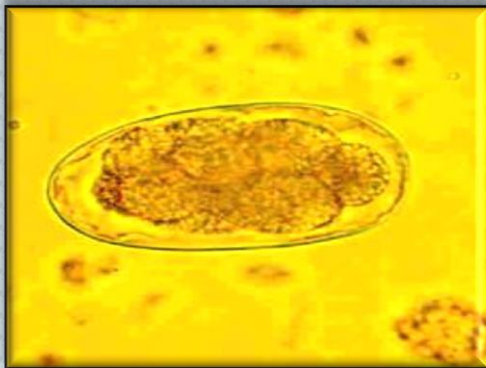


# TESIS DOCTORAL

*Jessica Quesada Rodríguez*

## **ENSAYO DE INMUNIZACIÓN EN GANADO CAPRINO CON TIOL-PROTEINASAS PROCEDENTES DE PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN (E/S) DE VERMES ADULTOS DE *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA***



**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD  
ALIMENTARIA**



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA**

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, 2015**





A mis padres

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
1.Introducción.....	6
2.Generalidades <i>Teladorsagia circumcincta</i> .....	8
2.1. Taxonomía y descripción morfológica.....	8
3.Biología de los nematodos gastrointestinales.....	11
4.Epidemiología de la ostertagiosis.....	13
5.Patogenia y lesiones.....	16
6.Signos clínicos.....	19
7.Diagnostico.....	21
8.Tratamiento.....	22
8.1.Resistencia a antihelmínticos.....	24
9.Control y profilaxis.....	26
9.1.Medidas de manejo.....	26
9.2.Quimioprofilaxis.....	27
9.3.Métodos complementarios.....	27
9.3.1.Control biológico.....	28
9.3.2.Suplementación nutricional.....	29
9.3.3.Respuesta inmune.....	30
9.3.4.Vacunación.....	30
9.3.5.Utilización de la selección genética.....	31
10.Respuesta inmune frente a los nematodos gastrointestinales.....	35
10.1.Introducción.....	35
10.2.Factores que modulan la respuesta inmune.....	35
10.2.1.Edad.....	36
10.2.2.Sexo.....	36
10.2.3.Especie, raza, individuo.....	36
10.2.4.Estado hormonal.....	37
10.2.5.Nutrición.....	38
10.2.6.Tratamiento antihelmínticos.....	39
10.3.7.Patogenicidad de la cepa parasitaria.....	39
10.3.Inmunidad innata frente a los parásitos.....	40
10.4.Inmunidad adaptativa frente a los parásitos.....	42
10.4.1.Presentación del antígeno y orientación de la respuesta inmunológica.....	43
10.4.2.Respuestas linfocitarias.....	47
10.4.3.Mecanismos efectores.....	50
10.5.Manifestaciones de la respuesta inmune frente a los nematodos GI.....	68
10.5.1.Frente a los estadios larvarios.....	68
10.5.2.Frente a estadio adulto.....	71
10.6.Evasión de la respuesta inmune.....	74
11.Inmunización frente a los nematodos GI.....	76



11.1. Vacunas atenuadas.....	76
11.2. Vacunas frente Antígenos expuestos al sistema inmune.....	77
11.2.1. Antígeno Excreción/secreción (E/S).....	77
11.2.2. Hc-SI3.....	80
11.2.3. Hc40.....	81
11.2.4. Hcp26/23.....	81
11.3. Vacunas frente antígenos ocultos al sistema inmune.....	82
10.3.1. H11.....	82
10.3.2. H-gal-GP.....	83
10.3.3. Proteinasas tipo cisteína.....	84
10.3.4. Otros antígenos ocultos.....	86
10.4. Vacunación frente a <i>Teladorsagia circumcincta</i> .....	86
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>89</b>
1. Animales.....	89
2. Parásitos.....	89
2.1. Protocolo de obtención de L3 de <i>Teladorsagia circumcincta</i> .....	90
2.2. Protocolo de obtención de vermes adultos y cultivo in vitro.....	91
2.3. Preparación de los homogenizados del parásito.....	93
2.4. Purificación de las fracciones proteolíticas a partir de productos de E/S.....	94
2.5. Determinación de la concentración y perfil proteico.....	96
3. Protocolo experimental.....	97
3.1. Inoculación experimental.....	97
3.2. Recogida de muestras a lo largo del experimento.....	98
3.3. Recogida de muestras tras el sacrificio.....	99
3.3.1. Recogida de muestras para el estudio histológico e inmunohistoquímico.....	99
3.3.2. Recogida de muestras para el estudio de expresión de citoquinas.....	100
3.3.3. Recogida del mucus abomasal.....	101
3.3.4. Recogida del contenido abomasal.....	101
3.3.5. Recogida de la mucosa gástrica.....	102
4. Análisis hemotológico.....	102
4.1. Hematocrito.....	102
4.2. Proteínas plasmáticas.....	102
4.3. Recuento total de leucocitos.....	102
4.4. Recuento diferencial de leucocitos en sangre periférica.....	103
5. Evaluación del pepsinógeno sérico.....	104
5.1. Evaluación del pepsinógeno sérico por micrométodo.....	105
5.2. Transformación de los valores de absorbancias en unidades de tirosina.....	106
6. Estudios parasitológicos.....	108



6.1. Recuentos fecales de huevos.....	108
6.2. Recuentos de vermes adultos en abomaso.....	109
6.3. Digestión de la mucosa gástrica y recuentos de vermes inmaduros	110
7. Respuesta inmune sistémica y local.....	111
7.1. ELISA para la detección de inmunoglobulinas específicas de suero.....	111
7.2. ELISA para la detección de inmunoglobulinas específicas de mucus.....	115
7.3. Inmunoblotting.....	117
7.4. Estudio de la expresión de citoquinas.....	127
8. Respuesta inmune local.....	136
8.1. Estudio	136
inmunohistoquímico.....	
8.2. Estudio histológico.....	139
9. Análisis estadístico.....	143
9.1. Normalidad y homocedasticidad de las variables.....	143
9.2. Diferencia entre variables puntuales.....	143
9.3. Modelo general lineal de medidas repetidas.....	143
9.4. Coeficiente de correlación de Spearman.....	144
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>145</b>
	145
1. Introducción.....	
2. Estudio del perfil proteico del inmunógeno.....	146
3. Estudio parasitológico.....	146
3.1. Recuentos de vermes adultos.....	146
3.2. Longitud de los vermes hembras y recuento de huevos en útero....	148
3.3. Recuento de larvas en la mucosa.....	148
4. Recuento fecal de huevos en heces.....	149
5. Estudio hematológico.....	152
5.1. Hematocrito.....	152
5.2. Proteínas plasmáticas.....	152
5.3. Recuento de eosinófilo, linfocitos y neutrófilos en sangre.....	153
6. Niveles de pepsinógeno en suero.....	156
7. Respuesta inmune humoral	157
sistémica.....	
7.1. Detección de inmunoglobulinas IgG específica en suero.....	157
7.2. Detección de inmunoglobulinas IgA específica en suero.....	158
7.3. Estudio mediante Western-Blot de IgG	159
específica.....	
8. Respuesta inmune local.....	160
8.1. Detección de inmunoglobulinas específica en el mucus.....	160
8.2. Correlaciones de los niveles de inmunoglobulinas específicas.....	161





8.3. Estudio mediante Western-Blot de IgG e IgA específica en el mucus.....	162
8.4. Estudio de expresión de citoquinas.....	163
8.4.1. Expresión relativa de citoquinas en nódulos linfáticos abomasales.....	165
8.4.2. Expresión relativa de citoquinas en la mucosa abomasal.....	165
8.5. Estudio inmunohistoquímico de la mucosa abomasal.....	166
8.6. Correlaciones entre variables parasitológicas y poblaciones celulares locales.....	168
8.7. Estudio histológico de la mucosa.....	169
8.8. Correlaciones entre variables parasitológicas y células efectoras abomasales.....	170
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>172</b>
1. Introducción.....	172
2. Estudio del perfil proteico del inmunógeno.....	175
3. Estudio de parámetros parasitológicos, hematológicos y de respuesta inmune sistémica generada tras la inmunización.....	177
3.1. Nivel de inmunoprotección conferida por la fracción inmunógena	177
3.2. Efecto de la inmunización sobre los parámetros hematológicos.....	187
3.3. Efecto de la inmunización sobre la respuesta inmune humoral sistémica.....	191
3.4. Efecto de la inmunización en la respuesta inmune local.....	194
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>207</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>209</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>211</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>216</b>

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

Los animales y el hombre pueden verse afectados por una gran variedad de nematodos gastrointestinales, cuyo efecto sobre la salud varía dependiendo, entre otros factores, de su localización, del nivel de infección, de los mecanismos de acción patógena que desarrollan, así como del estado fisiológico y nutricional del hospedador. En los rumiantes domésticos, y en concreto en el ganado caprino, sin duda uno de los más prevalentes e importantes es el género *Teladorsagia*, constituyendo algunas especies, como *T. circumcincta*, el agente parasitario más frecuente en muchas regiones geográficas españolas (**Cordero del Campillo et al., 1994**), incluida la Comunidad Canaria (**Molina et. al., 1997**). A esta elevada frecuencia de presentación en la cabaña ganadera, se le une un importante potencial patógeno derivado del ciclo endógeno del parásito en la mucosa gástrica (**Urquart et al., 1996**), lo que lo convierte en uno de los parásitos más relevantes desde el punto de vista económico entre los que afectan a esta especie ganadera.

Actualmente el control de estas infecciones parasitarias se está realizando, como en otras nematodosis gastrointestinales de los pequeños rumiantes, mediante la aplicación de tratamientos antihelmínticos, así como otra serie de medidas de manejo. Los antihelmínticos han sido y continúan siendo una importante medida de control, pero la aparición de cepas resistentes a estos productos en ganado ovino y caprino (**Magona y Musisi, 1999**) y los problemas medioambientales y de salud alimentaria que originan sus residuos, han estimulado la búsqueda de otras medidas, como aquellas que tratan de potenciar la respuesta inmunológica del hospedador frente a determinados antígenos parasitarios (**Newton y Munn, 1999; Knox y Smith, 2001; Newton y Meeusen, 2003**).

En el desarrollo de estrategias de inmunización frente a nematodos gastrointestinales (NGI) de los pequeños rumiantes, sin duda ha tenido un papel protagonista el nematodo gástrico *Haemonchus contortus*, centrándose sobre él numerosos estudios, especialmente en ganado ovino, encaminados a inducir una respuesta inmunitaria protectora frente al parásito usando antígenos naturales y recombinantes, tanto de larvas 3 (L3), como de origen somático y productos de

excreción-secreción (E/S) de vermes adultos (**Jacobs *et al.*, 1999; Domínguez-Torano *et al.*, 2000; Vervelde *et al.*, 2002**).

Entre los antígenos con propiedades inmunoprotectoras que se han investigado, tanto en *H. contortus* como en otros NGI, destacan determinadas enzimas proteolíticas. Las importantes funciones biológicas de este tipo de enzimas en los nematodos, entre las que se incluyen la penetración a través de las barreras tisulares del hospedador (**Mattheus, 1977**), mecanismos de anticoagulación (**Hotez y Cerami, 1983**), la digestión extracorporal (**von Brand, 1973**), la proteólisis de inmunoglobulinas (**Auriault *et al.*, 1981**), así como la perturbación de los mecanismos de defensa del hospedador (**Leid, 1987**), las convierten en candidatos idóneos para el desarrollo de vacunas que impidan, o al menos dificulten, la penetración, asentamiento y pervivencia del parásito dentro del hospedador.

De todos esos tipos de proteinasas, las que parecen jugar un papel más importante en las relaciones parásito-hospedador, y por tanto las mejores candidatas para el desarrollo de protocolos de inmunoprotección son las cisteína-proteinasas, al intervenir en la penetración del parásito en los tejidos del hospedador, en su nutrición y en la defensa frente a los mecanismos efectores del sistema inmune (**Tort *et al.*, 1999**). A estas propiedades funcionales, se une una elevada actividad inmunógena (**Cox *et al.*, 1990**) lo que contribuye aún más a la idea de que este grupo de enzimas puedan ser idóneas en el desarrollo de vacunas frente a este tipo de nematodos (**Tort *et al.*, 1999**) u otros helmintos (**Neyra *et al.*, 2002; Legocki *et al.*, 2005; Loukas *et al.*, 2005**).

En la actualidad se han evaluado con fines inmunoprotectores con resultados satisfactorios algunas fracciones de *H. contortus* con actividad cisteína-proteinasa. Algunas de ellas muestran una homología con la

catepsina B (**Cox *et al.*, 1990; Boisvenue *et al.*, 1992**). Otras, con cierta similitud con las anteriores, han sido obtenidas a partir de vermes adultos y sus productos de

E/S, purificadas por cromatografía de afinidad en Thiol-Sepharosa y utilizadas tanto en ovinos como en caprinos (**Knox et al., 1995; 1999; 2005; Bakker et al., 2004; Ruiz et al. 2004;**).

Estos mismos planteamientos están siendo objeto de estudio en el caso de los nematodos del género *Ostertagia/Teladorsagia*, donde a pesar de incluir especies con un tipo de nutrición no hematófaga, claramente distinta de *H. contortus*, se reconoce un posible efecto inmunoprotector inducido por estas enzimas, debido a la ingestión parcial de sangre por parte del parásito (**Murray y Smith, 1994; Geldhof et al., 2000**).

Del mismo modo, algunas cisteína-proteinasas expresadas por los estadios larvarios (L4) de *T. circumcincta* (Catepsina F) parecen inducir una respuesta humoral protectora en ovinos, como demuestra el hecho de que animales con resistencia adquirida a la infección, presenten niveles de IgA específicos, que se encuentra correlacionados de forma negativa con los recuentos fecales, así como con la longitud y la fecundidad de los vermes (**Redmond et al., 2006**).

Aunque se ha avanzado en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos inmunes que se desarrollan frente a los NGI, y se dispone de herramientas cada vez más eficaces para analizarlos, lo cierto es que se requieren más trabajos que contribuyan a esclarecer qué respuestas inmunes se manifiestan cuando llega a desarrollarse una protección frente a las infecciones parasitarias. De hecho, se desconoce de forma precisa el tipo de respuesta que tiene lugar frente a estas infecciones, o incluso si esas se manifiestan de la misma forma frente a todos los NGI (**Balic et al., 2000**). Es más escasa aún la información que se dispone cuando se ponen en juego distintos inmunógenos parasitarios, como las enzimas proteolíticas que estamos considerando, información que podría ser de gran interés a la hora de tratar de potenciar los mecanismos defensivos inducidos por estas enzimas en algunas de las especies parásitas del género *Ostertagia/Teladorsagia* (**González, J.F. et al., 2006; Gómez-Muñoz et al., 2004**).

En el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo una experiencia en la que se analizó la inmunoprotección, inducida en ganado caprino por enzimas cisteína-proteinasas procedentes de productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcineta*, atendiendo a la respuesta inmune desarrollada en el curso del estudio tanto a nivel sistémico como local, así como las poblaciones celulares relacionadas con dicha respuesta tras un desafío con 8000 L3 del parásito.

Los datos recogidos no sólo fueron expuestos de modo descriptivo, sino que también se analizaron estadísticamente en profundidad. Así se evaluó la significación de las diferencias observadas entre las medias de los diferentes parámetros estudiados (hematológicos, parasitológicos, niveles de anticuerpos específicos, expresión de citoquinas y poblaciones celulares a nivel local), del mismo modo, las diferentes variables fueron correlacionadas entre sí, intentando establecer qué tipo de asociación se establece entre ellas.

Por tanto, los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

### **Objetivos Generales:**

- Analizar el valor inmunoprotector en ganado caprino de proteinasas tipo cisteína presentes en los productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcineta*.
- Analizar la respuesta inmune generada en ganado caprino, tras la inmunización con dichas proteinasas de *T. circumcineta*, así como su relación con experiencias previas en las que llevaron a cabo infecciones primarias con este parásito en condiciones experimentales similares.

**Objetivos Específicos:**

1. Evaluar la protección inducida en caprino por proteínas tipo cisteína procedentes de productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcincta*, mediante el estudio del recuento total de vermes inmaduros y adultos en abomaso, longitud y fecundidad de vermes hembras, así como recuentos fecales de huevos, obtenidos tras el desafío con L3 del parásito.
2. Analizar la evolución de distintos parámetros sanguíneos (valor hematocrito, concentración de proteínas plasmáticas, recuento total y diferencial de leucocitos y niveles de pepsinógeno sérico) en el curso de la inmunización y tras el posterior desafío con L3 infectantes del parásito.
3. Estudiar la respuesta inmune humoral (local y sistémica) mediante el análisis de los niveles de anticuerpos específicos en suero y mucus gástrico a lo largo de la experiencia.
4. Estudiar inmunohistológicamente las poblaciones celulares efectoras y las subpoblaciones linfocitarias presentes en el abomaso tras el reto con L3 de *T. circumcincta*.
5. Evaluar la expresión de citoquinas en mucosa abomasal y nódulos linfáticos regionales en animales inmunizados tras la infección experimental con larvas infectantes de *T. circumcincta*.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (NGI), considerados los parásitos más frecuentes de los rumiantes en todo el mundo, son causantes de las denominadas gastroenteritis parasitarias, que se caracterizan por ser procesos generalmente endémicos, de curso crónico y mortalidad baja. En este tipo de nematodosis se encuentran involucradas distintos grupos parasitarios que se localizan en el estómago e intestino, entre los cuales destaca el Orden Strongylida, y más concretamente la familia Trichostrongylidae (**Balic et al., 2000**). Dentro de los géneros que se localizan en el abomaso, *Haemonchus* spp., *Ostertagia* (*Teladorsagia*) spp. y *Trichostrongylus axei* se consideran los más relevante; los de mayor importancia en intestino delgado son *Trichostrongylus* spp. y *Nematodirus* spp.; mientras que en el intestino grueso *Oesophagostomum* spp. y *Chabertia* spp. son los más prevalentes de mayor patogenicidad.

En los rumiantes domésticos, y en concreto en el ganado caprino, uno de los géneros más prevalentes es el género *Teladorsagia*, constituyendo la especie *T. circumcincta* el agente parasitario más frecuente en muchas regiones geográficas españolas (**Cordero del Campillo et al., 1994**), incluyendo la Comunidad Canaria (**Molina et. al., 1997**). A esta elevada frecuencia de presentación se le une un importante potencial patógeno, derivado del ciclo endógeno del parásito en la mucosa gástrica (**Urquart et al. 1996**), lo que lo convierte en una de los parásitos más relevantes desde el punto de vista económico entre los que afectan a esta especie ganadera. Actualmente el control de las nematodosis gastrointestinales se realiza mediante tratamientos estratégicos con antihelmínticos, lo que se estima corresponde al 10% del gasto mundial en fármacos veterinarios (**Kassai, 1999**).

Las pérdidas económicas debidas a los nematodos de la familia Trichostrongylidae son especialmente severas en países en vías de desarrollo. En Etiopía, **Biffa y colaboradores, en 2007**, cuantificaron en 82 millones de dólares

anuales las pérdidas causadas por NGI en pequeños rumiantes y, sólo en fármacos, se calculó que estas parasitosis podrían provocar gastos anuales del orden de 46 y 103 millones de dólares en Sudáfrica e India, respectivamente (**Mcleod, 2004; Waller y Chandrawathani, 2005**). En Australia, un país con una gran cabaña ovina, **Sackett y colaboradores, en 2006**, valoraron en 369 millones de dólares las pérdidas debidas a NGI.

A las pérdidas debidas a la disminución de las producciones, muertes y decomisos, hay que sumarle los gastos originados por las medidas de control tradicionales, incluyendo la aplicación de tratamientos antihelmínticos, manejo de pastos y otras. Los antihelmínticos han sido y continúan siendo una importante medida de control, pero la aparición de cepas resistentes a estos productos en ganado ovino y caprino (**Magona y Musisi, 1999; FAO, 2004; van Wyk *et al.*, 2006**), los problemas medioambientales y de salud alimentaria que originan sus residuos y la creciente demanda por parte de los consumidores de productos animales libres de residuos farmacológicos (**Kassai, 1999**) han estimulado a la comunidad científica a la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico y de control que sean más fiables y precoces, y que eviten los inconvenientes y pérdidas asociados al uso de antihelmínticos. Dentro de estas alternativas destacan los estudios basados en la eficacia de la modificación de la dieta (**Waller, 1997b; Bricarello *et al.*, 2005; Valderrábano *et al.*, 2006**), la utilización de hongos vermícidias para el control de los estadios preparasíticos (**Waller *et al.*, 2004**), o el uso de vacunas que tratan de potenciar la respuesta inmunológica del hospedador frente a determinados antígenos parasitarios (**Newton y Munn, 1999; Knox y Smith, 2001; Knox *et al.*, 2003; Newton y Meeusen, 2003**).

## 2. GENERALIDADES SOBRE *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA* Y OTROS NEMATODOS GASTROINTESTINALES DEL GANADO CAPRINO

### 2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

#### 2.1.1 Superfamilia Trichostrongyloidea Cram, 1927

Esta superfamilia es la más amplia entre los nematodos que cuentan con bolsa copuladora (**Anderson, 1992**). Se caracterizan por presentar una cápsula bucal reducida o rudimentaria y carecer de corona radiada. Pueden tener entre 3-6 labios o bien carecer de ellos, presentan un cuerpo delgado y cuentan, en la mayoría de los casos, con una bolsa copuladora (**Anderson, 1992; Urquhart et al., 2001**).

#### 2.1.2 Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912

Los nematodos pertenecientes a esta familia son de pequeño tamaño, con una cápsula ausente o muy pequeña, sin coronas radiadas y normalmente sin dientes. La fase adulta se localiza en el tracto digestivo de los rumiantes, équidos y otros vertebrados. El aparato reproductor está bien desarrollado en ambos sexos. El aparato genital de las hembras es doble y la vulva se localiza en el tercio posterior del cuerpo, presentando en algunos géneros una solapa o lengüeta vulvar. Los machos presentan una bolsa copuladora bien desarrollada, con dos lóbulos laterales y un pequeño lóbulo central. Los géneros más importantes son *Trichostrongylus*, *Graphidium*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Marshallagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Haemonchus* y *Mecistocirrus* (**Soulsby, 1988; Bowman, 1995, Cordero del Campillo, 2000**). Su distribución es mundial (**Kassai, 1999**).

### 2.1.3 Género *Ostertagia* Ransom, 1907

Las especies pertenecientes a este género se localizan en su mayoría en el abomaso, y ocasionalmente en el intestino delgado, de ovejas, cabras, vacas y otros rumiantes (**Soulsby, 1988; Anderson, 1992**).

Se caracterizan por ser nematodos delgados y poseer una cutícula externa dotada de estrías transversales en su extremo anterior. El resto de su cutícula corporal lleva 25-35 estrías longitudinales y ninguna transversal. Son de color pardo y de ahí que se les conozcan vulgarmente como gusano pardo del estómago. El macho posee una bolsa copuladora con dos lóbulos laterales y uno dorsal y una membrana bursal accesoria. Sus espículas son cortas, y su extremo posterior termina en 2 ó 3 procesos. La hembra muestra una vulva que puede ir cubierta con una pequeña solapa anterior (**Soulsby, 1988**). Generalmente miden menos de 14 mm de longitud (**Georgi y Georgi, 1990**). Los huevos poseen una morfología típica estrogiloide (**Georgi y Georgi, 1990; Bowman, 1995**).

Los adultos pertenecientes a este género pueden ser visibles mediante una exhaustiva inspección o mediante lavados gástricos. Las larvas se desarrollan en las glándulas gástricas del abomaso y sólo podemos apreciarlas mediante el uso del microscopio (**Urquhart et al., 1996**). Dichas larvas pueden sufrir secuestros larvarios en los estadios tempranos de la cuarta fase larvaria (**Anderson, 1992**), fenómeno que se denomina hipobiosis.

Morfológicamente, *Ostertagia* y *Teladorsagia* son prácticamente indistinguibles, denominándose *Teladorsagia* a los vermes de este género que afectan a pequeños rumiantes y *Ostertagia* a los que afecta al ganado vacuno (**Bowman, 1995; Georgi y Georgi, 1990**). La diferenciación entre especies puede llevarse a cabo a partir de la morfología de las espículas (**Urquhart et al., 1996**).

#### 2.1.4 *Teladorsagia circumcincta* Stadelmann, 1984

Es un parásito del abomaso del ganado ovino y caprino que muestra una gran adaptación a estos hospedadores (**Borgsteede, 1981b**), aunque también se ha localizado en el abomaso de ciervos, llamas, muflones, etc. (**Anderson, 1992**).

Los machos miden entre 7,5 y 8,5 mm de longitud. Muestran unas espículas finas (0,28 – 0,32 mm) que terminan en un abultamiento y un pequeño proceso agudo. La hembra mide entre 9,8 y 12,2 mm, presenta una vulva que normalmente está cubierta con una solapa. Muestran, cerca del extremo de la cola, una banda engrosada que contiene de 4 a 5 estrías transversales (**Soulsby, 1988**).



**Fig.1** Macho de *T. circumcincta*. Bolsa copuladora



**Fig.2** Solapa vulvar de la hembra de *T. circumcincta*

Los huevos miden entre 80-100 x 40-50  $\mu\text{m}$  y tienen una forma elíptica regular de polos simétricos no muy anchos. Las paredes laterales son simétricas. Poseen una cápsula delgada, quitinosa y de superficie lisa, tapizada en su interior por una delgada membrana (**Thiendepont et al., 1979**). Eclosionan a las 18 – 24 horas y el primer estadio larvario mide 350  $\mu\text{m}$  de longitud (**Anderson, 1992**). La L3 infectante mide entre 797 y 866  $\mu\text{m}$  incluyendo la vaina que la recubre (**Dikmans y Andrews, 1933**).



**Fig.3** L3 infectante de *T. circumcincta*



**Fig.4** Extremo anterior L3 *T. circumcincta*



**Fig.5** Huevo de *T. circumcincta*

### 3 BIOLOGÍA DE LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

*Teladorsagia* presenta un ciclo biológico directo muy parecido al de otros tricostrongílidos. Los huevos, de la morfología típica de los tricostrongílidos, salen con las heces de forma no embrionada, siendo su excreción variable dependiendo de factores relacionados con el hospedador (edad, estado inmunitario, consistencia fecal), así como de la propia prolificidad individual del parásito. Los huevos suelen ser bastante resistentes a las condiciones adversas y presentan una gran capacidad de adaptación. Pueden eclosionar en intervalos de temperatura que oscilan entre los 4-38°C (Crofton, 1965; Crofton y Whitlock,

1965), variando el tiempo que invierten en eclosionar en función de la temperatura y de la cepa parasitaria.

En el medio se produce el desarrollo de la L1 que, en condiciones óptimas, eclosiona desarrollándose la L2 y posteriormente la L3, que es la forma infectante para el hospedador. Este proceso tiene lugar en aproximadamente dos semanas, aunque el desarrollo puede retrasarse varios meses si la temperatura y la humedad no son las óptimas. Las dos primeras fases larvarias permanecen en las heces, alimentándose de materia orgánica y microorganismos presentes en las mismas. La L3 conserva la cutícula del estadio anterior, lo que la aísla del medio externo y la hace más resistente al frío y la desecación que las fases previas. Asimismo, las L3 están dotadas de movilidad, lo que les permite desplazarse, en condiciones ambientales desfavorables como la falta de humedad y las altas temperaturas, hacia las partes más bajas de la vegetación o del pasto para evitar el efecto de la desecación (**Machen *et al.*, 1994; Schoenian, 2005**).

Las larvas L3 infectantes migran de las heces a la hierba cuando las condiciones de humedad son idóneas, lo cual facilita que el hospedador rumiantes las ingiera (**Urquhart *et al.*, 1996**). Una vez ingerida, pierde la vaina en el rumen y penetra en las glándulas gástricas de la mucosa del abomaso (preferentemente en su región fúndica), formando nódulos de color blanquecino a los 3-4 días de la infección. A los 7 – 10 días, las larvas ya han madurado a L4 (hembras con 7 mm y machos con 5 mm de longitud) y a los 14-42 días alcanzan su fase adulta (**Threlkeld, 1934; Sommerville, 1953; 1954; Armour *et al.*, 1966**), a menos que sufran el fenómeno de hipobiosis o arresto larvario. En tal caso, las L4 pueden quedar secuestradas en las glándulas gástricas (**Armour *et al.*, 1966**) hasta un periodo de 6 meses, lo cual permite a esta especie, como a otros tricostrongilidos, superar condiciones medioambientales adversas (**Dunsmore, 1960,1963; Georgi y Georgi, 1990; Bowman, 1995**). También se ha demostrado que una gran exposición larvaria favorece el fenómeno de hipobiosis, y que el empleo de antiparasitarios que reducen la carga de nematodos adultos parece estimular el que una parte las larvas secuestradas

reanude su desarrollo para reestablecer la población de vermes en el abomaso. La hipobiosis jugaría, por tanto, un papel en el mantenimiento de la población de vermes adultos. Finalmente, este fenómeno también puede considerarse como una consecuencia de la respuesta inmune del hospedador (**Balic *et al.*, 2000b**). La exposición continua al antígeno parasitario sería crítica para detener el desarrollo parasitario ya que, en ausencia de más L3 infectantes, el secuestro de las L4 es breve (**Smith, 2007**). Cuando no tiene lugar el fenómeno de arresto larvario el periodo de prepatencia es de unas tres semanas (**Soulsby, 1988; Urquhart *et al.*, 1996**).

#### **4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTERTAGIOSIS**

La magnitud de la parasitación por *T. circumcincta* en un rebaño está condicionada por su ciclo biológico, así como por factores ambientales y factores relacionados con el hospedador. Todo ello determina una cantidad variable de estadios infectantes (L3) en el medio y, por tanto, de la carga parasitaria en los animales y de las fuentes de infección, lo cual se traduce en distintos modelos epidemiológicos, con sus correspondientes ritmos de infección y de contaminación del medio (**Cordero del Campillo, 2000**).

La presencia de huevos de *Teladorsagia* en el medio procedente de animales parasitados no es constante. Así, en torno al parto - dos semanas antes y seis semanas después del nacimiento de las crías - se produce normalmente un incremento del número de huevos (**Dunsmore, 1965; Andrews *et al.*, 1995; Dorny *et al.*, 1995; Urquhart *et al.*, 1996; Kassai, 1999**). Este incremento se considera consecuencia de ciertos cambios hormonales asociados al parto que implican una relajación en la respuesta inmune del hospedador (**Barger, 1993; Urquhart, 1996**). Como resultado se favorece el desarrollo de las larvas hipobióticas y se incrementa la fecundidad de los vermes hembras alojados en el abomaso. La eliminación masiva de huevos aseguraría una elevada



presencia de L3 infectantes en el momento en que los animales destetados salgan al pasto (Soulsby, 1987).

La activación de las larvas quiescentes parece que no se debe exclusivamente a una reducción de la respuesta inmune del hospedador, sino que está también relacionada con la mejora de las condiciones ambientales en el exterior, aunque los mecanismos que median esta activación son aún desconocidos (Blitz y Gibbs, 1971; Gibbs, 1986). Lógicamente, los momentos del año con climatología más favorable suelen coincidir con las parideras, por lo que los efectos del incremento de la movilización larvaria durante el parto y la activación de las larvas hipobióticas asociadas a las mejores condiciones climatológicas se suman. En zonas de climas templados, en los que ninguna larva puede sobrevivir en el pasto durante el invierno, esta combinación de factores parece determinante para el mantenimiento de la población parasitaria en los rebaños (Capitini *et al.*, 1990; Waller y Chandrawathani, 2005).

La carga infectante de los pastos también se sustenta partir de las L3 que superaron el invierno (Urquhart *et al.*, 1996). De hecho, la supervivencia de las L3 durante tres meses a -10°C y por periodos mucho mayores a 4°C justifican esta capacidad de hibernación (Gibson y Everett, 1972) y explican la posibilidad de que inicien una nueva infección en primavera cuando los animales vuelvan al pasto (Waller y Thomas, 1978).

En general, la disponibilidad de larvas infectantes en los pastos suele presentar una variación estacional, aunque en lugares con escasos cambios estacionales se pueden mantener ritmos de infección prácticamente constantes a lo largo de todo el año (Urquhart *et al.*, 2001).

En áreas de clima templado, como por ejemplo Europa, el número de L3 de *T. circumcincta* que están en la vegetación se incrementa sensiblemente a mitad de verano y es entonces cuando aparece la enfermedad (Urquhart *et al.*,

1996), lo cual se ve favorecido por la susceptibilidad de los terneros, corderos y cabritos durante su primer periodo de pastoreo (**Kassai, 1999**).

En áreas subtropicales, como por ejemplo las islas Canarias, el desarrollo de la enfermedad es similar a la descrita para las zonas templadas, excepto porque el ritmo estacional de eventos es diferente. En muchas de estas áreas el parto sucede conjuntamente con un aumento del pasto, normalmente al final del otoño o invierno, coincidiendo con las condiciones más favorables para el desarrollo de las fases de vida libre de *Ostertagia* spp., concentrándose un mayor número de larvas a lo largo del invierno y originando los problemas clínicos o las pérdidas productivas en la segunda mitad del invierno. El secuestro larvario o hipobiosis podría tener lugar al final del invierno o al principio de la primavera, no descartándose la posibilidad de que en determinadas zonas climáticas (seco-desértico) este fenómeno pudiera tener lugar durante las épocas más secas y calurosas del año (**Urquhart et al., 1996**). Así mismo, la importancia relativa del pasto como fuente de infección en cualquier área geográfica podría variar de acuerdo con las condiciones ambientales durante el periodo más adverso para la supervivencia de estas larvas. Por ejemplo, si el verano es muy seco y caluroso (como en las islas Canarias), se reduce la longevidad de las L3, a excepción de en zonas de sombra, que serán los reservorios de la infección hasta que llegue el siguiente invierno, tal y como se ha demostrado zonas próximas de Marruecos (**Ouhelli et al., 1981; Pandey et al., 1990**).

Si la ingesta de L3 tiene lugar antes de octubre, la mayoría de las larvas madurarán en tres semanas; si es posterior, lo normal es que frenen su desarrollo y queden en hipobiosis durante varios meses y precipiten la ostertagiosis tipo II (detallada más adelante) cuando maduren. En el hemisferio norte se ha detectado este fenómeno durante los meses fríos, mientras que en zonas desérticas ocurre durante los meses más calurosos, debido a la desecación.

Cabe destacar que las L3 son más resistentes a la desecación que las L1 y las L2, aunque son muy sensibles a la exposición directa a la luz solar (**Kassai,**

1999). Un estudio desarrollado sobre el efecto de la temperatura en la supervivencia la L3 de varios géneros de nematodos, considerando un intervalo de temperaturas entre 5-30 °C, demostró que *Ostertagia* spp era el género más resistente (Boag y Thomas, 1985). También parecer ser más capaz de soportar mejor el frío que otros tricostrongídeos (Furman, 1944; Pandey, 1972; Jasmer *et al.*, 1987).

Los nematodos gastrointestinales inducen un cierto grado de inmunidad que hace que, conforme aumenta la edad del hospedador, éste sea más resistente a la enfermedad, pasando a tener importancia como fuente de contagio. La inmunidad se adquiere lentamente y generalmente se requieren dos estaciones de pastoreo antes de que se adquiriera una resistencia significativa a la infección (Urquhart *et al.*, 1996).

## 5 PATOGENIA Y LESIONES

Por lo general, en condiciones naturales coexisten en un mismo hospedador varias especies de tricostrongídeos, cada una de ellas con diferentes mecanismos de acción patógena y localizaciones a lo largo del tracto gastrointestinal. La acción patógena total será, por tanto, el conjunto de la acción de todas las especies coexistentes en el hospedador (Cordero del Campillo *et al.*, 2000; Meana y Rojo, 2000). En esta acción intervienen tanto las formas larvarias como el estadio adulto, teniendo las primeras por lo general un mayor protagonismo. En consecuencia, el curso de la infección variará en función de factores tales como el número de vermes, las especies presentes en el tracto gastrointestinal, así como la edad y estado nutricional del hospedador, entre otras (Kassai, 1999).

