 2000). Los linfocitos T_H2 activados por el MHC inician una cascada de señalización para estimular mecanismos celulares a través de proteínas secretadas como son las citocinas, grupo de moléculas con diferente actividad pero que actúan en sincronización. Un ejemplo claro de una citocina secretada por este tipo de células es la IL-4, esta citocina estimula la producción de anticuerpos IgE, para la identificación de antígenos y defensa contra agentes patógenos que causan alergias, como los NGI (Shea-Donoju *et al.*, 2015). La actividad de IL-4, así como de otras citocinas asociadas al proceso de inflamación (ej. IL-6 e IL-8) fueron notificadas por Reyes-Guerrero *et al.*, (2018) durante el inicio de la infección por *H. placei* bajo condiciones *in vitro*. Los autores observaron regulación de la expresión modulada por dos ESP, identificadas como proteínas de 65 y 72 kDa aproximadamente. Lo cual sugiere que los ESP de *H. placei* podrían tener una función biológica importante en la interacción hospedero-parásito. Sin embargo, se requiere realizar estudios que permitan conocer las características bioquímicas de los ESP de *H. placei*, así como su posible función dentro del sistema inmune. La presente propuesta pretende identificar, caracterizar y determinar la posible función inmunológica de los ESP del nematodo *H. placei* derivados de la larva histiotrófica o larva cuatro (L₄). Los ESP son secretados durante el proceso de invasión al tejido, digestión de alimentos, y desarrollo de los diversos estadios endoparásitos de NGI. La caracterización parcial y evaluación del funcionamiento de los ESP de *H. placei* en la activación de la respuesta inmune permitirá apoyar el desarrollo de posibles agentes vacúnales, así como estudios dirigidos a conocer de la biología de este tipo nematodo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Producción pecuaria: México

La creciente demanda del sector ganadero ha sido cubierta por las grandes cadenas de producción ganadera y sistemas tradicionales de producción, sustento para 1 300 millones de personas en zonas rurales (FAO, 2016). El sector pecuario ha crecido a una tasa anual de 3.7%, dónde la producción de carne incrementó su demanda en un 2.45%, de la cual América latina y el Caribe producen el 23% de la carne derivada de bovinos domésticos y de búfalos a nivel mundial. Asimismo, éstas regiones producen el 11.2% de leche y sus derivados, siendo el 85% de origen vacuno (FAO, 2018). Cuadro 1.

Cuadro 1. Panorama del mercado mundial de la carne

	2016 estimación	2017 pronóstico	Variación de 2017 a 2016
	Millones de toneladas		%
BALANZA MUNDIAL			
Producción de Carne en:	321.0	322.0	0.3
Bovino	68.3	69.6	1.9
Ave	117.2	117.7	0.4
Cerdo	115.6	114.7	-0.8
Ovino	14.4	14.5	0.6
Comercio de Carne en:	31.2	32.0	2.5
Bovino	8.9	9.0	0.8
Ave	12.8	13.2	2.9
Cerdo	8.3	8.6	4.1
Ovino	0.9	0.9	-2.0
Indicadores de la oferta y la demanda			
Consumo humano per cápita:			
Mundial (Kg/ año)	43.1	42.7	-0.9

FAO: Perspectivas alimentarias-Análisis del mercado mundial 2017

En el 2017 en América Central la producción de leche aumentó en 1.1% con 17.6 millones de toneladas, siendo México el mayor productor. Actualmente, la producción de carne ocupa la octava posición y la producción de leche el treceavo lugar. El cuadro 2 muestra los principales estados en México productores de carne

y de leche. Además, la contribución de la ganadería no se centra sólo en la producción de alimentos, también involucra productos como pieles, fibras y fertilizantes relacionados en la producción pecuaria (FAO, 2016).

Cuadro 2. Principales entidades productoras de carne y leche

Producto	Entidad federativa	% en el total nacional	Lugar nacional
Carne	Veracruz	13.4	1 de 32
	Guadalajara	11.5	2 de 32
	Chiapas	6.1	3 de 32
Leche	Guadalajara	19.2	1 de 32
	Coahuila	11.9	2 de 32
	Durango	10	3 de 32

LACTODATA, 2018; SIAP, 2016

2.2 Problemas en el sector ganadero: NGI

En México, la ganadería se desarrolla de dos formas: 1. Extensiva, bajo sistemas de pastoreo y 2. Intensiva, donde los animales reciben alimento procesado y están en confinamiento. En los sistemas de producción de la ganadería extensiva, los bovinos se encuentran expuestos a infecciones por diversos tipos de parásitos, entre los más importantes están los NGI (Encalada-Mena *et al.*, 2009). Las nematodosis se localizan en diferentes regiones geográficas, dependiendo de su adaptación al ambiente, así las especies de *Trichostrongylus* spp. y *Cooperia* spp. predominan en regiones templadas; *Ostertagia* spp. y *Nematodirus* spp. en regiones nórdicas y en regiones subpolares; y *Haemonchus* spp., *Strongyloides* spp. y *Oesophagostomum* spp. en las regiones del cinturón ecuatorial (Vázquez Prats *et al.*, 2004). Dentro de la familia de *Trichostrongílicos* se encuentran los géneros de mayor impacto negativo en las regiones de clima tropical como *Haemonchus*, *Mecistocirrus*., *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Oesophagostomum* (Waruiru *et al.*, 2001), comunmente presentes en infecciones mixtas.

2.3 Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico preciso del género en las parasitosis es importante para la elección del tratamiento y del monitoreo de su eficacia. Las infecciones por NGI en rumiantes se encuentran (en su mayoría) en el tracto digestivo, por lo que su

diagnóstico se realiza más frecuentemente en muestras fecales. Por esta razón, el desarrollo de métodos cuantitativos de bajo costo a través del recuento de huevos de parásitos en las heces nos permite estimar el nivel de infección para llevar a cabo la selección de animales resistentes, vigilancia en tratamientos antihelmínticos e incluso obtener información de los efectos en la respuesta inmunológica (Levecke *et al.*, 2012). Sin embargo, las semejanzas en la morfología de los huevos de las diferentes especies de NGI hace su identificación difícil de realizar, por lo cual actualmente el diagnóstico depende en gran medida de métodos basados en la identificación morfológica de las larvas en el estadio infectante obtenidas a partir de coprocultivos. No obstante, el desarrollo de cultivos larvarios y la identificación morfológica requieren tiempo y personal de laboratorio calificado, por ello en los últimos años se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar las regiones de ADN ribosomal para identificar los diferentes géneros parasitarios (Sweeny *et al.*, 2011).

Dentro de los modelos biológicos para el estudio de los NGI destaca la especie *H. placei* debido a su patogenicidad, y múltiples mecanismos de desarrollo y similitud morfológica con otros NGI.

2.4 *Haemonchus* spp.

Los parásitos del género *Haemonchus* spp. tienen como hábitat definitivo el abomaso (estómago) de los rumiantes de regiones tropicales y templadas. Las especies propias de este género son *H. contortus* y *H. bispinosus* para ovinos y caprinos; *H. placei* y *H. similis* para bovinos. Estos presentan, hábitos histiófagos y hematófagos por lo que presenta coloración roja en intestino que se entrelaza con el útero de color blanquecino en caso de las hembras, a éste género también se le denomina "palo de barbería" (Tehrani *et al.*, 2012).

Haemonchus spp., pertenece al Reino: animalia; Phylum: Nematelminetos; Clase: Secernentea; Orden: Strongylida; Superfamilia: Trichostrongyloidea; Familia: Haemonchidae; Género: *Haemonchus* (Sánchez , 2006).

2.4.1 Morfología

El género *Haemonchus* spp. es de los más largos de la superfamilia Trichostrongyloidea. Las hembras miden 3 cm de longitud, poseen una vulva en la parte media del cuerpo. El macho mide 1.5 cm y presenta como principal característica una bursa copulatrix con rayos laterales en forma de "Y", cilíndrica y alargada con menos de 7 mm de longitud, además poseen espículas que le sirven de guía para copular con la hembra (Enrique, 2005). El género *Haemonchus* posee una pequeña lanceta oral que le sirve al parásito para romper los vasos sanguíneos y alimentarse, aparato digestivo, canales excretores laterales, papilas cervicales sensoriales, sistema nervioso y reproductivo (Bowman *et al.*, 2011). La larva infectante (L₃) de *Haemonchus* presenta como característica un esófago filariforme, una cabeza angosta redondeada, la vaina forma una cola de longitud media que termina en un punto fino, posee 16 células intestinales y mide una longitud de 650-890µm (Van Wyk y Mayhew 2013), ver Fig. 1.

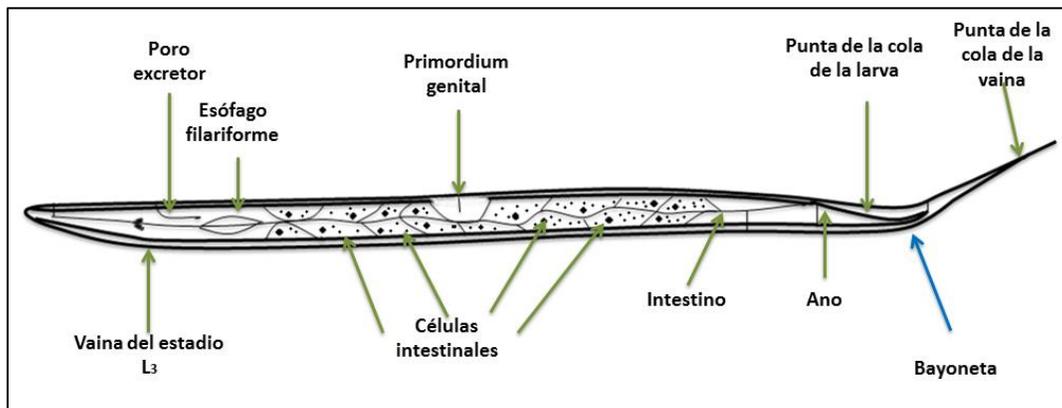


Figura 1. Morfología del estadio infectante de *H. placei*. La imagen muestra las principales características morfológicas de L₃ como son 16 células intestinales que la conforman con gránulos lipoides que le aportan energía debido a que no se alimentan en esta etapa. Además, posee una longitud de 650-890 µm y en la punta de la cola de larva se observa una curvatura muy característica de la especie del nematodo denominada "bayoneta". Fuente: Propiedad de la autora del presente trabajo, con referencia de (Van Wyk y Mayhew, 2013)

2.4.2 Ciclo biológico

Haemonchus spp. presenta ciclo de vida directo (no involucra hospederos intermediarios) con dos fases de desarrollo: no parasítica o exógena desde huevo hasta la larva del tercer estadio (L_3), y fase parasítica o endógena, desde la ingestión de L_3 hasta la formación de los adultos (Lopez-Arellano *et al.*, 2011).

En el abomaso después de la copula la hembra expulsará entre 5,000 a 10,000 huevos por día al ambiente (Fiel *et al.*, 2011). Posteriormente, a temperatura alrededor de 25°C y humedad del 80% el huevo eclosionará para dar origen a larvas del primer estadio (L_1), las cuales mudarán y posteriormente se convertirán a larvas del segundo estadio (L_2). Las larvas L_1 y L_2 se alimentan de bacterias, hongos y detritus presentes en la materia fecal, después sufren una nueva muda para formar la L_3 . Este estadio se encuentra cubierto por una cutícula de queratina que le confiere protección y no le permite alimentarse, por lo que la larva dependerá de sus reservas energéticas para su sobrevivencia (Hempworth *et al.*, 2006; Aroztegui *et al.*, 2013).

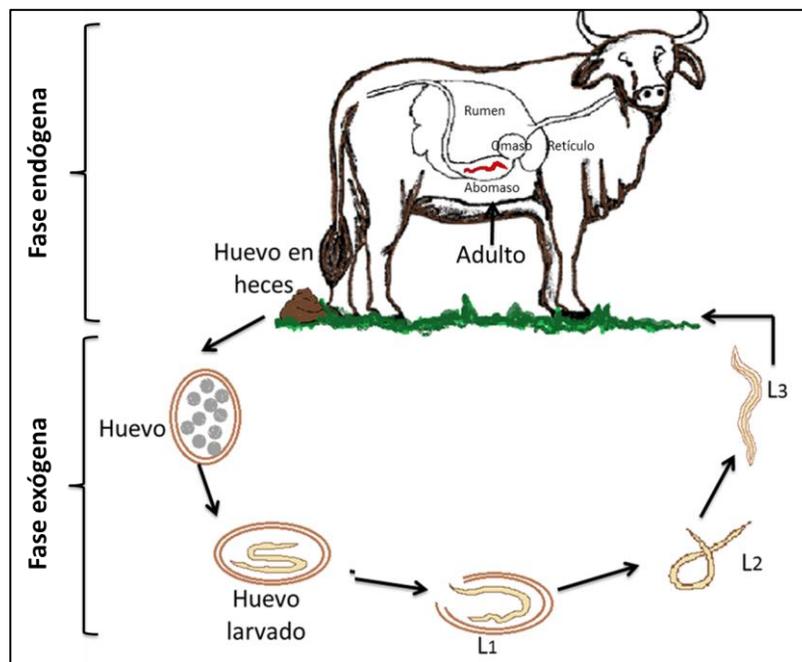


Figura 2. Ciclo Biológico de *Haemonchus* spp. Fuente: Propiedad de la autora del presente trabajo, con referencia de (Soulsby, 1987).

Las condiciones ambientales adecuadas, como bajas temperaturas y luz tenue hacen que la L₃ migre hacia las puntas de las hojas de los pastos para ser ingeridas por los rumiantes. Cuando la L₃ empieza a migrar por el sistema digestivo y llega al rumen, pierde su cutícula exterior por acción del incremento de pH (5.5 a 7.0), atmósfera de CO₂ y actividad enzimática (ej. pepsinógeno). Inmediatamente después la L₃ ya sin vaina rompe tejido abomasal donde sufrirá dos mudas más convirtiéndose en larva del cuarto estadio (L₄). Posteriormente, emerge como pre-adulto o larva cinco (L₅) para madurar sexualmente como parásito adulto (Mildrey *et al.*, 2005).

2.4.3 Patogenia

Durante el proceso de desarrollo y patogenia de la infección, los estadios endoparásitos de *Haemonchus* spp. son hematófagos. En su desarrollo como larvas parásitas, *Haemonchus* spp. causa lesiones en tejido abomasal de los rumiantes, como consecuencia de la invasión de larvas y como parte de su crecimiento. Este desarrollo se lleva a cabo entre las células epiteliales de la pared estomacal. Una vez que las larvas han finalizado su primer estadio endoparásito (L₄), migran a la luz del abomaso para evolucionar a los siguientes estadios como L₅ y adulto (Balic *et al.*, 2000).

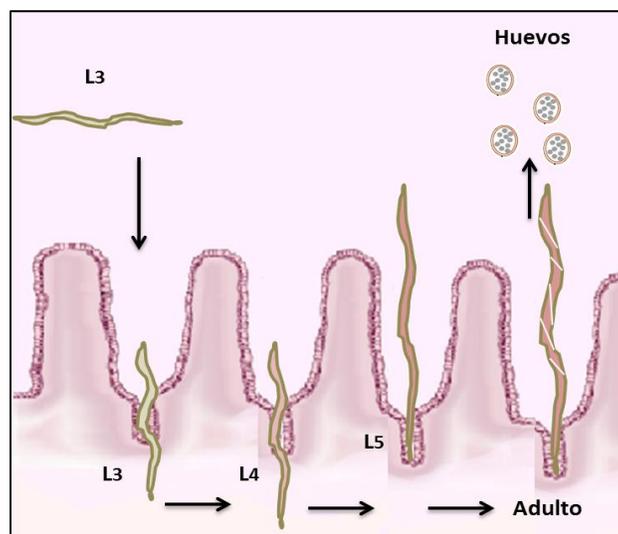


Figura 3. Ciclo biológico del estadio L₃ a adulto. Fuente: Propiedad de la autora del presente trabajo, con referencia de Soulsby, 1987.

En la morfología de los endoparásitos destaca la lanceta oral, estructura necesaria para alimentarse a través de los vasos sanguíneos. Además, secretan sustancias anticoagulantes en las lesiones, de tal manera que éstas seguirán sangrando. Debido a esto se producirán alteraciones como hiperplasia, descamación y disminución de la secreción de ácido clorhídrico facilitando el aumento de pH en el aparato digestivo del bovino. El aumento de pH repercute negativamente en la digestión proteica y el efecto bacteriostático, aumentando el número de bacterias y apareciendo diarreas (Gallego, 2006). Por otro lado, el grado de infección de un animal dependerá de la capacidad que tenga el individuo para resistir la infección, dada por la constitución genética del mismo, así como la edad, raza y grado de nutrición de este. Por esta razón, se observan animales jóvenes con mayor susceptibilidad a infecciones agudas por inmadurez del sistema inmune, situación que provoca retraso en su crecimiento e incluso muerte en animales menores (Mildrey *et al.*, 2005).

Dentro de su ciclo de vida la L₄ de *Haemonchus* spp tiene la capacidad de entrar en estado de hipobiosis (disminución del metabolismo) para asegurar la supervivencia del parásito cuando se encuentra expuesto a condiciones ambientales adversas entre las células epiteliales del abomaso en el hospedero (Soulsby, 1962). Se ha señalado que en la hipobiosis intervienen factores inmunológicos de hospedero, sexo, edad y raza por lo que se puede presentar en condiciones adversas durante el desarrollo de L₄ (ej. incremento de temperatura y pH) debido a la respuesta inmune del hospedero (Soulsby, 1987).

2.5 Inmunología de los bovinos

La inmunología es una ciencia que estudia el sistema inmune de todo organismo vivo, invertebrado (insectos) y vertebrados (ser humano y animales), cuya función es defender a los individuos de partículas extrañas y patógenos. Los procesos inmunes entre los diferentes organismos vivos, muestran similitudes entre ellos, sin embargo, existen diferencias muy significativas que distinguen a cada hospedero con base en el reconocimiento de sus propios antígenos. Estas diferencias son marcadas principalmente por moléculas del sistema inmune,

denominadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex, por sus siglas en inglés). A través de la investigación del MHC, los estudios relacionados a infecciones por patógenos han contribuido a estudiar su biología para analizar sus posibles métodos de diagnóstico y control inmunológico (Abbas *et al.*, 2015).