En el caso concreto de *Ostertagia* spp se han documentado cambios morfológicos y funcionales como consecuencia de infecciones experimentales en terneros por *O. ostertagi* (Murray *et al.*, 1970). En este estudio se demostró que

el principal efecto patogénico de la infección por *O. ostertagi* era la reducción de la funcionalidad de las glándulas gástricas, así como la amplia superficie de mucosa que podía verse (Soulsby, 1988).

Los cambios fisiopatológicos que resultan de la infección empezarían a desarrollarse aproximadamente a los 17 días post-infección (dpi) coincidiendo con el desarrollo larvario en las glándulas gástricas. El desarrollo larvario ocasiona la pérdida de funcionalidad de las glándulas gástricas parasitadas, siendo reemplazadas las células mucosas, zimógenas y parietales por células indiferenciadas columnares de secreción mucosa (Soulsby, 1988; Noble *et al.*, 1989; Kassai, 1999).

Entre los 17-35 dpi, como consecuencia de la salida de los vermes adultos de las glándulas gástricas, se desarrollan importantes cambios en las glándulas gástricas adyacentes. Las glándulas parasitadas se muestran agrandadas y se dilatan las glándulas circundantes. Este fenómeno estimula una rápida división de las células epiteliales, especialmente las parietales, lo cual da origen a unas células aplanadas indiferenciadas que pierden su capacidad funcional. Estos cambios determinarán la aparición de una mucosa gástrica engrosada e hiperplásica que provoca la desaparición de los complejos de unión intercelulares (Soulsby, 1988; Kassai, 1999).

Macroscópicamente, todos estos cambios se traducen en lesiones a nivel de las glándulas parasitadas, de morfología nódulo-circular prominente, de 2-3 mm de diámetro y con un orificio central. En infecciones muy intensas, el abomaso se muestra edematoso e hiperémico, con el aspecto del “cuero repujado” (Soulsby, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Bowman, 1995).

Funcionalmente, se produce un incremento del pH del abomaso debido al cese de la producción de ácido clorhídrico por las células parietales (Soulsby, 1988; Kassai, 1999) y a la modificación del Diferencial del Potencial Transmural, es decir, el potencial eléctrico a través de la pared gástrica e

intestinal, y de la concentración intraluminal de iones (**Cordero del Campillo, 2000**).

El aumento del pH gástrico puede alcanzar valores alrededor de 7, lo que tiene importantes repercusiones, ya que disminuye el poder bacteriostático de los jugos gástricos y se reduce la conversión del pepsinógeno en pepsina. Asimismo, como consecuencia de la pérdida de uniones intercelulares, hay una mayor permeabilidad para las macromoléculas, por lo que el pepsinógeno que se acumula en el abomaso es reabsorbido y aumentan sus niveles en el plasma, a la vez que detectan proteínas plasmáticas, como la albúmina, en el contenido abomasal (**Dargie, 1975; Miller y Horohov, 2006; Soulsby, 1988**).

Algunos autores no están seguros de que los cambios fisiológicos y bioquímicos descritos en los párrafos anteriores sean como consecuencia exclusiva de las lesiones producidas por las larvas en el epitelio gástrico. De hecho, los tratamientos antihelmínticos recuperan el pH gástrico mucho antes de que las células puedan recuperarse. Es posible que pudiera haber una inhibición de la secreción ácida en los lugares donde el verme no tiene una acción directa, determinada por un factor gástrico de origen desconocido que estaría inducido por la presencia del verme. Este efecto se ha atribuido a algunos productos de excreción-secreción (E/S) del parásito (**Cordero del Campillo et al., 2000**).

Parece ser que también juega un papel en la fisiopatología de la enfermedad la hipersensibilidad y la degranulación eosinofílica generada durante el desarrollo larvario (**Schillhorn, 1981; Hammerberg, 1986; Smith, B.P., 1990**).

Por último, hacia el día 35 pi, se inicia la pérdida gradual de los parásitos adultos, lográndose progresivamente un regreso a la normalidad de la mucosa gástrica hacia el día 63-70 de infección (**Soulsby, 1988**).

Dentro de la patogenia descrita, la infección puede desarrollarse de dos formas diferentes:

Ostertagiosis tipo I: es causada por la ingesta de un elevado número de L3 recientes y, por tanto, se manifiesta 3-4 semanas después de su ingreso en el hospedador, siendo la mayoría de los vermes presentes adultos (**Kassai, 1999**). En estos casos, la respuesta al tratamiento suele ser buena, por lo que estas formas clínicas cursarían con una morbilidad alta y una mortalidad normalmente baja (**Soulsby, 1988**). En las regiones cálidas, esta forma clínica es la más común en la época de destete y en los meses siguientes, mientras que en las regiones templadas más frías, es la forma que se desarrolla en animales jóvenes durante su primer verano de pastoreo y a principios de otoño.

Ostertagiosis tipo II: tiene lugar cuando un elevado número de larvas que se encuentran en estado de hipobiosis (L4) se movilizan y salen de las glándulas gástricas. Las lesiones serán similares a las de la Ostertagiosis tipo I pero más extensas (**Soulsby, 1988**). En las regiones templadas-cálidas, las larvas propensas a la inhibición son adquiridas en primavera y la enfermedad puede ocurrir cuando un gran número de larvas reanudan su desarrollo hasta la fase de adulto, a finales del verano u otoño. En las regiones templadas-frías, las larvas en hipobiosis son adquiridas al final del otoño y maduran a finales del invierno o principio de la primavera (**Aiello, 2000**).

## 6 SIGNOS CLÍNICOS

Las tricostrongilidosis están asociadas a una serie de signos clínicos, entre los que destacan una menor ganancia en peso, mal estado general, inapetencia y diarrea. Asimismo, es común la observación de cambios característicos en la composición de la sangre, como hipoalbuminemia, disminución en la concentración de las proteínas totales y anemia. La anemia es un signo característico de las infecciones de las especies hematófagas, como *H. contortus*, aunque puede observarse también en animales que padecen un cuadro crónico causado por especies no hematófagas. En este caso, sería más una consecuencia de las deficiencias nutritivas asociada a la anorexia y a la excesiva

pérdida de proteínas plasmáticas a través de la mucosa digestiva que a una pérdida de sangre (**Cordero del Campillo et al., 2000**).

Los trastornos digestivos pueden incluir diarrea cuando las infecciones son moderadas o graves. En infecciones por *Teladorsagia* spp, la aparición de diarrea coincide con la maduración de las larvas, a lo que contribuye el incremento de la población bacteriana favorecido por el aumento del pH.

Los efectos de las infecciones parasitarias por nematodos gastrointestinales sobre la producción se suelen traducir en una reducción de la ganancia diaria de peso, del crecimiento, así como de la calidad de la lana y la producción de la leche (**Cordero del Campillo et al., 2000**).

En las infecciones por *Ostertagia* spp en ganado vacuno, el signo más sobresaliente es una diarrea intensa. En esta especie, la ostertagiosis tipo I se caracteriza por la aparición de edema y necrosis en la mucosa gástrica, fenómenos que aparecen acompañados por una reducción de los niveles de albúmina, anorexia, con el desarrollo de una profusa diarrea acuosa, generalmente de un color verde brillante por la falta de desnaturalización de la clorofila en el abomaso (**Soulsby, 1988; Kassai, 1999**), pérdida de peso, deshidratación, aumento del pepsinógeno plasmático y ocasionalmente edemas periféricos. El número de huevos por gramo de heces (h.p.g.) en estos casos suelen ser altos (>1000 h.p.g.) (**Kassai, 1999**). La morbilidad observada es por lo general alta, mientras que la mortalidad suele ser baja, siempre que se aplique el tratamiento antiparasitario adecuado (**Soulsby, 1988**).

Cuando los animales parasitados manifiestan ostertagiosis tipo II, se desarrolla una grave diarrea crónica y emaciación (**Matín et al., 1957; Kassai, 1999**), anorexia, deshidratación, incremento del pepsinógeno plasmático, e hipoalbuminemia muy marcada, que se traduce generalmente en edemas periféricos (**Mulligan et al., 1963; Kassai, 1999**). Circunstancialmente, podría producirse una mortalidad elevada (**Matín et al., 1957; Kassai, 1999**), siendo la morbilidad generalmente baja. La mucosa del abomaso se observa engrosada y

edematosa, al tiempo que puede haber una necrosis superficial conjuntamente con un exudado inflamatorio. En ganado ovino y caprino, el signo clínico que aparece con mayor frecuencia es una marcada pérdida de peso. La diarrea, cuando se manifiesta, suele ser intermitente y generalmente no tan acuosa como en bovino (Uquhart *et al.*, 1996).

En climas tropicales y subtropicales, donde no suelen desarrollarse ciclos biológicos tan marcados, y donde las L3 viables permanecen en el medio durante periodos más prolongados, el desarrollo de una ostertagiosis clínica es mucho menos frecuente. De producirse formas clínicas, el tipo I tendría lugar a finales del invierno (enero-marzo), y las formas tipo II en otoño, con el comienzo de la estación de lluvias (septiembre-diciembre) (Kassai, 1999).

## 7 DIAGNÓSTICO

Se puede establecer a partir de datos clínicos, así como del historial epidemiológico, y posteriormente confirmado mediante distintos tipos de análisis laboratoriales (Soulsby, 1988).

El diagnóstico atendiendo a los signos clínicos es difícil ya que los síntomas más frecuentes (diarrea, pérdida de peso y falta de apetito) pueden aparecer también en otros procesos. Sin embargo, todos estos signos, acompañados de datos epidemiológicos como la salida al pasto de los animales más jóvenes, pueden hacer sospechar al clínico de un cuadro de gastroenteritis parasitaria (Urquhart *et al.*, 2001).

El análisis coprológico, mediante la observación directa de huevos en las heces, es la técnica indicada para confirmar la presencia de NGI en el rebaño. Los huevos de las distintas especies de Trichostrongylidae, salvo los del género *Nematodirus spp.*, son prácticamente indistinguibles entre sí. Por este motivo, una vez evidenciada la presencia de huevos con morfología compatible con *T. circumcincta* sería necesario llevar a cabo su identificación mediante



coprocultivo e identificación de los caracteres morfológicos de las L3 que se desarrollan a partir de los huevos (Molento *et al.*, 2004; Urquhart *et al.*, 2001; Van Vyck, 2001; Van Vyck *et al.*, 2006).

El número de huevos presentes en las heces del animal es orientativo, en cierta medida, del grado de parasitación. La técnica habitual para cuantificar el número de huevos en heces es el método de McMaster (MAFF, 1989). Los recuentos fecales pueden ser elevados en la enfermedad tipo I, pero muy bajos e incluso negativos en animales que padecen la enfermedad tipo II (Soulsby, 1988). En cualquier caso, los recuentos de huevos no siempre son proporcionales a la carga parasitaria ni a los signos clínicos. De hecho, corderos, cabritos y terneros pueden sufrir de forma fatal la enfermedad coincidiendo con la fase larvaria, siendo en ese momento el recuento de huevos insignificante. Se estima, de modo orientativo, que 250-2000 h.p.g. de *T. circumcincta* corresponden a un grado de parasitación intermedio (Kassai, 1999).

La determinación de las proteínas séricas (Meana y Rojo, 2000), los niveles de pepsinógeno sanguíneo (Anderson *et al.*, 1965) y los niveles séricos o en la leche de inmunoglobulinas específicas (Molina *et al.*, 2009) pueden ser también de interés pronóstico. Finalmente, hallazgos en la necropsia concordantes con una ostertagiosis (presencia de vermes, gastritis, etc.) pueden ayudar a completar el diagnóstico.

El diagnóstico se confirma a menudo por la respuesta al tratamiento con antihelmínticos. La enfermedad tipo I responde rápidamente y en 48 horas se recobra el apetito y se produce una rápida regeneración de los cambios en el abomaso. El tipo II responde de manera menos espectacular, siendo necesaria a menudo la repetición del tratamiento (Soulsby, 1988).

## 8 TRATAMIENTO

El tratamiento y el control de las nematodosis gastrointestinales se han

basado fundamentalmente en el uso de fármacos antihelmínticos, en combinación con determinadas medidas de manejo en el pastoreo que reduzcan el riesgo de infección.

La aplicación a gran escala de antihelmínticos de probada eficacia ha transformado la industria ganadera, especialmente en el caso de los rumiantes. Se llega a afirmar que la ganadería de rumiantes en su forma actual no sería posible sin fármacos antihelmínticos (**Stear *et al.*, 2000**). Los fármacos más utilizados son los bencimidazoles y probencimidazoles, los imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas. En el pasado también se utilizaron los organofosforados, que dejaron de emplearse debido a su elevada toxicidad.

- *Bencimidazoles y probencimidazoles*. Se administran por vía oral, absorbiéndose con rapidez y alcanzando sus niveles plasmáticos más altos a las 2-3 horas de la administración. Los más utilizados son: albendazol, oxibendazol, mebendazol, oxfendazol, fenbendazol, flubendazol y cambendazol (**Cordero del Campillo, 2000; Ostlind *et al.*, 2006; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006**).

- *Imidazotiazoles*. Dentro este grupo de fármacos se encuentran el tetramisol y el levamisol. Estos dos fármacos son eficaces frente a la forma adulta de los NGI, siendo menor su eficacia sobre los estadios larvarios. Se recomienda periodos de supresión de dos días para el consumo de leche y una semana en el caso de la carne (**Cordero del Campillo, 2000; Ostlind *et al.*, 2006; Martin y Robertson, 2007**).

- *Lactonas macrocíclicas*. Dentro de este grupo se encuentra la ivermectina, fármaco que a dosis muy bajas (0,2 mg/k.p.v.) suele presentar una efectividad del 100% (**Ostlind *et al.*, 2006**). También se clasifica en este grupo la doramectina que, administrada a la misma dosis en cabras, es efectiva frente a la haemonchosis, y su efecto persiste entre los 14-25 días post-tratamiento (**Molina *et al.*, 2005**). Este mismo compuesto en ovino también se ha

demostrado eficaz frente a otros NGI como *Teladorsagia circumcincta*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus filicollis*, *Oesophagostomum venulosum* y *Trichuris spp.* (Dorchies *et al.*, 2001). Ambos fármacos tienen una gran eficacia frente a adultos y estadios larvarios, incluso en hipobiosis; además, son eficaces frente ectoparásitos. Sin embargo, el periodo de supresión es muy alto, en el caso de la carne 21 días y en el caso del ganado lechero no se puede administrar (Cordero del Campillo, 2000).

Otro fármaco perteneciente a este grupo es la epinomectina, cuya eficacia se ha demostrado frente a NGI tanto en cabras como en ovejas. En cabras, resulta eficaz frente a *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Hoste *et al.*, 2004). La eficacia de este fármaco también ha sido constatada por otros autores (Cingloli *et al.*, 2003) en ovinos frente a *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus capricola*, *Nematodirus spp* y *Chabertia ovina*. Una ventaja de este fármaco es que puede utilizarse en animales en fase de lactación.

En este apartado cabe considerar también a la moxidectina, una milbemicina que ha demostrado ser altamente eficaz frente a *Haemonchus contortus*, llegando a reducir los recuentos fecales de huevos entre un 90% y un 100% a las 48 horas del tratamiento (Tyrrel-Acosta y Jacobs, 1999).

#### 8.1. RESISTENCIA A ANTIHELMÍNTICOS

El uso incontrolado de antihelmínticos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes en todo el mundo. La administración frecuente, el uso repetido del mismo fármaco o grupos de antihelmínticos, la administración de dosis subterapéuticas, unido al elevado potencial biótico de los parásitos y las condiciones climáticas favorables para la supervivencia de los estados larvarios, son algunos de los factores que han favorecido la aparición creciente de

resistencia antihelmíntica (**Cordero del Campillo, 2000**).

El fenómeno de resistencia se debe esencialmente a un cambio en la frecuencia de un gen de una población de vermes, asociado a una selección inducida por drogas, que determina una reducción de la eficacia por debajo del 95% (**Kassai, 1999**).

En España, la primera cita sobre la existencia de cepas de NGI resistentes a antihelmínticos es de 1960 (**Prichord et al., 1980**). Posteriormente, diversos estudios han confirmado la aparición de resistencias a las tres grandes familias de antihelmínticos, sin que la situación, por ahora, parezca tan grave como en otros países (**Álvarez Sánchez et al., 2006; Díez Baños et al., 2008; M. Martínez-Valladares et al., 2011**).

Este problema no fue valorado en su momento, al confiar en que las empresas farmacéuticas comercializarían nuevos fármacos. Sin embargo, durante 25 años han sido muy escasos los nuevos antihelmínticos destinados a animales de abasto, fundamentalmente por razones económicas (**van Wyk et al., 2006**).

Recientemente, han sido descubiertos nuevos grupos farmacológicos con efecto antihelmíntico, lo que permitirá disponer de fármacos, al menos temporalmente, libres de resistencias. Se pueden destacar los derivados del amino-acetonitrilo, en concreto el monepantel (**Kaminsky et al., 2008**), cuya comercialización ya ha sido aprobada en Europa para ganado ovino. Otros grupos de fármacos con estas características son los ciclooctadepsipéptidos (**von Sammson Himmelstjerna et al., 2005**), los spiroindoles (**Sangster, 2009**) o el derquantel (**Little et al 2010**).

En cualquier caso, se hace necesaria una nueva política en el tratamiento de estos parásitos, que implique un uso correcto y racional de los fármacos, con rotaciones de los mismos (**Urquhart et al., 1996; van Wyk, 2001; Sangster, 2009**) y tratamiento selectivo de los animales (**van Wyk et al., 2006**), todo ello

acompañado de diferentes medidas de control.

## 9 CONTROL Y PROFILAXIS

El control de la parasitación por NGI pretende evitar la aparición de la enfermedad en los momentos en que los animales son más susceptibles (**Kassai, 1999**) y, en la medida de lo posible, fomentar también el desarrollo de la inmunidad frente al parásito, mejorando con ello el rendimiento productivo de los animales

Las medidas de manejo encaminadas a minimizar los riesgos de infección y la realización de tratamientos estratégicos con antihelmínticos son dos de los métodos tradicionales para controlar las enfermedades por NGI (**Urquhart *et al.*, 1996**).

### 9.1 MEDIDAS DE MANEJO

Si se dispone de datos medioambientales de la región (pluviometría, temperatura, humedad y otros relacionados con la epidemiología de la enfermedad) es posible estimar cuando existen más riesgos de acumulación de larvas e incluso intuir cuál será la severidad previsible de la infección en el rebaño (**Kassai, 1999**). Todo ello imposibilita aplicar una misma pauta profiláctica en todas las explotaciones ganaderas (**Georgi y Georgi, 1990**). Las medidas de manejo en pastoreo se basan en la especificidad de hospedador (pastoreo mixto por especies), en la resistencia adquirida (pastoreo separado por edades), o en el empleo de pastos poco o nada contaminados (pastoreo rotacional, uso de barbechos, quema de pastos, etc.). Estas medidas complementan el uso de antihelmínticos. Su objetivo es lograr que los animales pasten en hierba no contaminada por especies de parásitos frente a los que son susceptibles. En general, la buena gestión del pastoreo no puede llegar a significar el control absoluto de las infecciones por NGI, pero, cuando menos,

debería suponer una medida complementaria fundamental para que dicho control sea efectivo (**Stear *et al.*, 2007**).

## 9.2 QUIMIOPROFILAXIS

El control de las parasitosis producidas por NGI depende en su mayoría del uso como profilácticos de los antihelmínticos. Existen otros métodos complementarios o alternativos, pero a pesar de ello, hoy en día es indispensable el uso de fármacos eficaces para un control adecuado de las gastroenteritis parasitarias, y es muy posible que la quimioprofilaxis siga jugando un importante papel, al menos a corto-medio plazo (**van Wyk *et al.*, 2006**).

El objetivo del tratamiento profiláctico con antihelmínticos es eliminar las dos fuentes principales de contaminación del pasto: los huevos eliminados en periparto y las larvas que han sobrevivido al invierno en climas templados, o al verano en zonas tropicales o subtropicales (**Soulsby, 1987**).

Pero el empleo de antihelmínticos como estrategia de profilaxis es, sin embargo, costoso ya se suelen tratar todos los animales del rebaño; además, se favorece el desarrollo de resistencias, como ya se mencionó anteriormente.

## 9.3 MÉTODOS COMPLEMENTARIOS

El uso combinado de antihelmínticos y medidas de manejo en pastoreo debería ser suficiente para controlar los NGI. Sin embargo, en la actualidad existen algunos elementos que han comprometido la eficacia de dichos métodos.

A la aparición del fenómeno de resistencia antihelmíntica ante considerado, se une la preocupación del consumidor por la presencia de residuos farmacológicos en los alimentos de origen animal, y crece la demanda de productos de ganadería ecológica, en la que la administración de fármacos está

restringida.

Estas razones han llevado a buscar métodos alternativos para el control de las gastroenteritis parasitarias o, al menos que complementen la profilaxis mediante el uso de antihelmínticos.

### 9.3.1 Control biológico

Todos los organismos vivos, y por tanto también los parásitos, tienen un desarrollo limitado por factores abióticos (especialmente el clima y los requerimientos nutritivos), o por factores bióticos, esencialmente los parásitos, los depredadores y los competidores.

Uno de los métodos alternativos de control biológico con el que se han obtenido exitosos resultados es el uso de microsporas del hongo nematocida *Duddingtonia flagrans* (FAO, 2002; Waller *et al.*, 2004; Waller y Chandrawathani, 2005, Gómez-Rincón *et al.*, 2006, 2007). Diversos ensayos han demostrado que los estadios larvarios de los NGI pueden quedar atrapados por *Duddingtonia flagrans*, por lo que el hongo tendría capacidad potencial de disminuir el número de larvas en los pastos, reduciendo con ello la intensidad y gravedad de las infecciones producidas por estas especies parásitas (Waller *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2008).

El uso de hongos nematocidas representa una opción prometedora para el control de los nematodos gastrointestinales, aunque no está exenta de algunos inconvenientes cuando se quiere conseguir un rendimiento óptimo; en tal caso se requiere la incorporación diaria de esporas, así como de suplementos en la dieta que satisfagan las necesidades de los propios hongos (Waller y Thamsborg, 2005; Stear *et al.*, 2007).

Otro método alternativo consiste en influir en la tasa de descomposición

de la materia fecal, circunstancia que depende del tipo de forraje, así como de la densidad y distribución espacial de las heces (**Niezen *et al.*, 1998; Williams y Warren, 2004**). Las etapas de vida libre de los nematodos se desarrollan en las heces, de modo que un aumento en la tasa de la degradación de la materia fecal podría exponer a las larvas a las inclemencias del tiempo, reduciendo con ello su viabilidad (**Williams y Warren, 2004**).

También se ha constatado, tanto *in vivo* como *in vitro*, la existencia de especies vegetales que poseen actividad antihelmíntica, como por ejemplo la achicoria (*Cichorium intybus*), la lotera (*Lotus corniculatus*) (**Waller et Thamsborg, 2005**), la “seríceo” (*Lespedeza cuneata*) (**Guija *et al.*, 2013**) o la ruda salvaje (*Ruta pinnata*) (**Ruiz *et al.*, 2010**). La actividad antihelmíntica de los extractos vegetales puede ser debida a compuestos activos de diversa naturaleza, pero comúnmente parece estar asociada a la presencia de taninos y polifenoles (**Waller et Thamsborg, 2005**).

### 9.3.2 Suplementación nutricional

Una alimentación adecuada es necesaria para mantener la salud y el bienestar de los animales, y es determinante para evitar el desarrollo de cuadros clínicos en los animales parasitados. Sin embargo, a los beneficios de la alimentación suplementada deben sumarse inconvenientes de carácter económico, como el costo de dichos suplementos y el incremento de trabajo que supone (**Stear *et al.*, 2007**).

Diversas experiencias han demostrado que incrementos en la concentración de proteínas y/o oligoelementos en la dieta permiten al hospedador minimizar los efectos del parásito y aumentar la productividad (**Waller, 1997b; Strain y Stear, 2001; FAO, 2004; Stear *et al.*, 2007**), tal y como se ha demostrado en infecciones por *H. contortus* (**Abbott *et al.*, 1984, 1986, 1988; Wallace *et al.*, 1999**). Del mismo modo, las hembras gestantes que



mantienen una adecuada condición corporal, gracias a los aportes energéticos extras, muestran una reducción de los recuentos de huevos en heces durante el periodo del periparto (**Valderrábano *et al.*, 2006**).

### 9.3.3 Respuesta inmune

Además del medio ambiente y la suplementación nutricional, la respuesta inmunitaria desarrollada por los hospedadores frente al parásito interviene de forma decisiva en el desarrollo del nematodo. Los animales resistentes suelen tener menor carga parasitaria y los nematodos hembra que se desarrollan en estos animales son, por lo general, son menos prolíficas (**Stear y Bishop, 1999**). Asimismo, los huevos producidos son menos viables (**Jorgensen *et al.*, 1998**) y en el caso de llevarse a término su eclosión, las larvas desarrolladas suelen requerir un periodo más prolongado para completar su ciclo en el medio (**Stear *et al.*, 2007**).

### 9.3.4 Vacunación

Debido a las dificultades a la hora de controlar las infecciones por NGI, quizás ningún área de investigación se ha potenciado de forma tan intensa como la vacunación (**Emery, 1996; Smith, 1999; Dalton *et al.*, 2003; Knox *et al.*, 2003; Vercruyse *et al.*, 2004**).

En el desarrollo de vacunas frente a este grupo de parásitos se han usado, básicamente, las siguientes estrategias:

- Vacunas con larvas atenuadas (**Anon, 1959; Jarrett *et al.*, 1960; Armour, 1967; Burger y Pfeiffer, 1969; Smith y Christie, 1979; Stear *et al.*, 1999; Bain, 1999**).
- Vacunas basadas en la inmunidad natural (antígenos somáticos

expuestos y de E/S) (Schalling *et al.*, 1997; Vervelde *et al.*, 2002; Geldhof *et al.*, 2002., Meeusen y Piedrafita, 2003).

- Antígenos somáticos ocultos (Munn, 1997; Newton & Munn, 1999; Smith, S.K., 1999; Smith, W.D. *et al.*, 2000; Knox *et al.*, 2003; Miller & Horohov, 2006; Taylor *et al.*, 2007).

Pero los resultados hasta ahora no han permitido el desarrollo de vacunas comerciales, a diferencia de lo que ocurre con muchas bacterias y virus (Kassai, 1999).

### 9.3.5 Utilización de la selección genética

La selección genética ha estado ligada a la ganadería desde sus inicios facilitando, en muchos casos de forma indirecta, la cría de individuos resistentes a los parásitos. Sin embargo, no fue sino hasta el desarrollo de la genética moderna cuando se produjo un mayor avance en la utilización de esta herramienta como una forma de lucha frente a los parásitos. A pesar de la controversia que la selección de animales resistentes suscita, algunos autores la consideran sostenible, posible y deseable (Stear *et al.*, 2001).

Actualmente, se pueden considerar tres estrategias básicas de selección frente a los nematodos que nos ocupan: selección entre razas, el mestizaje y la selección dentro de la misma raza (Nicholas, 1987).

- Selección entre razas

Existen diferentes razas genéticamente resistentes a las gastroenteritis parasitarias de los pequeños rumiantes. Suelen ser razas locales, muy adaptadas al hábitat en el que viven, capaces de evitar el establecimiento y/o el

consiguiente desarrollo de la infección parasitaria. Esta circunstancia les permitiría mantener la producción a pesar de presentar una infección por NGI, de ahí el interés de la FAO en conservar y potenciar este tipo de razas (FAO, 2004).

Un claro ejemplo lo muestra las diferencias en cuanto a resistencia frente a *H. contortus* entre distintas razas de ovejas. Así, en Kenia, las razas indígenas son más resistentes que las razas importadas, tales como la Dorper (Mugambi *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1999; Nguti *et al.*, 2003). En la Costa del Golfo, la raza nativa es más resistente que otras razas como la Suffolk (Bahirathan *et al.*, 2000). Asimismo, la St Croix (Gamble y Zajac, 1992) y la barbados de vientre negro del Caribe (Yazwinski *et al.*, 1979; 1981) son razas notablemente resistentes frente a *H. contortus* (Stear *et al.*, 2007). Recientemente, también se ha observado que algunas razas ovinas canarias podrían presentar cierta resistencia natural a las infecciones por *H. contortus* (Gonzalez *et al.*, 2008).

También se han descrito razas caprinas que son resistentes de manera natural frente a las infecciones por *H. contortus*, por ejemplo la cabra enana de África Occidental (Chiejina *et al.*, 2002; Behnke *et al.*, 2006) o las razas indígenas de Thai (Pralomkarn *et al.*, 1997). También la cabra pequeña del Este de África muestra una mayor resistencia a las infecciones por NGI que otras razas más seleccionadas (Baker *et al.*, 1998).

- Mestizaje

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre mestizaje se han llevado a cabo en el ganado vacuno; como resultado se han obtenido razas mestizas, como la Belmont Red, con resistencia natural a las infecciones parasitarias (Mackinnon *et al.*, 1991).

Del mismo modo, el cruce entre las razas ovinas Border Leicester y

Merino se ha constatado que determina individuos que son más resistentes que las ovejas de raza pura Merino (**Donald et al., 1982**). Asimismo, en Nueva Zelanda, cruces entre ovejas Texel y ovejas Romney mostraron un menor recuento de huevos en heces que la raza pura Romney en infecciones naturales por NGI (**Niezen et al., 1996**).

- Selección dentro de raza

Los criterios para realizar la selección dentro de una raza suelen constar de 3 pasos: elegir los caracteres que queremos mejorar (objetivo de selección), la elección de los criterios de medida (criterio de selección) y la ponderación relativa de los rasgos (índice de selección) (**Nicholas, 1987**).

La respuesta a selección depende de la heredabilidad, que se define como el porcentaje del total de variación entre animales para un rasgo en particular y que se debe a los genes que han heredado (el resto es atribuible al medio ambiente) (**Nicholas, 1987**).

El recuento de huevos en heces es uno de los parámetros más ampliamente utilizado para medir la resistencia a la infección por nematodos. Diferentes estudios han demostrado que la heredabilidad de este parámetro está en el rango de 0,2 a 0,4 en ovejas (**Bisset et al., 1992; Sreter et al., 1994; Gruner et al. 2001; Morris et al., 2000**) y en el ganado bovino (**Leighton et al., 1989; Stear et al., 1990; Morris et al., 2003**). Estos valores de heredabilidad indican una rápida respuesta a la selección para la reducción del recuento del número de huevos fecales (**Stear y col, 2007**). **Bishop y Stear (1997)** desarrollaron un modelo para este tipo respuesta hereditaria, demostrando respuestas rápidas a la selección con una reducción entre 2-5 veces del recuento de huevos en heces durante un periodo de 10 años. Sin embargo, estos resultados deben ser tratados con cierta cautela, ya que no tienen en cuenta, entre otros factores, las condiciones meteorológicas que pueden afectar la intensidad de la infección (**Stear et al., 2007**).

Además del recuento fecal de huevos, se han utilizado otros marcadores de la selección, que por lo general se pueden agrupar en alguno de los siguientes tipos:

- Marcadores basados en mediciones fenotípicas, como niveles de anticuerpos específicos o marcadores moleculares (**Douch et al., 1996**), que son conocidos como indicadores de rasgos.

-Marcadores basados en el polimorfismo genético, conocidos como marcadores genéticos.

Los marcadores moleculares genéticos son probablemente más importantes que los indicadores de rasgos (**Dominik, 2005**). Sin embargo, éstos no pueden mostrar asociaciones coherentes como los indicadores de rasgos, como por ejemplo el recuento de huevos en heces. Solamente la realización de necropsias de infecciones controladas proporcionan una valoración real de la resistencia a los parásitos, para distinguir marcadores genéticos fiables a partir de marcadores que muestran asociaciones casuales en ensayos de campo (**Stear et al., 2007**).

En *T. circumcincta* se han encontrados marcadores genéticos como el complejo mayor de histocompatibilidad (**Schwaiger et al., 1995; Paterson et al., 1998; Charon et al., 2002; Sayers et al., 2005; Stear et al., 2005**) y el locus del interferón gamma (**Coltman et al., 2001**), aunque en ambos casos, las mutaciones causantes aún no se han identificado (**Stear et al., 2007**). El complejo mayor de histocompatibilidad también podría ser un marcador de resistencia frente a *T. colubriformis* (**Hulme et al., 1993**), pero probablemente no para *H. contortus* (**Cooper et al., 1989; Blattman et al., 1993; Crawford et al., 1997**).

## 10 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

### 10.1 INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune protectora que desarrollan los rumiantes frente a los NGI es el resultado de una compleja interacción entre mecanismos específicos e inespecíficos vinculados tanto a la inmunidad celular como a la humoral (**Miller, 1984; González et al., 2003**). Así, el bloqueo de sus mecanismos efectores celulares mediante la administración de corticoides genera infecciones experimentales más intensas de diversos tricostrongídeos tales como *T. colubriformis* y *H. contortus* (**Adams, 1988; Jackson et al., 1988; Emery et al., 1992; Peña et al., 2004**). A su vez, la exposición a NGI provoca un incremento en los niveles de inmunoglobulinas específicas, tanto en el suero como en las mucosas locales (abomaso), hasta el punto de que muchos autores utilizan dichos niveles para evaluar el grado de exposición a estos parásitos (**Ploeger et al., 1990; Schallig et al., 1995; Martínez Valladares et al., 2005a; Molina et al., 2009**).

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que generan esta protección y su base genética son aspectos de gran importancia para optimizar la capacidad inmunogénica y protectora que podrían proporcionar futuras vacunas, o la identificación de dianas terapéuticas (**Miller y Horohov, 2006; Piedrafita et al., 2010**).

### 10.2. FACTORES QUE MODULAN LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune frente a los NGI se encuentra afectada por distintos factores, dependientes del hospedador, del parásito y del manejo al que se encuentran sometidos los animales (**González et al., 2003; O'Connor et al.,**

2007).

#### 10.2.1. Edad

Diversos estudios han mostrado que los corderos y cabritos de menos de un año de edad son más susceptibles que los animales adultos (**Kassai, 1999; Schallig, 2000; Miller y Horohov, 2006**). En animales inmunizados con fracciones proteicas purificadas también se ha observado que la eficacia de la inmunización podría verse modificada por la edad (**Vervelde et al., 2002**), protegiéndose los animales de 6 meses, pero no así los de 3 (**Knox et al., 1999; Ruiz et al., 2004a; Martín et al., 2011**). Algunos autores sugieren que la relación entre la edad y el desarrollo de una inmunidad adquirida menos eficiente es debida más a la falta de resiliencia por parte de los corderos que a una deficiencia inmunológica específica (**Halliday et al., 2010**).

#### 10.2.2. Sexo

Tradicionalmente se ha considerado que los machos de los rumiantes son más susceptibles que las hembras a las infecciones por NGI (**Asanji, 1988; Barger, 1993; Mandonnet et al., 2003**), lo que se manifiesta en recuentos fecales de huevos, tasas de establecimiento larvario y cargas parasitarias mayores (**Aumont et al., 2003; Gauly et al., 2006**). En infecciones experimentales con *H. contortus* en Scottish Blackface, **Stear et al., 1995a** estimaron que la influencia del sexo del animal y sus interacciones sobre el peso podrían ser responsables de una variación del 14 % en la carga parasitaria. Sin embargo, esta circunstancia podría verse afectada por el estado hormonal, como se comentó anteriormente. Por todo ello, se recomienda habitualmente realizar experimentos de inmunización con animales de un único sexo (**Adams, 1989**).

#### 10.2.3. Especie, raza e individuo

Entre los pequeños rumiantes, se ha considerado una mayor susceptibilidad a las infecciones por NGI del caprino respecto al ovino, hecho que se refleja en distintos parámetros inmunológicos y parasitológicos

(**Huntley et al., 1995, Hoste et al., 2008**). Las cabras, en particular, muestran dificultades para establecer una respuesta inmunitaria protectora tras inoculaciones repetidas de L3 de *H. contortus* y *T. circumcincta*, a diferencia de lo que ocurre en las ovejas (**González, 2002**). Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta a la hora de aplicar programas de control en sistemas de explotación en los que conviven ambas especies, circunstancia muy habitual en la ganadería de las Islas Canarias. Evidentemente, este hecho diferencial deberá valorarse al escoger métodos de control alternativos al uso de fármacos.

Existe una variación importante entre razas e individuos en la resistencia a NGI, probablemente causada por diferencias genéticas (**Sayers y Sweeney, 2005; Stear et al., 2007**). Diversas experiencias en corderos han estimado que existe una alta heredabilidad (0,3) en los recuentos fecales de huevos de NGI en la primera y segunda estación de pastoreo, lo que indica que corderos con recuentos bajos probablemente serán adultos con recuentos bajos de huevos en heces (**Stear et al., 2000a**). Esta circunstancia puede ser aprovechada para disminuir los niveles de parasitación en el rebaño mediante selección reproductiva, como quedó reflejado anteriormente.

#### 10.2.4. Estado hormonal

La compleja interacción que se establece entre el sistema endocrino del hospedador y los agentes parasitarios puede llegar a modificar la respuesta inmune (**Suárez, 2007**). Algunas especies parásitas se benefician directamente del efecto de determinadas hormonas que estimulan su crecimiento y multiplicación (**Escobedo et al., 2005**) o bien lo hacen indirectamente, al inducir determinados estados hormonales o situaciones de inmunodepresión de las que se benefician los parásitos.

Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos inmunitarios implicados en la influencia hormonal sobre el desarrollo parasitario, pero sí se sabe que durante el periparto se produce un incremento de la susceptibilidad de



los animales a adquirir nuevas infecciones, así como un incremento de la fecundidad de los vermes adultos, además de una maduración de las larvas hipobióticas (**Soulsby, 1987**). Algunos autores atribuyen a la prolactina algún papel en este fenómeno que experimentan las ovejas en torno al parto, puesto que, al administrarla en corderos antes o después de ser inoculados con *H. contortus*, induce un aumento en los recuentos fecales de huevos y de la fecundidad de las hembras del parásito (**Fleming, 1993**). Sin embargo, no existe acuerdo unánime, puesto que otros autores no han logrado reproducir estos efectos en ovinos inoculados con *T. circumcincta* (**Jeffcoate et al., 1990; Barger, 1993**).

La influencia de las hormonas adrenales en las infecciones por otras especies parásitas como *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica* y *Schistosoma mansoni* también es un hecho reconocido (**Escobedo et al., 2005**).

#### 10.2.5. Nutrición

La respuesta inmune del hospedador eleva los requerimientos nutricionales y modifica la distribución de los recursos (**Colditz, 2008; Greer et al., 2008**). Por ello, una adecuada alimentación es importante para mantener una respuesta inmune adecuada frente a los parásitos.

Al ser el metabolismo proteico el más afectado durante las infecciones por NGI, un aumento de proteína metabolizable en la dieta puede mejorar la resistencia y la tolerancia a la parasitación, aunque no pueda prevenir el establecimiento inicial del parásito. Por lo que, cuando se suministran dietas con bajos aportes proteicos, las consecuencias de la enfermedad se agravan (**Kassai, 1999; Coop y Kyriazakis, 2001**) y los genotipos más resistentes pueden no mostrar diferencias en su capacidad defensiva en comparación con individuos más susceptibles (**Bricarello et al., 2005; Martínez Valladares et al., 2005b**). Este aporte proteico repercute directamente en la mejora de distintas respuestas efectoras, aumentando los niveles de mastocitos, eosinófilos y leucocitos

globulares en la mucosa, e incrementando los niveles de anticuerpos sanguíneos (**Athanasiadou y Huntley, 2008**).

#### 10.2.6. Tratamientos antihelmínticos

Cuando los tratamientos profilácticos se administran de forma excesiva, puede suceder que no exista contacto entre el parásito y el hospedador, impidiendo el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Por ello se aconseja plantear una quimioprofilaxis que permita cierto grado de parasitación (**Claerebout, 2002; Taylor et al., 2007**). Así, por ejemplo, programas de control que combinen el tratamiento antihelmíntico de los animales jóvenes con el traslado a pastos limpios, pueden provocar que el hospedador no desarrolle ninguna respuesta inmunitaria frente a NGI, siendo estos individuos más susceptibles en sucesivas estaciones de pastoreo que otros animales que no se hayan tratado previamente (**Claerebout et al., 1998 a,b, 1999a**).

#### 10.2.7. Patogenicidad de la cepa parasitaria

La selección por resistencia a fármacos puede haber generado distintos genotipos con diferencias en la inmunogenicidad y patogenicidad de determinadas cepas parasitarias (**Barret et al., 1998**). En ocasiones, resistencia frente a antihelmínticos y mayor patogenicidad pueden ir asociadas, como reflejaron **Kelly et al., 1978** al comparar ovinos inoculados con cepas de *H. contortus* resistentes o susceptibles a los benzimidazoles. Sin embargo, no se trata de una regla fija, puesto que **Macleane et al., 1987** observaron justamente lo contrario con una cepa de *T. colubriformis* resistente a benzimidazoles. Sin embargo, no se han podido constatar diferencias en la inmunogenicidad de las distintas cepas que afectan a los ovinos, aunque sí en su acción patógena, su establecimiento larvario y su fecundidad (**Barret et al., 1998; Aumont et al., 2003**).

### 10.3. INMUNIDAD INNATA FRENTE A PARÁSITOS

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a los parásitos. Comprende una serie de mecanismos celulares y moleculares, presentes antes del encuentro con el agente patógeno, capaces de activarse rápidamente, de modo previo a la aparición de respuestas adaptativas. Estos mecanismos pueden reconocer los antígenos sin gran capacidad de discriminación, es decir, con independencia del tipo de antígeno identificado, aunque no parecen estar capacitados para desarrollar memoria inmunológica. Una serie de barreras físicas, químicas o biológicas previenen la entrada del agente infeccioso o parasitario; una vez que éste ha superado estas barreras, y ha entrado en el organismo, intervienen células y factores solubles (**Cutuli, 2007; de Veer et al. 2007**).

En el aparato digestivo hay múltiples mecanismos de inmunidad innata; dentro de las barreras externas, el pH gástrico y las enzimas contenidas en el mucus, así como la flora bacteriana, constituyen las principales. En el caso de que algunos agentes patógenos superen estas barreras, entran en acción las células fagocitarias (macrófagos y neutrófilos), una subpoblación de linfocitos conocidos como células asesinas naturales (NK, *del inglés Natural Killer*), y diversos factores solubles, tales como los componentes de la vía alternativa del complemento, citoquinas y otros mediadores químicos de la inflamación (**Cutuli, 2007; Collado et al., 2008**).

Entre los componentes que constituyen la inmunidad innata, serán mencionados a continuación aquellos que podrían tener un papel relevante en la respuesta frente a NGI, al menos teóricamente, los receptores tipo Toll, los linfocitos T  $\gamma\delta$  y la subpoblación de linfocitos B-1a.

Los **receptores tipo Toll** (TLR, del inglés *toll-like receptors*) presentes en la membrana de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen-*

*presenting cells*), tales como macrófagos, células dendríticas y algunas células epiteliales, son los encargados del reconocimiento del antígeno y activación de los fagocitos. Estos receptores detectan moléculas expresadas frecuentemente por los agentes exógenos que no están presentes en los hospedadores, denominadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) (Tizard, 2009). Inducen señales internas que promueven, entre otras acciones, la destrucción microbiana en el fagosoma, la liberación de citoquinas estimuladoras de la inflamación, y la activación de los leucotrienos (Werling *et al.*, 2006). El papel de los TLR en el reconocimiento de antígenos parasitarios y la activación de la respuesta efectora ha sido poco estudiada hasta el momento, y algunos autores sugieren que podrían tener gran relevancia en el desarrollo de este tipo de respuestas (Jackson *et al.*, 2006; Vanhoutte *et al.* 2007). En ovinos y bovinos se han identificado homólogos de los diez TLR reconocidos hasta el momento en humanos (Menzies e Ingham, 2006).

Dentro de los linfocitos B existe una subpoblación importante a la que se asigna un papel específico en la inmunidad innata, son los denominados **linfocitos B-1a**. Estas células expresan, junto con otras, el marcador CD5, estimándose en el vacuno que un 5-35% de los linfocitos B de sangre periférica corresponde a esta subpoblación (Howard y Morrison, 1994). Sintetizan principalmente IgM de baja afinidad y especificidad antigénica. Estos anticuerpos podrían jugar un papel importante como primera barrera frente a agentes invasores o componentes dañados del organismo, activando respuestas independientes de linfocitos T (Arjona, 2007).

Los **linfocitos T  $\gamma\delta$** , denominados así por el tipo de cadenas presentes en su receptor TCR (del inglés, *T-cell receptor*), intervienen en las respuestas innatas llevando a cabo funciones efectoras y secretando citoquinas que estimulan la respuesta inmune adaptativa de base celular (Cutuli, 2007). En los rumiantes, los linfocitos T  $\gamma\delta$  son especialmente abundantes, pudiendo constituir

el 60 % de los linfocitos circulantes en animales jóvenes, frente al 5-15 % habitual en la especie humana y en ratones (Tizard, 2000). Gran parte de los linfocitos T  $\gamma\delta$  expresan en su superficie un marcador de activación específico denominado WC-1 (del inglés, *Workshop cluster*). Las funciones de esta molécula no se conocen en profundidad, pero las células que los expresan son siempre T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (Howard y Morrison, 1994).

El aumento de la población de linfocitos B y T  $\gamma\delta$  en la mucosa, en detrimento de la de linfocitos T  $\alpha\beta$ , es un hallazgo frecuente en vacunos durante el curso de una infección primaria por *O. ostertagi*, aunque no siempre asociado a protección (Almería *et al.*, 1997a). En el ovino y caprino se han realizado estudios histopatológicos de la mucosa abomasal en animales inoculados primariamente con *H. contortus* en los que se han encontrado elevadas cantidades de linfocitos T  $\gamma\delta$  entre los días 3 y 13 pi, sugiriéndose la intervención de este tipo de linfocitos en respuestas rápidas frente al parásito (Balic *et al.* 2000a; Pérez *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio anterior en ovinos parasitados con *T. colubriformis* reveló que la depleción de linfocitos T WC1<sup>+</sup>, realizada con anticuerpos monoclonales, mejoraba la respuesta frente a una inoculación desafío en un 88% (McClure *et al.*, 1996). Estos resultados son difíciles de comparar, debido a la variedad de especies parásitas y protocolos utilizados en cada caso, si bien señalan que la población de linfocitos T  $\gamma\delta$  estaría jugando un papel importante en la respuesta inmune frente a NGI, ya sea favoreciendo o dificultando la implantación de los parásitos.

#### 10.4. INMUNIDAD ADAPTATIVA FRENTE A PARÁSITOS

La respuesta inmune adaptativa es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado que la inmunidad innata. Sus respuestas son específicas frente al antígeno que han reconocido, y tienen la capacidad de desarrollar una memoria inmunológica. Se activa cuando los agentes patógenos han superado las barreras

de la inmunidad innata y han penetrado en el organismo. Tarda varios días en instaurarse, tiempo necesario para que el hospedador reconozca el antígeno y se produzca la diferenciación de los linfocitos T y B (McClure *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, se considera que la inmunidad adaptativa contiene dos tipos de mecanismos con la finalidad común de eliminar los agentes extraños del hospedador. Por una parte, la **inmunidad celular**, mediada fundamentalmente por los linfocitos T, y por otra, la **inmunidad humoral**, mediada por los anticuerpos.

Independientemente del tipo de mecanismo que se ponga en marcha, su desarrollo se divide en tres fases: reconocimiento del antígeno, activación de los linfocitos y respuesta efectora.

#### 10.4.1 Presentación del antígeno y orientación de la respuesta inmunológica

El inicio de la respuesta inmune adaptativa se produce con el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos **T CD4<sup>+</sup>**; este antígeno es presentado a los linfocitos por células presentadoras de antígeno, unido a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (**MHC II**, del inglés *major histocompatibility complex*). El reconocimiento por el TCR específico, desencadena una señal de activación que permite establecer interacciones de alta afinidad entre el **TCR** y el **MHC II**, tras lo cual, otras moléculas de membrana contribuyen a la activación del linfocito T que ha contactado con su antígeno específico. Estas moléculas, denominadas coestimuladoras, desencadenan una segunda señal de activación que amplifica la primera. De estas moléculas, la más importante es el CD28. En ausencia de esta segunda señal se produce un efecto contrario a la activación, en un proceso de anergia en el que los linfocitos T específicos del antígeno se vuelven refractarios a cualquier activación.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, tanto por las primeras como por las segundas señales, quedan alojados en el órgano linfoide secundario en el que han contactado con el antígeno, multiplicándose durante 4-6 días, periodo durante el cual no se pueden detectar linfocitos T específicos circulantes. Posteriormente podrán ser detectados en sangre y linfa, ya como células activadas.

Otro tipo de presentación antigénica se produce cuando las células infectadas presentan antígenos específicos unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (**MHC I**), expresado por casi todas las células del organismo. En este caso los linfocitos que reconocen el antígeno son los **T CD8<sup>+</sup>**. El resultado de esta interacción es la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y su transformación en células con alta capacidad citotóxica denominadas linfocitos citolíticos. Este tipo de linfocitos produce la lisis de la célula diana mediante la liberación de una serie de moléculas, principalmente perforinas y granzimas, presentes en vesículas de secreción, o bien a través de la activación de los mecanismos de apoptosis (**Aparicio, 2007**); ambos constituyen los principales mecanismos defensivos frente a virus y bacterias intracelulares que infectan diversos tipos de células (**González, 2007**).

Las **células dendríticas** son células presentadoras de antígeno, y sus características funcionales y morfológicas las convierten en indispensable para la interacción entre la inmunidad innata y adquirida. Están especializadas en capturar y presentar antígenos, siendo las únicas capaces de activar la subpoblación de linfocitos T (**Akesson et al., 2008; McNeilly et al., 2009**). Algunos autores señalan que este tipo de células podrían tener un papel crucial en la orientación de la respuesta hacia Th1 o Th2 (**Belkaid y Oldenhove, 2008; Diebold, 2008**). De modo excepcional, las células dendríticas no infectadas pueden presentar antígenos en el contexto del MHC I, produciendo la activación del linfocito T CD8<sup>+</sup>, pero sin desencadenar la destrucción de la célula, en un mecanismo denominado “presentación cruzada” (**Albert et al., 1998**).

- Orientación de la respuesta inmune adaptativa (Th1/Th2, Treg, Th17)

Se ha demostrado que los linfocitos T colaboradores (Th, del inglés *T-helper*) se subdividen en dos subpoblaciones claramente diferenciadas, denominadas **Th1** y **Th2** (Urban *et al.*, 1992). Este tipo de linfocitos se diferencian fundamentalmente por las citoquinas que producen, que orientarán la respuesta inmune hacia mecanismos efectores para la destrucción de patógenos intracelulares, fundamentalmente (respuesta Th1) o extracelulares (Th2) (Paul y Seder, 1994; van den Ham *et al.*, 2013).

Inicialmente se ha asociado una respuesta Th1 a una mayor susceptibilidad a las infecciones con NGI, mientras que la respuesta del tipo Th2 se relacionaría a una mayor resistencia (Nakamura *et al.*, 2002). Sin embargo, el que el balance entre estas dos respuestas determine el grado de susceptibilidad/resistencia a este tipo de nematodos ha sido recientemente revisado (Venturina *et al.*, 2013), ya que habitualmente se observa una expresión de INF $\gamma$  e IL-12 a pesar de predominar una respuesta Th2 (Almería *et al.*, 1997b; Meeusen *et al.*, 2005; Pernthaner *et al.*, 2005). Del mismo modo, en ovinos infectados con *T. circumcincta*, además de observarse una respuesta Th2 en el curso de la infección (con un aumento en los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 en los linfonódulos abomasales) (Craig *et al.*, 2007), se detectaron incrementos de citoquinas asociadas a una respuesta Th1 temprana, además de un aumento en los niveles de expresión de IL-10 y TGF $\beta$ , citoquinas que están relacionadas con los linfocitos Treg, al menos en la especie humana y en roedores (Beissert *et al.*, 2006; Askenasy *et al.*, 2008).

Recientemente, la subpoblación linfocitaria Th17 también se ha sugerido que podría intervenir en el curso de las infecciones por NGI. Este tipo de respuesta se ha descrito asociada a infecciones bacterianas a nivel de las mucosas (Korn *et al.*, 2009), así como en enfermedades inflamatorias autoinmunes (Peck y Mellins, 2009). En corderos infectados con *T.*



*circumcincta*, se observó en los seleccionados por su susceptibilidad a la infección (alto recuento de vermes adultos y huevos fecales, bajos niveles de IgA) mayores daños patológicos, asociados con una fuerte infiltración inflamatoria en el abomaso y con un aumento de los niveles de citoquinas asociadas a la respuesta Th17 (IL-6, IL-21 e IL-23A) en los linfonódulos abomasales, los cuáles se correlacionaron positivamente con la carga de vermes adultos y con los recuentos fecales (**Gossner et al., 2012**). Estos datos apoyan la hipótesis según la cual las ovejas con infecciones crónicas por NGI desarrollarían una respuesta inflamatoria Th1 o Th17 que inhibiría la producción de anticuerpos, permitiendo la persistencia de la infección (**Venturina et al., 2013**).

- Teoría común de la mucosa

Estudios realizados en roedores han demostrado interacciones entre determinadas estructuras de la mucosa y los linfonódulos locales. Estos circuitos de migración celular se exponen en la denominada “teoría común de la mucosa”. Su extrapolación a los rumiantes ha de ser realizada con precaución, dado que aún no hay suficientes estudios que la confirmen.

Este hecho implicaría una migración linfocitaria desde los tejidos linfoides de la mucosa a los linfonódulos locales y posterior retorno a su lugar de origen en la mucosa. En este modelo jugarían un papel fundamental las denominadas células M, células epiteliales especializadas que se localizan sobre las placas de Peyer, capaces de capturar antígenos y transportarlos hacia el interior de la placa, donde se produce la estimulación linfocitaria (**Owen, 1999; Nicoletti, 2000; Kanaya, 2007**). Posteriormente, los linfocitos B y T viajan a los linfonódulos locales donde se multiplican. Estos linfocitos diferenciados, especialmente las células de memoria, son capaces de retornar a la mucosa digestiva, coordinando una respuesta local específica (**González et al., 2003**).

#### 10.4.2. Respuestas linfocitarias

Tras la presentación del antígeno al linfocito T, éste regula las respuestas efectoras frente al parásito. En los rumiantes, algunos estudios han demostrado la importancia del papel de los linfocitos T en la protección frente a NGI, por ejemplo, **Smith 1984, 1986** observaron que la transferencia de linfocitos procedente de la linfa gástrica de ovinos inmunizados frente a *H. contortus* o *T. circumcincta* son capaces de inducir una respuesta inmune protectora frente a estos parásitos. Posteriormente, otros estudios han demostrado que la depleción *in vivo* de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante anticuerpos monoclonales anti-CD4 suprime la inmunidad frente a *H. contortus* en ovinos genéticamente resistentes (**Gill et al., 1993a**) o con inmunidad adquirida previamente frente al parásito (**Karanu et al., 1997**).

En general, la infección con NGI produce un incremento en el número de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales. Sin embargo, las poblaciones linfocitarias que ven incrementado su número varían con la especie parasitaria, el hospedador y el tipo de infección (primaria o secundaria) (**Balic et al., 2000b**).

- Respuestas linfocitarias en inoculaciones primarias

La infección primaria por NGI genera cambios celulares significativos, tanto en los tejidos como en los ganglios linfáticos adyacentes. Sin embargo, se observan marcadas diferencias entre las reacciones que tiene lugar durante el desarrollo larvario y la infección por el verme adulto, así como en infecciones producidas por diferentes especies de nematodos (**Balic et al., 2000**).

En infecciones experimentales con L3 de *Cooperia* spp., *H. contortus*, *O. ostertagi* y *T. colubriformis*, las respuestas linfocitarias se muestran variables en grado, duración y consistencia, si bien suelen acontecer entre los 7 y 14 dpi

(Adams, 1978). La situación es más compleja en animales jóvenes; así, los linfocitos sanguíneos reactivos a antígeno en corderos infectados por *H. contortus* no se detectan en animales de menos de 4 meses de edad (Lloyd y Soulsby, 1987).

Las modificaciones de la actividad linfoproliferativa, en el caso de las infecciones primarias, se acompaña de cambios en cuanto al número y tipos de linfocitos presentes en los tejidos. Así, en infecciones primarias con *O. ostertagi* en vacunos se pueden observar hasta siete veces más linfocitos en la mucosa de terneros inoculados en relación con los recuentos observados en animales controles no infectados, alcanzando un pico máximo al cuarto dpi y retornando a los niveles basales a los 28 dpi. Las poblaciones de linfocitos B y  $T\gamma\delta^+$  sufren por su parte el mayor incremento, siendo éste menos relevante en los linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Este incremento del número de algunas poblaciones linfocitarias llega a traducirse en un aumento del peso de los linfonódulos abomasales, 12 veces mayor en los animales inoculados que en los controles el día 28 pi (Almería *et al.*, 1997a).

Por su parte, caprinos que recibieron una inoculación primaria con *H. contortus*, mostraron un incremento en la cantidad de linfocitos T en la mucosa abomasal a los 11 dpi, y de linfocitos T  $CD4^+$  y  $\gamma\delta^+$  entre los días 10 y 13 pi, con un incremento menos pronunciado de la subpoblación  $CD8^+$ . En linfonódulos locales el máximo incremento se observó en el número de los linfocitos B (Pérez *et al.*, 2003; 2008).

- Respuestas linfocitarias en inoculaciones secundarias

En animales previamente infectados suele producirse una respuesta más rápida y pronunciada de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales (Smith *et al.*, 1983; Balic *et al.*, 2002; Halliday *et al.*, 2009). Especialmente se producen

aumentos de las poblaciones linfocitarias T CD4<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta^+$  y B en aquellos animales en los que se observa un rechazo tardío de las larvas.

Ovinos previamente sensibilizados frente a *H. contortus* muestran una escasa infiltración linfocitaria en la mucosa y linfonódulos después de evitar el establecimiento de las larvas en el tejido (**Balic et al., 1999; 2002**), pero por el contrario se producen incrementos significativos en las células T  $\gamma\delta^+$ , B y T CD4 cuando las larvas invaden los tejidos, de forma similar a lo observado en infecciones primarias (**Balic et al., 2000a; 2002**).

Bovinos previamente infectados con *O. ostertagi* desarrollan un aumento significativo del ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, así como un incremento moderado de linfocitos B, sugiriendo que el aumento de protección podría ir acompañado de un descenso en la activación policlonal de células B observado en las infecciones primarias (**Almería et al., 1998**). Esta misma respuesta también ha sido observada en ovinos resistente a la reinfección con *T. circumcincta*, predominando en el infiltrado celular linfocitos T CD4<sup>+</sup> y células plasmáticas, estas últimas responsables de un incremento posterior de los niveles de IgA específicos (**Halliday et al., 2009**).

En caprinos reinfectados con *H. contortus* se detectó en la mucosa abomasal un fuerte incremento en las poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta^+$ ), células B (CD79  $\alpha^+$ ), así como de células plasmáticas (IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>) en relación con las infecciones primarias (**Pérez et al., 2003; 2008**).

Sin embargo, **Lacroux, 2006** y **Lacroux et al., 2006** no observan ningún incremento en las poblaciones de linfocitos de ovinos inoculados con *H. contortus* y *T. colubriformis* y sacrificados entre 3 y 28 dpi, cuando se comparan animales primoinfectados con otros que recibieron una inoculación secundaria.

En general, por tanto, la respuesta inmune frente a NGI en rumiantes

implica un incremento de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales, especialmente linfocitos T CD4<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y B, tanto en inoculaciones primarias como en inoculaciones secundarias en las que el animal logra rechazar las larvas. En cambio, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no parecen tener especial relevancia, o bien su papel en el desarrollo de los mecanismos defensivos no se encuentra ligado a un incremento manifiesto de su número, coincidiendo con la falta de un papel funcional de los linfocitos CD8<sup>+</sup> observado en infecciones por helmintos en roedores (**Finkelman *et al.*, 1997; Bancroft y Grencis, 1998; Balic *et al.*, 2000b**).

#### 10.4.3. Mecanismos efectores

Los mecanismos responsables de la resistencia frente a los parásitos GI no se conocen en su totalidad, aunque se suelen observar más o menos constantemente algunos cambios en la mucosa y linfonódulos locales en animales resistentes. Entre estos cambios destacan la hiperplasia de los mastocitos de la mucosa, la aparición o el incremento en el número de leucocitos globulares, el aumento de la población de eosinófilos periféricos y en las mucosas, la producción de anticuerpos específicos, tanto a nivel sistémico como en el propio mucus, así como un aumento en la producción de mucus, e incluso la aparición de sustancias inhibitoras de la actividad de las larvas y adultos en el mismo (**Hernández, 2010**).

En rumiantes, el desarrollo de un grado de resistencia efectivo frente a NGI requiere de infecciones repetidas (**Dobson *et al.*, 1990a, Claerebout *et al.*, 1996**). Esto sugiere que una respuesta inmune eficaz por parte del hospedador sólo se consigue tras alcanzar un cierto grado de estímulo, que varía según la especie implicada, la fase del ciclo biológico del parásito e incluso el grado de maduración del sistema inmune del hospedador. El estímulo ha de ser antigénico, pudiendo también estar involucrados otros factores, como la lesión mecánica o enzimática de la mucosa provocada por el parásito (**Balic *et al.***

2000b).

- Mastocitos, basófilos y leucocitos globulares

Los basófilos son células que se localizan a nivel del torrente circulatorio y pueden ser movilizados hacia los focos inflamatorios. Constituyen una población celular bastante homogénea.

Los mastocitos, por su parte, se hallan en los tejidos y pueden responder rápidamente ante la acción de un agente invasor. Existen poblaciones diferenciadas de mastocitos según la composición de sus gránulos: mastocitos del tejido conectivo (CTMC, del inglés *connective tissue mast cells*) y mastocitos de mucosa (MMC, del inglés *mucosal mast cells*). La subpoblación de MMC puede residir en la lámina propia o en el epitelio. Los mastocitos intraepiteliales se caracterizan por tener gránulos de mayor tamaño, especialmente en rumiantes. Se les denomina también leucocitos globulares y se consideran una última fase efectora de la célula, en una localización en la que liberan sus gránulos, los cuales pueden alterar el medio ambiente parasitario con una mínima lesión tisular (**Balic *et al.*, 2000b**).

Por otro lado, los mastocitos y los basófilos son células con características similares, especialmente en lo que se refiere a la composición de sus gránulos y a sus mecanismos de activación. Comparten receptores de membrana para IgE y TLRs (**Arinobu *et al.*, 2005**).

La activación de los mastocitos ocurre generalmente tras contactar con moléculas de E/S del parásito o procedentes del tejido como consecuencia del daño tisular inducido por éste.

Los gránulos citoplásmicos de estas células incluyen potentes mediadores

celulares que son liberados tras la estimulación (mediadores primarios), como proteasas, proteoglicanos o histamina. Los mediadores secundarios son sintetizados tras una adecuada estimulación. Entre ellos se encuentran los leucotrienos, el factor de activación plaquetaria (PAF), la prostaglandina D2 y diversas interleuquinas, entre las que destaca la IL-4. Las consecuencias de la liberación de estas sustancias consisten en vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, contracción de la musculatura lisa y aumento de la secreción de mucus (**Mckay y Bienenstock, 1994**). Con todo ello, se incrementa el peristaltismo y se liberan gran cantidad de líquido a la luz, facilitándose la expulsión de los parásitos. El resultado de la activación de los mastocitos determina, por tanto, la creación de un ambiente hostil para el parásito, que facilita a su vez la activación de otros elementos de la respuesta inmune frente a helmintos (**Balic *et al.*, 2000b**).

Los mastocitos participan también en la inmunidad innata, al poder ser activados directamente por moléculas de la vía alternativa del complemento, por productos bacterianos, así como por otras sustancias. Esta participación en los mecanismos de respuesta innata no es impedimento para que puedan intervenir a modo de puente entre ésta y la inmunidad adaptativa (**Gómez-Lucía *et al.*, 2007**).

La hiperplasia de mastocitos en la mucosa y la aparición de leucocitos globulares son fenómenos frecuentes en roedores y rumiantes infectados con NGI (**Rothwell, 1989; Balic *et al.*, 2000b**), coincidiendo estos procesos con la aparición de parásitos adultos (**Salman y Duncan, 1984; Pfeffer *et al.*, 1996; Winter *et al.*, 1997; Balic *et al.*, 2000a; Lacroux *et al.*, 2006**).

El aumento en el número de mastocitos también aparece frecuentemente asociado a resistencia parasitaria, especialmente cuando se analizan los leucocitos globulares. Diversos estudios en los que se comparan razas ovinas resistentes y susceptibles a NGI han observado recuentos de leucocitos

globulares significativamente mayores en los abomasos de las razas resistentes que en las susceptibles, sin que hubiera diferencias en los recuentos de mastocitos (**Gamble y Zajac, 1992; Bricarello et al., 2004**). Del mismo modo, en otros estudios se han encontrado correlaciones negativas entre carga parasitaria y número de leucocitos globulares (**Douch et al., 1986; Stear et al., 1995b**).

Sin embargo, la acción de estas poblaciones sobre la expulsión de los NGI son bastantes contradictorias. Por un lado, **Emery et al., 1993** observaron una activación de estas células en el proceso de expulsión del parásito en el ganado ovino, mientras que otros autores como, **Huntley et al., 1992** sugieren que el aumento de los mastocitos no es necesario para la expulsión del parásito, ya que hallaron altos niveles de resistencia considerables sin incrementos en los recuentos de este tipo celular. Por consiguiente, parece bastante probable que la eficacia de la acción de los mastocitos dependa de la localización tisular del parásito, siendo más efectivos frente a especies o estadios que se alojen en la mucosa del órgano diana que frente a aquellos que se localicen en la luz del órgano (**Anthony et al., 2007**).

Algunos autores sugieren también que el papel de los mastocitos y de los leucocitos globulares está limitado a la expulsión inmediata de los vermes, siendo muy poco efectivos en la expulsión larvaria más retardada (**Balic et al., 2002**), y que la presencia de mastocitos y leucocitos globulares no es indicativa de su funcionalidad (**Rothwell, 1989; Miller, 1996; Balic et al., 2000b**). Se puede constatar su activación, y el grado de degranulación, si se detectan los distintos mediadores químicos que liberan estas células. Por ejemplo, el estudio de los niveles de proteasas derivadas de los mastocitos (SMCP) en el mucus y en los tejidos muestra su relación con la expulsión inmediata de NGI en animales inmunizados. La mayor susceptibilidad del caprino frente a los NGI podría deberse, al menos parcialmente, a que presentan niveles más bajos de SMCP tisular que el ovino (**Huntley et al., 1995**).



- Eosinófilos

Los eosinófilos constituyen una población celular homogénea, que una vez maduros son transferidos desde la médula ósea a la sangre y de ahí a los tejidos, en los que se pueden encontrar habitualmente, de modo especial en la mucosa digestiva. En infecciones por helmintos es frecuente observar un incremento de los eosinófilos tanto en sangre como en tejidos (**Balic *et al.*, 2000b; Gill *et al.*, 2000; Bricarello *et al.*, 2002**).

Dentro de la composición de sus gránulos existen unas proteínas fuertemente catiónicas, como son la proteína básica mayor, la peroxidasa eosinofílica, la proteína catiónica de los eosinófilos y la neurotoxina derivada de eosinófilos, e hidrolasas lisosomales. También producen lisofosfolipasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y peroxidasa (**Serrano y Uceda, 2007**).

Los eosinófilos activados producen también metabolitos tóxicos derivados de oxígeno y sintetizan un amplio rango de mediadores lipídicos, como prostaglandinas, factor activador plaquetario y leucotrienos. También se ha demostrado su capacidad para producir una serie de citoquinas (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) y quimoquinas (MIP-1 $\alpha$ , RANTES, eotaxina) (**Balic *et al.*, 2000b; Rothenberg y Hogan, 2006**).

Otra molécula liberada por los eosinófilos es la galectina-14, considerada como un buen indicador de la actividad de estas células (**Young *et al.*, 2009**). Los niveles de esta molécula en el mucus aparecen elevados en animales parasitados en comparación con los controles, así como en animales sometidos a un protocolo de inoculaciones repetidas en comparación con los que reciben una inoculación única (**Kemp *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2011**).

- Activación de los eosinófilos

La IL-5 es la citoquina responsable de la eosinofilia dependiente de linfocitos T en sangre y tejidos tras la infección por helmintos (**Balic *et al.*, 2000b**).

Los eosinófilos tienen receptores para algunas proteínas del complemento y para las inmunoglobulinas IgG IgA e IgE (**Balic *et al.*, 2000b; Salinas, 2007**). Es por ello, que se requiere normalmente de una inmunidad adquirida que permita desarrollar anticuerpos específicos para que los eosinófilos puedan adherirse a los parásitos y desarrollar, de este modo, su acción efectora (**Meeusen y Balic, 2000; Salinas, 2007**).

La acción efectora del eosinófilo sobre los helmintos parece estar basada en la degranulación celular sobre el parásito, mediada por la unión de los receptores de membrana a anticuerpos específicos frente a los vermes.

- Eosinofilia en infecciones primarias

La eosinofilia en infecciones primarias por NGI se produce fundamentalmente en asociación a los estadios larvarios, más que a la presencia de los vermes adultos, lo que podría deberse al elevado poder quimiotáctico de las larvas sobre los eosinófilos (**Adams y Colditz, 1991; Wildblood *et al.*, 2005**). Sin embargo, la repercusión de la eosinofilia sobre el asentamiento y desarrollo larvario es escasa, probablemente porque se requiere una mayor activación de los eosinófilos mediada por anticuerpos tal y como sugieren **Meeusen y Balic, 2000 y Terefe *et al.*, 2009**.

Las infecciones primarias de larvas de NGI producen una moderada eosinofilia. En concreto, en infecciones con *T. circumcincta* se observa una eosinofilia tisular a los 10 y 21 dpi (**Stevenson *et al.*, 1994**). En el caso de

ovinos primoinfectados con *H. contortus*, los máximos niveles de eosinófilos en el tejido se observan a los 5 dpi, siendo a los 27 ó 36 dpi la eosinofilia menor, aunque con recuentos mayores que los observados en animales control (**Balic et al., 2000a**).

Por otra parte, **Gill et al., 2000**, hallaron a los 28 días de una primoinfección con L3 de *H. contortus* mayores concentraciones de eosinófilos y mastocitos en la mucosa abomasal de los animales genéticamente más resistentes, sugiriendo estos datos que la resistencia de los animales podría estar relacionada con la presencia de eosinófilos en el tejido (**Gill et al., 2000; Shakya et al., 2009; 2011**).

En el caso de los helmintos con fases larvarias, como por ejemplo *O. columbianum*, se ha podido observar un aumento en los recuentos de los eosinófilos en el momento de la salida de las L 4, a los 5 dpi (**Shelton y Griffiths, 1967**). También se han encontrado mayores niveles de eosinófilos tras la salida al exterior de nematodos adultos (21-23 dpi) de sus estructuras quísticas, como el caso de *Nematodirus battus* (**Winter et al., 1997**).