El presente proyecto de tesis pretende contribuir al estudio de proteínas derivadas de un nematodo parásito, *H. placei*, altamente patógeno para bovinos. Los animales han desarrollado mecanismos inmunes naturales y adquiridos para protegerse del daño provocado por este patógeno, entre estos mecanismos las barreras externas como la secreción de saliva, pH y enzimas con actividad proteolítica contribuyen en las defensas del hospedero (De veer *et al.*, 2007). Sin embargo, cierta cantidad de larvas de *Haemonchus* logran evadir esta barrera y migran hacia su hábitat definitivo, el abomaso. Durante su trayecto, las larvas de nemátodos deben pasar otras barreras anatómo-fisiológicas específicas de los bovinos. Debido a que las L₃ de *H. placei* ingresan por vía oral al pasar por los tres compartimientos pre-estomacales de los bovinos, el rumen, retículo y omaso, la larva se va desprendiendo de la cutícula de queratina que la protegió como estadio de vida libre. La importancia de éstos compartimientos se debe a que, en el rumen, se encuentra un gran número de bacterias y protozoarios que le ayudan al rumiante a digerir el alimento, sin causar daño porque son fauna normal del hospedero. En contraste, estos microorganismos también contribuyen a las defensas del hospedero debido a que inhiben la invasión de patógenos. En la invasión al tejido, las L₃ dañan la integridad y funcionalidad de las células del estómago, causando inflamación y desórdenes fisiológicos (ej. mala digestión). Estos mecanismos, a su vez, atraen células del sistema inmune con objeto de regular la infección parasitaria.

2.5.1 Mecanismos de defensa natural

Diversos estudios de los mecanismos inmunológicos han descrito los múltiples factores inmunes involucrados en la adquisición de resistencia y regulación de las parasitosis internas, como son los nematodos. Sin embargo, estos mecanismos

son específicos con base en la interacción hospedero-parásito. Por ejemplo, los rumiantes han desarrollado una gran variedad de mecanismos inmunes que reconocen los diferentes estadios larvarios de NGI, así como los ESP, proteínas de superficie y extractos crudos (Meeusen *et al.*, 2005). El conocimiento de los mecanismos inmunes que desempeñan un papel importante en la protección del hospedero son importantes para el desarrollo de vacunas, diagnóstico y selección de individuos resistentes genéticamente a nematodos (Miller y Horohov, 2006; Piedrafita *et al.*, 2010). Entre las funciones del sistema inmune se ha observado que evita la invasión de larvas y afecta fecundidad de las hembras disminuyendo su capacidad para ovopositar (Halliday *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2011). Durante los procesos de invasión y desarrollo, las larvas de *H. placei*, así como de otros NGI causa la ruptura de tejido, y debido al daño celular y acción de los mecanismos de inflamación se incrementa la población de células polimorfonucleares, que eliminan productos vaso activos en conjunto con la acción de enzimas del aparato digestivo (ej. pepsinógeno) e interrumpen el desarrollo de larvas (Balic *et al.*, 2002). Además, los mecanismos inmunes presentan una serie de proteínas efectoras circulantes (ej. factores de coagulación) y diversas citocinas (TNF, IL-1, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-12, IL-15, IL-10, TGF β , etc.) que contribuyen en la regulación de la infección por nemátodos y también participan activamente como células de memoria inmunológica (Meeusen *et al.*, 2005).

2.5.2 Mecanismos de defensa de la inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida o memoria inmunológica se desarrolla durante la patogenia de la hemoncosis a través de la participación de dos clases de células, los linfocitos T (inmunidad celular) y los linfocitos B (inmunidad humoral). Los linfocitos T y B son células que se generan en la médula ósea, circulan en la sangre y sistemas linfáticos para habitar en diversos órganos linfoides.

En los linfocitos T, se distinguen dos subpoblaciones distintas denominadas linfocitos T $\alpha\beta^+$ y linfocitos T $\gamma\delta^+$, que presentan receptor de células T (TCR) con características estructural y funcionalmente distintas: el receptor clonotípico T $\alpha\beta$ o T $\gamma\delta$ (encargado del reconocimiento antigénico) y el complejo CD3 (responsable de

la traducción de señales durante la activación). El linfocito $T\alpha\beta^+$ virgen identifica al antígeno a través del MHC, el linfocito prolifera y se diferencia en linfocito T de memoria y posteriormente en células T efectoras. Se han clasificado a la fecha dos subpoblaciones de células $T\alpha\beta^+$, colaboradoras (T_H) y citotóxicas (T_c) (Abbas *et al.*, 2015). Una vez que la célula T_H reconoce la interacción antígeno-MHC, ésta se activa y secreta moléculas conocidas como citocinas (Abbas *et al.*, 2008). Por otro lado, los linfocitos $T\gamma\delta^+$ en su mayoría no requieren moléculas clásicas presentadoras de antígeno, y parece que reconocen algunos antígenos de manera similar a las interacciones anticuerpo-antígeno. Este grupo de células T es muy poco frecuente, pero son abundantes en la mucosa del aparato digestivo, formando parte de la población de linfocitos intraepiteliales (Kotas y Locksley, 2018).

Respecto a los linfocitos B, éstos maduran en la médula ósea y cuando la abandonan, expresan un receptor de unión de antígenos único en su membrana celular. Posteriormente, se diferencian en células B de memoria, los cuales expresan el anticuerpo en su membrana, y linfocitos B efectores, que producen inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE, IgM). La respuesta adquirida es activada en el momento en que los antígenos son reconocidos de forma específica por linfocitos B y T (Rojas-Espinosa, 2006). En nematodosis gastrointestinales, se ha observado que los linfocitos $T\alpha\beta^+$, que expresan marcadores de membrana tipo $CD4^+$, son importantes en los procesos de inmunidad adquirida contra NGI. Una vez activados las células T se inicia la producción de citocinas específicas y células polimorfonucleares como son los eosinófilos y neutrófilos para regular el daño causado por NGI. A su vez, la exposición de antígenos (secretados u ocultos) de NGI tienen la capacidad de estimular la población de linfocitos B para la producción de anticuerpos como la IgE, específica contra alérgenos, como los antígenos liberados por NGI (Meeusen *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2010).

2.5.3 Reconocimiento y procesamiento de antígeno

El nematodo al ingresar al hospedero, comienza a secretar antígenos, los cuales desencadenan la activación de las células que tienen la función de procesar y

presentar de antígenos (ej. células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, etc.). Los linfocitos $T\alpha\beta^+$, solo reconocen fragmentos peptídicos lineales y cortos, unidos a moléculas del MHC de clase I ó II. Las moléculas de la clase I se expresan en casi todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de la clase II se expresan sólo en las células dendríticas, los linfocitos B, macrófagos y algunos otros tipos celulares. La función efectora de los linfocitos T_c $CD8^+$ están restringidos por el MHC clase I para afectar patógenos intracelulares y reconocer péptidos de 8 a 11 aminoácidos. Por el contrario, los linfocitos T_H $CD4^+$ restringidos por el MHC clase II y reconocen péptidos extracelulares de hasta 30 aminoácidos o más, como es el caso de péptidos derivados de NGI (Vervelde *et al.*, 2003).

La generación de péptidos con las características requeridas para asociarse a moléculas del MHC depende de los mecanismos de procesamiento del antígeno en las células presentadoras de antígeno. Los péptidos unidos al MHC clase II se debe a la degradación proteolítica de antígenos extracelulares fagocitados en vesículas y degradados en lisosomas. Posteriormente, se lleva a cabo la unión del MHC clase II en las vesículas. A continuación, el complejo, MHC-péptido, es transportado a la superficie celular para su reconocimiento por células $T\alpha\beta^+$ (Abbas *et al.*, 2015). Sin embargo, en diversas ocasiones los rápidos cambios antigénicos que presenta el nematodo dentro del hospedero no permiten una respuesta adaptativa eficaz.

2.5.4 Activación de células T

La activación de células $T\alpha\beta^+$ y su diferenciación en células efectoras y de memoria, implica el reconocimiento de antígeno, la co-estimulación y la producción de citocinas. La activación es iniciada por la interacción del receptor de célula T con un péptido antigénico unido a moléculas del MHC en células presentadoras de antígeno. Además del reconocimiento antigénico, otras diversas proteínas de superficie del linfocito T participan en el proceso de activación. Entre ellas los correceptores del linfocito T, el $CD4^+$ y $CD8^+$ se unen a las regiones no polimórficas de las moléculas del MHC, complementando las señales durante la activación del linfocito T (Abbas *et al.*, 2015).

En la inmunidad adquirida, los linfocitos T CD4⁺ están involucrados en la resistencia a infecciones con *H. contortus* y otros parásitos, ya que han demostrado estimular la actividad celular para la producción de inmunoglobulinas (Ig) y citocinas (Peña *et al.*, 2006). El marcador CD4⁺ además de ser responsable de la restricción para reconocer MHC de clase II, potencia la activación de cinasas acopladas al complejo del receptor de células T para estimular mecanismos de señalización que culminarán en la transcripción y regulación de citocinas. Cada subgrupo de linfocitos T_{H1} o T_{H2} activa diferentes factores de transcripción, entre ellos STAT6 y GATA-3 que actúan como reguladores en la diferenciación de T_{H2} al incrementar la expresión de los genes *IL-4*, *IL-5* e *IL-13* (Knot *et al.*, 2009). La resistencia a NGI en rumiantes involucra niveles altos de *IL-4*, *IL-5* e *IL-13*. En estudios realizados en ovinos por Jacobs *et al.*, (2016) se observó sobre expresión de *IL-4* en mucosa del abomaso durante los primeros días de infección por *H. contortus*, asimismo genes involucrados en el aumento de la activación de macrófagos y de eosinófilos también se regularon positivamente. De igual manera, estudios realizados en infecciones por *Cooperia punctata* demostraron regulación de *IL-4* e *IL-13* en animales resistentes e *IL-2*, *IL-12p35*, *IFN γ* y *MCP-1* (T_{H1}) en los susceptibles (Bricarello *et al.*, 2008). Asimismo, en estudios realizados con antígenos ocultos del intestino de *H. contortus* han mostrado activar células de la clase T_{H2} e IgG que ocasionan alteración en la alimentación y malnutrición del parásito (Newton y Munn 2001).

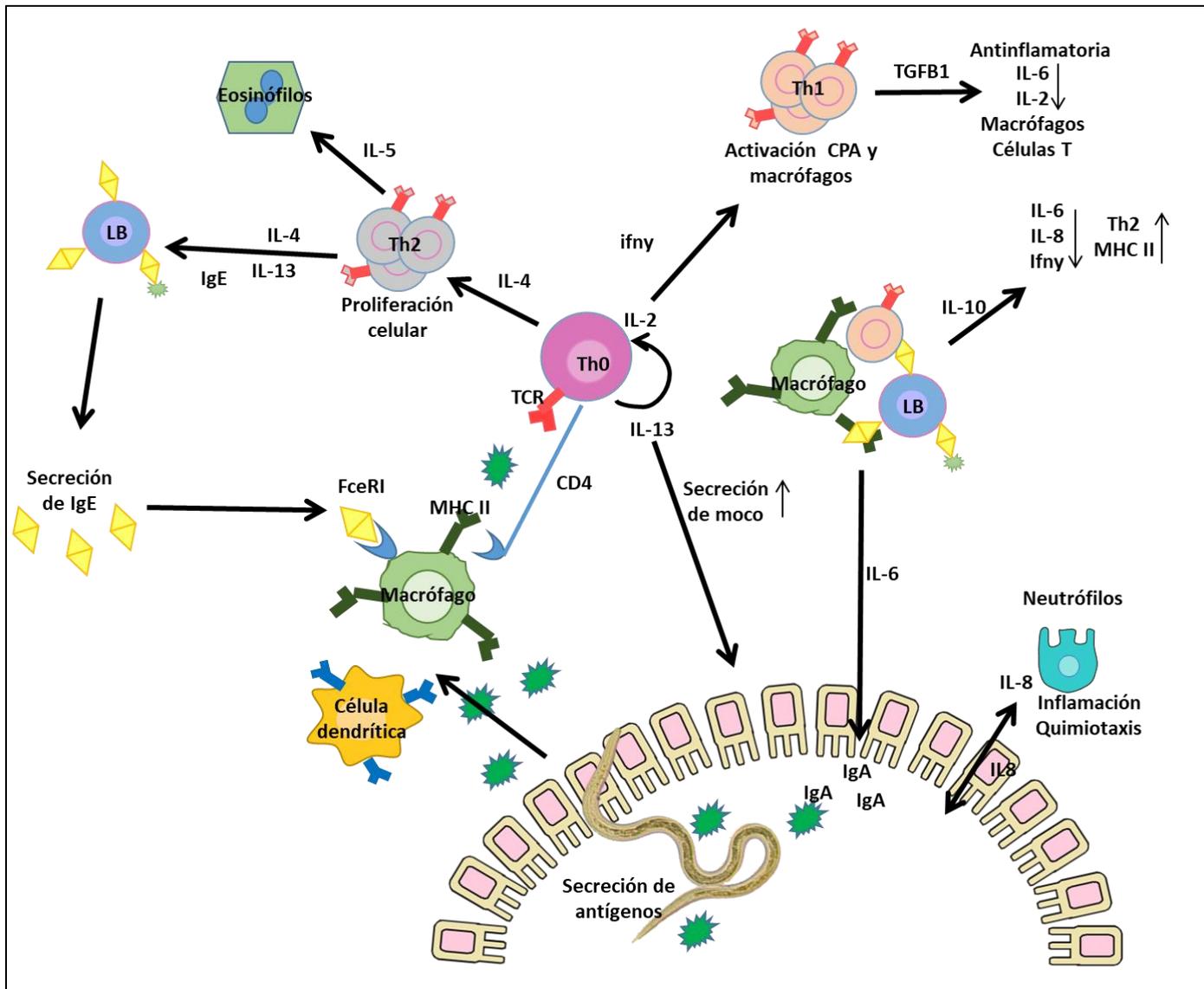


Figura 4. Mecanismos de la respuesta inmune en contra NGI. La imagen muestra las principales funciones de algunos componentes relacionados durante el reconocimiento, la activación y regulación de los mecanismos inmunitarios. Fuente: Propiedad de la autora del presente trabajo, con referencia de Abbas *et al.*, 2015.

2.5.5 Inmunidad de barreras epiteliales y mucosas

La inmunidad del tracto gastrointestinal desempeña importantes funciones en la defensa del hospedero contra infecciones por nematodos. Dentro del tejido conjuntivo y de las mucosas se encuentran varios tipos de células epiteliales intestinales (Vervelde *et al.*, 2003). Entre ellas están las células calciformes secretoras de moco, que residen en la parte superior de las vellosidades intestinales; las células epiteliales encargadas de la absorción y secreción de citocinas; las células M captadoras de antígenos, que se encuentra por encima de los tejidos linfáticos; y las células de Paneth secretoras de péptidos antibacterianos. En una respuesta inmunitaria, los linfocitos T se encuentran en el epitelio intestinal, dispersos a lo largo de la lámina propia, la submucosa y dentro de las placas de Peyer, órgano linfático (Abbas *et al.*, 2015). Los linfocitos T CD4⁺ localizados dentro de las placas de Peyer y en otros folículos adyacentes al epitelio intestinal incluyendo los linfocitos T_H foliculares, y los linfocitos T de memoria. En la respuesta inflamatoria local estimuladas por helmintos, se activan el complemento, así como mastocitos, células polimorfonucleares, etc., que genera un ambiente favorable para la activación de citocinas y linfocitos TCD4⁺ (Balic, 2000; Hein *et al.*, 2010).

En estudios realizados por Zaros *et al.*, (2010) y por Ibelli *et al.*, (2011) en muestras de tejido del abomaso durante una infección por *H. placei* se observó aumento en la expresión de la interleucina 4 (*IL-4*) indicando polarización hacia la respuesta inmune efectora tipo T_H2 en animales que presentaban resistencia a la infección. Este tipo de respuesta tiene como característica la activación de eosinófilos, receptor de IgE (*FCεR1A*), diversas citocinas, enzimas, radicales libres de hidrógeno que producirán ruptura y lesiones en las paredes del parásito, provocando su muerte (Balic *et al.*, 2006; Ortolani *et al.*, 2013). Además, al aumentar los mastocitos, éstos son capaces de producir mediadores de la inflamación (ej. histamina e heparina), así como inmonoglobulinas (ej. IgA en secreciones de la mucosa).

Los linfocitos T que presentan en la membrana al marcador CD4⁺ son reclutados en órganos linfoides secundarios (ej. ganglios y bazo) donde se reconoce al antígeno para llevar a cabo la proliferación de linfocitos T específicos. En este proceso, la IL-2 inicia la señalización y activación de la proliferación celular, regulación de citocinas, quimiocinas y otros factores inmunológicos. Una vez que se ha finalizado el periodo de reclusión, los linfocitos T pueden ser detectados en la sangre y órganos linfáticos como células efectoras (Meeusen *et al.*, 2005).

2.6 Métodos de control

2.6.1 Control antihelmíntico

En la actualidad, los antihelmínticos representan el principal método para controlar las poblaciones de NGI, esto se debe a que son fármacos que poseen amplio espectro de acción, fácil acceso y poseen bajos costos, lo que lleva a su fácil aplicación y uso constante por los ganaderos (Coles *et al.*, 2006)

El uso frecuente de antihelmínticos en animales no solo genera residuos en la leche y carne de consumo humano, también se ha detectado residuos en heces, que dañan directamente al medio (Lozano y Arias, 2008). Por ejemplo, el efecto letal causado por la Ivermectina (antihelmíntico de la familia de las Lactonas Macroclínicas) en los escarabajos coprófagos al ingerir heces contaminadas (Martínez *et al.*, 2000). Además, el uso inadecuado, la falta de rotación de los principios activos, la falta de asesoramiento profesional y la aplicación de químicos sin la calidad debida, ha provocado problemas de resistencia antihelmíntica, factores que favorecen cambios genéticos en los NGI, confiriendo tolerancia al fármaco (Encalada-Mena *et al.*, 2009; DeGraef *et al.*, 2012). Este problema se ha ido extendiendo y persistiendo en países con clima templado, tropical y subtropical, por lo que es necesario implementar diferentes alternativas de control al uso de estos fármacos (Anziani, 2005).