- Eosinofilia en infecciones secundarias. Inmunidad adquirida

Se ha observado que en las infecciones secundarias por NGI existe un incremento de eosinófilos tanto en sangre como en los tejidos, sensiblemente superior al observado en animales primoinfectados, existiendo una estrecha asociación con las larvas del parásito localizadas en la mucosa (**Shelton y Griffiths, 1967; Stevenson et al., 1994; Balic et al., 2003, 2006**). La acción de los eosinófilos se relaciona de forma importante con un estado de resistencia (**Gill et al., 2000; Shakya et al., 2011**) y con la observación histológica o *in vitro* de su efecto lesivo sobre las larvas del parásito (**Rainbird et al., 1998; Balic et al., 2006**).

Se ha comprobado también cómo los eosinófilos se concentran alrededor de las larvas de *H. contortus* en ovinos previamente inmunizados. Estas larvas presentan diferentes grados de lesión, indicando que los eosinófilos pueden dañar o incluso matar las larvas de nematodos *in vivo* (Balic *et al.*, 2006).

Además de este efecto directo en la larva, los eosinófilos también liberan otras moléculas, como los leucotrienos, capaces de provocar efectos similares a los leucotrienos liberados por los mastocitos (Costa *et al.*, 1997; Weller, 1997).

Por otra parte, se han hallado niveles elevados de eosinófilos en los tejidos de razas e individuos genéticamente más resistentes a la infección (Gill *et al.*, 2000; Bricarello *et al.*, 2002, 2004). En otros casos los recuentos entre razas resistentes y susceptibles han sido similares, a pesar de observarse correlaciones negativas entre los eosinófilos en abomaso y los recuentos de huevos en heces en las razas resistentes (Amarante *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008).

Por el contrario, diversos autores sugieren que el medio ambiente generado por los eosinófilos podría ser beneficioso para los parásitos, debido al daño que producen las enzimas que liberan en los tejidos del hospedador. Los propios eosinófilos son atraídos mediante un efecto quimiotáctico de los productos de E/S tanto de las larvas como de los adultos sobre los eosinófilos (Klion y Nutman, 2004; Wildblood *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2008). Este hecho es especialmente relevante en especies parásitas cuyas fases evolutivas se alojan en las criptas gástricas, como por ejemplo *T. circumcincta* (Balic *et al.*, 2000b). Algunos autores han evidenciado relaciones positivas entre los recuentos de eosinófilos sanguíneos y la longitud de los parásitos adultos, sugiriendo que la presencia de estas células podría favorecer el desarrollo de *T. circumcincta* (Henderson y Stear, 2006), aunque también podría demostrar simplemente un mayor reclutamiento celular ante una mayor biomasa parasitaria.

Los nematodos adultos no suelen inducir eosinofilia, y su expulsión está mediada por los mastocitos. Diferentes estudios sí han demostrado que los eosinófilos están implicados en un fenómeno de expulsión tardía de las larvas que han alcanzado la mucosa. Debido a que los diferentes estadios del parásito expresan distintos antígenos, se requieren varios contactos con el parásito para adquirir inmunidad, explicándose así la mayor efectividad de los eosinófilos en las reinfecciones (**Meeusen y Balic, 2000**).

- Células mucosas y caliciformes

Las células caliciformes se encuentran situadas en el intestino y aparato respiratorio. El abomaso carece prácticamente de ellas, y en su lugar existe un conjunto de células productoras de mucus que tapiza las fosillas en las que se abren las glándulas gástricas y las crestas situadas entre ellas. Se encuentran también células similares en el cuello de las glándulas (**Fawcett, 1991**). Estas células liberan a la luz el mucus que protege la pared abomasal del efecto del HCl y la pepsina.

La hiperplasia de células mucosas y caliciformes, y la modificación de la composición del mucus son fenómenos frecuentes en las infecciones por NGI y parecen estar mediados por las células T (**Nawa et al., 1994; Balic et al., 2000b; Khan y Collins, 2004**). Sin embargo, no existe un acuerdo unánime (**Khan et al., 1995**).

En el ovino, la inoculación tanto de L3 como de adultos de *T. circumcincta* produce un aumento de las células mucosas de la pared gástrica, así como una reducción de la actividad de las células parietales, aumentando el pH del estómago que favorecería la supervivencia larvaria (**Scott et al., 1998a**). En el caso de infecciones por *H. contortus*, la hiperplasia de células productoras de mucus puede acompañarse de una adaptación de las células principales, productoras habitualmente de zimógeno, que podrían producir también mucus

(Scott *et al.*, 1998b).

- Efecto del mucus y de la motilidad gastrointestinal

El mucus localizado sobre el epitelio gastrointestinal tiene una consistencia altamente viscosa, la cual parece ejercer un efecto negativo sobre los parásitos, disminuyendo su motilidad y dificultado su alimentación (Douch *et al.*, 1983; Miller, 1987; Rothwell, 1989). El mucus libera diferentes sustancias que aumenta su acción nociva sobre el parásito, de entre ellas cabe destacar la histamina, los leucotrienos y las lectinas; estas últimas han sido particularmente estudiadas en los últimos años (Young y Meeusen, 2004).

Un ejemplo de la importancia del mucus en el control de la infección por NGI se ha demostrado en diversos estudios desarrollados en ganado ovino, donde el mucus de ovejas inmunes parece capaz de paralizar las larvas de nematodos (Douch *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1994).

Dentro de las sustancias presentes en el mucus destacan la galectina-14 y la galectina-15. La galectina-14 la producen los eosinófilos (Dunphy *et al.*, 2002) y, aunque se expresa habitualmente en los tejidos sanos, se libera espontáneamente en la mucosa gastrointestinal ante la infección por NGI, siendo su concentración mayor en animales re infectados con *H. contortus*. Por ello, su actividad se relaciona tanto con mecanismos de inmunidad innata como adquirida (Kemp *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2011), siendo capaz de generar un aumento de la viscosidad del mucus y, como consecuencia, provocar la inmovilización parasitaria (Young *et al.*, 2009).

La galectina-15 la producen las células del epitelio mucoso del abomaso y tiene una función similar a la anterior. Tras la inoculación con *H. contortus*, aparece mayor concentración de esta molécula en los animales que han sufrido

repetidas infecciones, en comparación con animales primoinfectados (**Meeusen et al., 2005**).

En un estudio reciente con terneros infectados con *O. ostertagi*, se observó que aunque los cambios en la biosíntesis del mucus empezaron temprano durante la infección, los mayores efectos se produjeron cuando los adultos estuvieron presentes en la superficie de la mucosa abomasal. Se detectaron incrementos en la expresión de algunos genes encargados de regular la producción de mucus en los animales inoculados, así como cambios en la glucosilación de éste (**Rinaldi et al., 2011**).

El peristaltismo también juega un papel esencial en la expulsión de los vermes. El mucus impide la adhesión de los vermes a la mucosa, mientras que las contracciones de la musculatura lisa los hacen avanzar hacia regiones más distales del aparato digestivo. En diversos estudios se ha observado que en infecciones por NGI existe un aumento tanto de la motilidad del aparato digestivo como de la producción de mucus, sugiriéndose una base inmunológica común (**Vallance et al., 1998, 1999; Zhao et al., 2003, Finkelman et al., 2004; Khan y Collins, 2004, 2006**).

- Efecto de las citoquinas en la respuesta inmune frente a NGI.

Las citoquinas son proteínas producidas fundamentalmente por células del sistema inmune cuando y se consideran como vehículos de comunicación entre los distintos componentes del mismo para su actuación coordinada. Entre sus características peculiares cabe destacar la escasa especificidad para su producción (existe una gran diversidad de células capaces de sintetizar una misma citoquina) y la capacidad que tienen de inducir distintas respuestas en función de la célula que activen (**Gómez Lucía et al., 2007**).

Se conocen más de cien citoquinas, destacando las siguientes en los estudios realizados en infecciones por NGI (**Lacroux, 2006; García, 2007; Beetz et al., 2008; Tizard, 2009**):

- **Interleuquina 2 (IL-2):** es producida fundamentalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y, en menor medida, por los CD8<sup>+</sup>, e induce la proliferación de linfocitos Th1 y CD8<sup>+</sup> previamente activados por la IL-12, así como una elevación de la actividad de las células NK.
- **Interleuquina 4 (IL-4):** es producida principalmente por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos y, secundariamente, también por los eosinófilos. Estimulan la proliferación de los mastocitos, promueven la diferenciación de los linfocitos T hacia la subpoblación Th2, e inducen el cambio de isotipo a IgE e IgG1 en los linfocitos B. Esta citoquina induce hiperplasia de las células productoras de mucus y estimula la motilidad de la musculatura lisa.
- **Interleuquina 5 (IL-5):** es sintetizada mayormente por linfocitos y mastocitos, y es capaz de promover una hiperplasia de eosinófilos, la producción de IgE e IgA, e inducir hiperplasia de las células productoras de mucus.
- **Interleuquina 10 (IL-10):** es producida fundamentalmente por linfocitos B y Th2; su principal característica es la capacidad de inhibir la producción de citoquinas propias de la respuesta Th1 y promover la actividad de los mastocitos.
- **Interleuquina 12 (IL-12):** es sintetizada principalmente por macrófagos, aunque también por los linfocitos B, monocitos y células dendríticas. Inhibe la producción de IL-4, y con ello la de IgE. Promueve la respuesta inmune de base celular al estimular la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 y aumentar la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK.



- **Interleuquina 13 (IL-13):** es producida fundamentalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th2, promueve la producción de IgE, la contracción del músculo liso y la hiperplasia de las células productoras de mucus.
- **Interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ):** es sintetizada por los linfocitos Th1,  $\gamma\delta^+$ , por las células NK, y algunos CD8<sup>+</sup>. Entre sus funciones destaca la inhibición de la producción de IL-4, y con ello la de IgE, la inducción de la producción de IgG2 en los linfocitos B y el aumento de la capacidad antimicrobiana de los macrófagos y de la actividad de las células NK.
- **Eotaxina 1:** es sintetizada por los linfocitos T activados y se caracteriza por ejercer un efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos.
- **Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ):** es sintetizada por varios grupos celulares, entre los que se destacan los linfocitos T ( $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ) y B, los macrófagos, y los mastocitos. Son capaces de promover la apoptosis de células tumorales e infectadas por virus e interviene en las respuestas inflamatorias.
- **Factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ):** es producido por plaquetas, macrófagos activados y linfocitos T y B. Interviene en la división celular, generando inmunosupresión y acelerando la fibrosis y la cicatrización.
- **Interleuquina 17A (IL-17A):** es producida por linfocitos Th17. Promueve la inflamación mediada por neutrófilos, como parte de la inmunidad innata, e inicia la producción de citoquinas proinflamatorias por las células endoteliales, epiteliales y macrófagos. Regula las respuestas inmunes adaptativas destinadas a la eliminación de bacterias extracelulares y hongos. El INF $\gamma$  suprime el desarrollo de linfocitos Th17 y así inhibe la inflamación mediada por IL-17A.

Existe cierta controversia en cuanto al tipo de respuesta que se genera en el curso de las infecciones con NGL. Así, en ovinos infectados con *H. contortus*, **Gill et al. (2000)** y **Lacroux et al. (2006)** observaron un patrón de citoquinas de tipo Th2 a los 3, 5, 7 y 28 dpi, asociado a eosinofilia, mastocitosis y aumento de IgA e IgG específica en la mucosa y la sangre, todo lo cual sugiere el desarrollo de una respuesta Th2. Del mismo modo, en otro estudio llevado a cabo también en ovinos pero infectados con *T. circumcincta* se observó que la respuesta generada en los linfonódulos fue predominantemente Th2 (**Craig et al., 2007**), aunque en este estudio también se observó un aumento en los niveles de IL-10 y TGF $\beta$ , citoquinas que están relacionadas con los linfocitos Treg (**McNeilly et al., 2009**). También se ha observado en algunos otros estudios respuestas mixtas Th1/Th2, tanto en infecciones primarias como secundarias. Así, en terneros primoinfectados con *O. ostertagi*, se observó tanto en la lámina propia como en los linfonódulos abomasales una expresión de mixta citoquinas (**Almería et al., 1997b; Canals et al., 1997**). En otro estudio posterior, los terneros primoinfectados mostraron un perfil mixto también en la mucosa abomasal, pero no así en los linfonódulos abomasales, donde se originó un patrón Th2 con disminución de los niveles de INF $\gamma$  e IL-12p40 (**Claerebout et al., 2005b**). Todo parece indicar que son muchos los factores que determinan el desarrollo de un tipo y otro de respuesta inmune, y que se trata de un proceso muy dinámico, pudiendo ser determinante el momento en el que se lleve a cabo el análisis, sin olvidar que podría estar mediatizado por otras circunstancias relacionada con el parásito o el hospedador, entre otros factores. En concordancia, también se ha observado que, si bien las poblaciones de linfocitos en los linfonódulos y en los tejidos infectados están usualmente correlacionadas, la expresión de algunas citoquinas puede variar ampliamente entre ambos tejidos, en parte debido a la población no linfocitaria tisular que contribuye al patrón de citoquinas. (**Balic et al., 2000b**). Por este motivo, el seguimiento de la expresión de las citoquinas mediante la canulación de conductos linfáticos se ha mostrado como una herramienta muy útil en el seguimiento de la respuesta linfocitaria (**Pernthaner et al., 2006**).

Las infecciones por NGI en rumiantes parecen inducir por lo general en un primer momento respuestas no protectoras en las que podrían ser Th1, Th2 o ambas, para posteriormente derivar a una respuesta Th2. Un ejemplo de este acontecimiento lo observamos en los trabajos llevados a cabo en ovinos infectados, tanto con *T. circumcincta* como con *H. contortus* donde se detectaron, en una primoinfección una respuesta Th1, y tras un segundo reto una respuesta Th2 (**Schallig, 2000; Craig et al., 2007**).

Estos patrones generales, también pueden verse modificados dependiendo de que tenga lugar o no el asentamiento de las larvas infectantes en la mucosa gástrica. En el caso de animales sensibilizados previamente a NGI. Se observó un patrón de citoquinas distinto dependiendo del establecimiento larvario. Así, en ovinos infectados con *H. contortus* donde las larvas alcanzaron la mucosa abomaso, hubo un aumento de IL-5, IL-13 e IFN $\gamma$  a los 3 dpi, mientras que la IL-4 se elevó a los 5 dpi. Sin embargo, en los animales en los que las larvas fueron expulsadas sin que pudieran penetrar en la mucosa, sólo se observaron niveles elevados de IL-4, antes y después de la inoculación, mientras que la IL-5 no mostró cambios relevantes (**Meeusen et al., 2005**). De estos resultados podría deducirse un papel prioritario de los mastocitos estimulados por la IL-4 en la expulsión inmediata de las larvas, mientras que la activación de los eosinófilos por la IL-5 se desencadenaría en caso de que las larvas infectantes infiltrasen el tejido.

No faltan tampoco los trabajos en los que no llega a determinarse un patrón claro. Es el caso de los estudios de inmunización con antígenos parasitarios de *O. ostertagi* en terneros realizados por **Geldhof et al. (2002)**, quienes no observaron ningún efecto de la vacunación sobre los niveles de citoquinas, ni aún utilizando como adyuvante hidróxido de aluminio, que es considerado un potente inductor de la respuesta Th2 (**Geldhof et al., 2004**).

- Respuesta inmune humoral frente a nematodos gastrointestinales

Según los resultados obtenidos en diferentes estudios es posible concluir que, como respuesta a la parasitación existe un aumento de los niveles séricos de IgG1 e IgE, así como de IgA en el tejido afectado. La expresión de los diferentes isotipos varía dependiendo de las distintas fases del desarrollo del parásito, siendo esta respuesta más rápida y potente en las infecciones secundarias que en las infecciones primarias (**Canals y Gasbarre, 1990; Schallig *et al.*, 1995; Balic *et al.*, 2000b, Pernthaner *et al.*, 2006**).

- **IgGs**

Son los anticuerpos propios de la respuesta inmune secundaria, se unen a los antígenos parasitarios solubles y pueden ejercer una acción directa sobre el parásito formando inmunocomplejos sobre los poros anal y oral de las larvas. En los bovinos se reconocen dos subtipos de esta inmunoglobulina, **IgG1 e IgG2**, que también parecen estar presentes en otras especies rumiantes (**Gutiérrez, 2007**).

En infecciones con *O. ostertagi*, se han observado incrementos séricos en los niveles de IgG1 específicas frente a antígenos somáticos de vermes adultos así como frente a L4-L5 y E/S de L4 de dicho parásito, alcanzándose las máximas concentraciones más precozmente los animales previamente sensibilizados, a los 14 dpi (antígenos larvarios) y a los 21 dpi (antígenos adultos), que los animales primoinfectados (**Canals y Gasbarre, 1990**).

En infecciones por *H. contortus* ocurre algo similar, cuando se utilizan antígenos larvarios se detecta un incremento de los niveles de IgG1 en animales primoinfectados e inmunizados, siendo únicamente los animales inmunizados los que presenta una respuesta de IgG1 comparable con la observada cuando se

emplean vermes adultos como antígeno (**Schallig et al., 1995; Gill et al., 2000**).

Otros estudios asocian la producción de IgG1 e IgE a resistencia frente a *H. contortus* al observar diferentes niveles de ambos tipos de inmunoglobulinas entre animales resistentes y susceptibles, después de una inoculación primaria (**Gill et al., 2000**).

Los niveles de IgG2 específicas aparecen especialmente elevados en bovinos parasitados con *O. ostertagi* (**Frankena, 1987**) y también en animales parasitados con *T. circumcincta* (**Yong et al., 1991**), lo cual sugiere la existencia de diferentes vías de la respuesta efectora frente a los distintos géneros de NGI (**Gill et al., 1993b; Claerebout y Vercruyse, 2000**).

- **IgA**

Es la inmunoglobulina más abundante en las mucosas y se considera responsable de prevenir la entrada de agentes patógenos (exclusión inmune) y de evitar reacciones frente a antígenos alimentarios inocuos (tolerancia oral) (**Brandtzaeg, 1974; 2009**).

La IgA apenas es detectable en suero, de hecho, su presencia a este nivel podría indicar una infiltración desde la luz gastrointestinal como resultado de una importante estimulación antigénica que provoque un incremento en su producción. (**Frankena, 1987**). Por el contrario, la producción local específica de IgA es especialmente relevante en el mucus (**Sinski et al., 1995b**), los tejidos (**Gill et al., 1993<sup>a</sup>, Stear et al., 1995b**) y los ganglios linfáticos (**Smith et al., 1983c, Bowles et al., 1995**) de animales infectados. En infecciones por *O. ostertagi* la mayor concentración de esta inmunoglobulina se ha detectado en presencia de vermes en estadio adulto y está fuertemente asociada a la salida de la mucosa abomasal de dichos vermes (**Thatcher et al., 1989**). Sin embargo,

otros autores detectan bajos niveles de IgA específica en animales infectados, asociada predominantemente con las fases larvarias, más que con los parásitos adultos (Canals y Gasbarre, 1990, Schalling *et al.*, 1994a, 1995).

Existe una fuerte asociación entre los niveles de IgA en el mucus y la disminución de la fecundidad de las hembras de *T. circumcincta* (Stear *et al.*, 1996; Martínez Valladares *et al.*, 2005a), así como de la longitud de adultos (Stear *et al.*, 1995c; Stear y Bishop 1999; Strain *et al.*, 2002; Martínez Valladares *et al.*, 2005a; Henderson y Stear, 2006). Este hecho podría estar relacionado con un bloqueo de los órganos sexuales del parásito (Salinas, 2007). También se ha observado una influencia de la IgA en la respuesta inmune frente a otros NGI como *H. contortus* (Amarante *et al.*, 2005) y *T. colubriformis* (Pernthaner *et al.*, 2006).

- **IgE**

La función principal de la **IgE** está relacionada con un mecanismo de hipersensibilidad de tipo I, mediante la activación de la degranulación de los mastocitos y eosinófilos (Miller, 1996; Else y Finkelman, 1998; Claerebout y Vercruyse, 2000). Los niveles de este anticuerpo se han asociado con una mayor resistencia en ovejas y cabras a infecciones por NGI (Pernthaner *et al.*, 2006; Chevrotière *et al.*, 2011), en algunos casos asociada a menores recuentos fecales de huevos (Huntley *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2010). No obstante, se han observado diferencias en el reconocimiento por IgE de determinados antígenos y en las asociaciones de los niveles de esta inmunoglobulina con parámetros parasitológicos, las cuales pueden ser debidas a las particularidades de los protocolos de infección y en lo métodos de detección empleados en cada estudio (Balic *et al.*, 2000b). Por ejemplo, se señalan fuertes incrementos en los niveles de IgE totales y de IgE específicos frente a antígeno E/S de adultos en la inoculación secundaria de ovinos con *H. contortus*. Sin

embargo, no se detecta el mismo incremento utilizando antígeno somático de L3 (Kooyman *et al.*, 1997). También Huntley *et al.* (1998) observan un claro incremento en los niveles de IgE en suero y vasos linfáticos locales en ovinos infectados con *T. circumcincta*, especialmente en animales previamente inmunizados. Por su parte, Pernthaner *et al.* (2006) observan un doble pico de IgE e IgA (el primero coincidiendo con la primera muda larvaria y el segundo con la aparición de adultos) tras la inoculación secundaria con *T. colubriformis* en ovinos con inmunidad adquirida.

Sin embargo, pese a que el aumento de IgE es una de las respuestas más características en las infecciones por NGI, su función en la protección frente al verme aún no está aclarado (Shaw *et al.*, 2009).

- **Linfocitos B**

La determinación de los recuentos de linfocitos B puede ayudar a valorar la dinámica de infiltración celular local y su relación con los niveles de inmunoglobulinas (Balic *et al.*, 2000a; Lacroux *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008). En estudios inmunohistoquímicos de la mucosa gástrica es frecuente el uso de anticuerpos frente a la molécula CD45R, dado que, además de linfocitos B, tan sólo reconocen una pequeña subpoblación de linfocitos T que se encuentra prácticamente ausente en la pared abomasal (Meeusen *et al.*, 1989; Balic *et al.*, 2000a).

## 10.5.MANIFESTACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A NEMATODOS GASTROINTESTINALES

### 10.5.1. Frente a estadios larvarios

- Hipobiosis

Consiste en el paro temporal del ciclo del nematodo en un momento preciso del desarrollo parasitario, que sirve para sincronizar el desarrollo del parásito con las condiciones del hospedador y del ambiente (**Soulsby, 1987**). El secuestro larvario (hipobiosis) en la mucosa del hospedador es un fenómeno frecuente en las infecciones por NGI en rumiantes. Se ha asociado a la resistencia frente a *O. ostertagi* (**Michel, 1963**) y *Haemonchus placei* (**Roberts, 1957**) en vacuno, y *H. contortus* (**Barger et al., 1985**), *T. circumcincta* (**Seaton et al., 1989a, Halliday et al., 2007**), *T. colubriformis* (**Barnes y Dobson, 1993**) y *Trichostrongylus vitrinus* en el ovino (**Seaton et al., 1989b**).

Diferentes trabajos han relacionado la hipobiosis con la estacionalidad, la cepa del parásito o la carga parasitaria de vermes adultos (**Blitz y Gibbs, 1971; Eysker, 1997**). La importancia de la hipobiosis deriva en que promueve una alta presencia en el pasto de L3 infectantes en momentos en los que hay gran disponibilidad de hospedadores susceptibles, tras la activación masiva de un elevado número de larvas que se encontraban quiescentes, desencadenando patologías más graves en los hospedadores (**Urquhart, 1996**).

En infecciones por *T. circumcincta* se ha observado que el fenómeno de secuestro larvario tiene un mayor protagonismo en los animales inmunizados, actuando como un mecanismo de resistencia frente al parásito, aunque no estén claros los mecanismos que provocan esta situación (**Stear et al., 1995b; Halliday et al., 2007**). Esta circunstancia tampoco se considera una regla constante, pues en algunos estudios realizado también con *T. circumcincta*, no se llegó a observar ninguna asociación entre la hipobiosis larvaria y la resistencia parasitaria (**Halliday et al., 2007**).

En infecciones naturales de animales en pastoreo, la renovación paulatina de la carga parasitaria adulta por las larvas quiescentes permite un nivel de



eliminación de huevos en el pasto que asegura el mantenimiento de la población parasitaria. El hecho de que la hipobiosis sea un fenómeno frecuente en distintas especies de NGI podría sugerir que el secuestro larvario sería más una estrategia de supervivencia efectiva que el resultado de un mecanismo defensivo del hospedador (**Balic et al., 2000b**).

- Fallo en el establecimiento larvario

La manifestación principal de la inmunidad adquirida frente a los NGI es la reducción del número de larvas en la mucosa gastrointestinal (**Balic et al., 2000b**). En este resultado influyen una serie de elementos:

- El fallo en el establecimiento larvario se expresa fuertemente tras contactos repetidos con el parásito, tal y como se ha observado en infecciones por diferentes NGI, entre ellos *H. contortus* (**Barger et al., 1985**), *Trichostrongylus vitrinus* (**Seaton et al., 1989b**), *T. circumcincta* (**Seaton et al., 1989a**), *T. colubriformis* (**Dobson et al., 1989b**) y *O. ostertagi* (**Michel, 1973; Claerebout et al., 1996**).
- Una vez adquirida la resistencia frente al establecimiento de las larvas de una determinada especie tras varias reinfecciones, la expresión de resistencia puede afectar a diferentes especies presentes en el mismo tejido. De esta manera, animales que han adquirido inmunidad mediante inoculaciones con larvas de *T. colubriformis* pueden expulsar otras larvas de nematodos intestinales, como *Nematodirus spathiger* o *Trichostrongylus vitrinus*, pero no las de los nematodos gástricos *T. circumcincta* o *H. contortus* (**Dineen et al., 1977; Barnes y Dobson, 1993; Emery et al., 1993**).
- Existen mecanismos específicos de resistencia para cada fase de desarrollo del parásito. Además, las distintas fases larvarias estimulan en

distinto grado la respuesta inmune y activan distintos mecanismos efectores. Por ejemplo, animales inmunizados con inoculaciones repetidas de L3 de diferentes especies de la familia Trichostrongylidae adquieren antes la capacidad de inhibir el establecimiento larvario que de reducir la carga parasitaria adulta (**Chiejina y Sewell, 1974; Dobson et al., 1990b**).

- La infección natural de los animales a través de los pastos tiene una intensidad muy variable, lo que activa diferentes mecanismos de expulsión larvaria.

La expulsión de las larvas es un proceso en el que intervienen los leucocitos globulares, capaces de impedir el acceso de las larvas a la mucosa en caso de infecciones repetidas, en un mecanismo mediado por IgE.

Cuando los niveles de leucocitos globulares no son suficientes para la expulsión, las larvas consiguen alcanzar la mucosa, desencadenando una respuesta que se caracteriza por la presencia abundante de eosinófilos y linfocitos en las mucosas y la liberación de citoquinas (principalmente del tipo Th2). Los eosinófilos destruyen las larvas alojadas en la mucosa mediante el contenido de sus gránulos, en un proceso de expulsión retardada del parásito (**Meeusen et al., 2005**).

#### 10.5.2. Frente a estadio adulto

- Cambios en la morfología del verme

Los cambios morfológicos descritos más importantes consisten en la alteración de la solapa vulvar en las hembras en respuesta a la inmunidad adquirida por parte del hospedador (**Balic et al., 2000b**). Estos cambios han sido

observados tras sucesivas infecciones en bovinos con *O. ostertagi* (Michel, 1969) y *T. circumcincta* (Denham, 1969). Reducciones en el tamaño de los vermes adultos también se han descrito en ovejas infectadas con *T. circumcincta* (Smith *et al.*, 1985a; Seaton *et al.*, 1989a; Stear *et al.*, 1995a), *H. contortus* (Coyne y Smith, 1992) y *T. colubriformis* (Douch, 1988), y en bovinos con *O. ostertagi* (Michel, 1969; Gasbarre *et al.*, 2001), como resultado del desarrollo de inmunidad adquirida por parte del hospedador. La reducción en el tamaño de los vermes se ha asociado a una respuesta de IgA en ovinos inmunes a la infección de *T. circumcincta* (Smith *et al.*, 1985a; Halliday *et al.*, 2007).

- Reducción de la fecundidad

Una reducción en la fecundidad de las hembras adultas, aparte de ser una consecuencia de la inmunidad adquirida, es influida por la carga parasitaria, que de ser muy elevada puede provocar una competencia intraespecífica, o alcanzar un nivel umbral que desencadene una respuesta inmunológica específica (Balic *et al.*, 2000b).

Los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la reducción de la fecundidad de los vermes son variados. Debido a la existencia de una estrecha asociación entre la longitud de los vermes y su fecundidad, tanto en *H. contortus* como en *T. circumcincta* (Stear *et al.*, 1999; Martínez Valladares *et al.*, 2005a; Lacroux *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2008), se ha llegado incluso a plantear la hipótesis de que el control de la fecundidad de los vermes tenga lugar de forma indirecta, mediante la regulación inmunológica del desarrollo de los mismos, en un proceso mediado por IgA (Strain y Stear, 2001; Rowe *et al.*, 2008). Sin embargo, la IgA u otras inmunoglobulinas también podría tener un efecto directo sobre la fecundidad mediante el bloqueo directo de los órganos sexuales del parásito (Salinas *et al.*, 2007).

El fenómeno de reducción de la fecundidad de los vermes hembras se ha descrito tras infecciones repetidas con *T. circumcincta* (Smith *et al.*, 1985; Stear *et al.*, 1995b) en ovinos, y con *T. colubriformis* en caprino (Pomroy y Charleston, 1989), así como en vacuno infectado con *O. ostertagi* (Michel, 1963), *T. colubriformis* (Gibson y Parfitt, 1973; Barnes y Dobson, 1990; Bisset *et al.*, 1996) y *H. contortus* (Dineen y Wagland, 1966); en general se acepta como una de las consecuencias de la respuesta inmune protectora (Coyne *et al.*, 1991; Coyne y Smith, 1992).

- Expulsión de los vermes adultos

La expulsión de los vermes adultos es dependiente del número de larvas infectantes, al menos en las infecciones por *H. contortus* y *T. colubriformis* (Barger *et al.*, 1985; Dobson *et al.*, 1990b), siendo necesario un umbral mínimo para que se desencadene el proceso de eliminación.

En ocasiones, en la parasitación por *H. contortus* la expulsión de los vermes adultos se desarrolla mediante un fenómeno denominado “autocura”, atribuido a un mecanismo de hipersensibilidad inmediata desencadenado por la entrada de larvas, que afecta de modo inespecífico a los adultos (incluso de especies distintas a la de las larvas infectantes); sin embargo, no necesariamente implica la adquisición de inmunidad frente a futuras infecciones (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La expulsión de los vermes adultos en inoculaciones primarias es un fenómeno raro en rumiantes (Behnke *et al.*, 1992), con la excepción de las infecciones por *Nematodirus battus* (Lee y Martin, 1976; Winter *et al.*, 1997). En cambio, la expulsión de la población adulta como resultado de infecciones repetidas es un fenómeno frecuente en las infecciones por *H. contortus*, (Barger *et al.*, 1985), *T. circumcincta* (Seaton *et al.*, 1989a), *Ostertagia leptospicularis*

(Hertzberg *et al.*, 1995), *T. vitrinus* (Seaton *et al.*, 1989b) y *T. colubriformis* (Dobson *et al.*, 1990b), y en terneros, por *O. ostertagi* (Michel, 1963).

Por lo que en general, la expulsión de los nematodos adultos sería el resultado de mecanismos inespecíficos, inducidos por larvas infestantes, y de mecanismos específicos, inducidos por los propios vermes adultos (Balic *et al.*, 2000b).

## 10.6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Los parásitos han desarrollado múltiples sistemas para evitar la respuesta inmune del hospedador. En algunos casos existen mecanismos de resistencia frente a los sistemas efectores del hospedador, en otros se dificulta el reconocimiento de antígenos, e incluso pueden llegarse a liberar sustancias que producen inmunosupresión, haciendo que la respuesta inmune sea menos efectiva (Gómez-Lucía *et al.*, 2007). Esta evasión de la respuesta inmune del hospedador es una capacidad variable, característica de cada especie parásita.

- Mecanismos de resistencia a los sistemas efectores del hospedador

Los vermes parásitos poseen una gruesa cutícula que los protege frente al daño causado por la mayoría de las células defensivas (Salinas, 2007).

- Mecanismos que evitan el reconocimiento de los antígenos.

Muchos helmintos imitan proteínas del hospedador para evitar ser reconocidos por los mecanismos inmunes (Tizard, 2009).

Otra forma de evasión de la respuesta inmune la desarrollan nematodos que son contenidos en estructuras que aíslan las etapas larvarias y las hacen poco accesibles a los mecanismos efectores y de reconocimientos. Por ejemplo, en *O.*

*ostertagi* y *T. circumcincta* las formas larvianas ocupan las fosas gástricas distendidas antes de emerger como jóvenes adultos. En el caso de *H. contortus* se sugiere que es la motilidad la estrategia de supervivencia, ya que al moverse el verme dificulta el contacto con las células defensivas del hospedador. (**Balic et al., 2000b**).

Además, las diferentes formas de desarrollo de los NGI muestran diversos antígenos somáticos y de E/S, comportándose, a efectos de reconocimiento antigénico, como parásitos distintos, lo que dificulta la generación de una respuesta inmune efectiva por parte del hospedador (**Cox et al., 1990; Balic et al., 2000b; Salinas, 2007**).

- Mecanismos que producen inmunomodulación

Las infecciones crónicas con helmintos están asociadas frecuentemente con una inmunomodulación de la respuesta inmune celular, presumiblemente para prolongar la supervivencia del parásito (**Nisbet et al., 2010**).

En muchos casos, la actividad inmunosupresora se atribuye a moléculas que son secretadas por los nematodos parásitos (**Grainger et al., 2010**). Por ejemplo, se ha demostrado un efecto inmunosupresor por parte de antígenos procedentes de L4 de *Ostertagia* sobre la proliferación de linfocitos abomasales (**De Marez et al., 1997; Gómez-Muñoz et al., 2004**). Otro claro ejemplo lo observaron **McNeilly et al., (2013)**, quienes identificaron actividad inmunosupresora en los productos de E/S derivados de L4 de *T. circumcincta* en ovinos, la cual se vio reducida en los animales que desarrollaron inmunidad.

También se ha propuesto que algunos helmintos podrían alterar las respuestas inmunitarias secretando algunas moléculas que imitan a citoquinas propias del hospedador (**Salinas, 2007**). Por ejemplo, en ovinos infectados

con *T. circumcincta* se le atribuye un posible papel inmunomodulador a un homólogo de la citoquina MIF (factor inhibidor de macrófagos) (Nisbet *et al.*, 2010).

## 11 INMUNIZACIÓN FRENTE A LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

Como se mencionó anteriormente una de las estrategias de control frente a las enfermedades parasitarias producidas por nematodos es la inmunoprofilaxis. Actualmente se reconocen tres tipos principales de vacunas: vacunas atenuadas (Bain, 1999), vacunas frente a antígenos expuestos al sistema inmune (Meeusen y Piedrafita, 2003) y vacunas frente a antígenos ocultos (Knox *et al.*, 2003).

### 11.1 VACUNAS ATENUADAS

Este tipo vacunas emplean como antígenos larvas atenuadas y han sido utilizadas desde hace más de 40 años en ganado vacuno contra el nematodo pulmonar *Dictyocaulus viviparus* (Jarret y Sharp, 1963; Johnson *et al.*, 2003).

La inmunización de ovinos con larvas atenuadas de *H. contortus* sólo ha obtenido resultados positivos en animales adultos, que por otra parte suelen ser más resistentes al parásito (Smith y Christie, 1979; Stear *et al.*, 1999), probablemente debido a la necesidad de mecanismos naturales de inmunidad del hospedador desarrollados (Stear *et al.*, 2007). También se han realizado algunos ensayos de vacunación con larvas irradiadas en otros nematodos gastrointestinales de rumiantes, como los llevadas a cabo por Smith *et al.* (1982) frente a *T. circumcincta* en ovinos adultos.