2.6.2 Métodos de control alternativo

Debido a la disminución de la eficacia de los antihelmínticos y el desarrollo de la resistencia múltiple en los NGI se ha buscado el desarrollo de diferentes métodos

de control que permitan un control integral en estas infecciones. A continuación, se describen algunos de los métodos de control alternativo:

- **Control biológico:** En la naturaleza los NGI se encuentran expuestos a la presencia de enemigos naturales con potencial uso en contra de los estadios de vida libre. El hongo depredador de larvas de nemátodos *Duddingtonia flagrans* ha mostrado reducciones alrededor del 92% (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008).
- **Resistencia genética:** La selección genética tiene un valor muy importante en la resistencia a las nematodosis a través de mecanismos inmunes. Los rumiantes han desarrollado la capacidad de controlar las parasitosis a través de sistema inmune. El sistema inmunológico en contra de NGI es regulada principalmente por células de la clase T_H1 y T_H2 . La actividad de linfocitos celulares tipo T participa en la presentación de antígenos en forma inmediata, además de generar mecanismos de memoria que evitan el daño por NGI. Sin embargo, no todos los individuos logran responder en contra de las nematodosis, debido a caracteres hereditarios. A través de esta estrategia de control, se seleccionan individuos resistentes genéticamente para mejorar las cruces entre individuos (Estrada-Reyes *et al.*, 2015).
- **Agentes inmunizantes:** El desarrollo de vacunas es el método preventivo en contra de los NGI que resulta más atractivo debido a la generación de memoria inmunológica por periodos más extendidos de tiempo. A la fecha, pocas vacunas contra nemátodos están en proceso. La variación antigénica de éstos patógenos ha contribuido a la evasión de la respuesta inmune y a la baja especificidad para ser reconocidos por factores inmunodominantes para generar una respuesta de memoria. Sin embargo, la importancia de contar con agentes inmunizantes altamente efectivos para su uso en vacunas es uno de los compromisos a nivel mundial para mejorar la salud animal y el control de NGI (Saumell *et al.*, 2005).

2.7 Desarrollo de Vacunas

Un antígeno es una molécula de procedencia exógena o un cuerpo extraño al organismo que al ser identificado podría activar o disminuir los mecanismos inmunes de defensa del hospedero (Vega, 2009). A pesar de esta dualidad que presentan los antígenos de NGI, su estudio ha permitido obtener derivados de géneros altamente patógenos (ej. *Haemonchus*) para su evaluación como vacunas. Para un mejor estudio, los derivados de NGI se han dividido en dos clases principales; 1. Antígenos ocultos (Hidden Antigens, HAg) y 2. Antígenos convencionales o naturales (NAG, Munn y Newton, 2000). A continuación, se describen algunos de los principales antígenos que han mostrado actividad inmunizante:

2.7.1 Antígenos ocultos

Los antígenos ocultos están disponibles para su reconocimiento y activación de la respuesta inmune durante la alimentación del parásito, por lo que solo son efectivos contra nematodos hematófagos. La importancia en la investigación de HAg ha permitido la identificación de diversos productos que confieren protección a través de Ig que interfieren en la actividad del intestino de los nematodos (Smith *et al.*, 1999). La glicoproteína H11 de la membrana del intestino de los nemátodos adultos de *H. contortus* de 110 kDa es una aminopeptidasa microsomal que ha mostrado actividad inmunoprotectora (Smith y Smith, 1996). La H11 ha sido probada en diferentes experimentos con diversas razas e incluso en jóvenes corderos y periparturales, en los cuales ha mostrado altos índices de protección con reducciones de huevos por gramo de heces (HPG) hasta del 90% y 75% en la carga parasitaria del abomaso (Newton y Munn, 1999). Sin embargo, esta vacuna aun no se ha comercializado en su forma recombinante debido diversos problemas que existe con la conformación proteica (Munn *et al.*, 1997).

Otro antígeno que mostró altos niveles de protección es H-gal-GP de *H. contortus*, el cual es un complejo multiproteico que oscila entre 31 y 230 kDa incluyendo dos aspartil-proteasa tipo pepsina, cuatro metalobendopeptidasas y una proteína tipo cisteína (Ekoja y Smith, 2010). La H-gal-GP tuvo reducciones de 93% en HPG y

72% en cargas parasitarias del abomaso de corderos (Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, el efecto inmunizante de la evaluación por separado y en su forma recombinante de las proteínas que conforman este complejo es menor en comparación con el complejo completo (Ekoja y Smith, 2010).

2.7.2 Antígenos convencionales

Los ESP de NGI son antígenos que entran en contacto con los tejidos del hospedero para estimular la producción de Ig durante el proceso de infección, por lo que a diferencia de los HAg son efectivos contra nemátodos hematófagos (Newton y Meeusen, 2003). Los ESP realizan diversas funciones en los NGI, como permitir la penetración de las larvas en el tejido, evitar la coagulación de la sangre, facilitar la degradación de las proteínas del huésped para su alimentación, por lo que tienen un potencial uso como agentes inmunizantes (Knox *et al.*, 2003; Suchitra y Joshi, 2005). Los antígenos *ES15* y *ES14* son ESP de bajo peso molecular expresados por L₄ así como por nemátodos adultos de *H. contortus*. La inmunización con estos antígenos ha reducido de 32 a 77% el HPG y un 64 a 85% la carga parasitaria en el abomaso (Schalling y van Leeuwen, 1997; Vervelde *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha encontrado que los antígenos naturales *ES15* y *ES14* inducen fuertes respuestas humorales y celulares, como lo es la proliferación de células T y producción de Ig (Schalling, *et al.*, 1994). Contrariamente, los antígenos recombinantes de esta vacuna no inducen ninguna protección en corderos jóvenes (Verveld *et al.*, 2002). Respecto al antígeno de superficie de la L₃ denominado Hc-sL3 con aproximadamente 83 kDa (Jacobs *et al.*, 1999) se observó reducciones entre 50-70% en HPG y cargas parasitarias (Piedrafita *et al.*, 2012; Piedrafita *et al.*, 2013). Se ha postulado que la inmunidad inducida por esta vacuna es dependiente de eosinófilos y es mediada por anticuerpos específicos para dicho antígeno, concordando con la eosinofilia relacionada con infecciones por NGI (Terefe *et al.*, 2007; Piedrafita *et al.*, 2013). Sin embargo, el antígeno HC-sL3 modificado postraduccionalmente no cuenta con clones de cDNA funcionales (Newton y Meeusen, 2003).

2.8 Uso de gerbos (*Meriones unguiculatus*) en el estudio de *Haemonchus* spp.

La patología causada por NGI en rumiantes se debe principalmente al daño que causan por la ruptura de tejido y por sus hábitos de hematofagia en géneros como *Haemonchus* (Balic *et al.*, 2000). Su estudio como el nematodo parásito requiere del hospedero definitivo y en ocasiones de sacrificar a los mismos. Numerosos estudios han contemplado el uso de animales de laboratorio como conejos, ratones y gerbos con objeto de contar con modelos biológicos que permitan el estudio de ésta parasitosis. Así, los gerbos han sido utilizados para evaluar fármacos y proteínas debido a que permiten la infección hasta el cuarto estadio parásito de diferentes géneros de nematodos de rumiantes como *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Ostertagia circumcincta* y *Haemonchus contortus* (López *et al.*, 2006; Gressler *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda global de productos de origen animal se ha incrementado a través de los años, por lo que es de importancia estudiar las infecciones por NGI que afectan la economía en la producción del sector ganadero. Dentro de los NGI, *H. placei* destaca por su alta patogenicidad, adaptación al entorno y alta prolificidad, provocando que este parásito tenga alta prevalencia en climas tropicales. Actualmente, el principal método de control de los NGI consiste en la utilización de productos químicos, sin embargo, el uso inadecuado ha desencadenado la resistencia a multidroga, daño a la salud animal y residuos tóxicos en los alimentos. Los bovinos tienen la capacidad de desarrollar inmunidad frente a las infecciones por NGI. En el 2018 Reyes-Guerrero y colaboradores han notificado la relevancia de antígenos de *H. placei* en la regulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune en una infección por NGI. Por lo que, la identificación de proteínas de excreción y secreción de los diferentes estadios endoparásitos encargadas de la activación de esta inmunidad y la identificación de los mecanismos inmunes involucrados en la resistencia a las infecciones por NGI, favorecería la comprensión de los mecanismos de defensa a nematodiasis y el desarrollo de nuevas herramientas de control. En la presente investigación se pretende identificar, caracterizar y determinar la presencia de factores inmunológicos activados por los ESP del nematodo *H. placei*.

4. HIPÓTESIS

Los antígenos de secreción de L₄ de *H. placei* estimularán *in vitro* la proliferación de linfocitos TCD4⁺ y Tγδ⁺, y la producción de citocinas asociadas a la inflamación.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el perfil de proteínas de secreción derivados del primer estadio endoparásito de *Haemonchus placei* y su efecto en la proliferación celular y producción de citocinas *in vitro*.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar parcialmente las principales proteínas de los productos de secreción de L₄ de *H. placei*.
2. Analizar si las proteínas de secreción inducen la proliferación de linfocitos TCD4⁺ y Tγδ⁺ *in vitro*, e identificar las poblaciones celulares activadas mediante citometría de flujo.
3. Cuantificar la expresión relativa de citocinas asociadas al daño inflamatorio inducidas por los productos de secreción de *H. placei*.

7. METODOLOGÍA

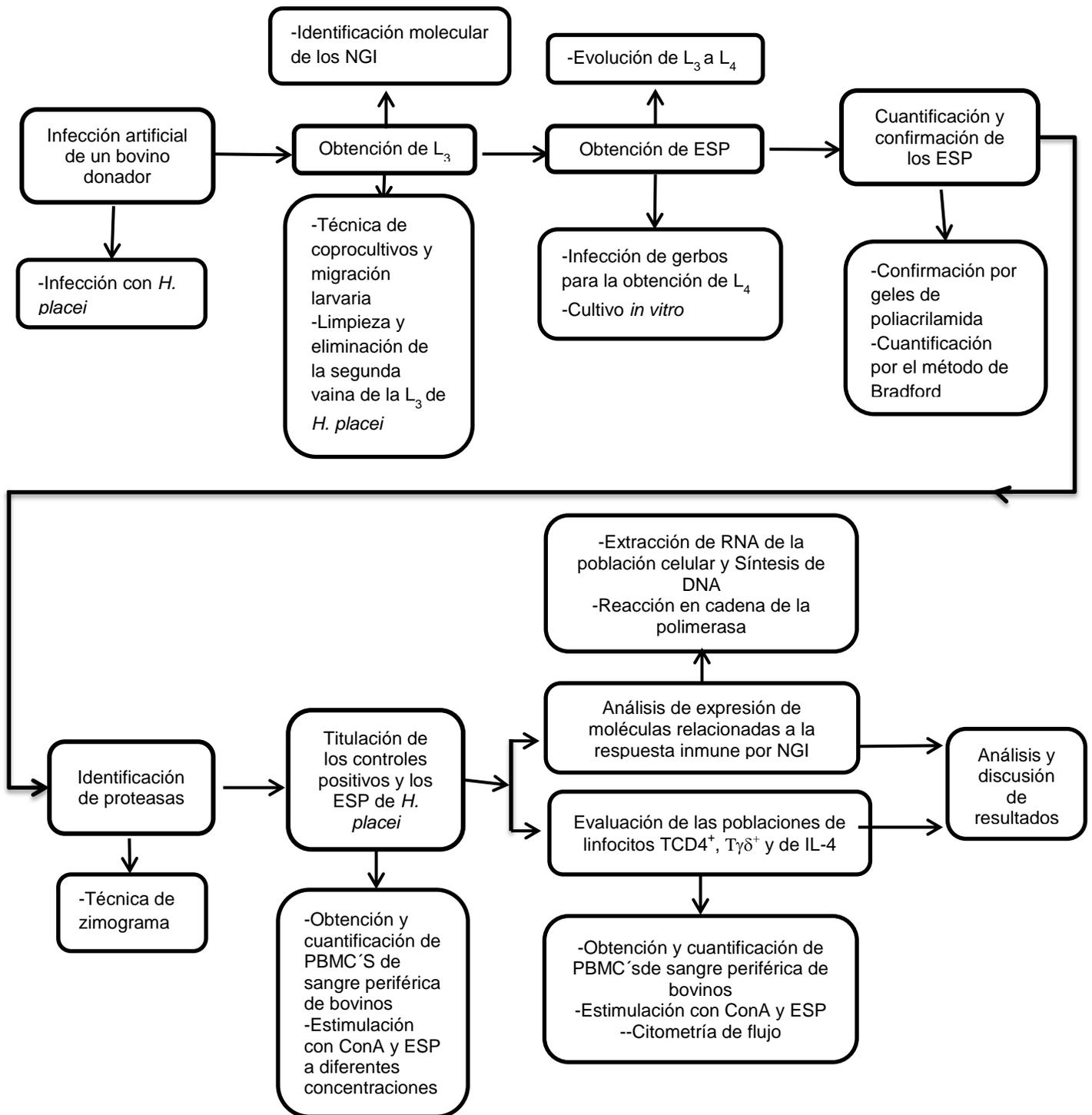


Figura 5. Diagrama de flujo general mostrando el proceso metodológico para el presente proyecto

7.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en la Unidad de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Jiutepec, Morelos, México y en el Laboratorio de Botánica Estructural del Centro de investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en Cuernavaca, Morelos, México.

7.2 Obtención de *H. placei*

7.2.1 Larvas infectantes

La obtención de de *H. placei* L₃ se realizó a partir de muestras de heces de becerros, positivas a la infección por NGI por técnicas la técnica de McMaster (Henriksen y Aagaard, 1976; Anexo A). Las muestras fueron colectadas del Sitio Experimental “Las Margaritas” del INIFAP, Hueytamalco, Puebla. La prevalencia de NGI en el sitio es mayor al 75% durante todo el año debido a condiciones de humedad del 100% y temperatura media anual del 30°C. Las muestras fueron procesadas para la obtención de L₃ (Liébano, 2004; Anexo B).

7.2.2 Eliminación de detritus y de la segunda vaina de L₃

Las L₃ obtenidas fueron tratadas con gradiente de densidad y centrifugación con sacarosa (10-60%) para la eliminación de detritus fecales. Asimismo, se eliminó la cubierta de queratina con hipoclorito de sodio al 0.187% (Cloralex®, Alen, México). El proceso de eliminación de la cubierta se supervisó en microscopio compuesto a 4X para proceder a la eliminación del hipoclorito con lavados con dH₂O y centrifugación a 400g por 3 minutos (Liébano *et al.*, 1996).

7.3 Genotipificación de NGI

7.3.1 Extracción de DNA

La identificación y confirmación de *H. placei* se llevó a cabo mediante la técnica de PCR de punto final utilizado DNA genómico de L₃ sin vaina. El proceso se realizó con DNeasy Blood & Tissue, siguiendo las indicaciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania, Anexo C). La concentración y pureza (2.0) del DNA se determinó empleando métodos espectrofotométricos (NanoPhotometer, IMPLLEN,

USA), a 280 nm (posible contaminación proteica) y 260 nm para determinar la concentración de DNA. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

7.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En el 2001, Zarlenga y colaboradores desarrollaron una metodología para la identificación de diferentes géneros de NGI. El método se basa en el uso de oligonucleótidos específicos para las regiones conservadas del DNA ribosomal de nematodos parásitos. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la región del primer espaciador interno de transcripción (ITS 1) de *Ostertagia*, el espaciador externo de transcripción (ETS) de *Haemonchus* y *Cooperia*, el segundo espaciador interno de transcripción (ITS 2) de *Trichostrongylus* y la región 3' del ITS 1 a través del extremo 5' del ITS 2 de *Oesophagostomum* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Oligonucleótidos específicos utilizados para la genotipificación de nematodos gastrointestinales de rumiantes

Género	Oligonucleótidos
<i>Ostertagia/Teladorsagia</i>	Fw: 5'TAAAAGTCGTAACAAGGTATCTGTAGGT3' Rv: 5'GTCTCAAGCTCAACCATAACCAACCATTG3'
<i>Haemonchus</i>	Fw: 5'CATTTTCGTCTTGGGCGATAT3' Rv: 5'TGAGACCGCACGCGTTGATTGAA3'
<i>Oesophagostomum</i>	Fw: 5'GCAGAACCGTGACTATGGTC3' Rv: 5'GACAAGGAGATCACGACATCAGCAT3'
<i>Trichostrongylus</i>	Fw: 5'CAGGGTCAGTGTCTGAATGGTCATTGTCAAATT3' Rv: 5' CAGGGTCAGTGGTTGCAATACAAATGATAATT3'
<i>Cooperia</i>	Fw: 5'TCGATGAAGAGTTTTTCGGTGTTTC3' Rv: 5'TTCACGCTCGCTCGTGACTTCA3'

(Zarlenga *et al.*, 2001)

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo con una mezcla comercial de reacción (Anexo D), bajo las siguientes condiciones de PCR durante 33 ciclos: 1. desnaturalización a 94°C por 55 seg. 2. Alineamiento a 60°C por 55 seg. 3.

Extensión a 72°C por 55 seg. Al término de la reacción de PCR se determinó el tamaño de los productos en una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio en solución TAE 1X (Anexo E).

7.4 Productos de secreción de *H. placei*

7.4.1 Cultivo *in vitro* de L₃ y L₄

Larvas del tercer estadio de *H. placei* sin vaina fueron incubadas con buffer de fosfatos, PBS pH 7.2 (Anexo F) suplementado con 100 µL antibiótico-antimicótico (100X Gibco®; por cada 20 mL de PBS) por dos horas a 37°C a 20 r.p.m. para eliminar cualquier posible contaminación por bacterias y hongos. Al término de la incubación las larvas fueron incubadas con medio Hank's Balanced Salts (Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA) suplementado (Anexo G) a 37°C en una atmosfera de CO₂ del 5% en cajas de cultivo celular de 6 pozos (Thermo Scientific™ Nunclon™ DELTA, México). La colecta de los productos de ESP obtenidos durante los cultivos *in vitro* del desarrollo de L₃ a la L₄ se realizó a los 7 días (Reyes-Guerrero *et al.* en el 2018). La purificación de proteínas se realizó por diálisis para retener partículas mayores a 12,000 monómeros (*Mr*) (Sigma-Aldrich, USA) con PBS pH 7.2 durante 24 h.

7.4.2 Productos de secreción colectados de gerbos infectados

Se utilizaron gerbos (*Merionis unguiculatus*) como modelos biológicos para la obtención de *H. placei* L₄. Gerbos de 21 días de edad, recién destetados, fueron infectados con 10,000 L₃ de *H. placei* sin vaina por vía oral. Previamente, se aplicó 0.04 mL de dexametasona (Vodexat ®, México) por vía subcutánea durante 3 días. Asimismo, se les administró una dieta de mantenimiento con alimento comercial Gebil (Cunipic®, México) y agua *ad libitum*. A los 9 días post-infección se realizó el sacrificio de los gerbos por desnucamiento (NOM-051-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-199) y los estómagos fueron extraídos de la cavidad abdominal. Las larvas localizadas entre el tejido y la mucosa estomacal fueron colectadas y lavadas con PBS pH 7.2 a 37°C. Posteriormente, las L₄ de *H. placei* fueron incubadas con medio Hank's Balanced Salts (Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA; Anexo G) a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂ en cajas de cultivo celular de 6

pozos (Thermo Scientific™ Nunclon™ DELTA, México). La colecta de los productos de ESP obtenidos durante el cultivo *in vitro* de L₄ de gerbos se realizó a las 24 h de incubación. La purificación de proteínas se realizó con filtros estériles de 0.20 µm (Corning®, Germany).



Figura 6. Procedimiento para la obtención de larvas del primer estadio endoparásito de *H. placei*. A) Gerbos de 21 días de edad; B) Aplicación subcutánea de dexametasona; C) Infección con L₃ de *H. placei* sin vaina por vía oral.

7.5 SDS-PAGE y Zimograma

Los ESP colectados *in vitro* fueron confirmados a través de SDS-PAGE al 5 y 12% (Anexo H). La estimación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay®, California, USA; Anexo I). Respecto a la técnica de zimograma, ésta es un método electroforético mediante la preparación de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes al 10% y al 3.7%, agregando gelatina al 0,7%. Posteriormente, el gel fue tratado con solución renaturalizante durante 2 h a 37°C, seguido de solución reveladora durante 18 h a 37°C. Se usó Coomassie Brilliant Blue G (Sigma Aldrich®, USA) para visualizar las bandas y determinar el peso molecular y la actividad proteolítica sobre el zimograma mostrando bandas no teñidas sobre el fondo oscuro del gel. Para determinar el punto isoeléctrico de la proteína de 70 kDa de *H. placei*, se realizó la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (BIO-RAD, USA; Anexo J).

7.6 Proliferación celular

7.6.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica de bovinos (PBMC's)

Se colectó muestra de sangre por vía intravenosa de bovinos, raza Angus (libre de patógenos), en bolsas con citrato de sodio BLORECEP® (Becton, Dickinson, USA). Cada muestra fue procesada inmediatamente con PBS pH 7.2 sobre un gradiente de densidad comercial (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway; Anexo K). Las PBMC's fueron suspendidas en medio RPMI+HEPES suplementado (Gibco, Carlsbad, California USA; Anexo L). La confirmación de la viabilidad y cuantificación celular se realizó utilizando la tinción por azul tripano. Este método de tinción por exclusión se basa en la captación del colorante por las células no viables, cuya membrana esta alterada; mientras que en células viables la membrana conserva su integridad y no permite el ingreso del colorante de acuerdo al protocolo comercial usado (Sigma-Aldrich, St. Louis-Missouri, USA; Anexo M).

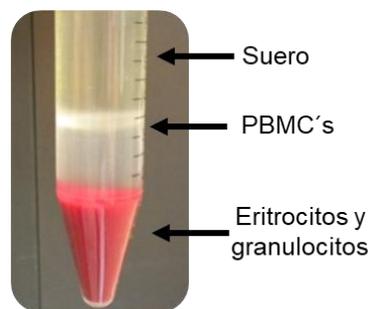


Figura 7. Separación de PBMC's por gradiente de densidad, utilizando lymphoprep

7.6.2 Titulación de control positivo (ConA) y ESP

Entre los productos utilizados como control positivo se consideran a las lectinas, entre ellas la Concanavalina A (ConA). La ConA se une a las glicoproteínas de superficie celular (α -manosa y α -glucosa) para inducir la división celular (mitosis) específica a linfocitos T (Norian *et al.*, 2015). Esto permitió asegurar la confiabilidad en los ensayos de proliferación celular propuestos en el presente estudio.

El procedimiento para llevar a cabo los ensayos de titulación utilizando ConA y los ESP de *H. placei* se llevaron a cabo con 500,000 PBMC's por pozo en 100 µL de medio RPMI+HEPES (Anexo L). Los ensayos se realizaron con tres repeticiones y por triplicado con base en el siguiente diseño experimental (Cuadro 4) para ConA y ESP (Cuadro 5). Con base en estudios previos realizados con productos de secreción, así como del uso de ConA, se evaluaron diferentes dosis de ambos productos debido a la variación en dichas publicaciones (McNeilly *et al.*, 2013; Norian *et al.*, 2015).

Cuadro 4. Titulación y estandarización de PBMC's de bovinos y ConA

Tratamientos	Concentración (µg/mL)	Variable respuesta
Control negativo	-	Porcentaje de proliferación celular
ConA	0.1	
	1	
	2.5	
	5	
	10	
	50	

Repeticiones=3; Réplicas=3

Periodos: 24 y 48 h

Nota: En cada pozo se depositaron 500,000 PBMC's

Cuadro 5. Titulación de los ESP de *H. placei in vitro*

Tratamientos	Concentración (µg/mL)	Variable respuesta
Control negativo	-	Porcentaje de proliferación celular
ConA	2.5	
ESP de <i>H. placei</i>	0.02	
	0.2	
	2	

Repeticiones=3; Réplicas=3

Periodo: 24 y 48 h

Nota: En cada pozo se depositaron 500 000 PBMC's

Las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂, durante 24 y 48 h después de la inducción de la proliferación. Se cuantificó la proliferación celular utilizando 20 µL de MTT (CellTiter 96® AQueous, USA) e incubación de 2 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, y las lecturas se realizaron en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD, USA) a 490 nm de OD.

7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en tiempo real (qRT-PCR)

7.7.1 RNA total

Se sembraron 10x10⁶ PBMC's en medio RPMI+HEPES (Anexo L), para ser retadas a concentración de 0.2 µg/mL con los ESP de 15 kDa (24 y 48 h de cultivo) y de 70 kDa (16 y 24 h de cultivo). A continuación, se procedió a realizar la extracción de RNA total usando QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany; Anexo N). Una vez obtenido el RNA total, se procedió a medir la concentración espectrofotométrica a 260 nm y la pureza se evaluó utilizando la relación OD₂₆₀/OD_{280nm} (IMPLEN, USA). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio en solución TAE 1X para corroborar la integridad del RNA total (Anexos H, I).

7.7.2 Transcriptasa reversa

El RNA total para evaluar las citocinas se descontaminó de trazas de DNA genómico siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante (RQ1 RNase-Free Dnase, Promega, Madison, USA). RNA total (250 ng/µL) se agregó a 1 µL de RQ1 *RNase-Free DNase Reaction Buffer* y 1 µL de RQ1 *RNase-Free DNase*. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C por 30 min y se agregó 1 µL de RQ1 *DNase Stop Solution* (20 mM EDTA, pH 8) e incubación por 10 min a 65°C para terminar la reacción. La reacción de síntesis de cDNA se llevó a cabo con reactivos comerciales (ImProm-II Reverse Transcription System, PROMEGA®, USA) por muestra de RNA como se indica en el Cuadro 6 y 7.

Cuadro 6. Componentes de la mezcla para la reacción de síntesis de cDNA

Componentes	Volumen (µL)
5X Buffer	4.0
MgCl ₂	2.0
dNTP	1.0
RT	1.0
rRNAsin	0.3
RNase-free water	6.7

Cuadro 7. Periodos de incubación para la síntesis de cDNA

Incubación	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	25	5
2	42	60
3	70	15

7.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se realizó con un arreglo comercial (Custom RT2 profiler PCR Array CAPB13410R, Qiagen, Germany), con 12 genes por muestra correspondientes a citocinas, *FCεR1A*, y gen constitutivo *2-β-microglobulina*. Los cebadores para la matriz de PCR fueron diseñados y sintetizados por una marca comercial (Qiagen, Hilden, Germany) basados en las secuencias de la especie *Bos taurus* datos GenBank (Cuadro 8). El arreglo consta de 100 tubos de 0.2 mL cada uno (Estrada-Reyes *et al.*, 201).

Cuadro 8. Oligos para la amplificación de genes específicos en RT-PCR tiempo real.

Símbolo del gen	Melting Curve Temperatura	Código de acceso Genbank	Nombre
<i>IL-2</i>	80.25	NM_173920	Interleucina 2
<i>IL-4</i>	79.7	NM_173921	Interleucina 4
<i>IL-5</i>	80.6	NM_173922	Interleucina 5
<i>IL-6</i>	81.6	NM_173923	Interleucina 6
<i>IL-8</i>	80.0	NM_173925	Interleucina 8
<i>IL-10</i>	80.4	NM_174088.1	Interleucina 10
<i>IL-13</i>	79.3	NM_174089.1	Interleucina 13
<i>IFNγ</i>	79.04	NM_174086.1	Interferón gama
<i>FCϵR1A</i>	81.75	NM_001100310	Receptor de la IgE
<i>TGFβ1</i>	80.72	NM_001166068	Factor de crecimiento transformante beta 1.
<i>β-2 Micro</i>		NM_003406	Beta-2 microglobulina

Los ensayos de PCR en tiempo real para la amplificación del cDNA de los genes fueron procesadas con la mezcla de PCR, siguiendo la metodología citada por Estrada-Reyes *et al.*, (2017). Todas las muestras experimentales se llevarán a cabo con 250 ng/ μ L de RNA. Cuadros 9 y 10.

Cuadro 9. Mezcla de Reacción de qPCR

Componentes	Volumen (μl)
SYBR Green qPCR Master Mix*	5
H ₂ O libre de RNAasas	1
Primer Forward	0.5
Primer Reverse	0.5

Posteriormente, las muestras fueron incubadas bajo las condiciones mostradas en el cuadro 10.

Cuadro 10. Condiciones de qPCR para amplificación de los genes

Ciclos	Pasos	Temperatura °C	Tiempo
1	Desnaturalización	95	10 min.
45	Alineamiento	95	15 seg.
	Extensión	60	45 seg.
1	Temperatura de fusión (<i>Melting point</i>)	Rampa de 65-95°C	

7.8 Citometría de flujo

Debido a la escasa cantidad de antígeno de 15 kDa, no se realizó el análisis de las poblaciones celulares por citometría de flujo; sin embargo, éste se realizó con el antígeno de 70 kDa. Se sembraron 100,000 PBMC's en medio RPMI+HEPES (Anexo L) y fueron retadas con 0.2 µg/mL del ESP y 2.5 µg/mL de ConA. Transcurridas 24 y 48 horas de incubación, se colectaron las células por centrifugación a 250 xg por 5 min. Para realizar la tinción extracelular, el precipitado celular se resuspendió en 100 µL de PBS pH 7.2 y se agregaron 50 µL de anticuerpo monoclonal anti-CD4⁺ conjugado con Alexa 647 (ABD, Serotech), o anti-γδ⁺ conjugado con FITC (BIO-RAD, USA) dilución 1:20 con PBS. Los PBMC's se incubaron con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 20 min, cubiertas de la luz. Posteriormente, se agregó 1 mL de PBS pH 7.2 y se lavaron por centrifugación a 250 xg por 5 min, al precipitado se le agregó 150 µL de PBS, finalmente las células se fijaron con 150 µL de paraformaldehído al 1%. Adicionalmente, se evaluó la presencia de la citocina IL-4 intracelular, para lo cual se permeabilizaron los PBMC's con 50 µL de reactivo comercial (BD IntraSure™ kit, USA), se agregó 50 µL de anticuerpo anti-IL4 conjugado con FITC (BIO-RAD, USA) a una dilución de 1:100 con PBS pH 7.2 y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min., las células se colectaron y fijaron como se indicón anteriormente. Las poblaciones de linfocitos se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria II (Beckton Dickinson) adquiriendo 10,000 eventos. El análisis de los datos se realizó con el programa Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos S.L., Salamanca).

7.9 Análisis estadístico

Los ensayos de proliferación celular se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias de Tukey, usando el programa de análisis estadístico SAS 9.0 (Statistical Analysis System).

Por otro lado, el análisis de expresión relativa de los genes en estudio fue realizado usando los valores del número de ciclos en donde la fluorescencia de amplificación es tal que rebasa el umbral de detección (*threshold cycle*, C_T). Estos fueron obtenidos del termociclador después de la reacción de qPCR de cada una de las PBMC's activadas por los ESP de *H. placei*.

El análisis de la expresión relativa se realizó a través del software bioinformático GeneGlobe Data Analysis Center® (<https://www.qiagen.com/mx/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/?akamai-feo=off>). El software permite hacer una normalización, utilizando el método de la $\Delta\Delta C_T$, en donde este es la división de la ΔC_T (cambio en la expresión de los genes de interés con respecto al gen constitutivo *2- β -microglobulina*) de las PBMC's expuestas a los ESP contra la medición de PBMC's sin estímulo, obteniendo así valores como el cambio en la expresión (*fold change*) de cada gen. Asimismo, el software bioinformático calcula los valores p en función de la prueba t de Student utilizando los valores $\Delta\Delta C_T$ para cada gen.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación molecular de *H. placei*

Se llevó a cabo la colecta de ESP a partir de muestras de heces del sitio experimental "Las Margaritas". La confirmación del género *Haemonchus* se realizó por la técnica de Zarlenga *et al.*, (2001). En la figura 8a se muestra el tamaño del producto de PCR para los cinco géneros de NGI con mayor prevalencia, siendo el fragmento de 176 pares de bases (pb) correspondiente a *Haemonchus*; 151 pb para *Cooperia*; 243 pb para *Trichostrongylus*; 257 pb para *Ostertagia* y 329 pb para *Oesophagostomum*. Por otro lado, en la figura 8b se indica solo la amplificación del fragmento de 176 pb positivo para el género *Haemonchus* de aquellas muestras utilizadas para la obtención de los ESP durante el cultivo *in vitro*.

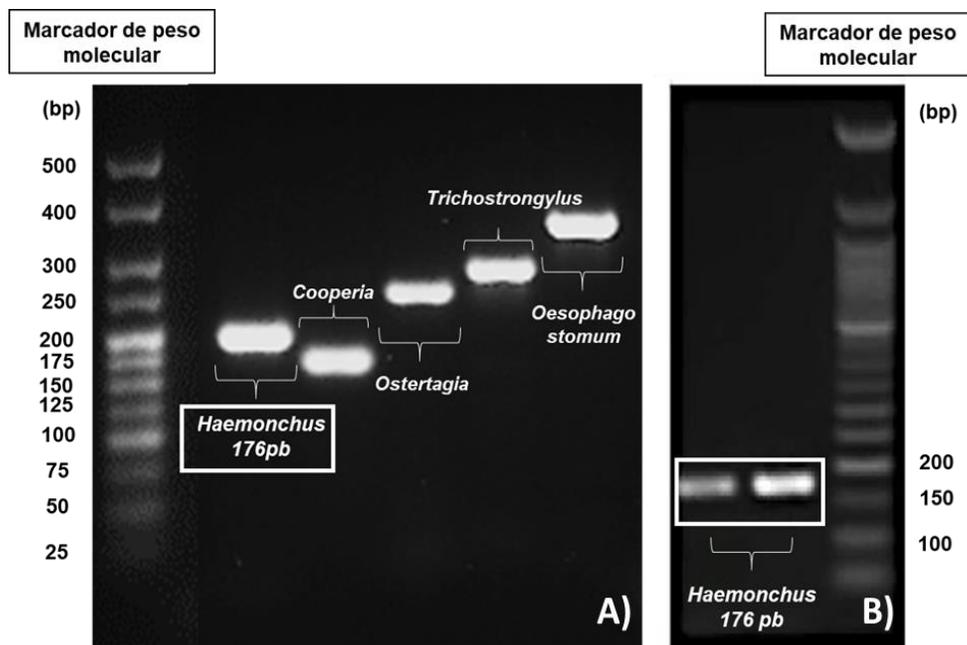


Figura 8. A) La imagen muestra los productos de amplificación para cada diferente género, siendo el fragmento de 176 pares de bases (pb) corresponde a *Haemonchus*; 151 pb para *Cooperia*; 243 pb para *Trichostrongylus*; 257 pb para *Ostertagia* y 329 pb para *Oesophagostomum*. C) Identificación molecular de *Haemonchus* de las L₃ utilizadas para la obtención de los ESP.

8.2 Identificación y caracterización parcial de ESP de *H. placei*

La colecta de los ESP de *H. placei* derivada de L₃ a L₄, se realizó a los 7 días del cultivo *in vitro*. Durante el desarrollo de larvas, se observó incremento del tamaño y morfogénesis de su estructura interna, como fue el cambio de las 16 células intestinales, características del tercer estadio, a un tubo delgado (intestino) que presenta color rojizo debido a sus hábitos de hematofagia, así como una cavidad oral de forma rectangular, entre otras. Éstas características fueron detectadas en cultivos de larvas derivadas de bovino y gerbo. Respecto a éstos últimos, las larvas del cuarto estadio larvario de *H. placei* fueron recuperadas del estómago de gerbos a los 9 días post-infección. Estas presentaban una coloración rojiza, esófago, cavidad bucal y poro excretor visibles, como es mostrado en la figura 9.