## 11.2 VACUNAS FRENTE ANTÍGENOS EXPUESTOS AL SISTEMA INMUNE

Con este término se hace referencia a las inmunizaciones en las que se utilizan como inmunógenos antígenos nativos del parásito, a los que tienen acceso el sistema inmune del hospedador. Cuenta como principal ventaja el hecho de no necesitar de revacunaciones, ya que se produce una estimulación cuando el hospedador contacta con el parásito. Como inconveniente, se encuentra la posibilidad de que su uso continuado determine la aparición de cepas resistentes a la inmunización por mecanismos similares a los que acontecen en la aparición de cepas resistentes a los antihelmínticos.

Durante muchos años se ha intentado inducir la inmunidad frente a nematodos gastrointestinales con antígenos nativos, así como con sus formas recombinantes. Se han utilizado diferentes tipos, entre ellos antígenos cuticulares, antígenos de E/S larvarios y de vermes adultos (totales y fraccionados), etc. Utilizando este tipo de antígenos se han conseguido reducciones en los recuentos fecales y en el número de vermes en abomaso; así, en protocolos de inmunización con *H. contortus* se obtuvo una reducción de hasta el 75% en los recuentos fecales y en el número de vermes en abomaso (**Emery, 1996**). No obstante, por el momento ninguno de estos antígenos ha dado lugar a un producto registrado (**Newton y Meeusen, 2003**).

### 11.2.1 Antígenos de E/S

Dentro de las funciones más relevantes desempeñadas por los productos de E/S de los NGI destacan las siguientes: permitir la penetración de las formas larvarias en el tejido, facilitar la degradación de proteínas del hospedador para alimentarse (**Cox et al., 1990; Karanu et al., 1993**), regular la respuesta inmune del hospedador y evitar la coagulación de la sangre, entre otras. Todas estas



actividades o cambios que inducen en el hospedador los hacen candidatos idóneos para el desarrollo de vacunas efectivas frente a los NGI (**Joshi y Singh, 2000; Suchitra y Joshi, 2005**).

Dentro de los antígenos de E/S más estudiados destacan los denominados *ES15* y *ES24* de *H. contortus* en ovinos, que se caracterizan por su bajo peso molecular y por ser expresados tanto por las L4 como por los vermes adultos. En inmunizaciones con preparaciones enriquecidas con este tipo de antígenos se redujeron los recuentos fecales en animales inmunizados entre un 32% y un 77%, y la media de vermes adultos en el abomaso se redujo entre un 64% y un 85% (**Schallig y van Leeuwen, 1997; Vervelde et al., 2002**). El mecanismo inmunitario conferido por este tipo de antígenos no ha sido definido aún, pero se ha relacionado con una respuesta proliferativa de células T (**Schallig y van Leeuwen, 1997**), el incremento de los niveles de anticuerpos específicos en suero (IgG1, IgA o IgE) (**Vervelde et al., 2002**), y la presencia de mastocitos en abomaso (**Schallig et al., 1997**). Se han realizado ensayos con antígenos *ES15* recombinantes con buenos resultados, aunque la eficacia no siempre fue evidente (**Vervelde et al., 2002**). Sin embargo, las respuestas protectoras siempre se han detectado en animales adultos, mientras que tanto los antígenos naturales como los recombinantes *ES15* y *E24* parecen no inducir protección en corderos (**Vervelde et al., 2002**).

Se ha identificado otros productos de E/S de vermes adultos de *H. contortus* que podrían ser capaces de inducir protección en animales inmunizados. Es el caso de una proteína de 66k Da (*p66*), que es capaz de estimular la proliferación de células mononucleares periféricas, así como inducir una reducción de la motilidad de los parásitos adultos *in vitro*. La concentración de anticuerpos específicos anti-*p66* en los animales vacunados se encontraron correlacionados de forma negativa con la carga parasitaria (**Rathore et al., 2006**), lo que demostraría el papel de la respuesta inmune en la protección observada.

Otras proteínas de productos de E/S que han mostrado actividad inmunoprotectora han sido antígenos parasitarios de distintas especies de NGI con afinidad por grupos thiol. Los antígenos obtenidos a partir de diferentes eluciones a través de una columna de Thiol Sepharose mediante el uso de cisteína y DL-dithiothreitol (DTT) son capaces de reducir el número de huevos en las heces y la carga parasitaria en torno al 50% en ovejas inmunizadas y posteriormente inoculadas experimentalmente con 5.000 L3 de *H. contortus* (**Bakker et al., 2004**). Asimismo, se consiguió una importante protección en ganado caprino utilizando extractos de vermes adultos solubles en PBS, y enriquecidas mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente. La protección inducida por estos productos se tradujo en una disminución de la eliminación de huevos en heces del 89% y en una reducción del número de vermes adultos en el abomaso del 68% (**Ruiz et al. 2004a**). La solubilidad de las proteinasas en PBS indicaría que se trata de antígenos expuestos al sistema inmune del hospedador, o bien que aparecerían formando parte de sus productos de E/S (**Ruiz et al., 2004a**). **De Vries et al. (2009)**, utilizando la cisteína-proteinasa AC-5 identificada en productos de E/S del parásito, consiguió una reducción de la carga parasitaria del 36% y de los recuentos fecales del 32% en ovinos inmunizados.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por **Knox et al. (1999)**, quienes no consiguieron inmunoprotección en corderos inmunizados con fracciones de similares características, si bien se trataban de ensayos en los que los animales de experimentación utilizados eran menores de 3 meses de edad, circunstancia que podría tratarse de un limitante importante a la hora de valorar la eficacia de estas inmunizaciones.

También se han empleado con éxito proteínas procedentes de productos de ES con afinidad por grupos thiol en estudios frente a *O. ostertagi* en ganado vacuno (ES-thiol) (**Geldhof et al., 2002**). La fracción enriquecida para cisteína

proteinasas contenía una prominente banda de 30 KDa, y la actividad proteolítica se observó en tres zonas destacadas de proteólisis, de aproximadamente 82, 56 y 40 KDa. La inmunización produjo una protección que se tradujo en una disminución significativa de los recuentos fecales (60%), la presencia de un alto porcentaje de L4 inhibidas (9,8%) y un menor número de vermes adultos (18%). Además, los adultos fueron significativamente más pequeños, y las hembras presentaron un menor número de huevos intrauterinos. Los niveles de anticuerpos locales específicos de *Ostertagia* mostraron una correlación negativa con el tamaño de los vermes adultos del parásito, el número de huevos por hembra y el recuento acumulado de huevos en heces. También se vieron elevados los recuentos de eosinófilos en abomaso, y estuvieron inversamente relacionados con el tamaño de los vermes adultos (**Geldhof et al., 2002**).

Posteriormente, el antígeno ES-thiol fue fraccionado, las proteinasas tipo cisteína y el resto de fracciones. Los tres tipos de fracciones fueron empleadas como inmunógenos, consiguiéndose reducciones en el recuento fecal de huevos del 74, 80 y 70%, respectivamente. Aunque no hubo disminución de la carga parasitaria, si se observó que los vermes eran de menor tamaño que los del grupo control (**Meyvis et al., 2007**), y se concluyó que la protección conferida por el antígeno ES-thiol se debía a varias fracciones.

### 11.2.2 Hc-sL3

Se trata de un antígeno de superficie de las L3 de aproximadamente 70-80 kDa, (**Bowles et al., 1995; Raleigh y Meeusen, 1996; Raleigh et al., 1996**). Las inmunizaciones con *Hc-sL3* han mostrado reducciones en el recuento fecal de huevos entre el 64 y el 69%, y entre el 45 y el 55% de la carga de vermes del abomaso (**Jacobs et al., 1999**). La protección parece ser dependiente de la respuesta Th2 (**Jacobs et al., 1999**).

También se ha observado que los eosinófilos son capaces de destruir las L3 desenvainadas *in vitro* en presencia anticuerpos mono y policlonales específicos para *Hc-sL3* (**Rainbird *et al.*, 1998**), en concordancia con las observaciones en las que se correlacionan la eosinofilia adquirida con la inmunidad natural frente a NGI en ovejas (**Jarrett *et al.*, 1959**).

### 11.2.3 Hc40

Se trata de otro antígeno larvario (**Sharp y Wagland, 1996**) que, sin embargo, también se han encontrado junto con un amplio panel de proteínas en productos de E/S de vermes adultos del parásito (**Yatsuda *et al.* 2003**), siendo capaz de reducir un 65% la carga de *H. contortus* en modelos experimentales (**Sharp y Wagland, 1996**).

### 11.2.4 Hcp26/23

**Domínguez-Toraño *et al.*, (2000)**, en corderos de 3,5-5 meses de edad, con un producto purificado a partir de material somático de *H. contortus* identificado mediante anticuerpos séricos de ovejas resistentes al parásito, denominado Hcp26/23, obtuvieron reducciones próximas al 60% en la carga de vermes adultos y de los recuentos fecales de huevos, acompañadas por una respuesta linfoproliferativa y altos niveles de anticuerpos séricos frente a extractos de *H. contortus* (**Domínguez-Toraño *et al.*, 2003**).

Recientemente, **Nisbet *et al.* (2013)** han conseguido los niveles de protección más altos observados usando vacunas recombinantes. Ovejas inmunizadas con un cóctel de 8 proteínas recombinantes de *T. circumcincta*, entre las que se encuentran antígenos de la superficie de L3, una catepsina F y una proteína de 20 KDa de productos de E/S de L4, tuvieron reducciones

significativas del 58-70% en los recuentos fecales de huevos y del 56-75% en el recuento de número de vermes del abomaso.

### 11.3 VACUNAS FRENTE ANTÍGENOS OCULTOS AL SISTEMA INMUNE

La utilización de los antígenos ocultos en el desarrollo de vacunas frente a NGI resulta muy atractiva porque se trata de moléculas que no han estado sometidas a una presión selectiva previa. Estas moléculas no son reconocidas por el sistema inmune del hospedador en la infección habitual, ya que no se encuentran accesibles (**Smith y Smith, 1993; Newton, 1995; Newton *et al.*, 1995; Knox *et al.*, 2003**) y parecen ser antígenos muy adecuados en inmunizaciones frente a parásitos hematófagos como *H. contortus* (**Jasmer y McGuire, 1991; Andrews *et al.*, 1995; Newton, 1995; Smith *et al.*, 1999**).

#### 11.3.1 H11

Es una glicoproteína de 110 KDa de la membrana del intestino de vermes adultos de *H. contortus* (**Smith *et al.*, 1993b**). Mediante clonación de cDNA se demostró que el antígeno H11 era una aminopeptidasa microsomal (**Graham *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997**) que posiblemente podría estar implicada en el proteólisis en pequeños péptidos que son producidos por la digestión de las proteínas (**Munn y Munn, 2002**), de ahí la hipótesis de que el mecanismo de protección sea inducido por anticuerpos que alteran la absorción de nutrientes. Han sido descritas tres isoformas del H11, que son idénticas en aproximadamente un 65% a nivel de su secuencia de aminoácidos (**Graham *et al.*, 1993**).

El antígeno H11 ha sido testado en un gran número de ensayos de vacunación en diferentes razas, incluyendo corderos jóvenes, en los que induce una importante reducción de los recuentos fecales de huevos y de la carga de vermes en el abomaso (**Newton y Munn, 1999**).

Aunque el éxito con la vacunación con antígenos naturales H11 fue uno de los primeros en notificarse en la literatura, y su forma recombinante fue patentada en 1993 (**Graham et al., 1993; Smith et al., 1993b**), lo cierto es que por el momento esta vacuna aún no ha sido comercializada, principalmente debido al coste de su forma nativa, o a los resultados variables obtenidos con la forma recombinante de los antígenos.

### 11.3.2 H-gal-GP

Es otro antígeno procedente de la membrana del intestino de *H. contortus*. El antígeno H-gal-GP es un complejo de proteínas cuyo tamaño oscila entre 31 y 230 kDa (**Smith y Smith, 1996; Smith et al., 1999**), y está provisto de actividad aspartil proteínasa, metaloproteínasa neutra y proteínasa tipo cisteína (**Smith et al., 1999**). La presencia de la actividad proteínasa sugiere que, como ocurría con el antígeno H11, el mecanismo de inmunidad proporcionado por H-gal-GP pudiera estar relacionado con la interrupción de la digestión.

Este inmunógeno también es capaz de inducir altos niveles de protección, con reducciones en los recuentos de huevos en heces próximos al 90% y del 60% en las cargas parasitarias (**Newton y Munn, 1999; Smith, 2007**). Aunque se ha conseguido inmunoprotección parcial con algunas fracciones de H-gal-GP separadas a partir de geles en condiciones no desnaturizantes (**Smith et al., 1999**), el fraccionamiento completo y, por tanto, la identificación de los componentes realmente activos no ha sido posible (**Knox y Smith, 2001**).

Mediante clonación de ADN complementario se han identificado también un homólogo de la trombospondina (**Skuce et al., 2001**), una galectina (**Newlands et al., 1999**) y una cistantina (**Newlands et al., 2001**) como componentes del antígeno H-gal-GP, pero las versiones recombinantes de todas estas proteínas no han demostrado tener actividad protectora en ovinos (**Skuce et al., 2001**). Por el contrario, otros autores han obtenido porcentajes de reducción en los recuentos fecales de huevos y la carga parasitaria entre el 40-50% en caprinos infectados con *H. contortus* utilizando como antígeno galectinas recombinantes (rHco-gal-m y rHco-gal-f) (**Yanming et al., 2007**).

Se han encontrado homólogos en *Teladorsagia/Ostertagia* a ambos antígenos glicoproteicos de la membrana intestinal de *H. contortus* (**McMichael-Philips et al., 1995; Siefker y Rickard, 1998**), pero en general, cuando se han hecho estudios con el uso de estas proteínas el resultado es mucho menor que el obtenido cuando se ensaya contra *H. contortus* (**Siefker y Rickard, 2000; Smith et al., 2000a; Smith et al., 2001a**). Bovinos inmunizados con combinación de homólogos H11 y H-gal-GP de *O. ostertagi* mostraron una reducción significativa del 30-50% en los recuentos fecales, pero no hubo efecto en la carga de vermes (**Smith et al., 2000a**). Por otro lado, cuando este mismo experimento se llevó a cabo con el parásito *T. circumcincta* en ovinos, no se obtuvo protección (**Smith et al., 2001a**). Es posible que esta ausencia de protección por parte de estas glicoproteínas se deba a que la cantidad de anticuerpos ingeridos por el parásito resulte insuficiente (**Smith et al., 2001a**), a pesar de que se ha observado que ambas especies son capaces de ingerir algunos anticuerpos (**Murray y Smith, 1994**).

### 11.3.3 Proteinasas tipo cisteína

Como ya indicamos, podrían estar presentes tanto en productos de E/S como formando parte de células de membranas intestinales parasitarias, con lo

que algunas de ellas podrían ser catalogadas como antígenos ocultos, por no ser accesibles al sistema inmune del hospedador.

En los trabajos de **Knox et al., (1999)**, a partir de homogeneizados de vermes adultos de *H. contortus*, utilizando detergentes capaces de extraer proteínas integrales de las membranas celulares (Triton X-100), y posteriormente enriquecidos mediante cromatografía en columnas de thiol-sepharosa, pudieron obtenerse extractos con actividad proteínasa capaces de inducir un elevado grado de protección frente al parásito en ovinos inmunizados con el producto obtenido. Dicha protección se tradujo en una reducción del 52% en el número de vermes adultos, así como del 95% en los recuentos fecales. Esta fracción, además de mostrar actividad cisteína-proteínasa, se localizó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos en la superficie intestinal del parásito.

Otro componente de esta fracción es una proteína cuyo peso molecular es de aproximadamente 60 KDa (glutamato deshidrogenasa -GDH-) (**Skuce et al., 1999a**); sin embargo, esta proteína no parece contribuir a la protección inducida por el extracto completo (**Redmond y Knox, 2004; Knox et al., 2005**).

En *O. ostertagi* **Geldhof et al., (2002)** también realizaron inmunizaciones en vacuno con una fracción S3-thiol procedente de vermes adultos, de forma similar a los trabajos anteriores, pero no se obtuvo ningún nivel de protección.

Los productos recombinantes expresados en bacterias de este tipo de proteinasas sólo han mostrado una protección parcial (**Redmond y Knox, 2006**), por lo que se ha propuesto la posibilidad de obtener vacunas recombinantes utilizando sistemas eucariotas como *Caenorhabditis elegans* (**Murray et al., 2007**). Aunque se ha demostrado que las proteinasas extraídas son enzimáticamente activas y están glicosiladas, hasta el momento no hay datos de efectividad *in vivo*.



#### 11.3.4 Otros antígenos ocultos

- Contortina: es obtenida a partir de adultos del parásito, siendo capaz de reducir la carga parasitaria en un 78% en ovinos vacunados (**Munn *et al.*, 1987**).
- Antígenos *p52* y *p46*: forman parte de una poliproteína denominada GA1 (**Jasmer *et al.*, 1993; Jasmer *et al.*, 1996**) e inducen protección en cabras y ovejas reduciendo la carga de vermes adultos en el abomaso (33% en ovino y 60% en caprino) y el recuento de huevos en heces (78% en ganado ovino y 50% en caprino) (**Jasmer *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2000b**).
- Antígenos *p45*, *p49* y *p53*: son de tres proteínas que fueron separadas de la denominada *H11* por cromatografía de intercambio iónico y son capaces de reducir en aproximadamente un 70% los recuentos fecales, y en torno al 30% los recuentos de vermes de *H. contortus* (**Smith *et al.*, 1993b**); actualmente se incluyen dentro del denominado complejo p150.
- Antígeno *p26/23*: también se han obtenido resultados positivos a partir de fracciones somáticas purificadas de bajo peso molecular, las denominadas *p26/23*, que fueron capaces de estimular la respuesta inmune tanto a nivel local como general, con reducciones en torno al 60% tanto en los recuentos fecales como en la carga parasitaria (**Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Domínguez-Toraño *et al.*, 2003**).

#### 11.4 VACUNACIÓN FRENTE *T. CIRCUMCINCTA*

También se han llevado a cabo estudios de inmunoprotección frente a *T. circumcincta* utilizando como inmunógenos diferentes antígenos no ocultos y

ocultos. Un ejemplo sería el estudio llevado a cabo por **Smith et al., 2001**, en el cuál desarrollaron un doble ensayo en el que pretendían observar si se generaba alguna protección cruzada entre *H. contortus* y *T. circumcincta*. Para ello utilizaron como antígeno glicoproteínas de membrana tanto de *H. contortus* como de *T. circumcincta*. En dichos trabajos observaron que los animales inmunizados con glicoproteínas de membrana de *H. contortus* no generaban ninguna protección cruzada frente a *T. circumcincta* y sí para *H. contortus*; y aquellos que recibieron glicoproteínas de *T. circumcincta* no confirieron ninguna protección frente a su homólogo, pero si existió una protección cruzada frente a *H. contortus*.

Otro intento por reproducir la exitosa protección generada frente a *H. contortus* mediante diferentes antígenos fue el llevado a cabo recientemente por **Halliday y Smith et al., 2011**. En su estudio utilizaron como inmunógeno una fracción soluble de la membrana de L4 de *T. circumcincta* que incluía un conjunto de proteínas de peso moleculares de 40, 60 y 200 kDa. Se seleccionó este inmunógeno por el éxito generado en ensayos previos en bóvidos frente a *O. ostertagi*. En el estudio se generó una respuesta específica frente al antígeno (aumento de IgG específica), pero no se observó ninguna reducción significativa de los recuentos fecales de huevos ni del número de vermes.

Las proteínas del tipo H11, H-gal-GP y TBSP también se han ensayadas como inmunógeno frente a *T. circumcincta*, con disparidad de resultados. Por ejemplo, en el ensayo de inmunoprotección desarrollado por **Mc Gillivery et al. 1992**, donde se utilizó como inmunógeno proteínas de L3 de 31 kDa, se consiguió una fuerte protección frente al verme. Se obtuvo una reducción significativa de los recuentos de huevos en heces y del número de vermes, y se detectaron anticuerpos específicos desde el cuarto día post inmunización hasta la tercera semana pi. Asimismo, los animales inmunizados también experimentaron un incremento del número de larvas en las criptas, estando dichas larvas rodeadas por linfocitos y eosinófilos. Estos resultados no fueron reproducibles

en los ensayos llevados a cabo por **Morton et al., 1995** tras seguir un protocolo similar de inmunización. Los autores sólo detectaron un aumento de anticuerpos específicos antes del reto los animales inmunizados, pero no originó ninguna protección. Las discrepancias podrían explicarse por las diferencias en la composición del complejo de 31kDa empleado como inmunógeno en cada estudio.

Otro ensayo de inmunoprotección frente *T. circumcineta* fue el desarrollado por **Knox et al. 1995**, quienes tras la inmunización de corderos con TBSP frente a *T. circumcineta* obtuvieron unos exitosos resultados de protección, con reducciones de un 71% en los recuentos de huevos en heces y de un 65% en el número de vermes; sin embargo, estos prometedores resultados no fueron reproducibles en ensayos posteriores.

En general, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos frente a *T. circumcineta* han sido mucho menos consistentes que el caso de *H. contortus* (**Smith et al., 2000; Knox et al., 2001**). La combinación de algunos de estos productos sí parece determinar mejores resultados, tal vez porque sea necesaria el reconocimiento de varias proteínas para que tengan lugar el inicio de las respuestas protectoras (**Nisbet et al., 2013**).

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. ANIMALES

En esta experiencia se han utilizado un total de 9 cabritos de raza Majorera que en el momento de adquisición contaban con aproximadamente 6 meses de vida. Los animales fueron alojados en instalaciones desinfectadas convenientemente, situadas en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria y fueron mantenidos en condiciones libres de nematodos desde su llegada hasta el momento del inicio de la experiencia. Los animales fueron alimentados a base de concentrado, forraje y agua *ad libitum*.

Tras la ubicación de los animales, y antes de iniciar la fase experimental, se realizó una serie de controles para determinar su estado sanitario desde un punto de vista parasitológico. Así, se llevó a cabo un estudio coprológico mediante técnicas de concentración (flotación en solución saturada de cloruro sódico) (Hendrix, 1999), observándose la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. A tenor de estos resultados los animales se trataron con una dosis de 3,5 ml de Vecoxan (diclazuril 2,5mg/ml) por vía oral.

## 2. PARÁSITOS

Los vermes adultos y las larvas 3 (L3) necesarios para las pruebas de inmunoprotección y producción de antígeno (excreción-secreción E/S) se obtuvieron mediante la inoculación vía intrarruminal de animales donantes con L3 de una cepa de *T. circumcincta* que actualmente se mantiene en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón en Zaragoza. Esta cepa fue inoculada en animales donantes ubicados en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas, siguiendo el mismo protocolo que en experiencias similares realizadas con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Molina *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2004).

## 2.1. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE L3 DE *Teladorsagia circumcincta*

Las L3 de *T. circumcincta* utilizadas en el desarrollo de esta experiencia fueron cedidas por el Dr. Uriarte del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.

Un total de 8000 L3 de *T. circumcincta* fueron inoculadas a cabritos donantes por punción intrarruminal. A partir de la inoculación se realizaron controles coprológicos semanalmente mediante flotación en solución saturada de cloruro sódico (**Hendrix, 1999**) hasta que comenzó la liberación de huevos. En ese momento, los controles coprológicos se hicieron 3 veces por semana mediante una técnica cuantitativa (Mc Master modificado -Paracount-EPG<sup>TM</sup>-) (**Maff, 1989; Colville, 1991; Sloss et al., 1994**).

Adicionalmente, se recogieron heces para su posterior cultivo y obtención de L3. Para ello, uno de los cabritos se trasladó a una jaula individual durante 1 semana, recogiendo las heces diariamente. Una vez recolectadas las muestras fecales, se procedió a disgregarlas y mezclarlas con turba estéril con ayuda de una espátula, humedeciéndolas y evitando un exceso de agua. Las heces se introdujeron en recipientes de plásticos protegidos con una gasa tupida para favorecer su aireación. Las muestras fueron entonces incubadas a 22°C durante 12-14 días. A lo largo del periodo de incubación, se procedió durante días alternos a remover el material fecal cultivado para así facilitar la aireación de las capas más profundas, añadiéndoles agua para humedecerlas en caso necesario.

El aislamiento de las L3 obtenidas en el coprocultivo se llevó a cabo mediante el método Baerman. Las larvas aisladas de este modo quedaban retenidas en papel de filtro, que una vez seco se depositaba de nuevo en el aparato de Baerman. Una vez recogida la suspensión limpia de L3 en agua, se mantenía a 4°C hasta su uso (**Fleck y Moody, 1988; Maff, 1989; Colville, 1991**).

## 2.2. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE VERMES ADULTOS Y CULTIVO IN VITRO

La técnica utilizada para la recogida de adultos de *T. circumcincta* se basa en la capacidad de los vermes para migrar activamente desde una película semisólida de agar hacia un medio mantenido a 37°C. Para ello, tras abrir el abomaso de los animales donantes, se llevó a cabo el lavado del mismo con 700 ml de agua destilada a 37°C. Tras haber recogido una alícuota de 100 ml para el recuento de vermes adultos, se le añadió al volumen restante los 700 ml de la solución de agar a 43°C (Sigma-Aldrich) 2 % (p/v), cuya función es permitir a los vermes que queden adheridos a los paños para su aislamiento. En 700 ml de agua destilada se añadió 14 g de agar y se llevó a ebullición tantas veces como fuera necesario hasta que no quedaran grumos. Posteriormente, se introdujo el agar en hielo para bajar la temperatura hasta los 43°C, mezclándose bien. A continuación, la mezcla se depositó en bandejas que contenían los paños de material poroso. Una vez solidificada la mezcla, se introdujeron los paños verticalmente en las urnas que contenían PBS 0.01 M a 37°C.

### - Phosphate-buffered saline (PBS) 0,01M; pH 7,2

REACTIVO	FÓRMULA	MOLARIDAD
Cloruro sódico (Sigma-Aldrich)	NaCl	0,123 M
Dihidrógeno fosfato de potasio (Sigma-Aldrich)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,003 M
Fosfato disódico (Sigma-Aldrich)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01 M

Tras introducirlas en una estufa a 37°C (P- Selecta®), se incubaron durante 2 horas permitiendo con ello que los vermes viables emergieran de la mezcla agar-contenido gástrico y migraran al fondo de la urna. A continuación, se retiraron los paños con los nematodos menos viables así como los restos de contenido gástrico.



Finalmente, se procedió a la recogida y lavado de los vermes que quedaron en el fondo de las urnas mediante centrifugación (50 x g/5 min). Para el lavado se realizaron tres centrifugaciones, los dos primeros en PBS 0,01 M estéril y la última en medio RPMI 1640 con antibióticos y antifúngicos.

- **Medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich):**

Para 500 ml de RPMI 1640 (Gibco; 041-02409 M):

REACTIVO	
L-glutamina (200mM) (Sigma-Aldrich)	10 ml de 100mM
D glucosa (100mg/ml) (Sigma-Aldrich)	50 ml
Penicillin/streptomycin (P 0906) (Sigma-Aldrich)	5 ml de 10000iu/10000µg/ml
Amphotericin B (25µg/ml) (Sigma-Aldrich)	62,5 mg
Gentamicin sulphate (10mg/ml) (Sigma-Aldrich)	12,5 mg
Hepes (1 M) (Sigma-Aldrich)	10 ml

Se disolvieron todos los aditivos en el medio en condiciones de esterilidad, filtrándolo primero por un filtro 0,45µm y otro de 0.2µm de diámetro de poro (VWR) y conservándose finalmente a 4°C hasta su uso.



Finalmente se procedió al cultivo de los vermes bajo condiciones de esterilidad, para lo cual se trabajó bajo una campana de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR). Los vermes contenidos en el medio de cultivo fueron recogidos con una lanceta y se introdujeron en frascos de cultivo de 160 ml (Nunc).

Los frascos se mantuvieron 24 horas en estufa a 37°C con una saturación de CO<sub>2</sub> del 5% (Shel Lab, CO<sub>2</sub> Incubator). Transcurrido este tiempo, se recogió con una pipeta el medio de cultivo que se conservó en frío para su procesamiento posterior. El medio se renovó y se incubaron los vermes otras 24 horas en las mismas condiciones, tras las cuales se repitió el proceso. El medio de cultivo así obtenido, que contenía productos de excreción-secreción (ES) de los vermes, se filtró a través de un filtro de 0.45 µm de diámetro de poro (VWR) y se sometió a un proceso de concentración centrífuga con un punto de corte de 10 KDa (Amicon Ultra, 10KDa, MWCO) (3000 x g, 20 min, 4°C), hasta obtener un volumen aproximado de 5 ml. Una vez determinada la concentración proteica (Pierce® BCA Protein Assay) del producto obtenido, el antígeno excreción-secreción (ES) se conservó a -20°C para su posterior fraccionamiento en columnas de Thiol-Sepharose (**Geldhof, et al., 2000**).

Los vermes adultos que se mantuvieron en cultivo durante 48 h, se lavaron con PBS 0,01 M y se congelaron a -20°C para su uso posterior como antígeno en distintos ensayos.

### 2.3. PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENIZADOS DEL PARÁSITO

Para ello, una vez descongelados, los vermes adultos se homogeneizaron sobre hielo en la siguiente solución, a razón de 300 vermes/ml a 4°C:

REACTIVO	MOLARIDAD
PBS (phosphate-buffer saline)	0,01 M
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma-Aldrich)	1 mM
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Sigma-Aldrich)	10 mM

Para llevar a cabo la fragmentación de los vermes se utilizó un homogeneizador de dispersión (Ultra-Turrax T8, IKA® WERKE). Los vermes se homogenizaron durante 60 segundos a máxima velocidad (2400 r.p.m.), manteniendo la muestra en reposos de 1 min entre cada 30 segundos. Para eliminar los restos celulares se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804R) a 5000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se hizo pasar por un filtro de jeringa con una membrana de 0,45 µm de diámetro de poro (VWR). La muestra resultante se utilizó como antígeno somático de vermes adultos de *T. circumcincta*.

La concentración proteica de todos estos extractos se determinó mediante el método BCA utilizando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay (Thermo SCIENTIFIC) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.4. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEOLÍTICAS A PARTIR DE PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN (E/S) DE VERMES ADULTOS DE *T. circumcincta*.

La purificación de las fracciones thiol-proteinasas a partir de los productos de E/S se realizó siguiendo un protocolo similar al propuesto por **Geldhof et al. (2002)** con ligeras modificaciones, utilizando para ello un Cromatógrafo 2110 Fraction Collector (BioRad), monitorizado por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm.

### Activación de thiol-proteinasas

Todos los extractos fueron preincubados con DTT ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) (dithiothreitol) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 2,5 mM durante 30 min a 37°C antes de la cromatografía (**Geldhof et al., 2002**).

### Procedimiento

- Hidratación y estabilización de la matriz

Se pesaron 1,25 g de Thiol-Sepharose4B® (Amersham Pharmacia Biotech), que se hidrataron haciendo circular sobre ellos una columna 300 ml de  $dH_2O$  de forma progresiva. La matriz hidratada (25% de  $dH_2O$  de su volumen total) se desgasificó y se mantuvo a 4°C.

- Montaje de la columna

La columna utilizada en el sistema cromatográfico fue una Columna C 10/10 (Pharmacia Biotech). Para el montaje del sistema se mantuvo todo el material a 4°C. Tras la hidratación de la matriz, se rellenó la columna con PBS 0,01 M, pH 7,2, primero a un flujo de 5 ml/min durante 20 min para conseguir su empacamiento y posteriormente a 0,1 ml/minuto durante toda la noche para su equilibrado.

- Prueba “binding”

Durante esta fase de la cromatografía se procedió a la unión por afinidad de las thiol-proteinasas, presentes en los homogeneizados y productos de E/S de *T. circumcincta*, a las moléculas de Sepharose-4B de la columna mediante enlaces covalentes. Para ello, los homogeneizados proteicos se introdujeron en la columna a un flujo de 0.1 ml/min, recirculando durante 2-3 horas para asegurar la unión de todos los grupos thiol. Transcurrido este periodo, se hizo pasar PBS durante 2 h a través de la columna para el lavado de la misma. Simultáneamente se fueron recogiendo fracciones de 2 ml y registrando la absorbancia de cada una de ellas.

- Elución

La etapa de elución consistió en la separación de las proteinasas retenidas en la matriz de Sepharose-4B, para lo cual se hizo circular un tampón que contenía un ligando con mayor afinidad que las proteinasas por los grupos thiol de la matriz. El buffer de elución estuvo compuesto por PBS 0,01 M con DTT 50 mM (Sigma-Aldrich). El flujo de elución fue también de 0,1 ml/minuto.

- Separación de las fracciones proteicas enriquecidas para thiol-proteinasa

Las fracciones que constituyeron el pico de elución se mezclaron y se eliminó el DTT mediante lavados consecutivos con PBS en los dispositivos de concentración centrífuga (Amicon Ultra, 10KDa, MWCO) a 4500 x g durante 20 min a 4°C.



**Fig.1** Cromatógrafo

## 2.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PERFIL PROTEICO

La concentración proteica de la mezcla se determinó mediante el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay. Los componentes peptídicos fueron visualizados mediante fraccionamiento en geles de Tris/Glicina SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% bajo condiciones no reductoras (**apartado**

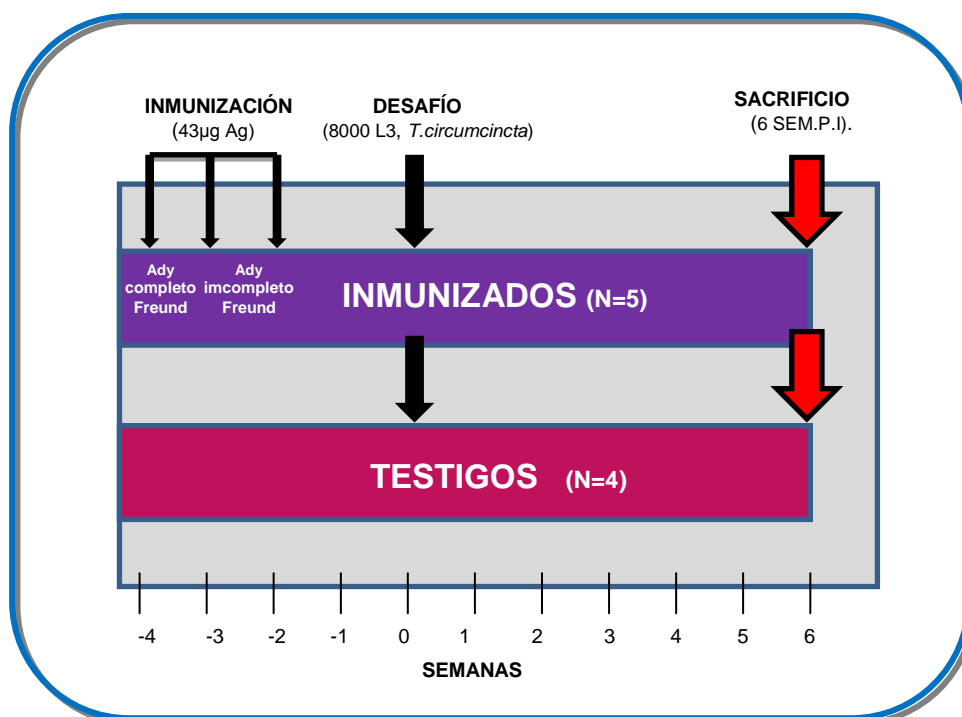
7.3.1.5.), revelándose con tinción de plata (Pierce® Silver Stain Kit. Thermo SCIENTIFIC). El peso molecular de estas fracciones se estimó con un análisis de regresión descrito en el **apartado 7.3.1.6.** Los extractos proteicos enriquecidos E/S-thiol fueron congelados a -80°C hasta su posterior utilización.