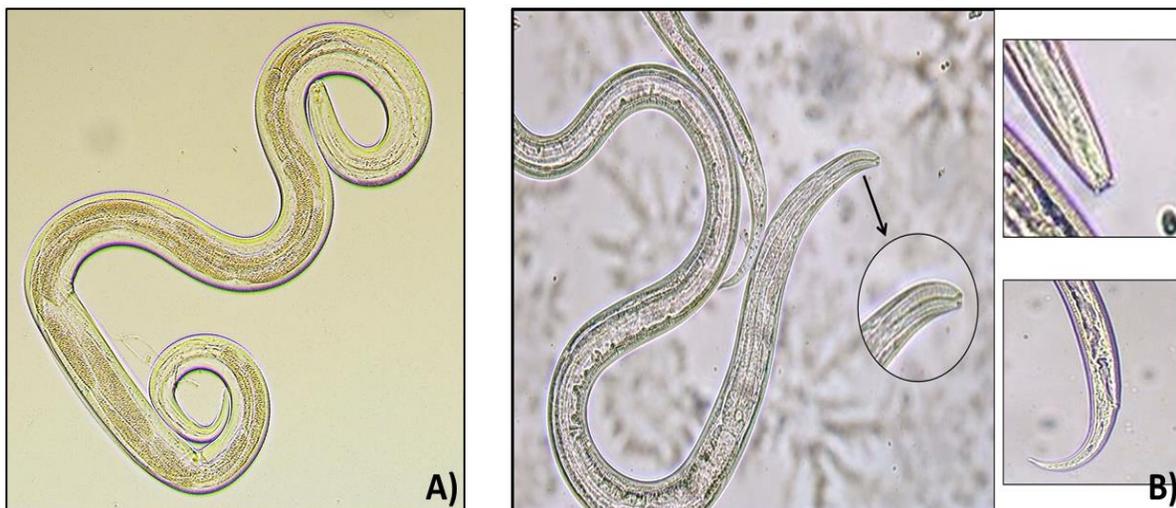


Figura 9. A) Larva del cuarto estadio larvario a los 16 días del desarrollo *in vitro* de L₃ a L₄. B) Larva del primer estadio hematófago de *Haemonchus placei*. Visto en microscopio en aumento 10X. Fuente: Propiedad de la autora del presente trabajo.

8.2.1 Antígeno de 15 kDa de *H. placei*

En la figura 10a se observa una banda de ~15 kDa en SDS-PAGE, sin embargo, en el zimograma, no se observa actividad de proteasa a la altura de esta banda (Figura. 10 a, b).

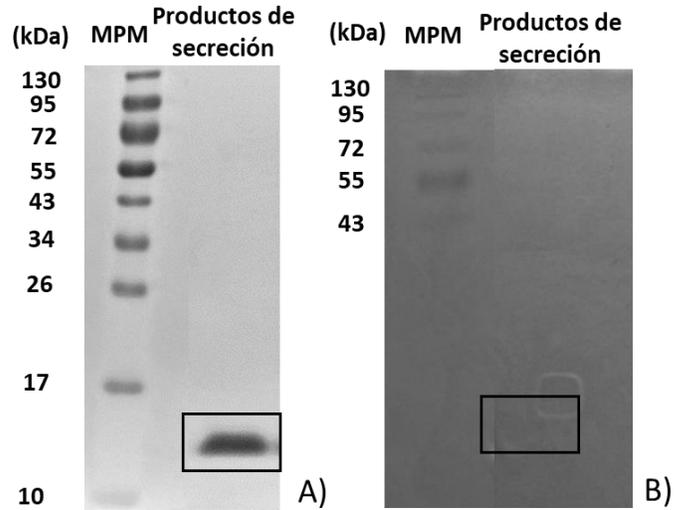


Figura 10. A) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%) de los productos de secreción; carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 ESP del estadio cuatro B) Zimograma de actividad de proteasa de los ESP en condiciones no desnaturizantes; carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 ESP del estadio cuatro. Fotografía en blanco y negro.

8.2.2 Antígeno de 70 kDa de *H. placei*

En la figura 11 a, b, se muestran los ESP colectados *in vitro* de *Haemonchus* a las 24 h. El SDS-PAGE muestra la presencia de una banda de ~70 kDa obtenida durante todo el desarrollo larvario de L₃ a L₄ de *H. placei*. Figura (11A)

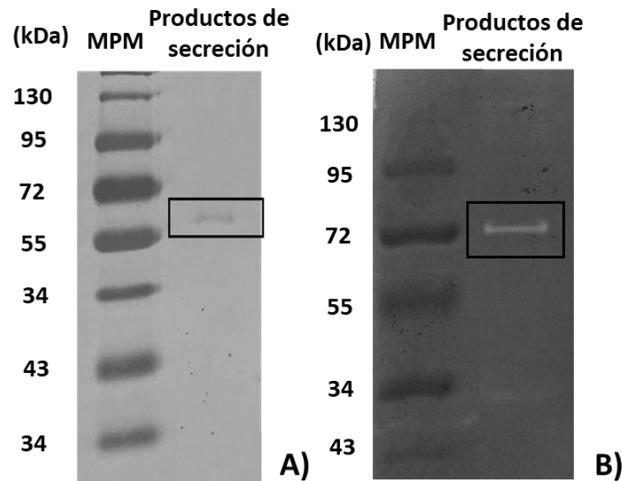


Figura 11. A) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12%) de los productos de secreción; carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 ESP del estadio cuatro B) Zimograma de actividad de proteasa de los ESP en condiciones no desnaturizantes; carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 ESP del estadio cuatro. Fotografía en blanco y negro

Asimismo, una banda de peso molecular similar fue colectada *in vitro* de L₄ obtenidas a partir de gerbos infectados. La banda de 70 kDa presentó actividad de proteasa en la matriz de gelatina. Además, se determinó el punto isoeléctrico de esta proteína siendo de ~ 5.7 (Figura 12).

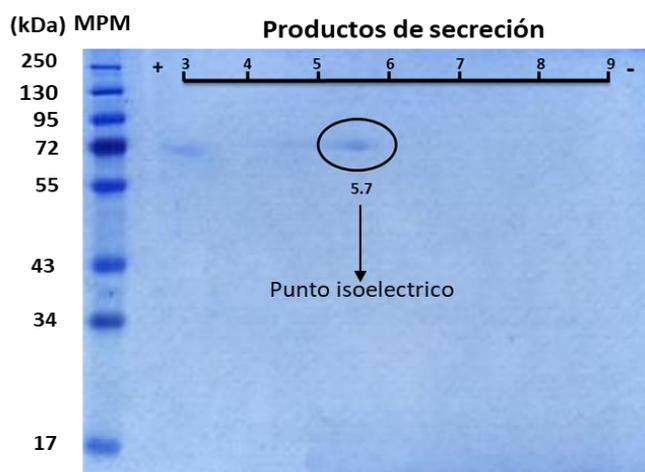


Figura 12 Gel de Segunda dimensión del ESP de 70 kDa de *H. placei*; carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 punto isoeléctrico de ESP.

8.3 Titulación de los ESP *H. placei*

El análisis de los resultados obtenidos en el análisis *in vitro* de los ESP se llevó a cabo considerando el 100% de células utilizando PBMC's de dos animales libres de patógenos. La titulación de los ESP de *H. placei* se realizó con diferentes concentraciones de ConA. En el cuadro 11, se indican el promedio y desviación estándar de las lecturas de proliferación celular utilizando ConA para los diferentes tratamientos. Los datos obtenidos no muestran diferencias significativas entre concentraciones ($p>0.05$), por lo que la concentración intermedia de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se tomó como valor base para titular los ESP de *H. placei*, así como para identificar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Cuadro 11. Evaluación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones ConA.

Tratamiento		24 horas	48 horas
		Proliferación celular \pm SD	
Control negativo		100 \pm 0 ^b	100 \pm 0 ^c
ConA (μ g/mL)	0.1	126.22 \pm 28.12 ^{ab}	143.96 \pm 22.61 ^b
	1	135.68 \pm 34.17 ^{ab}	229.41 \pm 34.83 ^a
	2.5	160.82 \pm 44.79 ^a	236.64 \pm 33.65 ^a
	5	169.07 \pm 45.23 ^a	233.12 \pm 37.48 ^a
	10	167.17 \pm 47.54 ^a	226.00 \pm 41.48 ^a
	50	150.14 \pm 49.63 ^{ab}	160.53 \pm 16.82 ^b

Medias dentro de la misma columna con distinta literal indican diferencias estadísticas $p < 0.05$, Tukey.

8.3.1 Antígeno de 15 kDa de *H. placei*

Los resultados de proliferación celular con el antígeno de 15 kDa de *H. placei* en el primer estadio hematófago mostraron menor proliferación celular en comparación con los controles negativo y positivo. Con ninguna de las concentraciones evaluadas 0.02, 0.2 y 2 μ g/mL hubo diferencias significativas con respecto al control negativo ($p > 0.05$). Por lo cual, la concentración intermedia de 0.2 μ g/mL fue seleccionada para llevar a cabo ensayos posteriores.

Cuadro 12. Estimación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones del ESP de 15 kDa.

Tratamiento		24 h	48 h
		Proliferación celular \pm SD	
Control negativo		100 \pm 0 ^{ab}	100 \pm 0 ^b
ConA (2.5 μ g/mL)		107.647 \pm 14.44 ^a	125.452 \pm 19.04 ^a
ESP (μ g/mL)	0.02	95.306 \pm 8.69 ^b	99.177 \pm 4.33 ^b
	0.2	95.167 \pm 8.19 ^b	102.373 \pm 5.61 ^b
	2	89.098 \pm 7.82 ^b	101.391 \pm 4.95 ^b

Medias dentro de la misma columna con distinta literal indican diferencias estadísticas $p < 0.05$, Tukey.

8.3.2 Antígeno de 70 kDa de *H. placei*

En los ensayos de titulación de ESP de 70 kDa del primer estadio hematófago de *H. placei*, las tres concentraciones de antígeno evaluadas 0.02, 0.2 y 2 µg/mL indujeron un incremento significativo en la proliferación celular con respecto al control negativo a las 24 h ($p < 0.05$). Por otro lado, similares diferencias fueron obtenidas a concentración de 0.02 y 0.2 µg/mL a las 24 y 48 h ($p < 0.05$). Por esta razón, la concentración intermedia de 0.2 µg/mL fue seleccionada para los ensayos posteriores.

Debido a que la respuesta inmune varía con respecto al estadio del patógeno durante las primeras horas se realizó el reconocimiento de antígeno y la activación de factores inmunes de señalización. Estudios previos, realizados por Reyes-Guerrero *et al.*, (2018) reportaron la expresión de citocinas inducidas por la infección con los primeros estadios de *Haemonchus* durante las primeras horas de estimulación (16 y 24 h) de los PBMC's con los ESP de 70 kDa de *H. placei*. Por lo que, en el presente trabajo se evaluó la expresión de genes asociados a respuesta inmune a las 16 y 24 h de post-estimulación.

Cuadro 13. Estimación de la proliferación celular de PBMC's en respuesta a diferentes concentraciones del ESP de 70 kDa.

Tratamiento		24 horas	48 horas
		Proliferación celular \pm SD	
Control negativo		100 \pm 0 ^b	100 \pm 0 ^d
ConA (2.5 µg/mL)		131.77 \pm 12.83 ^b	232.82 \pm 27.55 ^b
ESP (µg/mL)	0.02	122.93 \pm 29.96 ^b	151.28 \pm 22.76 ^c
	0.2	102.20 \pm 22.20 ^b	167.80 \pm 34.13 ^c
	2	592.93 \pm 125.56 ^a	1378.93 \pm 31.43 ^a

Medias dentro de la misma columna con distinta literal indican diferencias estadísticas $p < 0.05$, Tukey.

8.4 Expresión de factores inmunes activados por los ESP de *H. placei*

8.4.1 Antígeno de 15 kDa de *H. placei*

La actividad de PBMC's se incrementó a las 24 h de exposición con el ESP de 15 kDa de *H. placei* para la mayoría de los genes estudiados. Los genes *IL-2*, *IL-4*, *IL-*

5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y FC ϵ R1A, tuvieron valores entre 17 a 91 veces más de incremento con respecto a las muestras control sin tratamiento y al gen constitutivo β -2 Micro ($p < 0.05$). Las citocinas correspondientes a IL-5 e IL-13 obtuvieron el mayor incremento de RNAm (157 y 124 veces respectivamente). Contrariamente, la expresión de TGF β 1 disminuyó durante el tiempo de evaluación ($p < 0.05$; Fig. 13).

La evaluación de las PBMC's con ESP a las 48 h indica disminución del RNAm de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN γ y FC ϵ R1A con valores de 0.03 veces ($p < 0.05$). Por el contrario, se incrementó la expresión de las citocinas TGF β 1 y IL-8 (122 y 3.1 veces respectivamente; $p < 0.05$).

Gen	24 horas	
	Fold change \pm DE	p-value
IL-2	17.33 \pm 0.1	0.00100
IL-4	27.66 \pm 0.08	0.00069
IL-5	157.58 \pm 0.09	0.00001
IL-6	37.79 \pm 0.005	0.00014
IL-8	2.49 \pm 0.045	0.00259
IL-10	51.27 \pm 0.06	0.00047
IL-13	124.50 \pm 0.06	0.00045
ifn γ	28.64 \pm 0.005	0.00014
FC ϵ R1A	91.45 \pm 0	0.00015
TGF β 1	0.14 \pm 0.05	0.00074
β -micro	1 \pm 0.17	0.00000

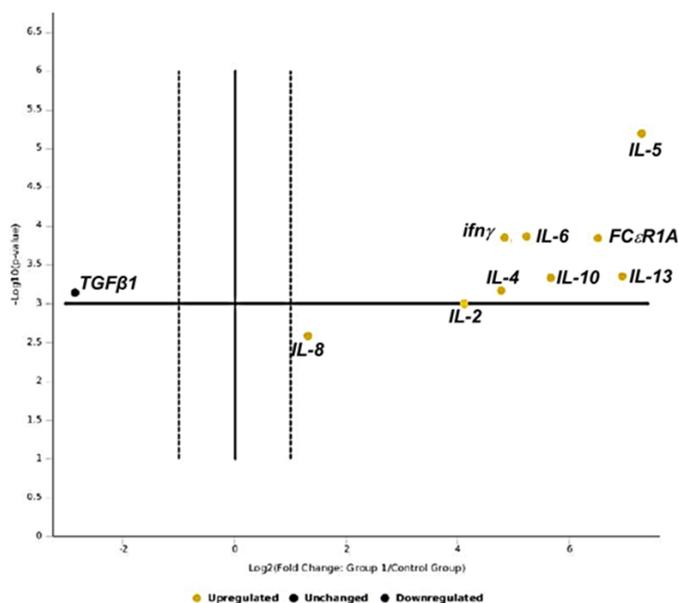


Figura 13. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FC ϵ R1A activados por productos secretados de *H. placei* de 15 kDa *in vitro* a las 24 h de incubación.

Gen	48 horas	
	Fold change \pm DE	p-value
IL-2	0.001 \pm 0.78	0.00001
IL-4	0.003 \pm 0.31	0.00001
IL-5	0.001 \pm 0.55	0.00000
IL-6	0.004 \pm 0.11	0.00032
IL-8	3.110 \pm 0.1	0.00000
IL-10	0.032 \pm 0.6	0.00013
IL1-3	0.003 \pm 0.17	0.00002
ifn γ	0.009 \pm 0.04	0.00000
FC ϵ R1A	0.001 \pm 0.44	0.00003
TGF β 1	121.935 \pm 0.07	0.00000
β -micro	1 \pm 0.01	0.00000

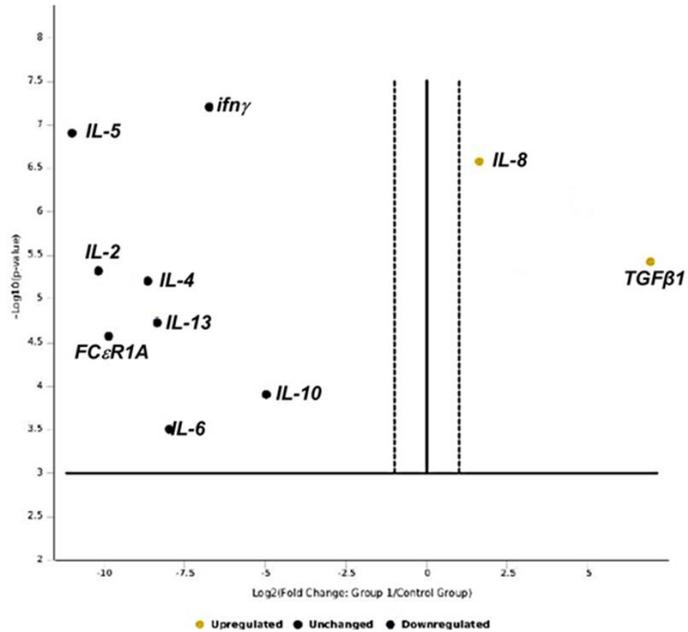


Figura 14. Cuantificación relativa de transcritos de mRNA de citocinas, quimiocina y genes FC ϵ R1A activados por productos secretados de *H. placei* de 15 kDa *in vitro* a las 48 h de incubación.

8.4.2 Antígeno de 70 kDa de *H. placei*

Los resultados de la evaluación de células PBMC's activadas a las 16 h post-activación con el ESP de 70 kDa de *H. placei* indican sobreexpresión de TGF β 1 y IL-8 de 2.4 a 15.6 veces, respectivamente, con respecto al control ($p < 0.05$). Mientras que el incremento de expresión ~ 2 por IL-6, IL-13, IFN γ y FC ϵ R1A, a las 24 h fue menor. Contrariamente, se detectó sub-expresión de IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN γ y FC ϵ R1A, el valor máximo fue de 0.5 veces en relación al control a las 16 h de incubación. Mientras que, a las 24 h, los genes IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 y TGF β 1 tuvieron una expresión similar al gen constitutivo.

Gen	16 horas	
	Fold change \pm DE	p-value
IL-2	0.288 \pm 3.34	0.087
IL-4	0.42 \pm 2.03	0.130
IL-5	0.444 \pm 1.87	0.080
IL-6	1.435 \pm 0.55	0.446
IL-8	15.664 \pm 0.82	0.030
IL-10	1.151 \pm 0.74	0.758
IL-13	0.490 \pm 1.27	0.084
ifn γ	0.356 \pm 1.88	0.064
FC ϵ R1A	0.473 \pm 1.66	0.071
TGF β 1	2.375 \pm 0.51	0.116
β -micro	1 \pm 0.97	0.000

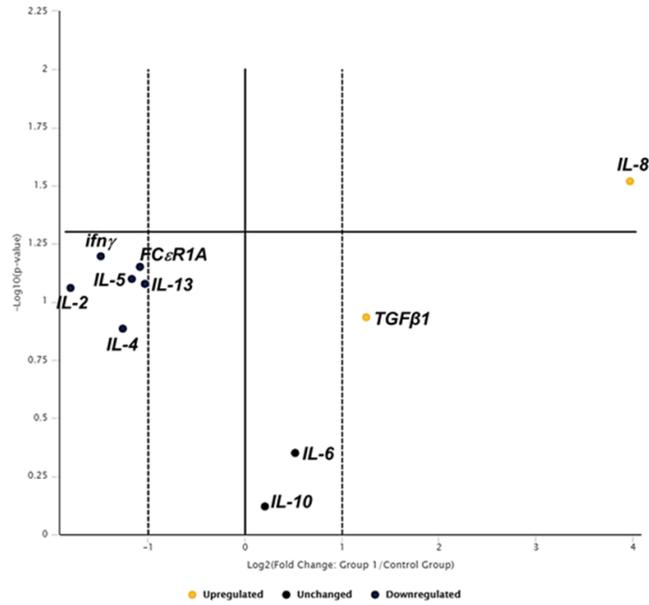


Figura 15. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FC ϵ R1A activados por productos secretados de *H. placei* de 70 kDa durante ensayos *in vitro* a las 16 horas.

Gen	24 horas	
	Fold Change \pm DE	p-value
IL-2	1.7963 \pm 5.53	0.495
IL-4	1.7546 \pm 4.47	0.415
IL-5	1.6409 \pm 4.51	0.366
IL-6	2.0287 \pm 4.08	0.377
IL-8	1.6314 \pm 2.93	0.220
IL-10	1.9097 \pm 3.39	0.274
IL-13	2.0673 \pm 3.09	0.110
ifn γ	2.1593 \pm 4.14	0.439
FC ϵ R1A	2.6007 \pm 4.73	0.395
TGF β 1	1.3226 \pm 1.90	0.296
β -micro	1 \pm 2.08	0

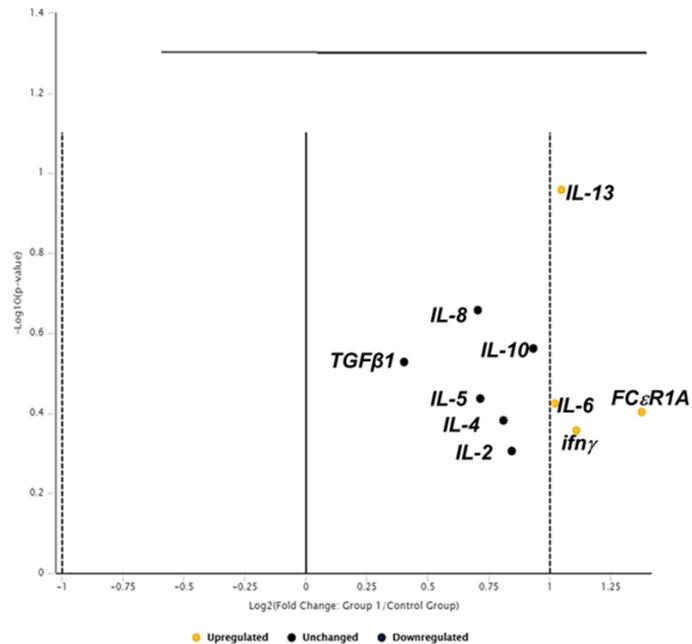


Figura 16. Cuantificación relativa de transcritos de ARNm de citocinas, quimiocina y genes FC ϵ R1A activados por productos secretados de *H. placei* de 70 kDa durante ensayos *in vitro* a las 24 horas.

8.5 Identificación de poblaciones celulares activadas en respuesta al antígeno mediante citometría de flujo

Con el objetivo de evaluar el efecto de los ESP de 70 kDa de *H. placei* en PBMC's, se evaluó el porcentaje de linfocitos TCD4⁺, Tγδ⁺ e IL-4 a las 24 y 48 h de incubación. Las figuras 17 y 18 muestran las gráficas de los linfocitos control sin estímulo, de linfocitos estimulados con ConA ó linfocitos estimulados con el ESP de *H. placei*.

La población de linfocitos TCD4⁺ en el control sin tratamiento fue de 35.03%. A las 24 h de incubación con el antígeno de ESP de 70 kDa hubo un incrementó de esta población celular de un 4.43%. Mientras que a las 48 h el porcentaje disminuyó ligeramente (4.09%). Por otro lado, a las 24 h de incubación con el control positivo ConA hubo disminucón del 6.95%, mientras que a las 48 h los TCD4⁺ disminuyeron el 23.65% (Figura 17).

La población de linfocitos Tγδ⁺ fue muy poco abundante, siendo de 0.85% en el control sin tratamiento; sin embargo, en los linfocitos tratados con ESP hubo un incrementó de 47.48% a las 24 h, mientras que a las 48 h los Tγδ⁺ incrementaron 3850%. Asimismo, a las 24 h de incubación con ConA hubo disminucón del 26.25%, mientras que a las 48 h los Tγδ⁺ incrementaron 2933.33% (Figura 18).

Por el contrario, no se obsevó actividad basal de la IL-4⁺ con ninguno de los tratamientos durante los tiempos evaluados.

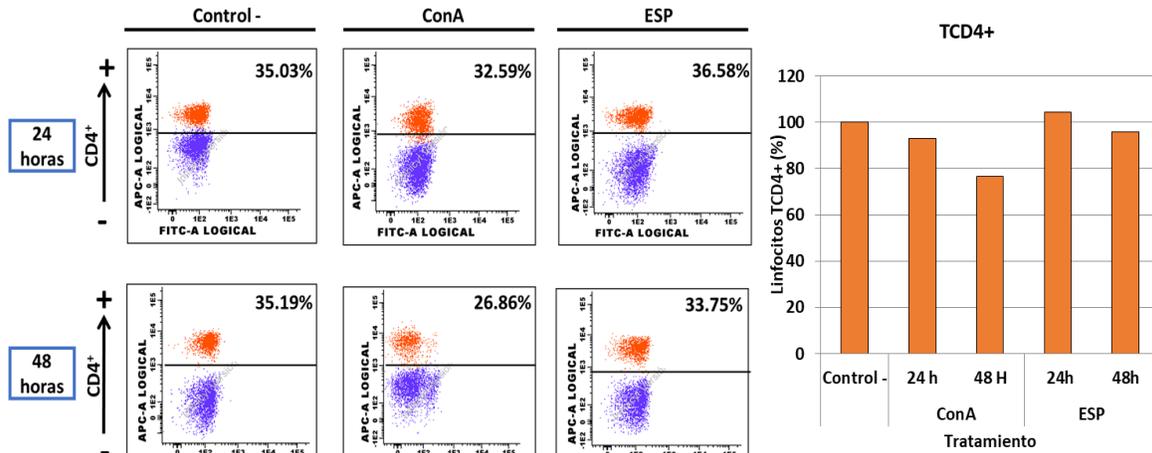


Figura 17. Gráficas representativas de linfocitos TCD4⁺ expuestos al ESP de 70 kDa de *H. placei*. La imagen muestra el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ en color rojo y en color azul los linfocitos CD4⁺.

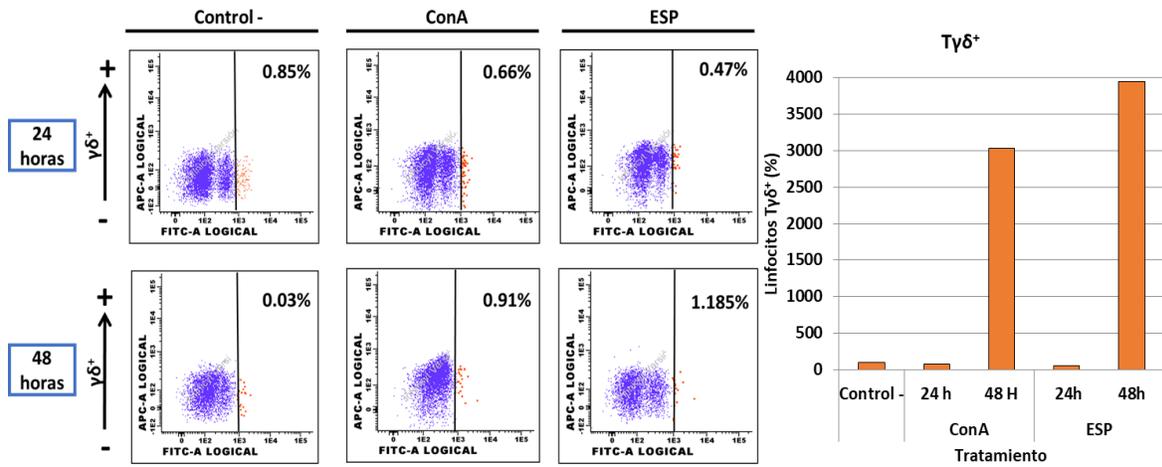


Figura 18. Gráficas representativas de linfocitos Tγδ⁺ incubados con ESP de 70 kDa de *H. placei*. La imagen se muestra el porcentaje de linfocitos Tγδ⁺ en color rojo y en color azul los Tγδ⁻.

9. DISCUSIÓN

Las infecciones por NGI representan una de las principales causas de pérdidas económicas del sector ganadero debido al daño que causan a la salud y bienestar de los rumiantes. Entre los principales NGI, el género *Haemonchus* spp. es un claro ejemplo del impacto negativo de las nematodosis por el daño severo que provoca en los hospederos y su alta y continua prevalencia bajo condiciones de climas tropical y templado (Guzmán *et al.*, 2010). En la actualidad, el tratamiento comercial más utilizado en el control de NGI son los antihelmínticos, sin embargo, su constante uso ha provocado la generación de parásitos resistentes a múltiples fármacos comerciales, por lo que actualmente se buscan tratamientos de control integral como es el uso de vacunas (Mederos y Banchemo, 2013). Para alcanzar este objetivo, se ha planteado la utilización de antígenos que entren en contacto con el tejido del hospedero, produciendo factores inmunes eficaces durante el proceso de infección, entre los que se encuentran los ESP (Newton y Meeusen, 2003; Nisbet *et al.*, 2010).

El amplio estudio del perfil de proteínas del género *Haemonchus* ha permitido la identificación de diferentes productos con actividad protectora, mostrando una reducción significativa en la carga parasitaria de rumiantes (Munn y Newton, 2000; Ekoja y Smith, 2010). El problema es la presentación de los mismos, tratando de conservar su actividad protectora. Para ello, se debe entender mejor la función biológica de éstos productos y su actividad durante la invasión a tejidos, principalmente en la primera etapa de la infección, llevada a cabo por los derivados de L₄, como primer estadio invasivo (Reyes-Guerrero *et al.*, 2018).

Durante los estudios realizados con proteínas de NGI se ha logrado la identificación de moléculas que facilitan la invasión de larvas a tejido, desarrollo y permanencia de las mismas en el hospedero (McNeilly *et al.*, 2013). Los mecanismos de acción durante la patogenia del nematodo son variados, entre ellos destacan la digestión del tejido por enzimas como las metaloproteasas, cistein proteasas y aspartil proteasas, las cuales favorecen la infección (Suchitra y Joshi, 2005). Este tipo de enzimas han sido ampliamente estudiadas debido a que cumplen un papel fundamental durante el proceso de patogenia, por lo que se han

utilizado para el desarrollo de agentes inmunizantes como la metaloproteasa H11 y el complejo multiproteico H-gal-GP que se localizan en la membrana del intestino del adulto de *H. contortus* (Newton y Meeusen, 2003). En forma similar, en el presente estudio se detectaron dos bandas de proteínas de 15 y 70 kDa de *H. placei*, las cuales se han presentado mayoritariamente y constantemente en el cultivo *in vitro*. Respecto a las proteínas de 70 kDa sobresale el nivel de expresión de factores inmunes durante su exposición con PBMC's. Por lo que se sugiere como un componente necesario para la alimentación y evolución del nematodo (Reyes-Guerrero *et al.*, 2018). Respecto a las proteínas de 15 kDa y por la alta expresión de citocinas inflamatorias durante los ensayos *in vitro*, posiblemente se requiera durante la invasión al tejido e invadir al hospedero, como ha sido descrito por otros autores (Shallig *et al.*, 1995).

Los ESP son proteínas con importancia biológica que han sido exploradas en la elaboración de agentes vacunales; pero también presentan actividad inmunomoduladora, que en ocasiones favorece la permanencia de los nematodos al disminuir la acción de factores inmunes y dañar más la salud del hospedero. En el presente estudio, los ESP de aproximadamente 15 kDa derivados de larvas endoparásitas de *H. placei* (L₄) tuvieron un menor efecto en la proliferación celular a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h de interacción del antígeno con células mononucleares la proliferación celular aumentó, indicando que este mecanismo posiblemente fue bloqueado inicialmente para activarse posteriormente, principalmente con factores asociados a la inflamación. Estudios previos (Gómez-Muñoz *et al.*, 2004), sugieren que los ESP de la L₄ del nematodo *Ostertagia ostertagi* en bovinos inhiben la respuesta de proliferación celular, como un mecanismo de protección durante su desarrollo en el tejido del estómago.

Contrariamente al efecto del producto de 15 kDa de *H. placei*, el ESP de 70 kDa al parecer regula a factores inmunes a través del factor transformante y de la quimiocina *IL-8*. Estudios realizados por Shallig *et al.*, (1996) publicaron el reconocimiento de los ESP de aproximadamente 50-55 kDa por *H. contortus* por IgG de corderos infectados. Recientemente, se ha demostrado que la proteína *H.*

contortus con peso molecular comparable de 70-83 kDa induce una respuesta inmune protectora tipo T_H2, consistente con la muerte *in vitro* por eosinófilos en presencia de anticuerpos específicos para este antígeno (Newton y Meeusen, 2003). Sin embargo, existen pocos estudios reportados relacionados a terneros infectados con *H. placei*. Uno de estos trabajos es el realizado por Jensen y Vieria (2008) dónde se menciona la importancia de un producto de 68 kDa derivado del intestino de nematodos adultos (Jensen y Vieria, 2008).

En la actualidad, las funciones de los productos de 15 y 70 kDa de *H. placei* durante la patogenia que causa por la infección no se conocen, por lo que es necesario comprender su relación en la modulación de factores inmunológicos del hospedero. Entre ellos, la *IL-2* es expresada por linfocitos T activados después del reconocimiento del antígeno induciendo la proliferación de linfocitos y la secreción de citocinas. En el presente estudio, PBMC's activados por el ESP de 15 kDa de *H. placei* presentan una expresión temprana de esta citocina, seguida de la expresión de citocinas asociadas a una respuesta T_H2 como *IL-4* e *IL-13*, involucradas en la producción de inmunoglobulinas y factores inflamatorios (Gossner *et al.*, 2013). Estas citocinas desarrollan un papel fundamental en la regulación de las funciones efectoras del hospedador contra NGI, estimulando el crecimiento de células B, el cambio de isotipo de IgE, así como la expresión del *FCεR1A* (Craig *et al.*, 2007). En estudios previos, durante la patogenia de helmintos se ha observado la activación del crecimiento de células B y la producción de anticuerpos por la citocina *IL-5*, en concordancia, en el presente estudio el gen de transcripción de la *IL-5* y el *FCεR1A* mostraron sobrerregulación a las 24 h. Sumado a lo anterior, la activa participación de eosinófilos ha sido notificada durante la patogenia de la hemoncosis en rumiantes, ligada ésta a *IL-5* (Balic *et al.*, 2006). Aunque, en el presente estudio no se determinó la función de los eosinófilos, pero sí la de *IL-5* se podría asumir la actividad quimiotáctica para atraer eosinófilos contra el antígeno de 15 kDa.

Nuestros resultados indican la activación de genes que codifican para citocinas inflamatorias *IL-8* y *TGFβ1* a las 16 h por la proteína de 70 kDa y a las 48 h por la

proteína de 15 kDa en PBMC's. En correlación, durante las primeras horas en la patogenia por los helmintos, la *IL-8* posee la capacidad quimioatrayente de múltiples promotores de la inflamación y ataque contra NGI, como lo son los neutrófilos. Por otro lado, el *TGFβ1* es una citocina con múltiples funciones regulatorias en la inflamación, adhesión, proliferación, quimiotaxis e inmunoregulación de linfocitos T y citocinas. La actividad pleiotrópica de *TGFβ1* y su activación en los diferentes tiempos, nos permitiría atribuir la activación de sus diferentes funciones por las proteínas identificadas en el presente estudio. Por otro lado, es importante mencionar que los ESP de 15 kDa de *H. contortus*, confieren una protección $\geq 70\%$ al ser aplicados como vacuna (Gadahi *et al.*, 2015; Schallig *et al.* 1997), sin embargo, no se ha identificado el mismo efecto protector de una proteína de peso molecular similar de la especie *H. placei*, por lo que se considera importante este hallazgo en el presente estudio.

Respecto al estudio de la proteína de 70 kDa, se observó el incremento en proliferación celular, factores reguladores de la respuesta inmune y factores asociados a reacciones alérgicas e inflamación causados por nematodos. Estudios previos, realizados con este antígeno de *H. placei* demuestran el incremento de factores inflamatorios inmunes, resultados que concuerdan con el presente estudio (Reyes-Guerrero *et al.*, 2018). Asimismo, estudios realizados con otros patógenos incluyendo a *Haemonchus* describen a la proteína de 70 kDa como una glicoproteína involucrada en procesos de invasión, respuesta al estrés y contribución a la sobrevivencia de los nematodos *Trichinella spiralis*, *Setaria cervi* y *Brugia malayi* (Gadahi *et al.*, 2015). La respuesta de expresión de *TGFβ1* e *IL-8* durante el primer periodo sugieren mecanismos de modulación para incrementar niveles de respuesta T_H1 (*IFNγ*) y T_H2 asociados al daño inflamatorio (*IL-6* e *IL-13*) y activación de anticuerpos (*FCεR1A*). Estos resultados indican mecanismos inmunes tipo dicotómicos para modular el daño que causa el antígeno a las células de hospedero. Sin embargo, se requiere la evaluación de esta proteína como agente vacunal, evaluación de muerte celular, actividad hemolítica y de supresión de la proliferación inducida por mitógenos para confirmar si esta respuesta es tipo protector y/o supresora.