### 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Para la experiencia se emplearon 9 baifos de raza majorera de 6 meses de edad. Los animales se agruparon en dos lotes: **lote inmunizado** (n=5) y **lote testigo** (n=4). Los animales incluidos en el lote inmunizado recibieron vía intramuscular tres dosis del inmunógeno (43 µg/dosis cisteína-proteinasas procedentes de productos de excreción-secreción (E/S) de vermes adultos de *T. circumcincta*) durante tres semanas consecutivas. La primera dosis se combinó con adyuvante completo de Freund y la segunda y la tercera dosis con adyuvante incompleto de Freund. El lote testigo recibió las mismas tres inoculaciones pero sólo con adyuvante y diluyente, no con inmunógeno. Ambos lotes fueron desafiados 1 semana después de la última inmunización con 8000 L3 de *T. circumcincta*. Todos los animales del estudio se sacrificaron a las 6 semanas del desafío.

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la protección inducida tras la inoculación con cisteína-proteinasas procedentes de productos de excreción-secreción (E/S) de vermes adultos de *T. circumcincta* en ganado caprino, así como el análisis de la respuesta inmune (local y sistémica) desarrollada tras dicha inmunización, comparando los resultados observados con aquellos obtenidos en animales testigos. A lo largo del estudio también se analizaron diferentes parámetros biopatológicos en los dos lotes experimentales considerados (inmunizado y testigo).



### 3.2. RECOGIDA DE MUESTRAS A LO LARGO DEL EXPERIMENTO

A lo largo de la experiencia se obtuvieron semanalmente muestras de sangre, suero y heces, con el objeto de estudiar diferentes parámetros hemáticos, respuesta inmune humoral y el número de huevos de *T. circumcincta* liberado por los animales inoculados.

Las muestras de sangre para el estudio hematológico se obtuvieron por punción aséptica en la vena yugular y se recogieron en tubos colectores de 3ml (BD Vacutainer) que contenían 0,072ml de K<sub>3</sub>E al 7,5%. Para la obtención del suero se procedió del mismo modo, recogándose en este caso las muestras en tubos colectores de 3,5 ml sin anticoagulante (BD Vacutainer). Las muestras se conservaron a 4°C durante 90 min para posteriormente separar el suero mediante centrifugación a 1500 r.p.m durante 30 min. Los diferentes sueros, convenientemente identificados, se conservaron en viales de poliuretano de 1,5 ml y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Las muestras fecales se recogieron directamente del recto de los animales y con ellas se realizaron estudios coprológicos cualitativos y cuantitativos. El muestreo se realizó tres veces por semana desde que se detectó la presencia de huevos, hasta la última semana del estudio, momento en el que se procedió al sacrificio. Para evitar, en la medida de lo posible, fluctuaciones diarias en los recuentos fecales (MAFF, 1989), todas las tomas de muestras se realizaron aproximadamente a la misma hora, procediéndose inmediatamente al procesamiento de las mismas.

### 3.3. RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO

El sacrificio se realizó en el Matadero Insular de Gran Canaria. Una vez sacrificados los animales y retirado el paquete gastrointestinal a la cadena de despojos, se obtuvieron los abomasos y ligaron el píloro y cardias. Se tomaron muestras también de los nódulos linfáticos abomasales y mesentéricos.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de la Unidad de Parasitología del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

#### 3.3.1. Recogida de muestras para el estudio histológico e inmunohistoquímico

Para el estudio histológico, se tomó una muestra de aproximadamente 2x2 cm de la curvatura mayor del abomaso correspondiente al fundus gástrico, que fue conservada en formol tamponado al 10 % (tabla 1) durante 24-48 horas. Posteriormente, las muestras se procesaron, siguiendo el método habitual, en un procesador automático de tejidos (Leica TP-1050, Leica Instruments GMBH, Nussloch, Alemania) y se incluyeron en parafina para su corte histológico.

<b>dH<sub>2</sub>O</b>	900 ml
<b>Formalina pura</b> (Panreac)	100 ml
<b>Fosfato sódico monobásico</b> (Merck)	4 g
<b>Fosfato sódico dibásico</b> (Merck)	6,5 g

**Tabla 1:** Preparación del formol tamponado al 10%

Para el estudio inmunohistoquímico se recogió otra muestra de tamaño similar del abomaso. Las muestras fueron recubiertas previamente con O.C.T. (Optimal Cutting Temperature, Tissue Tek<sup>®</sup>; Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Holanda) y congeladas durante unos minutos en un recipiente que contenía isopentano (PRS Panreac Química SA), el cual se había mantenido previamente a -80°C durante unas horas. El isopentano actúa como crioprotector al mantener la morfología celular e impedir la destrucción tisular por choque térmico. Una vez que el O.C.T. adquirió una consistencia sólida, los bloques con las muestras se almacenaron en cámara a -80°C hasta su posterior procesado. A partir de estos bloques, y con la ayuda de un criostato (Reichert-Jung 2800 Frigocut N) a -20°C, se obtuvieron cortes histológicos con un grosor de 5 µm.

### 3.3.2. Recogida de muestras para el estudio de expresión de citoquinas

Para el estudio de la expresión de citoquinas se recogieron muestras de nódulos linfático abomasales y mesentéricos, así como de la curvatura mayor del abomaso de cada animal de aproximadamente. Las muestras, de aproximadamente 0,5x1x1cm, se introdujeron en criotubos con trizol (**Sambrook *et al.*, 1989b**), se sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se mantuvieron a -80°C.



### 3.3.3. Recogida del mucus abomasal

La recogida de mucus se realizó suavemente de la región fúndica del abomaso con la ayuda de un portaobjetos. Estas muestras se utilizaron para la posterior determinación de anticuerpos específicos locales (isotipos IgG e IgA). Para proteger las muestras en su degradación, cada gramo de mucus se suspendió en 2,5 ml de buffer con inhibidores de proteinasas a pH 7,1, según el siguiente protocolo:

REACTIVO		CONCENTRACIÓN
Fosfato disódico (Sigma-Aldrich)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,1 M
Cloruro sódico (Sigma-Aldrich)	$\text{NaCl}$	0,05 M
Ázida de sodio (Sigma-Aldrich)	$\text{NaN}_3$	3 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)	$\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$	1 mM
Ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich)	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mM

### 3.3.4. Recogida del contenido abomasal

A fin de determinar la carga parasitaria de los animales inoculados, el abomaso se abrió a través de la curvatura mayor, procediéndose al lavado de la superficie gástrica con 700 ml de agua destilada a 37°C, raspando cuidadosamente la superficie. A continuación, se agitó la suspensión para obtener una mezcla homogénea, y se recogieron alícuotas de 100 ml, que fueron conservadas hasta su posterior procesado añadiendo formaldehído (35-40%, Panreac) hasta conseguir una concentración final del 10% (modificado de **MAFF, 1989**).

### 3.3.5. Recogida de mucosa gástrica

Con la ayuda de un portaobjetos, se realizó un raspado profundo de la totalidad de la mucosa gástrica para estimar la población de vermes inmaduros presentes en la mucosa en el momento del sacrificio. Las muestras recogidas de cada animal fueron posteriormente pesadas y conservadas en congelación a -20°C hasta su posterior procesado.

## 4. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

Durante el periodo experimental, se valoraron diversos parámetros hematológicos en todos los animales.

### 4.1. HEMATOCRITO

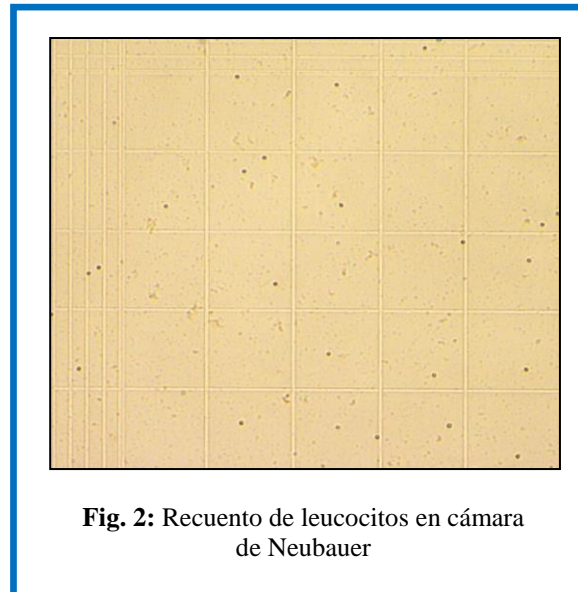
Las muestras de sangre se centrifugaron (Mixtasel, Selecta) a 8000 r.p.m. durante 7 min en capilares de microhematocrito (Marienfeld, Glassware). La determinación de este parámetro tras la centrifugación se llevó a cabo con la ayuda de una escala comercial (J.P. Selecta, S.A).

### 4.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La concentración de las proteínas plasmáticas (g/dl) se determinó con ayuda de un refractómetro (Comecta SA) a partir de las muestras plasmáticas obtenidas al analizar el hematocrito.

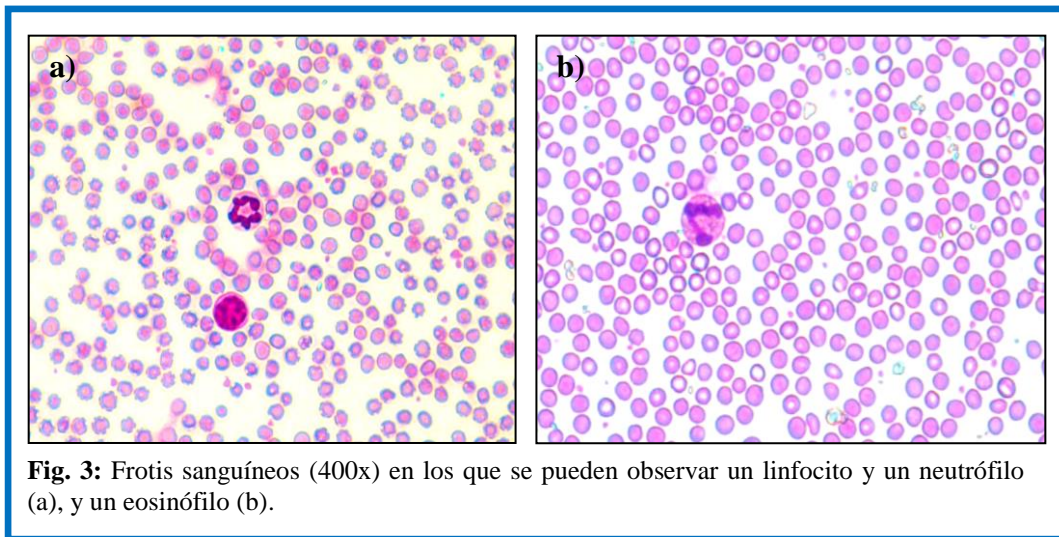
### 4.3. RECUENTO TOTAL DE LEUCOCITOS

Tras realizar una dilución de las muestras sanguíneas de cada animal investigado (1:20) en líquido de Türck (Panreac SA), (Voigt, 2003), se llevó a cabo el recuento total de los glóbulos blancos con ayuda de una cámara de Neubauer (Tiefe) de un volumen de 0,02 µl de muestra diluida. El resultado se multiplicó por 50 y de este modo se obtuvo el nº de leucocitos/ml de sangre.



#### 4.4. RECuento DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA

Para realizar el recuento diferencial de leucocitos se llevaron a cabo extensiones de sangre de cada animal que posteriormente se tiñeron con panóptico rápido (Panreac SA). A continuación se procedió al recuento diferencial de 100 leucocitos en cada preparación, discriminando entre neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. A partir de este dato y del número total de leucocitos/ml de sangre, se calculó el número de células de cada tipo leucocitario/ml de sangre.



## 5. EVALUACIÓN DEL PEPSINÓGENO SÉRICO

La medida de la concentración del pepsinógeno en suero ha sido recomendada como un método para valorar la carga parasitaria en las infecciones por *Ostertagia/Teladorsagia* sp. (Berghen *et al.*, 1993). Las L3 de *T. circumcincta*, así como las de otros nematodos gástricos, penetran en las glándulas gástricas, donde mudan y se transforman en L4 y posteriormente a L5 (preadultos). En este proceso lesionan las glándulas gástricas encargadas de producir HCl. El aumento del pH gástrico determina un acúmulo de pepsinógeno que no se transforma en pepsina. Los daños de la mucosa gástrica favorecen el paso de este compuesto al torrente sanguíneo, donde se detecta de forma proporcional al daño tisular ocasionado por el parásito (Cordero del Campillo, 1999). La estimación de los niveles de pepsinógeno se llevan a cabo mediante un micrométodo (Dorny & Vercruysse, 1998), basado en la medición de la actividad proteolítica del suero en relación a un estándar de concentración de aminoácidos (L-tirosina) conocida (Edwards *et al.*, 1960; Jennings *et al.*, 1966; Berghen *et al.*, 1987).

## 5.1. EVALUACIÓN DEL PEPSINÓGENO SÉRICO POR MICROMÉTODO (Dorny & Vercruysse, 1998).

### 5.1.1. Material

- a) **Muestra:** suero obtenido según lo reflejado en el **apartado 3.2.**
- b) **Sustrato:** albúmina sérica bovina al 2% (p/v) en una solución de glicina-NaCl-HCl (0,1M) con un pH final de 2,5.
- c) **Ácido tricloroacético:** utilizado para precipitar el sustrato no digerido en la digestión peptídica, a una concentración del 4% (p/v) en agua destilada.
- d) **Diluyente:** solución de NaOH 0,25N.
- e) **Solución estándar:** diluciones de una solución de L-tirosina 0,01M en HCl 0,1N.
- f) **Colorante:** reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) diluido a una concentración 1:3 (v/v) en agua destilada.

### 5.1.2. Procedimiento

Tras su descongelación, se añadieron 50µl de cada una de de las muestras a viales de poliuretano de 1,5ml que contenían 250µl del sustrato. A continuación se agitaron los viales y se procedió a su incubación durante 24 h a 37°C.

Tras la incubación, la digestión peptídica se detuvo y el sustrato no digerido se precipitó añadiendo 500µl de ácido tricloroacético (4% p/v) e incubando durante 10 min, tras los cuáles se procedió a centrifugar los viales durante 5 min a 10000 x g en una microcentrífuga (P Selecta).

Una vez efectuada la centrifugación, se transfirieron por triplicado 20µl del sobrenadante a viales que contenían 200µl del diluyente. Cada uno de los

viales se agitó durante 2 min, y se añadió a cada uno 30µl del colorante diluido. Se volvieron a agitar durante 2 min, para posteriormente mantenerlos a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 min.

Tras la incubación, se procedió a la distribución de las muestras (200µl) en una placa de poliestireno (CORNING Dispensable Sterile ELISA Plates, Corning Glass Works). En cada placa, tres pocillos quedaron reservados como blanco de referencia de la reacción colorimétrica final, en cuyo caso, los 20µl de suero se sustituyeron por agua destilada.

Para calcular la cantidad de tirosina liberada durante la incubación de las muestras con el sustrato se utilizaron tres diluciones de la solución estándar: 0,1µm/ml, 0,2µm/ml y 0,3µm/ml. De cada disolución se transfirieron 20µl a viales que contenían 200µl del diluyente. Se agitaron los viales y se añadió el colorante, siguiendo el mismo procedimiento empleado sobre cada una de las muestras de suero.

Finalmente, se procedió a la medida de las absorbancias o densidades ópticas mediante un lector de placas de ELISA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 690 nm.

## 5.2. TRANSFORMACIÓN DE LOS VALORES DE ABSORBANCIAS EN UNIDADES DE TIROSINA (UTYR).

Con objeto de eliminar las fluctuaciones que presentan las densidades ópticas de una misma muestra obtenidas en los diferentes ensayos, los valores de absorbancia se transformaron en Unidades de tirosina (U tyr) a partir de las diluciones del estándar de tirosina con las que se obtuvo una curva estándar.

### 5.2.1. Corrección de la tirosina del suero

El suero no incubado contiene pequeñas cantidades de tirosina, por lo que se usó un factor fijo para corregirlo. Este factor se obtuvo de la medida del contenido de tirosina de 100 muestras de suero caprino no incubado con el sustrato, utilizando el mismo método. La absorbancia obtenida en las muestras no incubadas fue notablemente constante y presentó un valor medio de 0,059 a una densidad óptica de 690 nm. El factor 0,059 se incluyó en los cálculos para la obtención de la concentración de pepsinógeno en las muestras analizadas.

### 5.2.2. Procedimiento

El resultado de las tres medidas de densidad óptica de cada muestra de suero se transformó a Unidades de tirosina (U tyr), es decir, micromoles de tirosina liberados por litro de suero por minuto, usando una curva estándar preparada a partir del estándar de tirosina.

Los cálculos de la concentración de pepsinógeno fueron los siguientes:

$$U \text{ tyr} = (\text{OD muestra} - 0.059) \times F \times 11,11$$

Donde:

**U tyr:** unidades de tirosina expresadas en micromoles de tirosina liberados por litro de suero por minuto.

**OD:** media aritmética de la densidad óptica de los tres pocillos.

**0.059:** factor de corrección por la presencia de tirosina en muestras no incubadas.

**F:** factor calculado derivado de la curva estándar preparada del estándar de tirosina:

$$F = ( 0,1/(OD \text{ tyr } 0,1 \mu\text{mol/ml}) + 0,2/(OD \text{ tyr } 0,2 \mu\text{mol/ml}) + 0,3/(OD \text{ tyr } 0,3\mu\text{mol/ml}) )/3$$

**11.11:** factor de conversión de la dilución de los sueros y el tiempo de incubación.

## 6. ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS

En este estudio se utilizaron diversas técnicas parasitológicas que permitieron determinar el número de vermes adultos y formas larvarias en el contenido abomasal, el número de formas inmaduras de la pared del cuajar, así como parámetros relacionados con la fecundidad (longitud y número de huevos intrauterinos) y recuentos fecales de huevos.

### 6.1. RECUEENTOS FECALES DE HUEVOS

Tras el periodo prepatente, los controles coprológicos se hicieron 3 veces por semana, realizándose técnicas cualitativas de concentración y la técnica cuantitativa de McMaster modificado (Paracount-EPG<sup>TM</sup>).

#### - Métodos cualitativos

Se realizó una técnica de concentración con solución saturada de cloruro sódico (Fleck & Moody, 1988; Colville, J., 1991; Sloss *et al.*, 1994) con todas las muestras de heces recogidas de los animales infectados, con objeto de determinar la duración del periodo prepatente de la infección experimental.



- Métodos cuantitativos

La concentración de huevos de *T. circumcincta* en las heces se estimó utilizando el método McMaster modificado (Paracount-EPG™) (**Thienpont, et al., 1979; MAFF, 1989; Sloss et al., 1994**).



**Fig.4:** Huevo de *T. circumcincta*.

## 6.2. RECUESTO DE VERMES ADULTOS EN ABOMASO

Se contabilizaron todos los vermes adultos presentes en cada alícuota de 100 ml de contenido abomasal, diferenciando entre hembras y machos (**Cordero del Campillo, 1999**), con ayuda de una lupa binocular (Wild, Heerbrugg) a 16x. El número total de vermes de cada animal se calculó considerando el volumen total de líquido recogido en el lavado, tal y como se describió en el apartado correspondiente (**Wood et al., 1995**). De las hembras totales se recogieron 30 al azar, se depositaron en un porta y se midieron en una lupa binocular que disponía de una regla graduada en uno de los oculares, (9x), expresándose los resultados en milímetros. Posteriormente, se procedió al recuento de huevos intrauterinos de cada una de estos vermes.



**Fig. 5:** Macho de *T.*

**Fig. 6:** Hembra de *T. circumcincta*.  
(Solapa vulvar).

### 6.3. DIGESTIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA Y RECuento DE VERMES INMADUROS.

Tras descongelar la mucosa gástrica de cada animal, aproximadamente 9 g de la misma se incubaron con una solución de digestión que contenía pepsina y HCl (Tabla 2) a razón de 2 ml/g de mucosa. Este procedimiento se desarrolló durante 15 min a 37°C y en agitación (modificado del **MAFF, 1989**). Posteriormente se determinó el volumen resultante y se contabilizaron las formas inmaduras del verme en una alícuota de 20 ml con la ayuda de una lupa (Wild Heerbrugg) (16x).

<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Completar hasta 100 ml
<b>NaCl (Panreac)</b>	0,85 g
<b>HCl 37 % (Panreac)</b>	2 ml
<b>Pepsina (Sigma)</b>	0,8 g

**Tabla 2.** Composición de la solución de digestión para mucosa abomasal

## 7. RESPUESTA INMUNE HUMORAL SISTEMICA Y LOCAL

Las muestras de suero y mucus obtenidas según quedó recogido en los **apartados 3.2.** y **3.3.**, se utilizaron para analizar la respuesta inmune humoral mediante un método ELISA indirecto con el objetivo de detectar los niveles de anticuerpos específicos (isotipos IgG e IgA) frente a antígenos somáticos de vermes adultos. Dichas muestras también se utilizaron para analizar mediante Inmunoblot (Western-blot) las fracciones polipeptídicas de homogenizados de vermes adultos reconocidas por esos dos isotipos de inmunoglobulinas.

### 7.1. ELISA PARA LA DETECCIÓN DE Igs ESPECÍFICAS DE SUERO

Las muestras se analizaron por duplicado en microplacas mediante un test ELISA indirecto, usando como conjugados anti-IgG y anti-IgA caprinas. Todos los reactivos se titularon antes de su uso para determinar las condiciones óptimas de ensayo.

#### 7.1.1. Material inmunológico

##### A) Antígeno

Para antigenar las placas se utilizó antígeno somático crudo de *T. circumcinca* preparado como se describió anteriormente. El extracto antigénico se diluyó en tampón carbonato a una concentración de 0,5 µg/ml para la determinación de los niveles de IgG específicos, y a 5 µg/ml para analizar los niveles de IgA, en el caso del suero. Para la determinación en el mucus, se utilizó una concentración de 3 µg/ml para la determinación de los niveles de IgG específicos y de 5 µg/ml para los niveles de IgA.

##### B) Control positivo

Al no poder contar con un suero de referencia de *T. circumcinca* para la especie caprina y, tratando de eliminar en la medida de lo posible las diferencias o fluctuaciones a lo largo de la experiencia (inter-ensayo), se procedió a obtener

un “pool” de sueros y mucus que sirviera de control positivo de referencia. Para ello se llevó a cabo un ensayo con los sueros y mucus de los animales inoculados. Aquellas muestras que determinaron una densidad óptica más elevada fueron seleccionadas para obtener dicho “pool” de referencia (100 µl/muestra).

C) Control negativo

Se procedió de la misma manera que para el “pool” positivo pero seleccionando los animales con una densidad óptica más baja dentro de un lote control negativo procedente de otra experiencia realizada en el laboratorio.

D) Suero problema

Las muestras de suero problema, así como los “pool” positivos y negativos se diluyeron en PBS 0,01 M con ácido de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma-Aldrich) al 0.02% (p/v) a razón de 1:100 para la determinación de los niveles de IgG y a 1:25 para los niveles de IgA específica, tanto en el caso del suero como en el del mucus.

E) Conjugado

En el análisis de los sueros se utilizó como conjugado una anti-IgG caprina aislada de conejo (Sigma-Aldrich) y anti-IgA caprina aislada de conejo (Acris Antibodies GmbH), en ambos casos marcadas con peroxidasa. El conjugado para la determinación de IgGs se diluyó en PBS 0,01M a razón de 1:4000 y el correspondiente para las IgAs se utilizó a una dilución 1:7000, en el caso del suero; siendo 1:1000 y 1:5000 las diluciones empleadas para las determinaciones en mucus, respectivamente.

### 7.1.2. Reactivos

A) Tampón carbonato

El tampón carbonato (pH 9,6), se utilizó como diluyente del extracto antigénico para facilitar su absorción en los pocillos de las microplacas de

ELISA. Dicho reactivo se preparó según el protocolo siguiente:

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN
Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich)	90,6 ml	8,4% (p/v)
Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich)	36,4 ml	10,6% (p/v)
Agua bidestilada	2 litros	

#### B) Solución de lavado

Se utilizó PBS con Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate) (Sigma-Aldrich) al 0,05% (v/v).

#### C) Agente saturador

Para evitar reacciones inespecíficas, se empleó albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a una concentración del 3% (p/v) en PBS 0,01M.

#### D) Sustrato

Como sustrato se utilizó un tampón cítrico-fosfato con un 0,04% (p/v) de dihidroclorato de orto-fenilen diamina como portador de grupos cromogénicos (OPD, Sigma-Aldrich), al que se le añadió en el momento de su uso H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Panreac) a una concentración final del 0,1% (v/v).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
0.25 gr de ácido cítrico anhidro (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) (PANREAC) + PBS 0.01 M	2,1% (p/v)
0.23 gr de fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) + PBS 0.01M	1,8% (p/v)
10 mg de OPD	
35 µl de agua oxigenada	

### E) Frenado

La solución de frenado se preparó a partir de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a una concentración 2 M (Panreac Química, S.A.).

#### 7.1.3. Procedimiento

Tras incubar la placa durante 24 h con el antígeno diluido en buffer carbonato pH 9,6, se realizaron tres lavados de cinco minutos con 200 $\mu$ l de PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) para eliminar el antígeno que no se había fijado. La concentración final de cada uno de los antígenos utilizados se encuentra recogida en la Tabla 3.

Para evitar el desarrollo de reacciones inespecíficas, las placas se incubaron a 37°C durante 45 min con una solución de albúmina sérica bovina al 3% (p/v) en PBS al 0,01 M, a razón de 200  $\mu$ l / pocillo. Tras la incubación con albúmina se repitió el lavado de la placa con PBS-Tween 20 al 0,05% en las condiciones antes descritas.

Cada una de los sueros problema se diluyó en una solución de PBS-Tween 20 al 0,05% que contenía ázida de sodio al 0,02% (p/v). Se dispensaron por duplicado 100  $\mu$ l/pocillo, y se incubó durante 1 hora a 37°C, procediendo posteriormente a un nuevo lavado de la placa.

El revelado de la reacción se llevó a cabo añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de una solución de conjugado (anti-IgG y anti-IgA de cabra) en PBS-Tween 20 al 0.05% incubando 45 min a 37°C. Tras el lavado correspondiente para eliminar el conjugado libre, se añadió el sustrato (12,2 ml de ácido cítrico al 2,1%, 12,8 ml de fosfato sódico al 2,8% y 10 mg de OPD). A la solución anterior, se le añadieron 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y se dispensó a razón de 100  $\mu$ l/pocillo, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos.

Finalmente, la reacción se frenó añadiendo 50  $\mu$ l/pocillo de una solución de ácido sulfúrico 2M. La determinación de las densidades ópticas se llevó a cabo mediante un lector de placa de ELISA (Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 492 nm.

ISOTIPO	TIPO DE ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO	DILUCIÓN DEL SUERO	DILUCIÓN DEL CONJUGADO
<b>IgG</b>	Somático adulto	0,5 $\mu$ g/ml	1:100	1:4000
<b>IgA</b>	Somático adulto	0,5 $\mu$ g/ml	1:25	1:7000

**Tabla 3:** Tabla resumen de la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos en suero empleada en esta experiencia.

#### 7.1.4. Transformación de los valores de absorbancia en Unidades Relativas

Una vez obtenidas las densidades ópticas (DO), como todas las muestras se distribuyeron por duplicado en la placa, se calculó la media aritmética de la DO de cada una de ellas. Con el objetivo de eliminar las fluctuaciones que presentan las densidades ópticas de una misma muestra en los diferentes ensayos inmunoenzimáticos, se transformaron los valores de absorbancia en Densidades Ópticas Relativas (ODR), a partir del pool de sueros positivos y negativos.

Para ello se hallaron las densidades ópticas relativas refiriendo las densidades ópticas de cada muestra a la del control positivo:  $ODR = OD - NC / PC - NC$ , donde OD = absorbancia suero problema; NC = absorbancia del pool negativo; PC = absorbancia del pool positivo (**Strain & Stear, 2001**).

#### 7.2. ELISA PARA LA DETECCIÓN DE Igs ESPECÍFICAS DE MUCUS

Para proteger las muestras en su degradación, cada gramo de mucus

obtenido según el **apartado 3.3.3** se suspendió en 2,5 ml de buffer con inhibidores de proteinasas a pH 7,1, según el siguiente protocolo:

REACTIVO		CONCENTRACIÓN
Fosfato disódico (Sigma-Aldrich)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
Cloruro sódico (Sigma-Aldrich)	NaCl	0,05 M
Ázida de sodio (Sigma-Aldrich)	NaN <sub>3</sub>	3 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S	1 mM
Ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·H <sub>2</sub> O	5 mM

Tras centrifugar la mezcla a 5000 x g (Eppendorf Centrifuge 5804R) durante 1 hora, se recogió el sobrenadante y se conservó en congelación a -20°C hasta su posterior. El método utilizado fue el mismo para la determinación de los niveles de IgA e IgG séricas detallados en el **apartado 7.1.**, con ligeras modificaciones. Así, las muestras usadas en este caso fueron los sobrenadantes resultantes de la centrifugación del mucus. Estas muestras se diluyeron, al igual que el suero, en PBS 0,01M a la dilución recogida en la **Tabla 4**. El “pool +” se obtuvo con las muestras que mostraron una densidad óptica más elevada, y el “pool -” con las procedentes de los animales controles negativos no inoculados.

Del mismo modo, se ajustaron las concentraciones usadas del antígeno y el conjugado.



Isotipo	Tipo de antígeno	Concentración del antígeno	Dilución del mucus	Dilución del conjugado
IgG	Somático adulto	3 µg/ml	1:100	1:1000
IgA	Somático adulto	5 µg/ml	1:25	1:5000

**Tabla 4:** Tabla resumen de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos específicos en mucus empleada en esta experiencia.

### 7.3. INMUNOBLOTTING

#### 7.3.1. Inmunoblot (Western blot)-IgG sérico anti-*Teladorsagia circumcincta*.

La transferencia de proteína o “blotting”, consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección con sistemas diseñados para la tinción de estos “blots”. En este caso la tinción fue una reacción inmune, ya que se detectaron las fracciones proteicas transferidas a través de anticuerpos específicos.

##### 7.3.1.1. Material inmunológico

###### A) Antígeno

El extracto antigénico empleado se preparó mediante la homogeneización de los vermes adultos de *T. circumcincta* siguiendo el protocolo referido en el **apartado 7.1.1**. La concentración de dicho extracto fue de 2,24 mg/ml.

###### B) Marcadores de peso molecular

Se usó un marcador de bajo peso molecular (Pierce Blue Prestained Molecular Weight Marker, Thermo Scientific), que se preparó según las instrucciones del fabricante. El marcador contenía 7 proteínas con unos pesos moleculares de:

PROTEÍNA	PROCEDENCIA	P.M. (KDA)
Miosina	Músculo de conejo	215
Fosforilasa B	Músculo de conejo	120
Albumina (BSA)	Suero bovino	84
Ovoalbumina	Huevo de gallina	60
Anhidrasa carbónica	Eritrocitos bovinos	39.2
Inhibidor de la tripsina	Semilla de soja	28
Lisozima	Huevo de gallina	18,3

**Tabla 5.** Marcador molecular usado en la electroforesis

C) Control positivo

Se usó como control positivo el “pool +” utilizado en el test ELISA-IgG anti-*T. circumcincta* (**apartado 7.1.1.**) Este control positivo se diluyó a razón de 1/50 en PBS con azida de sodio a una concentración de 0,02% (p/v).

D) Control negativo

Se usó el “pool” utilizado en el test ELISA-IgG anti-*T. circumcincta*, diluido de la misma manera que el control positivo.

E) Suero problema

A la hora de llevar a cabo el Western-blot se utilizó un “pool” de sueros de algunas muestras séricas seleccionadas según los resultados obtenidos en los tests ELISA IgG anti-*T. circumcincta* (semanas -4, -2, 0, 3 y 6). La dilución de los diferentes “pool” de sueros, como en el caso del control positivo y negativo, se llevó a cabo a razón de 1/50 en PBS 0.01M con ázida de sodio (NaN<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 0,02% (p/v).

F) Conjugado

En el análisis de los diferentes sueros se utilizó como conjugado una anti-IgG caprina aislada en conejo y marcada con peroxidasa (Sigma-Aldrich), a una dilución 1/1000 en PBS 0,01M.

7.3.1.2. Reactivos para la electroforesis

A) Solución de acrilamida

La electroforesis del extracto antigénico se realizó sobre geles de Tris/glicina SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) preparados a partir de acrilamida y N,N'-metilen bisacrilamida a una concentración del 29,2% (p/v) y del 0,8% (p/v), respectivamente, como queda reflejado en el siguiente cuadro

REACTIVO		CANTIDAD	CONCENTRACIÓN
Acrilamida (Sigma-Aldrich)	$C_3H_5NO$	11,52 g	29,2% (p/v)
Bis-acrilamida N,N'-metilen bis-acrilamida (Sigma-Aldrich)	$C_7H_{10}N_2O_2$	0,32 g	0,8% (p/v)
Agua bidestilada		40 ml	

La solución final se conservó a 4°C hasta su uso.

#### B) Tampón del gel separador

El gel separador se elaboró a partir de un tampón 1,5 M de Tris, con un pH de 8,8 que fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl). El tampón se preparó de la siguiente forma, conservándose a continuación a 4°C:

REACTIVO		CANTIDAD
SDS. Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich)	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	0,5 g
Trizma base-TRIS (Tris-(hidroximetil)aminometano) (Sigma-Aldrich)	$C_4H_{11}NO_3$	22,75 g
Agua bidestilada		125 ml

#### C) Amonio persulfato

El amonio persulfato (APS)  $((NH_4)_2S_2O_8)$  (Merck) proporciona los radicales libres que favorecen la polimerización de la acrilamida y de la bis-acrilamida. Se empleó a una concentración del 10% (p/v) en agua destilada. La solución se alicuotó y conservó a -20°C.

## D) TEMED

El TEMED o N,N',N'-tetrametilenediamina ( $C_6H_{16}N_2$ ) (Sigma-Aldrich) acelera la polimerización de la acrilamida y de la bis-acrilamida al catalizar la formación de los radicales libres procedentes del amonio persulfato.

## E) Tampón del gel concentrador

El gel concentrador se elaboró a partir de un tampón 1,0 M de Tris, con un pH de 6,8 que fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl). El tampón se preparó de la siguiente forma, conservándose a continuación a 4°C:

REACTIVO		CANTIDAD
SDS. Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich)	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	0,5 g
Trizma base-TRIS Tris-(hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich)	$C_4H_{11}NO_3$	7,55 g
Agua destilada		125 ml

## F) Tampón de la cubeta de electroforesis

Para la realización de la electroforesis se dispuso un tampón 25 mM de Tris y 25 mM de glicina con un pH de 8,3 en los depósitos superior e inferior de la cubeta de electroforesis. El tampón se elaboró de la siguiente forma, y antes de su utilización se atemperó a 4°C:

REACTIVO		CANTIDAD
SDS. Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich)	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	1 g
Trizma base-TRIS Tris-(hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich)	$C_4H_{11}NO_3$	3 g
Glicina (Sigma-Aldrich)	$C_2H_5NO_2$	14,4 g
Agua destilada		1 litro

#### G) Diluyente de la muestra o tampón de carga

Como diluyente del extracto antigénico se empleó un tampón 0,5 M de Tris que fue ajustado a un pH de 6,8 con ácido clorhídrico (HCl) y al que se le añadió glicerina, duodecil sulfato sódico (SDS) (10%) (p/v) y azul de bromofenol (0,05%) (p/v). Se elaboró de la siguiente forma:

REACTIVO		CANTIDAD
SDS 10% (p/v) (Sigma-Aldrich)	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	4 ml
TRIS 0.5M-ClH (pH 6.8) (Sigma-Aldrich)	$C_4H_{11}NO_3$	2,5 ml
Glicerina (Panreac)	$C_3H_8NO_3$	2 ml
Azul de bromofenol (0.05%) (p/v) (Sigma-Aldrich)	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	0,5 ml

#### H) Tinción de geles

Tras la realización de la electroforesis algunos geles se tiñeron con un kit de tinción de plata (Pierce<sup>®</sup> Silver Stain Kit. Thermo SCIENTIFIC).