Con el objetivo de explicar la posible función de alguna de estas citocinas, se realizaron estudios de IL-4 por citometría de flujo en linfocitos activados por esta proteína, los cuales indicaron que hubo una respuesta negativa. Mientras que la respuesta de los receptores de membrana TCD4⁺ y Tγδ⁺ se estimuló ante el antígeno de 70 kDa de *H. placei*. En este sentido, también se ha reportado un incremento de TCD4⁺ y Tγδ⁺ en animales resistentes a la infección por hemoncosis y a un complejo de antígenos de 30-200 kDa (Jasmer *et al.*, 2007). En nuestro estudio, no se puede confirmar una respuesta similar porque se requieren estudios *in vivo*. La explicación que podemos asumir, es que ambos receptores están generando mecanismos de activación para combatir el daño causado por este tipo de antígenos en los linfocitos de bovino, aunque se puede sugerir la estimulación de *IL-13* por células TCD4⁺ debido a los resultados de expresión obtenidos y a su relación con factores inflamatorios. Además, la secreción de mucosidad está estrechamente ligada al incremento de la expresión de *IL-13* por células caliciformes que contribuyen a la expulsión del nematodo (Allen y Maizels, 2011).

Respecto a los linfocitos Tγδ⁺, éstos se pueden comportar como células presentadoras de antígeno para inducir la activación de TCD4⁺ y TCD8⁺ en células efectoras (Abbas *et al.*, 2015). Los mecanismos Tγδ⁺ están presentes en el inicio y durante la infección de patógenos, participando en respuesta innata y adaptativa y contribuyendo en la secreción de citocinas inflamatorias y de señalización como *IL-2* e *IFNγ* (Rogers *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se observó un alto porcentaje de linfocitos Tγδ⁺ y un moderado incremento de TCD4⁺ al ser estimulados con el antígeno de 70 kDa de *H. placei*. Estos resultados sugieren que los antígenos de ESP de *H. placei* fueron reconocidos principalmente por los linfocitos Tγδ⁺, seguido de TCD4⁺ y aunque en el presente estudio no se detectó la participación de IL-4, se podría considerar su actividad al incubar las PBMC's y el antígeno con un mayor tiempo de exposición. Finalmente, la literatura registra la producción de *IFNγ* por linfocitos Tγδ⁺ asociados a mecanismos de inflamación (Hedges *et al.*, 2003; Buza *et al.*, 2009), cuyos resultados son similares a los que

se observaron en el presente estudio, sugiriendo la importancia de los procesos inflamatorios y su regulación por diversas clases de células, T_H1 y T_H2 .

10. CONCLUSIONES

- En el presente estudio, se identificaron dos bandas de proteínas de 15 y 70 kDa a partir de cultivo *in vitro* de L₄ de *H. placei*. El ESP de 70 kDa presentó actividad proteasa y punto isoeléctrico de ~5.7, la banda de 15 kDa no presentó actividad enzimática.
- El ESP de 70 kDa estimuló la proliferación *in vitro* de linfocitos $T\gamma\delta^+$ a las 24 y 48 h, y la inducción de la proliferación *in vitro* de $TCD4^+$ a las 24 h. El alto porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta^+$ sugiere su relación en el reconocimiento del antígeno y su contribución en la secreción de citocinas inflamatorias, ej. *IL-8*, *TGF β* , *IFN γ* , etc. En contraste, se observó incremento de citocinas asociadas al reconocimiento de antígenos del nematodo por la banda de 15 kDa, por ejemplo, *IL-5*.
- Los resultados sugieren, que ambas proteínas tienen una función biológica importante en la interacción hospedero-parásito. La proteína de 15 kDa estimuló células tipo T_H2 asociada específicamente a las nematodosis tales como *IL-4*, *IL-5* y *FC ϵ R1A*. En contraste, la proteína de 70 kDa está asociada a mecanismos moduladores, por el incremento de receptores $T\gamma\delta^+$ asociados a una respuesta inmunológica innata y adquirida, tales como *IL8*, *TGF β 1*, *IL-6*, *IFN γ* y *IL-13*.

11. LITERATURA CITADA

1. Abbas, A. K., Lichtman, H. A., Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. (Novena Edición). España: Elsevier,13-289
2. Aguilar, C.A.J., Cámara, S.R.C., Torres, A.J.F., Sandoval, C.C. (2011). El control de nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿ Donde estamos? *Bioagrobiencias*, 4(2),10-16.
3. Aguilar-Caballero, A., Torres-Acosta, J., Cámara Sarmiento, R., Hoste, H., Sandoval-Castro, C. (2008). Inmunidad contra los nematodos gastrointestinales:la historia caprina. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9(1),73-81.
4. Allen, J., y Maizels, R. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews*, 375-388.
5. Angulo-Cúbillán, F., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., de la Fuente, C., Alunda, J. (2007). *Haemonchus contortus*- SHEEP RELATIONSHIP: A REVIEW. *Revista científica FCV-LUZ*, 17(6), 577-587.
6. Anziani, O.S., Fiel, C.A. (Roma 2005). Resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos: un problema emergente y relevante para la producción bovina nacional. *Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina, FAO Producción y sanidad Animal*, 40-49.
7. Aroztegui Rosas, J., Rodriguez Chagas, S., Tort Quintela, J. (2013). *Efecto de la eficacia parcial de un antihelmíntico comercial sobre diferentes parámetros productivos en corderos Merino dohne*. Montevideo, Uruguay: Facultad de veterinaria.
8. Balic, A., Bowles, V. M., Meeusen, E.N.T. (2000). Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Immunol. Immunopathol*, 75, 109-120.
9. Balic, A., Bowles, V., & Meeusen, E. (2000). The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol*, 45, 181-241.
10. Bowman, D. (2008). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (Novena edición). Canada: Saunders Elsevier.
11. Bowman, D., Lynn , R., Eberhard, M. (2011). *Parasitología para Veterinarios* (Novena edición). España, Madrid España: Elsevier.

12. Casillas-Aguilar, J., Mendoza de Gives, P., López Arellano , M., Liébano Henández, E. (2008). Evaluation of Multi-nutritional Bio-pellets containing *Duddingtonia Flagrans* chlamyospore for the control of ovine haemonchosis. *Ann. N. Y Acad. Sci*, 1149, 61–163.
13. Castells, D. (2005). Métodos de control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en resistencia genética: Situación actual y perspectivas (Revisión). *Producción Ovina*, 17, 21-36.
14. Cordero del Campillo, M., Rojo, V. (2002). *Parasitología Veterinaria* (Tercera reimpresión). Mc Graw Hill, Interamericana.
15. Craig, N., Miller, H., Smith, W., Knight, P. (2007). Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120 (2007), 47-54.
16. De veer, M., Kemp , J., Meeusen, E. (2007). The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, 9, 1-9.
17. Ekoja, S., & Smith, W. (2010). Antibodies from sheep immunized against *Haemonchus contortus* with H-gal-GP inhibit the haemoglobinase activity of this protease complex. *Parasite Immunology* (32):731-738.
18. Encalada-Mena, L. A., Corbala-Bermejo., J. A., J. José Vargas-Magaña, M. Jesús García-Ramírez, Luís Uicab-Brito, Río-Rodríguez, J. d. (2008). Prevalencia de nematodos gastroentéricos de becerros en sistemas de doble propósito del municipio de escárcega, campeche, México. *Agrociencia*, 43: 569-576.
19. Enrique, P. C. (2005). *Parasitología Veterinaria II*. Nicaragua, Managua: Universidad Nacional Agraria, Facultad de Ciencia Animal.
20. Estrada Reyes, Z., López Reyes, A., Lagunas Martínez, A., Ramírez Vargas , G., Olazarán Jenkins , S., Hernández Romano, J., López Arellano , M. (2015). Relative expression analysis of IL5 and IL6 genes in tropical cheep breed Pelibuey infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* (37): 446-452.
21. FAO. (21 de Enero de 2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/animal-production/es/>. [Fecha de recuperación: Octubre 2018].

22. FAO. (15 de Mayo de 2018). *Organización de las naciones unidas para la alimentación y la Agricultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/>. [Fecha de recuperación: Octubre 2018]
23. Fiel, C., Steffan, P., Ferreyra, D. (2011). *Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes: técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados*. Buenos Aires, República Argentina.: Tandil: Abad Benjamin.
24. Gadahí , J., Wang, S., Bo, G., Ehsan, M., Yan, R., Song, X. (2016). Proteomic Analysis of the Excretory and Secretory Proteins of *Haemonchus contortus* (HcESP) Binding to Goat PBMCs In Vivo Revealed Stage-Specific Binding Profiles. *Plus one*, 1-26
25. Gallego, B. (2006). *Manual de parasitología morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Universidad.
26. Gasbarre, L., Leighton, E., Sonstegard, T. (2001). Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, (98): 51-64.
27. Gómez-Muñoz, M., Canals-Caballero, A., Almeria , S., Pasquali, P., Zarlenga, D., Gasbarre, L. (2004). Inhibition of Bovine Tlymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol*, (120):199-214.
28. González, J., Hernández, Á., Meeusen, E., Rodríguez, F., Molina, J., Jaber, J., Piedrafita, D. (2011). Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and Breed sheep T cells in resistant Canaria Hair. *Veterinary Parasitology*, (178): 286-292.
29. Gossner, A., Wilkie, H., Joshi, A., & Hopkins, J. (2013). Exploring the abomasal lymph node transcriptome for genes associated with resistance to the sheep nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary research*, 44-68.
30. Gressler, L., Grandó, T., Machado do Carmo, G., Vaucher , R., Stefani , L., Monteiro, S. (2018). *Meriones unguiculatus* infected by *Haemonchus contortus*: evaluation of different experimental protocols. *Journal of Helminthology*, 1-6.
31. Halliday , M., Morrison, I., Smith, W. (2009). Kinetics of the local cellular response in the gastric lymph of immune and susceptible sheep to the infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol*, (31): 402-411.

32. Hempworth , K., Neary, M., Hutchens, T. (2006). Managing internal parasitism in sheep and goats. *Purdue Univerity West Lafayette*.
33. Henriksen, S., y Aagaard, K. (1976). A simple flotation and McMaster method. *Nordisk Veterinary Medicine*,(28): 392-397.
34. Hunt, P., McEwan, J., Miller , J. (2008). Future perspectives for the implementation of genetic markers on parasite resistance in sheep. *Tropical Biomedicine*, (25):18-33.
35. INEGI. (2010). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía* . <http://cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>. [Fecha de recuperación el 21 de Diciembre de 2016].
36. De Graef, J.C., Sarrea, B.J. Mills, S. Mahabir, S. Casaert, N. De Wilde, Claerebout, E. (2012). Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count reduction test and the controlled efficacy test. *Veterinary Parasitology*, (189):378–382.
37. Jacobs, H., Wiltshire, C., Ashman, K., y Meeusen, E. (1999). Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*, suing a purified larval surface antigen. *Elsevier*, (17)362-368.
38. Jacobs, J., Sommers, K., Zajac, A., Notter, D., Bowdridge, S. (2016). Early *IL-4* gene expression in abomasum is associated with resistance to *Haemonchus contortus* in hair and wool sheep breeds. *Parasite immunol*, 6(38):333-9.
39. Jasmer, D., Lahmers, K., & Brown, W. (2007). *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. *Parasite Immunology*, (29):139-151.
40. Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y., Obata, K. (2009). Newly discovered roles for basophils a neglected minority gains new respect. *Nat. Rev. Immunol*, (9): 9-13.
41. Knot, M., Matthaei, K., Foster, P., Dent, A. (2009). The roles of eotaxin and the STAT6 signalling pathway in eosinophil recruitment. *Molecular Immunology* (46):2714-2722.
42. Knox, D., Redmond, D., Newlands, G., Skuce, P., Pettit, D., Smith, W. (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*, (33): 1129-1137.

43. Koehler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal Parasitology*, (35): 336-345.
44. Kotas, M., y Locksley, R. (2018). Why Innate Lymphoid Cells? *Immunity Perspective*, (48):1081-1090.
45. LACTODATA. (2018). *Latodata, Información sobre el sector lechero*. <http://www.lactodata.info/boletin/produccion-de-leche-de-vaca/>. [Fecha de recuperación: Octubre del 2018].
46. Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M., Bosco, A., Vercruyse, J., Cringoli, G. (2012). The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary Parasitology*, 194-199.
47. Liébano, E., López-Arellano, M., Mendoza de Gives, P., Aguilar, L. (2011). Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. (2): 1-44.
48. Liébano, H. (2004). Identificación morfométrica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en rumiantes domésticos de México. *Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes de México*, 26-77
49. López, M., Flores, J., Mendoza, P., Vázquez, V., Liébano, E., Bravo, A., Zamudio, F. (2006). Use of *Bacillus thuringiensis* Toxin as an Alternative Method of Control against *Haemonchus contortus*. *Annals new york academy of sciences*, 347-354.
50. Lopez Arellano, M. E. (2011). Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestal, Agrícolas y Pecuarias*, 2.
51. Lopez Arellano, M., Mendoza de Gives, P., Aguilar Marcelino, L., Liébano Hernández, E. (2010). Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos rumiantes. (8).
52. Lozano, M. C., y Arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, (21):121-135.
53. Makepeace, B., Martin, C., Turner, J., Specht, S. (2012). Granulocytes in Helminth Infection- Who is calling the shots? *Current Medicinal Chemistry*, (19): 1567-1586.

54. Martínez M., I., Cruz R., M., Jean-Pierre, L. (2000). Efecto del diferente manejo de los pastizales y del ganado sobre los escarabajos coprofagos *Ataenius apicalis hinton* y *Ataenius sculptor harold* (Scarabaeidae: Aphodiinae:Eupariini). *Acta soologica mexicana (Nueva Serie)*, 185-196.
55. Maza Lopez, J. (2015). Respuesta periferica a la infección por el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus* en corderos pelibuey bajo condiciones de pastoreo. Morelos: Universidad Politecnica del Estado de Morelos.
56. McNeilly, T., Rocchi, M., Bartley, Y., Brown, J., Frew, D., Longhi, C., . . . Matthews, J. (2013). Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Veterinary research*, (44):1-18.
57. Mildrey , S., Roque , E., Maylin, S. (2005). Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Estación Experimental de Pastos y Forrajes*, 28 (3):175-185.
58. Miller, J., y Horohov, D. (2011). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of animal science*, (84):124-132.
59. Miranda Miranda, E., Murillo Sánchez, M., Cossio Bayúga, R. (2007). Uso del sistema de expresión de genes heterólogos basado en Baculovirus en la generación de un antígeno híbrido recombinante útil en el inmunodiagnóstico de la hemoncosis de rumiantes. *Bioquímica*, 32(3):83-90.
60. Moreau, E., y Chauvin, A. (2010). Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-9.
61. Munn, E., Smith, T., Smith, H., James, F., Smith, F., & Andrews, S. (1997). H11, Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen. *Parasite Immunology* (19): 243-248.
62. Newton, S., y Meeusen, E. (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunology* (25):283-296.
63. Newton, S., y Munn, E. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol Today*, (26):813-818.

64. Nisbet, A., Smith, S., Armstrong, S., Meikle, L., Wildblood, L., Beynon, R., Matthews, J. (2010). *Teladorsagia circumcincta*: Activation-associated secreted proteins in excretory/secretory products of fourth stage larvae are targets of early IgA responses in infected sheep. *Experimental Parasitology*, (125):329-337.
65. Norian, R., Delirez, N., Azadmehr, A. (2015). Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Research Forum*, 6(4):265-271.
66. Peña, M., Miller, J., Horohov, D. (2006). Effect of CD4⁺ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology* (138):240–246.
67. Piedrafita, D., de Veer, M., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M. (2012). Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Vaccine* (30): 7199-71204.
68. Piedrafita, D., Preston, S., Kemp, J., de Veer, M., Sherrard, J., Kraska, T., Meeusen, E. (2013). The effect of different adjuvants on immune parameters and protection following vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *PLoS One*, 8 (10):1-8.
69. Pulendran, B., y Ahmed, R. (2006). -translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, (124): 849-863.
70. Reyes-Guerrero, D., Lagunas-Martínez, A., Barba-Guadarrama, Y., Mendoza-de-Gives, P., Ramírez-Vargas G., Tello-López, A., López-Arellano, A. (2018). Inflammatory cytokine and other immune factor expression of bovine lymphocytes stimulated by secretory antigens from *Haemonchus placei* *in vitro*. *Veterinary Parasitology*.
71. Rodríguez-Vivas, R., Castillo-Chab, C., Rosado-Aguilar, J., y Ojeda-chi, M. (2014). Evaluación de la eficacia y persistencia de la moxidectina (10%) e ivermectina (3,15%) contra infecciones naturales de nematodos gastrointestinales en bovinos del trópico mexicano. *Arch. med. vet.*, 36(1):1-6.
72. Rogers, A., VanBuren, D., Hedblom, E., Tilahun, M., Telfer, J., Bladwin, C. (2005). Function of ruminant gd T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, (108): 211-217.

73. Rojas-Espinosa, Ó. (2006). *Inmunología (de memoria)*. (Cuarta edición). México: Medica panamericana. 1-300
74. Sánchez, J. (2006). Prevalencia de nematodos gastrointestinales en el ganado bovino del Ejido de Parotilla municipio de Lázaro Cárdenas Michoacán. Tesis médico veterinario zootecnista. México: Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
75. Saumell, C., Fusé, L., Iglesias, L., Steffan, P., Fiel, C. (2005). Alternativas adicionales al control químico de nematodos gastrointestinales en animales domésticos. *Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina*, 80-81.
76. Schalling, H., Leeuwen, M., Hendrix, W. (1994). Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, (108): 351-357.
77. Schalling, H., Van Leeuwen, M., y Hendriks, W. (1994). Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol*, (108):351-357.
78. SIAP. (2017). *Panorama Agroalimentario: Carne de bovino 2017*. de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017_1.pdf. [Fecha de recuperación 01 de octubre].
79. Smith, S., y Smith, W. (1996). Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with polypeptide components. *Research in Veterinary Science* (60): 1-6.
80. Smith, S., Pettit, D., Newlands, G., Redmon, D., Skuce, P., Knox, D., Smith, W. (1999). Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol*, (21):187-199.
81. Smith, W., Smith, S., Pettit, D., Newlands, G., & Skuce, P. (2000). Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*,(22):63-71.
82. Soulsby, E. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (Séptima edición). México: Interamericana.

83. Suchitra, S., y Joshi, P. (2005). Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biophys Biochim*, (1722): 293-303.
84. Sweeny P.A., J., Robertson D., I., Ryan M., U., Jacobson, C., Woodgate G., R. (2011). Comparison of molecular and McMaster microscopy techniques to confirm the presence of naturally acquired strongylid nematode infections in sheep. *Molecular y Biochemical Parasitology*, 62-67.
85. Tehrani , A., Javad, J., Jani, M., Sasani, F., Solati, A., Rajabian, M., Mohammadian, M. (2012). Histopathological Study of *Haemonchus contortus* in Herrik sheep Abomasum. Tehran, Iran: Department of Pathology, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran.
86. Terefe, G., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J., Dorchies, P., Brunel, J., . . . Jacquiet, P. (2007). In vitro pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Veterinary Research*, 38 (4):267-654.
87. Terez Shea-Donohue., J. F. (2010). Immune regulation of epithelial cell function: Implications for GI pathologies. *International Dairy Journal*, (20): 248–252.
88. Tizard, I. (2008). *Imunología veterinaria* (5 edición). San Paulo: Elsevier.
89. Tizard, I. (2009). *Inmunología veterinaria*. España: Elsevier.
90. Urban Jr., J., Katona, I., Paul, W., finkelman, F. (1991). Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,(88): 5513-5517.
91. Valcárcel-Sancho, F., Rojo-Vázquez, F., Olmeda-García, A., Arribas-Novillo, B., Márquez-Sopeña, L. (2009). *Atlas de Parasitología Ovina*. Zaragoza, España: Servet.
92. Van Wyk, J., y Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80 (1):1-14.
93. Vázquez Prats, V., Flores Crespo, J., Santiago Valencia , C., Herrera Rodríguez , D., Palacios Franquez , A., Liébano Hernández, E., Pelcastre Ortega, A. (2004). Frecuencia de nemátodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria de México*, 42(2):237-245.

94. Vega Robledo, G. (2009). Inmunología para el médico general: Antígenos e inmunógenos. *Rev. Fac. Med. UNAM: Medigraphic Artemisa*, 1(52):41-42.
95. Vervelde , L., Van Leeuwen, M., Kruidenier, M., Kooyman, F., Huntley, J., Van Die, I., Cornelissen, A. (2002). Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol*, (24):189-201.
96. Waruiru, R., Thamsborg, S., Nansen , P., Kyvsgaard, N., Bogh, H., Munyua, W., Gathuma, J. (2001). The Epidemiology of Gastrointestinal Nematodes of Dairy Cattle in Central Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, 173-187.
97. Zaros , L., Bricarello, P., Amarante, A., Rocha R., Kooyman, F., De Vries, E., Coutinho, L. (2010). Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Veterinary Parasitology*, 171(1-2): 68-73.

12. ANEXOS

A. Técnica de McMaster (Henriksen y Aagaard, 1976)

Para la técnica de McMaster es necesario recolectar muestras de heces directamente por vía rectal. Inmediatamente, 2 gramos de las heces son disueltas en 28 mL de solución saturada de cloruro de sodio y se maceran con una espátula hasta que no queden grumos. Posteriormente, se coloca una gasa sobre las heces ya disgregadas y después de 3 minutos se retirará muestra mediante el uso de una pipeta y es colocada en una cámara de McMaster. Se realiza el conteo de huevos en microscopio a 4X y se harán los cálculos mediante la siguiente fórmula.

$$\text{HPG} = \frac{\text{Número de huevos cuantificados en los dos compartimientos}}{2} \times 100$$

B. Coprocultivos y técnica de migración larvaria (Liéban, 2004)

Los coprocultivos se realizan con materia fecal macerada y mezclada con hule espuma y agua para mantener la oxigenación adecuada de los cultivos y promover la eclosión de los huevos y evolución hasta L₃. Después de un periodo de siete días pequeñas porciones de la mezcla son envueltas en gasas y colocadas en un embudo de Baermann (embudo de plástico de 14 cm de diámetro acoplado con una manguera de PVC a un tubo de ensaye) y cubiertas con agua. Posteriormente después de 24h a temperatura ambiente son recogidos los tubos del embudo de Baermann y son colocados durante 2 horas a 4°C.

Consecutivamente el pellet de larvas será recuperado y colocado en un aparato de Baermann con papel Optical Lens Paper (Thomas Scientific, USA) durante 12 horas, y seguidamente serán guardadas a 4°C hasta el momento de su uso.

C. Extracción de DNAg a partir de L₃ (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen®)

1. Transferir el paquete de larvas (n=1000) a un tubo de 1.5 mL con la menor cantidad posible de sobrenadante.

2. Agregar 180 μL de buffer de lisis ATL, posteriormente, macerar las larvas en el mismo tubo con la ayuda de un pistilo para facilitar el lisado
3. Adicionar 20 μL de proteinasa K, homogenizar mediante vórtex e incubar a 56°C hasta que las larvas estén completamente lisadas. Homogenizar por vórtex ocasionalmente durante el lapso de incubación para facilitar el proceso de lisis.
4. Adicionar 200 μL de buffer de lisis AL y homogenizar en el vórtex
5. Adicionar 200 μL de etanol (grado biología molecular) y mezclar con vórtex.
6. Transferir todo el contenido del tubo a una minicolumna de centrifugación colocada en un tubo recolector de 2 mL (incluida en el kit).
7. Centrifugar a 9000 r.p.m. durante 2 min. Desechar el tubo recolector junto con el filtrado.
8. Transferir la columna a un nuevo tubo colector. Adicionar 500 μL de buffer de lavado AW1 y centrifugar a 9000r.p.m. por 2 min. Desechar sobrenadante.
9. Añadir 500 μL del buffer AW2 y centrifugar a 14000r.p.m. por 3 min. Desechar tubo colector con sobrenadante.
10. Pasar la columna a un tubo de 1.5 mL. Añadir 100 μL de buffer de elución AE directamente sobre la columna. Incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 9000r.p.m. por 1 min con objeto de recuperar el ADN eluído.

D. Componentes de la PCR

- 10 μL de GoTaq Promega®
- 1 μL de Oligonucleotidos Fw
- 1 μL de Oligonucleotido RV
- 100 ng/ μl de ADN
- c.b.p 25 μl de agua libre de nucleasas

E. Preparación de solución Buffer TAE 50X (1L)

- 242 g de Tris base
- 57.1 mL de Ácido acético glacial
- 100mL de 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- Ajustar pH a 7.4

F. Preparación de 1 X PBS para 1 L

- 8.5 g NaCl
- 0.800 g Na₂HPO₄ 7H₂O
- 0.344 g NaH₂PO₄ H₂O
- Ajustar a pH 7.2

G. Medio de cultivo Hank's Balanced Salts (Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA)

- 49.2 mL (9.8 g/L) de solución de Sales balanceadas de Hank's sin bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA).
- 246 mL de antibiótico-Antimicótico (100X Gibco).
- 8 mL de eritrocitos de bovino (previamente lavados con solución VyM)

H. SDS-PAGE

Para llevar a cabo la preparación de geles de poliacrilamida primeramente se limpian los vidrios formadores del gel y se ensamblan formando un "sándwich". Posteriormente en un vaso de precipitado se preparará la mezcla del gel separador mostrada en el cuadro 7 y se llenará $\frac{3}{4}$ partes de mezcla en el espacio entre las dos placas. Enseguida, añadir encima una pequeña cantidad de isopropanol. Esperar hasta se termine la polimerización y retirar el exceso de isopropanol sobre el gel separador.

Posteriormente, en un vaso de precipitado prepara el gel concentrador mostrado en el cuadro 15 y adicionar el líquido lentamente sobre el gel separador ya polimerizado, inmediatamente colocar el peine formador de pozos. Esperar hasta que se termine la polimerización.

Cuadro 14. Componentes para la preparación de gel de poliacrilamida

Separador (Gel SDS-PAGE 5%, 5 mL)	
Componente	Cantidad (mL)
H ₂ O	1.6
Acrilamida 30%	2
Tris 1.5 M pH 8.8	1.3
SDS 10%	0.05
Persulfato de amonio 10%	0.05
TEMED	0.002

Separador (Gel SDS-PAGE 12%, 5 mL)	
Componente	Cantidad (mL)
H ₂ O	2.1
Acilamida 30%	0.5
Tris 1.5 M pH 8.8	0.38
SDS 10%	0.03
Persulfato de Amonio 10%	0.03
TEMED	0.003

Una vez preparado el gel, montar la cámara de electroforesis y agregar cada una de las muestras de ESP con buffer desnaturizante Laemmli (Bio-Rad®, USA) 4x, utilizando en proporción 1:3, con 10µM de 2- mercaptoethanol, 10% SDS, 0.0005 g azul de bromofenol.

Conectar a la fuente poder a 45 volts durante los primeros 15 minutos para el gel concentrador y 90 volts durante 40 minutos para el gel separador. Al termino de la electroforesis, se pocede ha realizar la tinción con reactivo Coomassie Brilliant Blue G (Sigma Aldrich®, USA) por un hora y luego se desteñen los geles con la Solución I (50% v/v de CH₃OH, 10%v/v de CH₃COOH y 40% v/v de dH₂O) por 20 min y con la Solución II (7% de CH₃COOH y 93% v/v dH₂O) por 2 horas aproximadamente.

I. Método de cuantificación de proteínas, Bradford

Se diluyen 4 ml de colorante Bradford 5X con 16 ml de agua destilada (dH₂O), esta misma se filtra en un papel whatman® #1 y se conserva a temperatura ambiente.

Para la preparación de la Curva estándar, se prepara una solución de BSA (Albumina Sérica Bovina) con PBS 1M pH 8.0 con una concentración final de 1

mg/mL. Se procederá a realizar las diluciones como se muestra en el cuadro siguiente, con PBS 1M pH 8.0.

Cuadro 15. Preparación de la curva estándar de BSA

ID	BSA 1mg/mL (μL)	dH ₂ O(μ)	Volumen final (μL)
BSA 0	0	200	200
BSA 1	10	190	200
BSA 2	20	180	200
BSA 3	40	160	200
BSA 4	80	120	200
BSA 5	160	40	200

En cada pozo de la placa se introducen 10 μL de las soluciones de la curva estándar (BSA 0-5) mencionados en el cuadro anterior. Se agregan 200 μL de Bradford preparado anteriormente a cada pozo, por lo que se obtienen las concentraciones finales de BSA especificadas en el cuadro 17.

Cuadro 16. Concentraciones finales de la curva estándar

ID	Volumen de estándares de BSA (μL)	Bradford (μL)	Concentración final (μg/mL)
BSA 0	10	200	0
BSA 1	10	200	0.0024
BSA 2	10	200	0.0028
BSA 3	10	200	0.0095
BSA 4	10	200	0.019
BSA 5	10	200	0.038

A continuación, se realizan diluciones seriadas de la proteína objetivo con PBS 1X pH 8.0. Relación proteína: PBS, (Dilución 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Asegurarse de homogenizar bien la solución de proteínas antes de diluir. Además, es importante

recalcar que se realizan por triplicado cada una de las diluciones a evaluar de la proteína y de la curva estándar.

Posteriormente se deja incubar a 37°C por 10 minutos y al término se lee en un lector de Elisa a 595 nm de longitud de onda.

Posteriormente, se realiza la regresión lineal de los datos y se pide la ecuación de la recta ($Y = mX + b$), así como el valor coeficiente de determinación (r^2), el cual para tener una aproximación adecuada debe ser no menos de 0.98.

$$Y = mX + b$$

Y = Absorbancia
m = pendiente de la recta
X = $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína
b = la ordenada al origen

por lo tanto:

$$\text{Absorbancia} = [(\text{valor de la pendiente}) (\mu\text{g} / \mu\text{L de proteína})] + \text{ordenada al origen}$$

J. Electroforesis bidimensional

El Isoelectroenfoque (IEF) o Primera Dimensión se realiza disolviendo la muestra en amortiguador de solubilización (Urea 8M, CHAPS al 2%, Dithiothreitol (DTT) 10 mM, IPG buffer al 0.5%, Azul de Bromofenol a 0.002%.) a una concentración de 125 μL de amortiguador de solubilización con 125 μg de proteína total. Posteriormente, la mezcla es colocada en contacto con la tirilla de poliacrilamida de 7 cm de longitud por 0.5 mm de espesor con gradiente de pH 3-10 (Immobiline DryStrip, Sigma-Aldrich®, St. Missouri, USA). A continuación, se incuba por 18 h a temperatura ambiente para que la muestra penetre en la tirilla y al mismo tiempo se hidrate. En seguida, se lleva a cabo el Isoelectroenfoque durante 2.5 h en una cámara IPG-Phor Ettan III (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante de las tirillas.

Una vez concluido el Isoelectroenfoque, se procede a llevar a cabo la fase de segunda dimensión o 2D. Para ello se recuperan las tirillas de poliacrilamida y se procede a incubarlas durante 15 min en una solución de amortiguador de equilibrado (Cuadro18) suplementado con DTT (100 mg/10mL) para reducir los

puentes disulfuro de las proteínas y al terminar esta fase. Posteriormente, se incuban por 15 min en amortiguador de equilibrado (Cuadro18) suplementado con Iodoacetamida (250 mg/10 mL) para alquilar las proteínas como prerrequisito previo a la electroforesis siguiente.

A continuación, la tirilla es colocada horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida al 12% en la cámara Mini Protean Tetra (Bio-Rad®, USA) a un voltaje constante de 150 volts. Terminada la electroforesis, se procede a realizar la tinción con reactivo Coomassie Brilliant Blue G (Sigma Aldrich®, USA) por una h y luego se destiñen los geles con la Solución I (50% v/v de CH₃OH, 10%v/v de CH₃COOH y 40% v/v de dH₂O) por 20 min y con la Solución II (7% de CH₃COOH y 93% v/v dH₂O) por 2 horas aproximadamente.

Cuadro 17. Amortiguador de equilibrado

Componente	Concentración
Tris-Cl	50 mM
Urea	6.0M
Glicerol	30%
SDS	2%
azul de bromofenol	0.0005 g

K. Obtención y cuantificación de células mononucleares por Lymphoprep™ (Axis-Shield)

Las muestras de sangre periférica del Bovino son procesadas inmediatamente bajo condiciones de asepsia. La sangre se diluye con PBS 1M pH 7.4, proporción 1:1 (3 mL de sangre y 3 mL de PBS) homogenizando lentamente con una pipeta serológica la dilución para evitar lisis de eritrocitos y otras células.

En un tubo se colocan 3 mL de Lymphoprep (Axis-shield®) y adicionan 6 mL de la mezcla de sangre + PBS verter por la pared del tubo sin mezclar con Lymphoprep de tal modo queden dos fases (Figura 19).

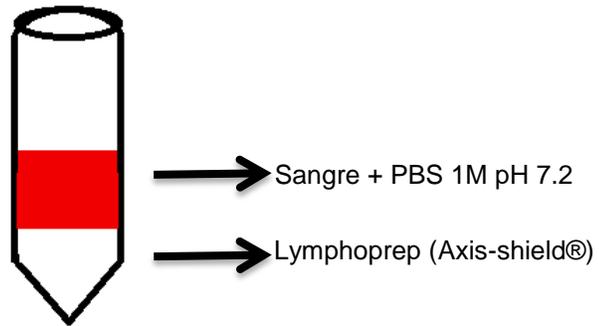


Figura 19. Gradiente de Lymphoprep con sangre periférica de ovinos

A continuación, centrifugar a 800 xg durante 30 min a temperatura ambiente (25 °C). Al término se observará la distribución de las células sanguíneas en fases (Figura 20), con cuidado de no tomar eritrocitos y usando pipeta pasteur los leucocitos se trasladan a otro tubo.

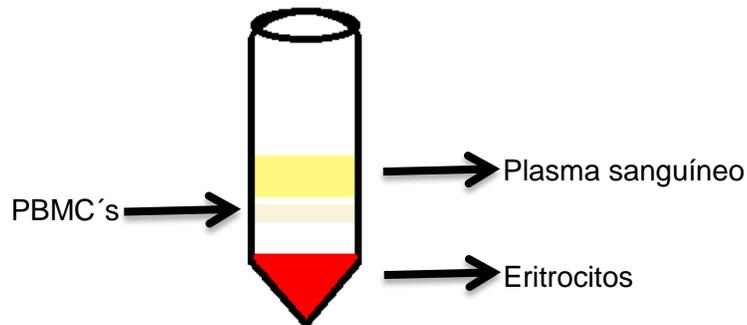


Figura 20. Distribución de las células sanguíneas

Inmediatamente los leucocitos son lavados con PBS pH 7.2 descartando el sobrenadante, y son conservados en medio RPMI+HEPES (Anexo L).

La cuantificación de PBM'C se realiza diluyendo 45 μ L de azul tripano con 5 μ L de PBM'C en medio RPMI+HEPES, Anexo L (proporción 1:10). Posteriormente, la muestra de la dilución anterior se coloca sobre la cámara de Neubauer y se procede a cuantificar en el microscopio a 40X. Para la cuantificación de leucocitos se toma en consideración los cuadrantes La concentración de células blancas sobre mililitro, se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mililitro}} = \frac{\text{número total de células}}{4} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

L. Medio RPMI suplementado para cultivo de linfocitos

- 44.5 mL de medio RPMI+HEPES (Gibco® Carlsbad, California USA)
- 5 mL Suero Fetal Bovino (10%)
- 500 µL Antibiotico-Antimicótico 1X (Gibco® Carlsbad, California USA)

M. Extracción de RNA con TRizol® Reagent Max™ Bacterial Isolation kit

1. Adicionar 1 mL de TRizol®, y dejar actuar por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Adicionar 200 µL de cloroformo por cada 500 µL de trizol. Agitar 15 segundos y dejar actuar 3 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 13000 rpm, 20 segundos a 4°C, posteriormente tomar la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL
4. Adicionar 500 µL de Isopropanol frío para precipitar el RNA. Mezclar suavemente con pipeteo e incubar 15 minutos o dejar durante la noche a 20°C.
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, desechar sobrenadante.
7. Adicionar 1 mL de Etanol frío al 75% y centrifugar 7500 rpm, 5 minutos 4°C.
8. Descartar sobrenadante y dejar secar en la campana de flujo laminar. Resuspender con agua libre de nucleasas.