## 7.3.1.3. Reactivos para la transferencia

## A) Tampón de transferencia

Para la realización de la transferencia a membranas de nitrocelulosa de las diferentes fracciones polipeptídicas separadas durante la electroforesis se empleó el siguiente tampón:

SOLUCIÓN	REACTIVO		CANTIDAD
A	Glicina (Sigma-Aldrich)	$C_2H_5NO_2$	16,8 g (1.44%)
	Trizma base-TRIS (Sigma-Aldrich)	$C_4H_{11}NO_3$	3,53 g (0.3%)
	Agua destilada		500 ml
B	Metanol (Panreac)	$CH_3OH$	233,3 ml (20%)
	Agua destilada		433,3 ml

Las soluciones A y B se elaboraron por separado y se conservaron a 4°C, mezclándose momentos antes de llevar a cabo la transferencia. La mezcla se dispensó en la cubeta de transferencia.

B) Solución de *Ponceau S*

Se usó para teñir un trozo de la membrana de nitrocelulosa y así confirmar que la transferencia se había llevado a cabo correctamente. La solución de *Ponceau S* contenía un 0,1% de *Ponceau S* (p/v) en una solución al 5% de ácido acético (v/v) ( $C_2H_4O_2$ ) (Sigma-Aldrich).

## 7.3.1.4. Reactivos para la reacción inmunoenzimática

## A) Solución de lavado

El tampón empleado en los lavados, PBS-*Tween 20*, se elaboró según el

protocolo descrito en el **apartado 7.1.2.**

B) Agente saturador

Se empleó albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a una concentración del 3% (p/v) en PBS.

C) Sustrato

El kit de revelado fue el AEC Chromogen kit (AEC Staining Kit, Sigma-Aldrich). En dicho kit la reacción positiva viene determinada por la precipitación del AEC Chromogen (3-amino-9-ethylcarbazole).

7.3.1.5. Procedimientos

➤ Electroforesis

Las proteínas del extracto antigénico se separaron mediante geles de Tris/Glicina SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, que permitían la separación de las proteínas en función de su peso molecular (gel separador). Tras la polimerización del gel durante unos 20 min, se elaboró el gel concentrador, cuya función es concentrar las proteínas en la línea de unión con el gel separador.

REACTIVO	SEPARADOR	CONCENTRADOR
Solución de acrilamida	6 ml	0,83 ml
Buffer separador o concentrador	3.8 ml	0,63 ml
SDS al 10%	0.15 ml	0,05 ml
APS al 10%	0.15 ml	0,05 ml
TEMED	0.006 ml	0,005 ml
Agua destilada	5 ml	3,4 ml



Una vez formado, el gel se introdujo en la cubeta que contenía el tampón de electroforesis y se cargó el extracto antigénico en condiciones no reductoras a razón 1:3 con tampón de carga, así como el marcador. Se conectó la cubeta (Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell BioRad) a la fuente de alimentación y se aplicó un voltaje de 100V constantes a 4°C. La electroforesis se detuvo cuando el frente de la electroforesis, teñido con azul de bromofenol, se encontraba a 0,5 cm del borde de la placa del gel.

➤ Transferencia de las proteínas

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Pure Nitrocellulose Blotting Membrane, Bio Trace<sup>®</sup> NT, Life Sciences) mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel y a la membrana. Antes de montar la cámara de transferencia, se separó el gel concentrador del gel separador. El gel separador se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa, seis papeles de filtro y dos almohadillas y el conjunto se incubó durante 15 min. en el tampón de transferencia a 4°C.

Tras estos 15 min se procedió al montaje del “cassette” de transferencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (Mini Trans Blot, BioRad). Cerrada la rejilla, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana, se introdujo en la cubeta, que se llenó con tampón de transferencia a 4°C. La transferencia se realizó a 100V constantes durante 1 h a la misma temperatura.

Al finalizar el proceso de transferencia se tiñó la parte de la membrana que contenía el marcador de peso molecular con la solución de *Ponceau S*, para confirmar que se había llevado a cabo con éxito la transferencia. El resto de la membrana se secó, se cortó en tiras de 6 mm de ancho y se inició la reacción inmunoenzimática.

➤ Reacción inmunoenzimática

Todo el proceso se realizó en agitación. Tras colocar las diferentes tiras de la membrana de nitrocelulosa en la bandeja de incubación, se sometieron a tres lavados de 5 min cada uno con 3 ml de PBS-Tween 20.

A continuación se bloquearon los espacios libres del filtro de nitrocelulosa con una solución de albumina bovina al 3% en PBS. Se aplicaron 3 ml a cada tira durante 1 h a 24°C, tras lo cual se realizaron otros tres lavados.

Tras realizar las diluciones de los controles positivo y negativo y de los “pool” de sueros, se dispensaron 3 ml de cada uno de ellos en sus respectivos pocillos, reservándose dos de éstos como blancos de referencia. A continuación se cubrió la placa y se incubó durante toda la noche a 4°C. Tras ese periodo de incubación, se realizaron otros tres lavados, tras los cuales se añadió el conjugado diluido 1/1000 en PBS durante 1 h a 24°C.

Antes de añadir el sustrato, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y un último lavado con PBS. A continuación se añadió el sustrato a razón de 1 ml por pocillo. Una vez que las bandas se visualizaron de forma nítida se frenó la reacción sumergiendo las tiras en agua destilada.

7.3.1.6. Estimación del peso molecular de las diferentes fracciones polipeptídicas detectadas en el inmunoblot IgG sérico anti-*T. circumcincta*.

La determinación del peso molecular de las diferentes subunidades polipeptídicas presentes, tanto en los geles de acrilamida que fueron teñidos con plata tras la electroforesis como en las tiras de membrana de nitrocelulosa procedentes de la reacción inmunoenzimática en el Western-blot se llevó a cabo a partir del marcador molecular mediante el empleo de un análisis de regresión (Milton, 1994; Gardiner, 1997), utilizando como referencia la migración.

### 7.3.2. Inmunoblot (Western blot)-IgG e IgA anti-*Teladorsagia circumcincta* en mucus

El método usado fue el mismo que el empleado para las muestras séricas (**apartado 7.3.1**), pero utilizando los “pools” de los sobrenadantes resultantes de la centrifugación del mucus, según quedó recogido en el apartado 7.2. Estas muestras se diluyeron, al igual que el suero, en PBS 0.01M con ázida de sodio 0,02% a razón de 1:1.

El antígeno se usó a la misma concentración que en el Inmunoblot de suero y los anticuerpos secundarios (anti-IgG y anti-IgA) se diluyeron en PBS 0,01 M a razón de 1:1000 en ambos casos.

## 7.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

En la mucosa abomasal y los linfonódulos abomasales, obtenidos según lo descrito en el **apartado 3.3.2.**, se estudió la expresión de diversas citoquinas ( $\gamma$ -Interferón, IL-2, IL-4, IL-10 e IL17). Para ello se realizó la técnica de retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para determinar los niveles de expresión del ARNm que codifica estas cinco citoquinas.

### 7.4.1. Extracción de ARN total de las muestras tisulares

Evitando la descongelación de la muestra, se extrajo el ARN según el siguiente protocolo:

- Se cortaron aproximadamente 100 mg de tejido congelado y se sumergieron inmediatamente en 1 ml de TRI-Reagent (TRIzol). Este producto induce la rotura de membranas celulares, liberándose el ARNm. La lisis celular se vio incrementada usando un homogeneizador de vidrio de paredes melladas.
- Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min,

añadiéndose posteriormente 0,2 ml de Cloroformo por cada ml de TRI-Reagent inicial. El cloroformo facilitó la separación de la fase acuosa de la orgánica.

- Posteriormente, las muestras se sometieron a agitación vigorosa durante 15 seg y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min.
- Para favorecer la separación de fases se procedió a la centrifugación de las muestras a  $12000 \times g/4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, recogándose el sobrenadante rico en ARN, el cual se transfirió a un nuevo tubo.
- A los sobrenadantes se les añadieron 0,5 ml de isopropanol por cada ml de TRI-Reagent inicial, mezclándose por inversión para provocar con ello la precipitación del ARN presente en la fase acuosa. actuarla mezcla se incubó durante toda la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se centrifugó finalmente a  $12000 \times g/4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.
- El “pellet” obtenido se lavó con 1 ml de Etanol 70% frío por cada ml de TRI-Reagent inicial, deshidratándose con ello el ARN. Para ello se mezcló y posteriormente se llevó a cabo una nueva centrifugación en las mismas condiciones anteriores.
- El sobrenadante se eliminó y se dejó secar el pellet dentro de una cabina de flujo laminar durante 15-20 min, para posteriormente resuspenderlo en agua libre de ARNasas.

#### 7.4.2. Medida de la concentración de ARN

Se midió por espectrofotometría a 260 nm utilizando un Nanodrop. También se analizó el grado de pureza del ARN mediante la determinación de la relación A260/A280, y la contaminación con agentes alcohólicos por la relación A260/A230. Estos valores se encontraron en todos los casos entre 1,8-2,1 y 2,0–2,2, respectivamente.

Para confirmar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel

de agarosa MOPS. El gel fue preparado al 1,2% de la siguiente forma:

- 0,6 gr de agarosa en 43,5 ml de agua destilada. Se hirvió hasta la completa dilución de la agarosa en la fase acuosa.
- Se añadió 5 ml de MOPS 10X y 1,5 ml de formaldehído 37%.
- Se mezcló la solución, se vertió en la cubeta, se colocó el peine y se dejó enfriar hasta la solidificación completa.

La solución MOPS a 10X se preparó de la siguiente forma, tras lo cual fue autoclavada:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MOPS	0,4M
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	0,01M
Acetato sódico	0,1M

Las muestras utilizadas en los chequeos incluían 2 µl de MOPS 10X, 3.5 µl de formaldehído 37%, 10 µl de formamida y 5 µg de ARN. La mezcla resultante se calentó a 65°C durante 10 min y pasado este tiempo se pasaron a un recipiente con hielo y se les añadió a cada una de ellas 2 µl del buffer de carga:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Azul de bromofenol	0,25%
Sacarosa en agua	40%

El gel se colocó en una cubeta con MOPS 1X y a continuación se cargaron las muestras. Como marcador se utilizó un producto comercializado por AppliChem con 17 fracciones. La electroforesis se realizó a voltaje constante

100 voltios durante 50 minutos.

Transcurrida la electroforesis, las bandas de ácidos nucleicos separadas en el gel se tiñeron durante 30 min con una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml durante 30 min en agitación. Después de la tinción, se procedió al lavado del gel durante 15 min en las mismas condiciones, visualizándose los resultados mediante un transiluminador de luz ultravioleta y registrándose como imagen fotográfica gracias al programa Image Lab™ Software Version 2.0.1. (BioRad).

#### 7.4.3. Tratamiento con DNAsa

Para llevar a cabo la eliminación de contaminaciones con ADN genómico en las muestras se utilizó un kit RQ1 RNase-Free DNase, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se añadió 1 U de DNAsa por microgramo de ARN y la mezcla se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se procedió a la inactivación de la enzima con el buffer inactivador incluido en el kit durante 10 min a 65°C.

#### 7.4.4. Síntesis de ADNc

En este procedimiento se usó el kit comercializado por BioRad (iScript™ cDNA Synthesis Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. En un vial de plástico para PCR se añadió 1 µg de ARN de la muestra extraída según el protocolo anterior (tras la lectura con el Nanodrop), 4µl de buffer iScript (mezcla única de tampones, oligo (dT), cebadores aleatorios, dNTPs, estabilizadores y potenciadores), 1µl de la mezcla que contiene la retrotranscriptasa (MMLV RNAasa H+reverse transcriptase) y agua hasta ajustar un volumen final de la reacción de 20 µl. Siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, la reacción se realizó en un termociclador en tres pasos consecutivos: 25°C/5 min (anillamiento), 42°C/30 min (síntesis de ADNc) y 85°C/5 min (finalización de la

reacción).

El ADNc resultante se diluyó en 80 µl de agua libre de DNAasa antes de su amplificación (dilución 1:5) en la reacción PCR a tiempo real. El ARN utilizado como control negativo de la extracción para chequear la contaminación por ADN genómico se diluyó de la misma forma y usado.

#### 7.4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Para este proceso se usó el termociclador (Thermo cycler, BioRad). El ciclo de amplificación, que se repetirá cuantas veces sean necesarias, constó de tres fases: desnaturalización, anillamiento y extensión.

El análisis la expresión génica de las citoquinas se realizó mediante una PCR a tiempo real (utilizando el accesorio MyIQ™ en un termociclador BioRad), gracias a la inclusión de una molécula fluorescente (SYBR green) que se une al ADN de doble cadena y proporciona información de la cantidad de producto amplificado en cada ciclo (Ct).

Para la puesta a punto de una qRT-PCR óptima, ha de obtenerse una alta eficiencia de la amplificación (95-105%). Esta eficiencia se determina con la elaboración de una curva estándar, que debe tener un coeficiente de correlación mayor de 0.98 ( $r^2$ ).

- Procedimiento

El proceso de amplificación a partir del ADNc se realizó en un termociclador iCycler al que se le ajustó una lámpara MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System. Para monitorear el proceso se usó el programa iQ 5 Ostical System Software Version 2.0 para Windows 2000 y XP (BioRad).

Durante las reacciones de amplificación se empleó la Taq polimerasa comercializada por Promega, que incluía en la mezcla “madre” GoTaq® qPCR

Master Mix y como fluoroforo BRYT Green® dye, el cual se une más específicamente y mejor a la doble cadena de ADN que el SYBR Green®. La mezcla de reacción se preparó según instrucciones del fabricante.

Se evaluó la expresión de las siguientes citoquinas: interleucina 2 (IL-2), IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  e IL-17. Como gen de expresión constante utilizado en este estudio se empleó la  $\beta$ -actina; de esta forma, los resultados se normalizaron en función de las copias amplificadas de  $\beta$ -actina de cada una de las muestras analizadas, con la ayuda del software iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software Versión 2.0 para Windows 2000 y sistemas que operen con XP (BioRad).

Las parejas de cebadores (“primers”) utilizados en cada caso, fueron suministrados por Invitrogen. Sus secuencias se encuentran recogidas en la siguiente tabla, donde se indica la secuencia del primer, la longitud del producto, las condiciones óptimas de amplificación y la referencia bibliográfica de estudios anteriores. Cuando fue necesario su diseño, se utilizó la información publicada en el NCBI BLAST.

Para todas las parejas de cebadores, la temperatura (Tm) óptima seleccionada mediante ensayos previos fue de 61°C. Los ciclos de amplificación para todos los genes analizados quedan recogidos en el siguiente esquema:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95°C	2'	1
<b>Replicación del ADN</b>	94°C	15''	45
	61°C	20''	
	72°C	15''	
<b>Elongación final</b>	72°C	2'	1

**Tabla 6:** Ciclos de amplificación



En la mezcla de reacción se usó el kit GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega), que incluye todos los componentes necesarios para llevar a cabo las copias de ADN a partir del ADNc (buffer, MgCl<sub>2</sub>, nucleótidos, GoTaq hot start polimerasa, niveles bajos de carboxy-x-rhodamine reference dye y SYBR green), salvo los cebadores y la muestra. Aunque, en relación a la concentración de cloruro de magnesio, para la mayoría de los ensayos se tuvo que suplementar una cantidad mayor a partir de una solución de MgCl<sub>2</sub> con una concentración 50 mM (BioRad). En el caso de los cebadores, la concentración de partida fue de 20 μM. Las amplificaciones se realizaron en placas, por triplicado para cada una de las muestras, y en todos los casos la preparación de la mezcla se llevó a cabo a 4°C y en condiciones de esterilidad. Para cada gen se estandarizó cada componente de la reacción de PCR hasta optimizar el proceso de amplificación, en un volumen total de 25 μl, tal y como se detalla en el siguiente cuadro:

	<b>β-actina</b>	<b>IL-2</b>	<b>IL-4</b>	<b>γ-IFN</b>	<b>IL-17</b>	<b>IL-10</b>
<b>Master</b>	10	10	10	10	10	10
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	9	6.5	6.5	6.5	8	6.5
<b>Cl<sub>2</sub>Mg</b>	2.5	1.5	2.5	1.5	0	1.5
<b>Primer R</b>	0.5	1	0.5	1	1	1
<b>Primer F</b>	0.5	1	0.5	1	1	1
<b>DNA</b>	2.5	5	5	5	5	5

**Tabla 7:** Características de la mezcla de amplificación para cada cebador utilizado.

En todas las PCR se incluyó un control negativo, que incluía todos los componentes de la solución de amplificación excepto el ADNc, también se incluyó un control positivo. La curva estándar se elaboró con un “pool” del ADNc de las muestras de todos los animales analizados. Con esta curva se calculó la eficiencia de cada ensayo a través de una regresión lineal. En función de esta curva, se determinó diluir las muestras ADNc de nuestro experimento a razón de 1:5 con agua libre de DNAasa.

#### 7.4.5.1. Obtención de los controles positivos.

Para la obtención de controles positivos para los distintos genes se estimularon linfocitos procedentes de aislados ganglionares. Estos controles se emplearon para confirmar la amplificación y especificidad de los pares de cebadores.

Se aislaron linfocitos de nódulos abomasales de cabras sacrificadas en el matadero. La viabilidad de las células antes del cultivo se determinó mediante la técnica de exclusión con Trypan blue. Una vez ajustada la concentración, se cultivaron en placas de 12 pocillos (Nunc, Argent), a razón de  $5 \times 10^6$  células/ml en 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) con L-glutamina 2 mM suplementado con penicilina/estreptomicina (10000U penicilina - 10mg estreptomicina/ml) (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino inactivado 20% (v/v). El cultivo *in vitro* se llevó a cabo a 37°C durante 6 h en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este tiempo las células se recogieron y congelaron con buffer de lisis (EZNA<sup>TM</sup> RNA Isolation Systems). Para incrementar la producción de citoquinas durante el cultivo, las células se estimularon con mitógenos. Los cultivos destinados a la obtención de controles positivos de IL-2, IL-10 e INF- $\gamma$  se estimularon con CoA a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, mientras que para los controles de IL-4 e IL-17A se utilizó Phorbol a una concentración de 5 ng/ $\mu$ l (Gohin *et al.*, 1997).

	Secuencia de Primers 5' a 3'	Tamaño producto PCR (pb)	Condiciones	Óptimas	Temperatura anillamiento (°C)	Referencia N. accession
			MgCl <sub>2</sub> (mM)	Tm producto (°C)		
<b>β-actina</b>	CCAACCGTGAGAAGATGACCC CCCAGAGTCCATGACAATGCC	122	5	85	61	AF481159
<b>IL-2</b>	GTGAAGTCATTGCTGCTGGA TGTTACAGTTTTTGTCTGGA	202	3	81	61	Craig et al., 2007
<b>IL-4</b>	GCTGGTCTGCTTACTGGTATG CGATGTGAGGATGTTTCAGC	100	5	80	61	FJ936316
<b>IL-10</b>	GTGGAGCAGGTGAAGAGATC TGGTCCGGATTTTCAGAGG	198	3	82	61	AJ458378
<b>IFN-γ</b>	AGATAACCAGGTCATTCAAAGGAG GGCGACAGGTCATTCATCAC	180	3	82.5	61	U34232
<b>IL-17A</b>	TGCTACTGCTTCTGAGTCTGGTGGC TGACCCTCACATGCTGTGGGAAGTT	111	0	83.5	61	Yan et al., (2011)

**Tabla 8:** Secuencia y características de los cebadores utilizados para la amplificación de cada gen.

#### 7.4.5.2. Chequeo de amplicones

Tras la RT-PCR a tiempo real se realizó una curva de disociación que comenzó a 55°C hasta alcanzar los 95°C, para asegurar que el resultado positivo se correspondía con el fragmento deseado y no se trataba de dímeros de cebadores o bien de fragmentos inespecíficos.

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
95°C	30''	1
55°C	1'	1
55°-95°C	30''	81
22°C	1'	1

**Tabla 9:** Curva de disociación.

Los resultados positivos se analizaron también en geles de agarosa al 2,4% (p/v) preparados con TBE 1X y fueron secuenciados.

REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD
Trizma base-TRIS 2 M (Tris-(hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich))	$C_4H_{11}NO_3$	242 gr
EDTA 0.5 M Ácido etilen diamino tetraacético (Sigma-Aldrich)	$C_{10}H_{13}N_2O_8Na_3$	100 ml

Para esto último, el producto de PCR fue purificado usando un kit de producto de PCR (Roche Diagnostics GmbH) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las secuencias fueron de nuevo chequeadas usando el NCBI BLAST y presentaron homología entre el 99 y 100% con las secuencias de ARNm/ADNc que codifican citoquinas en ovino publicadas en las bases de datos.

#### 7.4.5.3. Cálculos

Los datos se obtuvieron con la ayuda del programa informático iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software Versión 2.0 para Windows 2000 y sistemas que operan con XP.

Se realizó una cuantificación relativa, siguiendo el método propuesto por **Pfaffl, 2001** tras determinar el ratio entre los resultados obtenidos en animales “problemas” (inmunizados y testigos) y los controles.

Cada muestra se analizó por triplicado, descartando resultados con una desviación estándar igual o mayor a 0,700.

## 8. RESPUESTA INMUNE LOCAL

### 8.1. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

#### 8.1.1. Preparación de los cortes

A partir de las muestras de abomaso en congelación se obtuvieron secciones

de 4  $\mu\text{m}$  en un criomicrotomo (Frigocut N 2800, Reichert Jung). Tras secarse durante 30-45 min se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los portaobjetos sobre los que se depositaron las secciones fueron tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma).

### 8.1.2. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos monoclonales primarios (anti-MHCII, anti-CD4, anti-CD8, anti-CDR45, anti- $\gamma\delta$  y anti-WC1) fueron cedidos por la Profesora Els Meeusen de la MONASH University (Melbourne, Australia). Como anticuerpos primarios se utilizaron un suero policlonal biotinado anti-IgG caprino (VECTOR) y otro suero policlonal anti-IgA humana (DAKO), obtenidos en conejos en ambos casos.

	CLON	CÉLULAS IDENTIFICADAS	DILUCIÓN
Anti-CD 4	SBU-T4 pool	Linfocitos T colaboradores	1:15
Anti-CD 8	SBU-T8; 36.65	Linfocitos T citotóxicos	1:15
Anti-CD 45R	SBU-P220; 20.96	Linfocitos B	1:5
Anti- $\gamma\delta$	86D	Linfocitos T $\gamma\delta$	1:10
Anti-WC-1	19.19	Linfocitos T $\gamma\delta$ activados	1:5
Anti-MHCII	SBU-II; 28.1	Células presentadoras de antígeno	1:20
Anti-IgA		Células IgA+	1:5000
Anti-IgG		Células IgG+	1:500

**Tabla 10:** Anticuerpos utilizados para el estudio inmunohistoquímico de la mucosa abomasal

### 8.1.3. Procedimiento

Los cortes se descongelaron a 4°C durante 20 min con el fin de evitar condensaciones que dificultaran los recuentos. Posteriormente se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente y se fijaron durante 5-10 min en etanol 100%. Finalmente se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% v/v para bloquear la peroxidasa endógena.

Tras dejar secar, las preparaciones se incubaron con suero normal de conejo (Dako Cytomation) diluido en PBS 1:100 v/v, bloqueando con ello los lugares inespecíficos de unión del anticuerpo primario.

Posteriormente se dispensó sobre las preparaciones el correspondiente anticuerpo primario diluido en un medio compuesto por RPMI (RPMI-1640 Medium, Dutch Modification, Sigma) y suero fetal bovino (Biochrome AG) al 5% v/v. El tiempo de incubación fue de 90 min a temperatura ambiente.

Seguidamente se realizó una incubación de 30 min con el anticuerpo secundario biotinado anti-IgG de ratón (Dako) diluido 1:20 v/v en RPMI-suero fetal bovino a una concentración final del 5%. En los ensayos en los que se utilizó el anticuerpo primario anti-IgA se utilizó un anticuerpo policlonal secundario diluido 1:200 en PBS anti-IgG de conejo (Dako) obtenido en cerdo. Los cortes incubados con anti-IgG biotinado no recibieron anticuerpo secundario, por estar biotinado el suero primario.

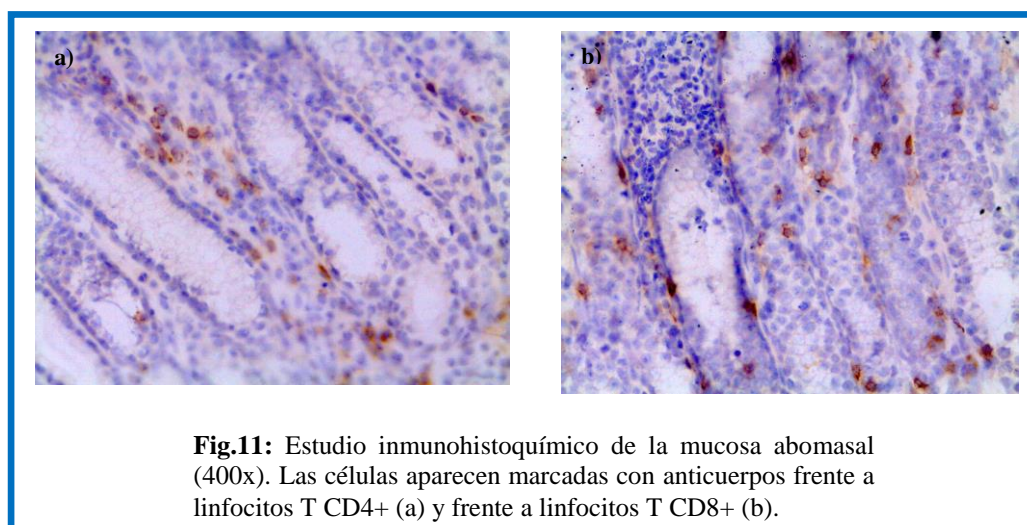
Posteriormente se procedió a la incubación de las muestras con el complejo avidina-biotina peroxidasa (Vector) diluido 1:100 v/v en PBS. Este procedimiento tuvo lugar en oscuridad durante 1 hora.

El revelado se llevó a cabo con una solución de 3,3'-Tetrahidrocloruro de diaminobenzidina hidratada (Sigma Aldrich), diluida al 0,035% p/v, a la que se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% diluida al 0,1% v/v en el momento previo a la incubación. La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris (Thermo). Finalmente, tras

deshidratar las preparaciones, se procedió a su montaje en medio DPX (Panreac).

#### 8.1.4. Recuentos celulares

Los recuentos de cada tipo celular se realizaron a 400 aumentos en 40 campos de 0,044 mm<sup>2</sup> situados en los tercios superior e inferior de la mucosa.



## 8.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

### 8.2.1. Preparación de cortes en parafina.

Las muestras de mucosa del fundus del abomaso de cada animal se tallaron y se embebieron en parafina. La pared del abomaso se orientó de modo que las glándulas fúndicas del abomaso se cortaran longitudinalmente, lo que permitió diferenciar fácilmente las distintas capas de la mucosa. A continuación se prepararon secciones de 4 µm con un microtomo (RM 3135, Leica) para su posterior tinción.

### 8.2.2. Desparafinado

Tras mantener los cortes en una estufa a 100°C durante 30 minutos, se procedió al desparafinado mediante dos pases sucesivos de dos minutos en xilol, otros dos en etanol 100°, y tres pases sucesivos en etanol 70° y agua destilada.

### 8.2.3. Tinciones

#### ➤ Tinción con hematoxilina-eosina

Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina permitieron contabilizar los eosinófilos y los leucocitos globulares de la mucosa del abomaso.

Tras el desparafinado, los cortes se tiñeron con hematoxilina de Harris (Thermo) durante 15 min a continuación se diferenciaron mediante 4 pases en alcohol clorhídrico (solución al 1% de HCl en etanol al 70%). Después de un breve lavado con agua corriente se realizaron 15 pases en agua amoniacal (solución de amoniaco al 0,2%) y se volvieron a lavar las secciones con agua corriente durante 15 minutos. A continuación se tiñeron las preparaciones con eosina-floxina (100 ml de eosina al 1% (p/v), 10 ml de floxina al 1% (p/v), 4 ml de ácido acético glacial y 780 ml de etanol al 95%) durante 4 minutos.

#### ➤ Tinción de Giemsa

Esta tinción permite reconocer los mastocitos gracias al fenómeno de metacromasia, por el que los gránulos de estas células son teñidos por los derivados del azul que contiene el colorante, proporcionando un color violáceo, distinguible del azul que normalmente se obtiene con este colorante en el resto del tejido.

Como solución de Giemsa se utilizó una gota de solución madre de Giemsa (Merck) por cada ml de agua destilada. Las preparaciones se mantuvieron en esta solución durante 25 minutos.



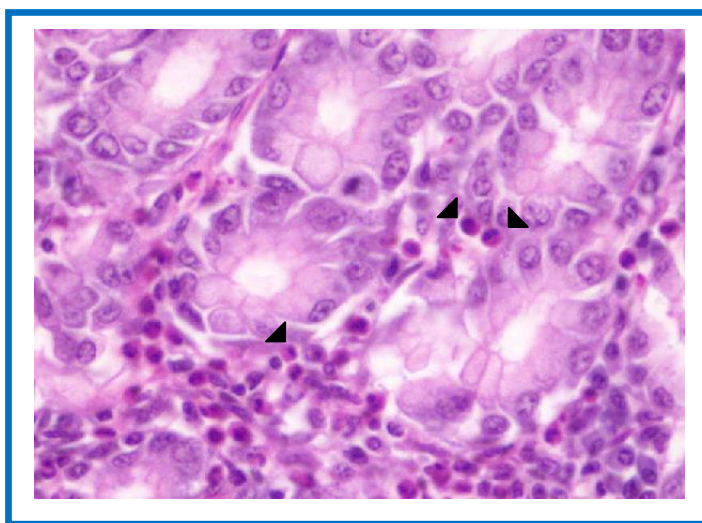
#### 8.2.4. Deshidratación y montaje

Tras la tinción de las secciones, se procedió a la deshidratación de las mismas mediante dos pases sucesivos de 2 min cada uno en etanol 96°, etanol 100° y xilol. El montaje se realizó en medio DPX (Panreac).

#### 8.2.5 Recuentos celulares

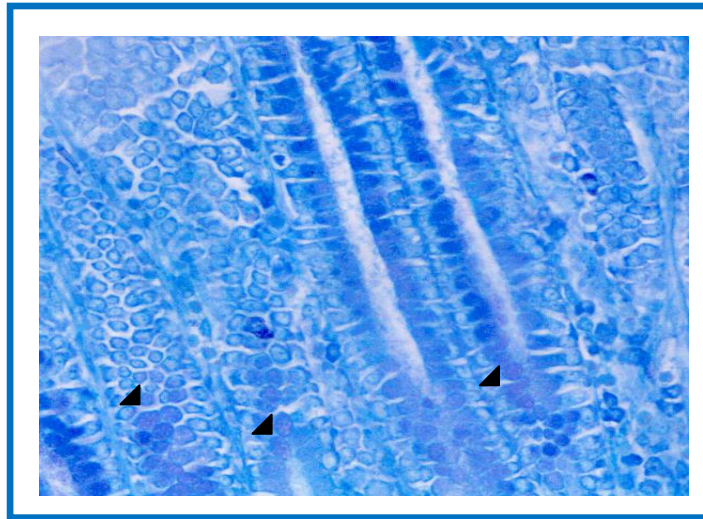
##### ➤ Eosinófilos de la pared gástrica

En las muestras de mucosa abomasal teñidas con hematoxilina-eosina se procedió al recuento de eosinófilos en, al menos, 30 campos de 0,044 mm<sup>2</sup>, en un área de tejido situada sobre la unión de la capa muscular de la mucosa y la lámina propia, utilizando para ello 400 aumentos. El resultado final se expresó en eosinófilos /mm<sup>2</sup>.



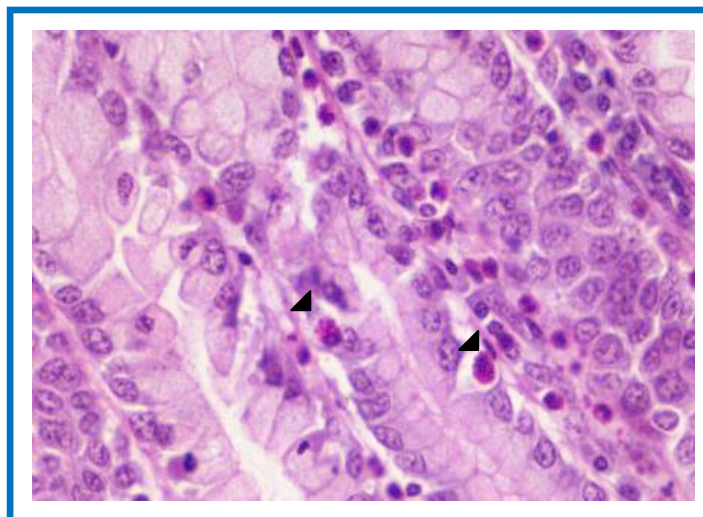
##### ➤ Mastocitos

A partir de las preparaciones de abomaso teñidas con Giemsa se realizó el recuento de mastocitos en, al menos, 30 campos de 0,044 mm<sup>2</sup>, en un área de tejido situada sobre la unión de la capa muscular de la mucosa y la lámina propia, a 400 aumentos. El resultado final se expresó en mastocitos /mm<sup>2</sup>.



➤ Leucocitos globulares

Los leucocitos globulares (mastocitos intraepiteliales) se contabilizaron en 30 campos de  $0,044\text{mm}^2$  en el tercio superior de la mucosa del abomaso, a partir de secciones teñidas con hematoxilina-eosina (400x). El resultado final se expresó en leucocitos globulares / $\text{mm}^2$ .



## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete informático SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., 2003).

### 9.1. NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD DE LAS VARIABLES

Para la aplicación de algunos test estadísticos fue necesaria la comprobación del ajuste de la variable correspondiente a una distribución normal. Se utilizó para ello el test de Shapiro-Wilk. Para comprobar la homogeneidad de la varianza u homocedasticidad se utilizó el test de Levene.

### 9.2. DIFERENCIAS ENTRE VARIABLES PUNTUALES

Para contrastar la existencia de diferencias entre los diferentes lotes de estudio en las variables puntuales, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Withney.

Las diferencias entre los lotes se consideraron significativas cuando el valor  $p$  fue menor o igual a 0,05.

### 9.3. MODELO GENERAL LINEAL DE MEDIDAS REPETIDAS (GLM MEDIDAS REPETIDAS).

Para la comparación de las variables tomadas en diferentes momentos, entre los animales controles, inoculados e inmunizados (número eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en sangre periférica, concentración de pepsinógeno sérico, hematocrito y concentración de proteínas plasmáticas) se utilizó el Modelo General Lineal (GLM) de medidas repetidas. Previamente se contrastó la normalidad como la homocedasticidad de los datos mediante el Test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente.

Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad fue

menor o igual que 0,05.

#### 9.4. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN

Con el propósito de correlacionar variables parasitológicas con las poblaciones celulares de la mucosa, y con otras variables hematológicas, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Las correlaciones se consideraron significativas cuando la probabilidad fue menor o igual que 0,05.

# **RESULTADOS**

## 1. INTRODUCCIÓN

Como queda recogido en el apartado correspondiente, los objetivos del presente estudio fueron evaluar la inmunoprotección inducida tras la inoculación con cisteína-proteinasas procedentes de productos de excreción-secreción (E/S) de vermes adultos de *T. circumcincta* en ganado caprino, así como analizar la respuesta inmune (local y sistémica) desarrollada tras dicha inmunización, comparando los resultados observados con aquellos obtenidos en animales primoinfectados con el parásito (testigos). Del mismo modo, se incluyó a lo largo del estudio, el análisis de diferentes parámetros biopatológicos en los dos lotes experimentales considerados (inmunizado y testigo). Asimismo, también se recoge información sobre los perfiles proteicos de los productos purificados y utilizados posteriormente en el protocolo de inmunización, además de las fracciones antigénicas reconocidas por inmunoglobulinas séricas y del mucus gástrico

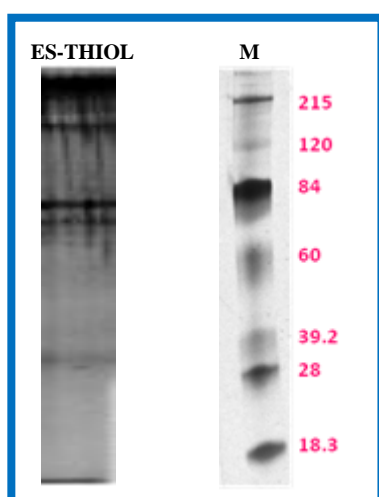
El lote inmunizado lo formaron 5 cabritos de raza Majorera, que recibieron tres dosis vía intramuscular del inmunógeno, según el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos. Por su parte, el lote testigo incluyó 4 cabritos de la misma raza, que solo recibieron adyuvante y diluyente de los extractos utilizados con el inmunógeno.

Ambos lotes fueron desafiados 1 semana después de la última inmunización con 8000 L<sub>3</sub> de *T. circumcincta*, procediéndose al sacrificio de todos los animales del estudio a las 6 semanas del desafío (p.i.).

Finalmente se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos, mediante la comparación de los resultados obtenidos entre los grupos experimentales, atendiendo a las distintas variables parasitológicas, hematológicas e inmunológicas analizadas.

## 2. ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DEL INMUNÓGENO

El perfil proteico obtenido tras el fraccionamiento en SDS-PAGE 12% bajo condiciones no reductoras, y tinción posterior con plata se muestra en la **Figura 1**. El extracto proteico utilizado en las inmunizaciones (ES-thiol) muestra un patrón complejo de fracciones proteicas con pesos moleculares >120 kDa aproximadamente, así como dos fracciones prominentes con un peso molecular de 80 kDa aprox. y una muy tenue de 31 kDa aprox.



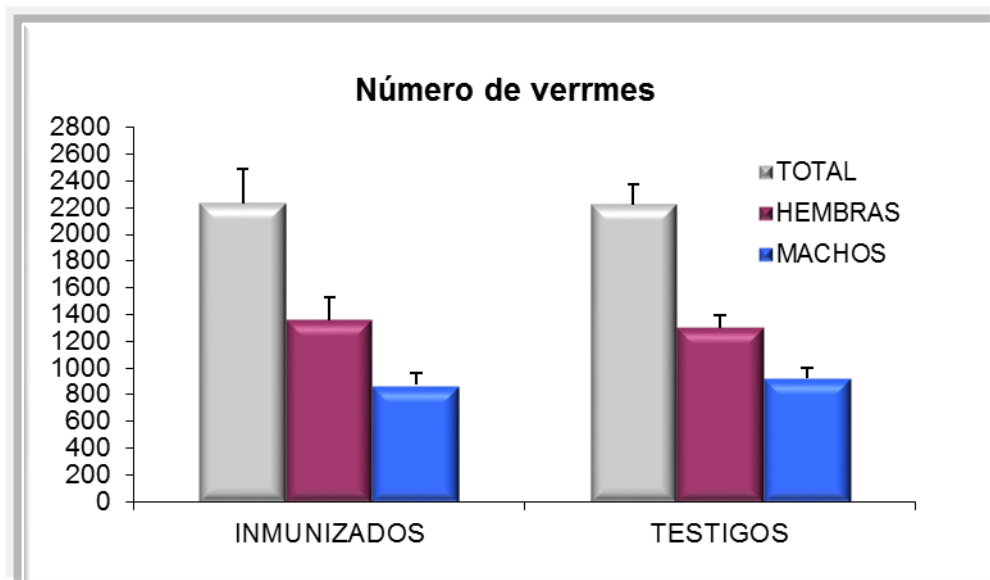
**Fig 1.** Electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras del extracto antigénico utilizado en las inmunizaciones (ES-thiol) y del marcador de peso molecular (M) visualizado con tinción de plata.

## 3. ESTUDIO PARASITOLÓGICO

### 3.1. RECUENTOS DE VERMES ADULTOS

Los datos obtenidos en relación a este apartado se encuentran recogidos en la **Figura 2**. Como se puede apreciar en la gráfica, los valores medios de vermes totales en los animales inmunizados fue de  $2232 \pm 258$  vermes/animal, con recuentos que oscilaron entre 1510 y 2695 vermes. Por su parte, estos recuentos alcanzaron un valor medio de  $2224 \pm 147$  vermes/animal en el lote de animales testigos, con un rango que osciló entre 1963 y 2560 adultos. Por tanto,

se puede apreciar que en el momento del sacrificio no hubo reducción en el número total de vermes adultos en los animales inmunizados respecto a los testigos.



**Fig 2. Número medio de vermes totales ( $\pm$  ES) y diferenciados por sexo en los lotes de animales inmunizados y testigos.**

En relación con los datos observados en los recuentos de vermes diferenciados por sexo, los datos referidos a los machos, presentaron unos valores medios de  $873 \pm 93$  y  $925 \pm 71$  vermes/animal en los lotes de inmunizados y testigos respectivamente, mientras que dichos datos para las hembras fueron de  $1359 \pm 169$  y  $1299 \pm 99$  vermes/animal. De nuevo, se puede apreciar que en el momento del sacrificio no hubo diferencias respecto a los testigos en los animales inmunizados en cuanto al número total de vermes hembras y machos.



### 3.2. LONGITUD DE LOS VERMES HEMBRAS Y RECUESTO DE HUEVOS EN EL ÚTERO

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran los valores medios de la longitud (mm) de los vermes hembras, así como el n° de huevos en útero de las mismas. Como se recoge en la misma, los resultados en ambos grupos de animales (inmunizados y testigos) fueron similares.

### 3.3. RECUESTO DE LARVAS EN LA MUCOSA

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la digestión de la mucosa del abomaso para detectar formas larvianas en los cabritos. Tras dicha digestión, se detectaron larvas L4 en fases tempranas de desarrollo en las que todavía no se reconocía el primordio genital. El número medio de larvas por gramo de mucosa se encuentra recogido en la **Tabla 1**.

La presencia de estas larvas se detectó en todos los animales del experimento, localizándose un 45.7% más en la pared abomasal de los animales inmunizados respecto a los testigos.

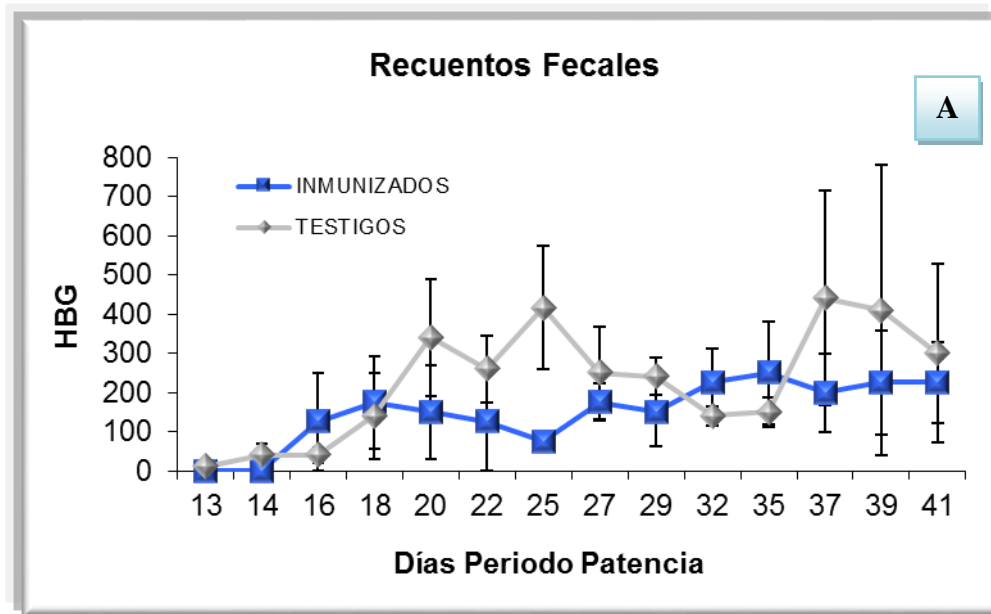
	<b>Testigos</b>	<b>Inmunizados</b>
<b>Larvas/gr mucosa</b>	6 ± 1,32	12 ± 2,18
<b>Vermes adultos</b>	2224 ± 147	2232 ± 258
<b>Vermes hembras</b>	1299 ± 99	1359 ± 169
<b>Vermes machos</b>	925 ± 71	873 ± 93
<b>Longitud (mm)</b>	9 ± 0,29	9 ± 0,24
<b>Huevos útero</b>	15 ± 5,03	14 ± 3,7
<b>Hpg 27-28 dpp</b>	262 ± 118	175 ± 48
<b>Hpg acumulados</b>	3670 ± 1232	2100 ± 648

**Tabla 1.** Datos parasitológicos de los dos lotes de animales estudiados (inmunizados y testigos)

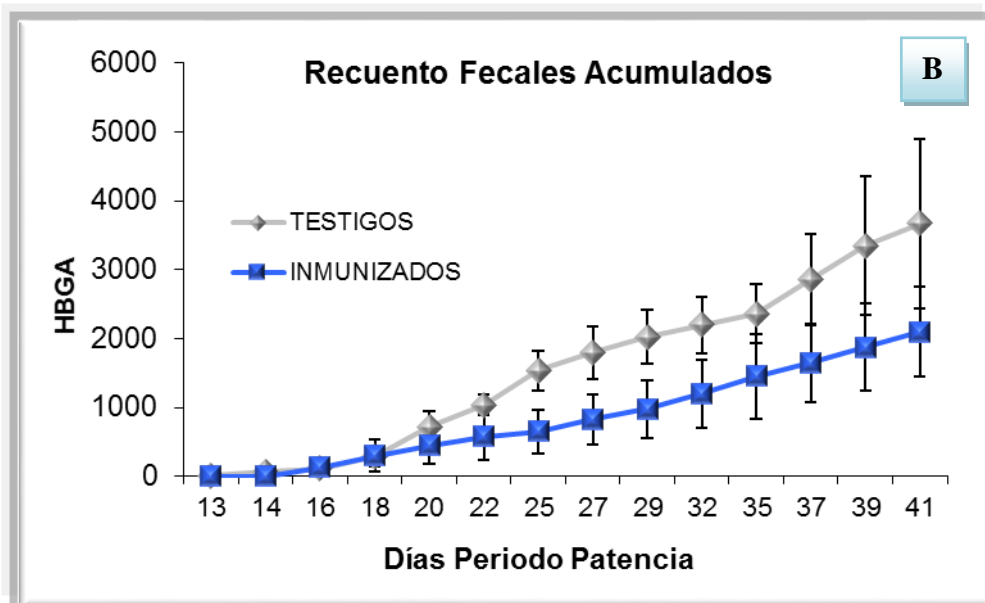
#### 4. RECUENTO FECAL DE HUEVOS EN HECES

Los resultados observados en este apartado se encuentran recogidos en la **Figura 3**. El periodo prepatente observado fue de 14 dpi en el grupo testigo y de 16 dpi en el inmunizado.

En la **Figura 3.A** se han representado los valores medios de huevos fecales por gramo de heces (hpg), tanto del lote inmunizado como del lote testigo a lo largo del estudio, mientras que en la **Figura 3.B** se encuentran los valores medios de los recuentos fecales acumulados (hpga). En dichas figuras se puede apreciar que el grupo inmunizado mostró unos recuentos fecales medios menores a los detectados en el grupo testigo, siendo especialmente patentes a partir de los 20 días del periodo patente, así como en los días 37 y 39, tal y como se puede observar en la **Figura 3.A**. Al final del estudio, se constató una reducción general del número de huevos fecales del 42.2%, en el grupo de animales inmunizados en relación con los observados en el lote testigo, pero esta reducción según el test no paramétrico U-Mann Whitney o mediante el modelo lineal de medidas repetidas, no fue estadísticamente significativa motivada por la variabilidad de los resultados individuales observados.



**Fig3a.** Recuento de huevos por gramos de heces. (A) Valores medios  $\pm$  ES, desde el inicio del periodo patente hasta el final del estudio.



**Fig3b.** Recuento de huevos medios acumulados  $\pm$  ES (B), desde el inicio del periodo patente hasta el final del estudio.

Con el fin de correlacionar las variables parasitológicas con los demás parámetros analizados que pudieran indicar alguna relación entre el nivel de inmunoprotección adquirido por el protocolo de inmunización y el desarrollo de la respuesta inmune, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Las correlaciones se consideraron significativas cuando la probabilidad (p) fue menor de 0,05.

Se analizaron las asociaciones existentes entre las distintas variables parasitológicas entre sí, con el fin de evaluar si había alguna diferencia en las relaciones que se establecen entre ellas en los animales que sólo recibieron la inoculación de las L3 respecto a los que fueron previamente inmunizados, utilizando para ello el coeficiente de correlación de Spearman. Tras analizar estos resultados cabe destacar la correlación positiva observada entre la longitud de los vermes hembras y el número de huevos intrauterinos, y esta asociación fue estadísticamente significativa tanto en el lote de animales inmunizados como en el lote de los animales testigos ( $p \leq 0,01$ ).

Por último, se observó una relación negativa entre el número de larvas presentes en la mucosa abomasal de los animales inmunizados, y el número de huevos en heces el día de sacrificio (EPG 14). Dicha relación fue positiva en el caso de los animales que solo recibieron la inoculación con las L3 (testigos), no llegando estas relaciones en ninguno de los dos casos a la significación estadística.

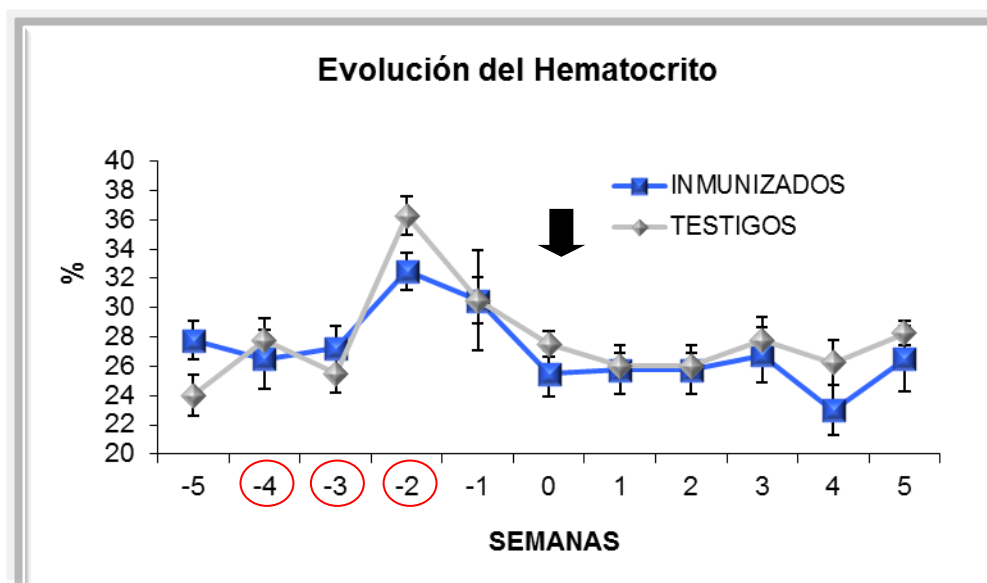
		Nº Larvas	Longitud
<b>EPG 14</b>	<b>Inm. Test.</b>	-0,800 0,400	
<b>Huevos intrauterinos</b>	<b>Inm. Test.</b>		1.000** 1.000**

**Tabla 2:** Correlaciones entre variables parasitológicas en los lotes de animales inmunizados y testigos (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

## 5. ESTUDIO HEMATOLÓGICO

### 5.1. HEMATOCRITO

El valor medio del hematocrito de ambos lotes, inmunizados y testigos durante el estudio fue el mismo, 28%. Si prestamos atención a la siguiente gráfica (Figura4) observamos varias fluctuaciones de dicho valor a lo largo del estudio, pero siempre similar entre ambos lotes, por lo que al comparar los valores medios mediante el modelo lineal general de muestras repetidas no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el tiempo de infección.

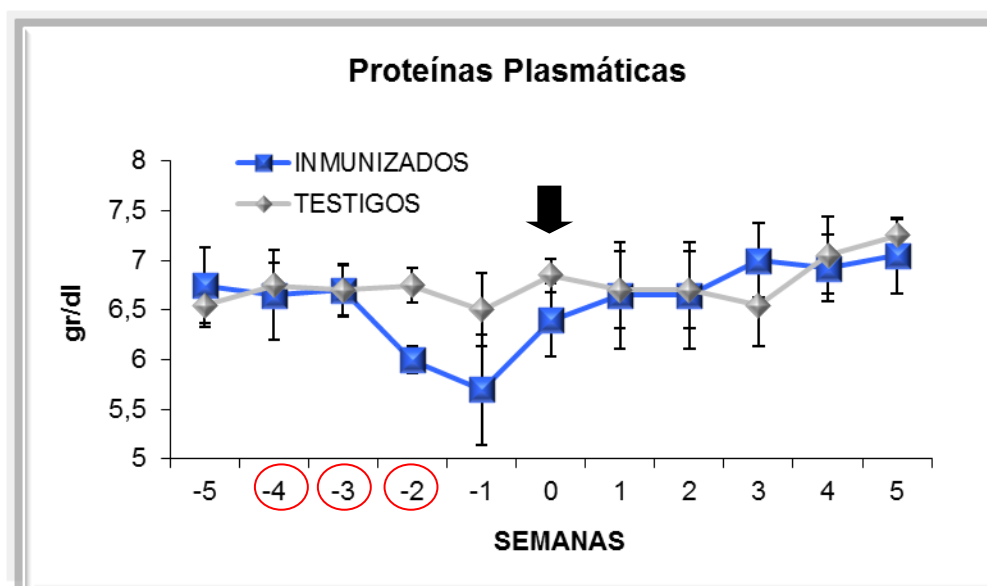


**Fig.4:** Evolución del valor del hematocrito del lote inmunizado y del lote testigo. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\circ$  Inmunización.

### 5.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La gráfica correspondiente a las proteínas plasmáticas se encuentra en la **Figura 5**. El lote de los animales inmunizados presentó una media de

concentración de proteínas plasmáticas de  $6,6 \pm 0,39$  gr/dl, mientras que el lote testigo alcanzó una concentración media de  $6,7 \pm 0,29$  gr/dl. De nuevo, los animales de nuestro estudio no sufrieron alteraciones en sus niveles de proteínas séricas desde el inicio del estudio hasta el momento del sacrificio.



**Fig.5:** Valores medios de las proteínas plasmáticas del lote inmunizado y lote testigo. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\blacktriangledown$  Semana de la inoculación.  $\circ$  Inmunización.

### 5.3. RECUENTO DE EOSINÓFILOS, LINFOCITOS Y NEUTRÓFILOS EN SANGRE.

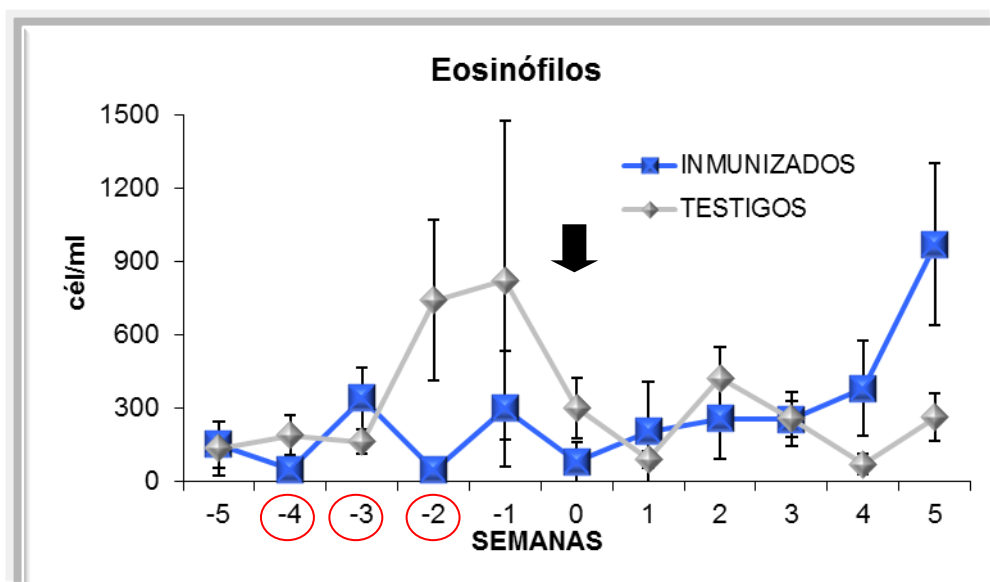
#### 5.3.1. Recuento total de leucocitos.

Ambos lotes de animales obtuvieron recuentos muy diferentes desde el principio de la experiencia, incluso siendo estas diferencias estadísticamente significativas para las semanas -5, -1 y 0. A partir de esta semana (semana 0), - semana de la inoculación experimental de larvas- los recuentos de leucocitos en sangre aumentaron, siendo estos valores similares para ambos lotes hasta el final del estudio. Los valores medios para el recuento de leucocitos en sangre fueron

18039  $\pm$  2129,708 para el lote inmunizado y 15387  $\pm$  1513,625 para el lote testigo.

### 5.3.2. Eosinófilos.

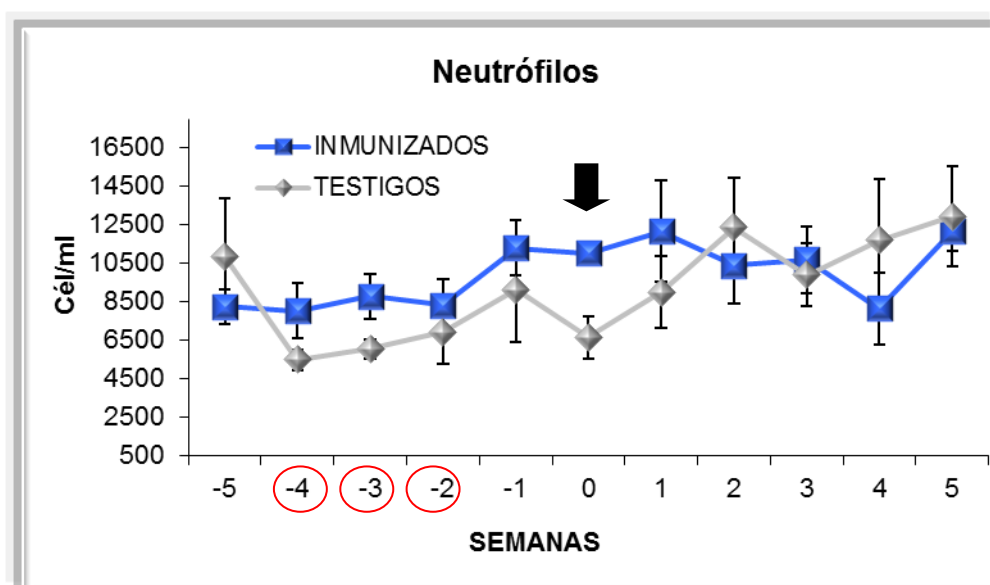
El lote de los animales inmunizados presentó una media de eosinófilos por mililitro de sangre de 275,704  $\pm$  148,566, mientras que el lote testigo alcanzó un nivel medio de 314,379  $\pm$  156,487. En la **Figura 6** podemos observar como la tendencia que siguen los eosinófilos en los animales inmunizados es un ligero incremento a partir de la 1<sup>ª</sup> spi, alcanzando el valor máximo la última semana de experiencia (970 eosinófilos/ml). Por su parte, los animales testigos registraron un aumento de los recuentos desde la semana -3 hasta la semana -1 (valor máx. 822 eosinófilos/ml) coincidiendo con las dos últimas semanas de las inmunizaciones, (los animales testigos solo recibieron adyuvante) tras estas semanas hasta el final del estudio, los valores se mantuvieron con pequeñas fluctuaciones en el lote en cuestión. El análisis estadístico mediante el modelo lineal general de muestras repetidas, no mostró diferencias estadísticamente significativas.



**Fig 6:** Eosinófilos en sangre periférica. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\bigcirc$  Inmunización.

## 5.3.3. Neutrófilos

El lote de los animales inmunizados presentó una media de  $9942,829 \pm 1443,149$  cél/ml, mientras que el lote testigo alcanzó un nivel medio de  $9194,5 \pm 1950,855$  cél/ml. El estudio estadístico tampoco mostró diferencias significativas en esta ocasión (**Figura 7**).

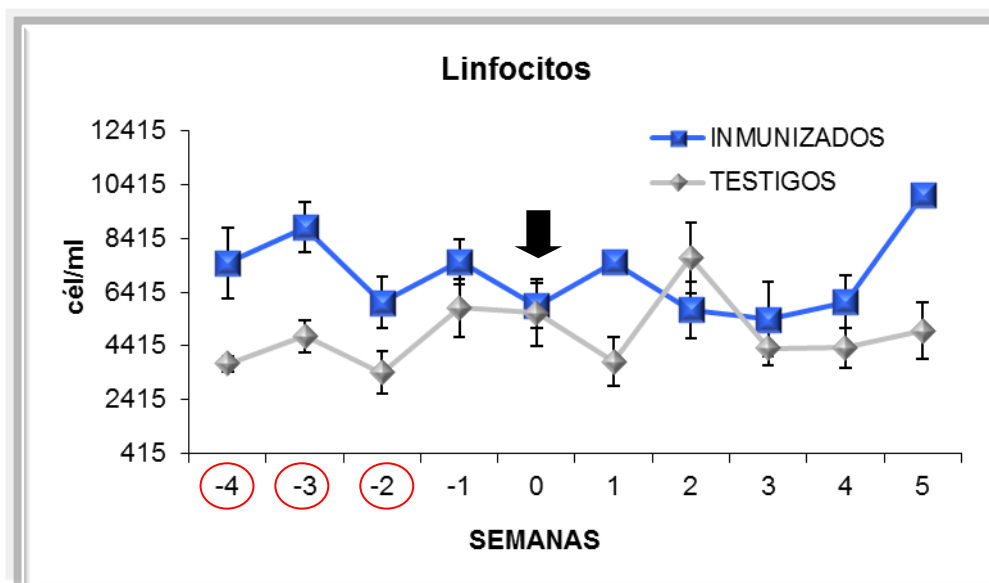


**Fig 7:** Neutrófilos en sangre periférica. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\bigcirc$  Inmunización.

## 5.3.4. Linfocitos

El lote de los animales inmunizados presentó una media de  $7053,112 \pm 4897,049$  cél/ml, mientras que el lote testigo alcanzó un nivel medio de  $4862,45 \pm 862,41$  cél/ml., no observándose diferencias entre ambos grupos (**Fig 8**).





**Fig 8:** Linfocitos en sangre periférica. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\circ$  Inmunización.

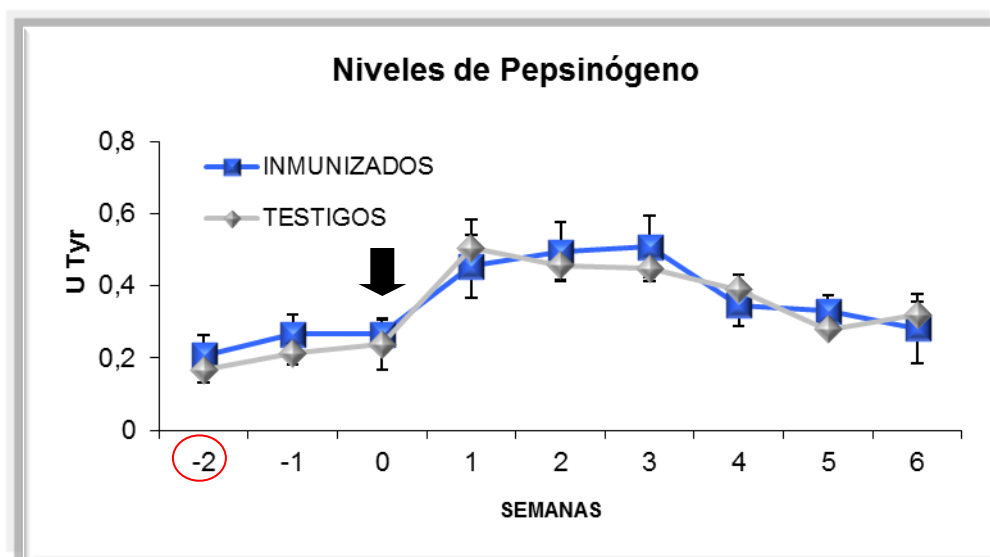
## 6. NIVELES DE PEPSINÓGENO EN SUERO

La evolución de los niveles de pepsinógeno (valor medio  $\pm$  ES) en los grupos de animales inmunizados y testigos, se encuentran recogidos en la **Figura 9**.

El lote de animales inmunizados presentó un valor medio de  $0,35 \pm 0,067$  Utyr, mientras que el lote testigo tuvo una media de  $0,334 \pm 0,042$  Utyr. Como podemos observar en la **Figura 9**, tras el desafío ambos lotes experimentaron un incremento de la concentración de pepsinógeno en sangre, alcanzando el punto máximo la tercera semana post-desafío ( $0,51 \pm 0,086$  Utyr) en los animales inmunizados y en la primera semana ( $0,50 \pm 0,077$  Utyr) los animales testigos. A partir de la semana 4 los niveles séricos de pepsinógeno de ambos lotes empezaron a descender, hasta llegar a sus valores iniciales.

El análisis estadístico de los niveles plasmáticos de pepsinógeno, tanto mediante el modelo lineal general de muestras repetidas como por el test no

paramétrico U-MannWhitney, no reveló diferencias estadísticamente significativas.



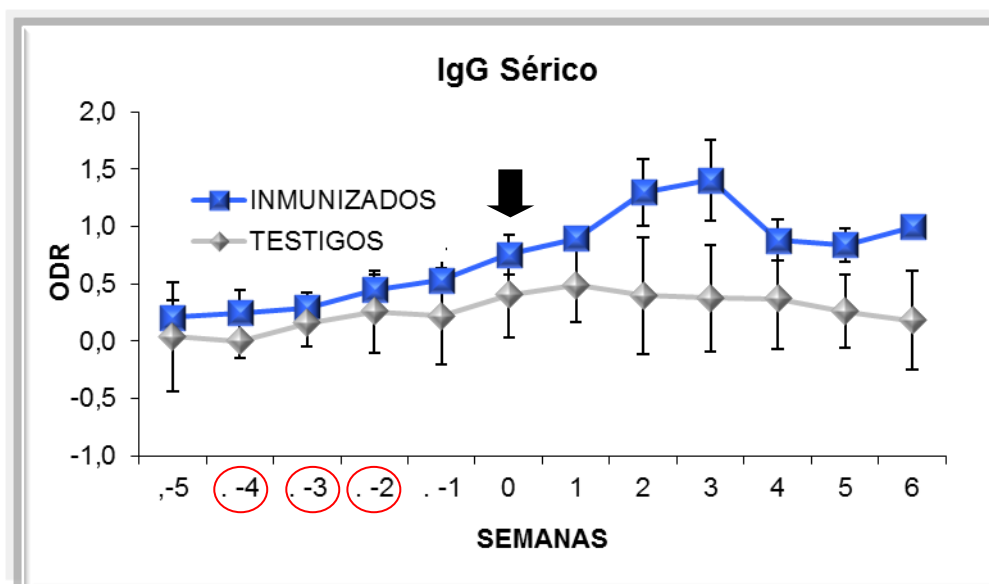
**Fig 9:** Valores medios a lo largo del estudio de los niveles de pepsinógeno en sangre, U Tyr. (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\circ$  Inmunización.

## 7. RESPUESTA INMUNE HUMORAL SISTÉMICA

### 7.1. DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS IgG ESPECÍFICAS EN SUERO

Los datos correspondientes a este apartado se pueden observar en la **Figura 10**. El lote de los animales inmunizados presentó una densidad óptica relativa media de  $0,734 \pm 0,768$  ODR. En este lote se detectó un aumento del valor promedio la misma semana en la que se realizó la inoculación de las larvas 3 del parásito, y continuó elevándose hasta la semana 3 post-infección ( $1,408 \pm 0,936$  ODR). Posteriormente el nivel medio descendió, para elevarse de nuevo la última semana del estudio (semana 6) ( $0,997 \pm 0,184$  ODR), cuando se produjo el sacrificio de los animales. Los cabritos del lote testigo tuvieron un valor

promedio de  $0,263 \pm 0,928$  ODR, con un valor máximo 1 semanas pi ( $0,488 \pm 0,507$  ODR), tras lo cual comenzaron a disminuir paulatinamente.



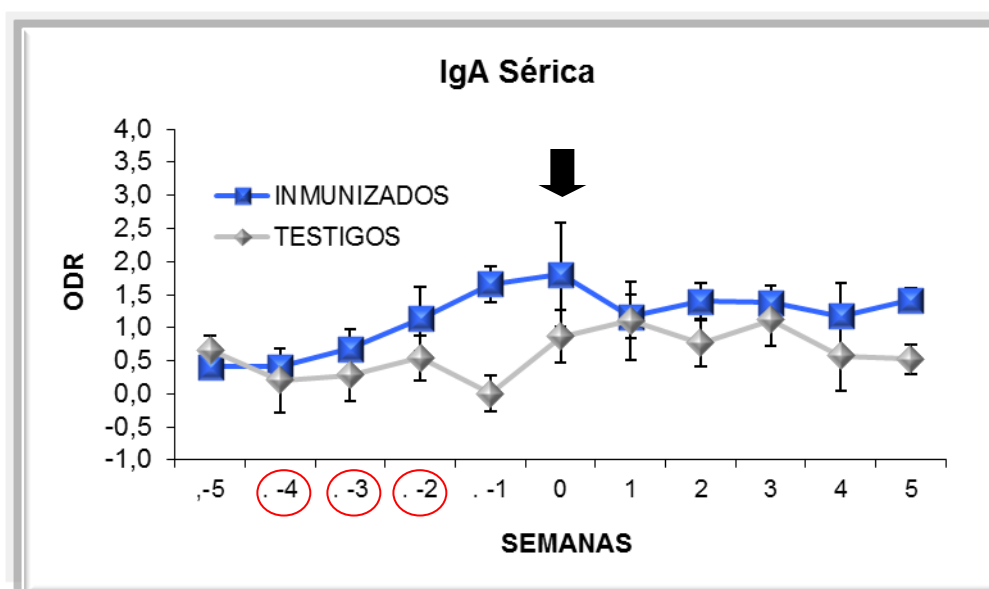
**Fig 10:** Valores medios a lo largo del estudio de la concentración de IgG específica en suero (Densidad Óptica Relativa, ODR). (Valor medio  $\pm$  ES). ↓ Semana de la inoculación. ○

## 7.2. DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS IgA ESPECÍFICAS EN SUERO

La representación gráfica de los niveles medios se encuentra en la **Figura 11**.

En el análisis de los niveles de IgA en suero, el lote de los animales inmunizados presentó una densidad óptica relativa media de  $1,199 \pm 0,768$  ODR. Los niveles medios de IgA específicas comenzaron a elevarse una semana después de la primera inmunización y los niveles máximos se detectaron una semana después de la última inmunización ( $1,806 \pm 0,852$  DOR). El lote testigo mostró un nivel medio de  $0,643 \pm 0,928$  DOR. En este grupo, durante el protocolo de inmunización los niveles medios fueron descendiendo ligeramente, detectándose el valor mínimo una semana después de la última inmunización.

El estudio estadístico de los niveles medios tanto de IgG como de IgA sérica durante el tiempo que duró la experiencia mediante el modelo lineal general de muestras repetidas, no demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.



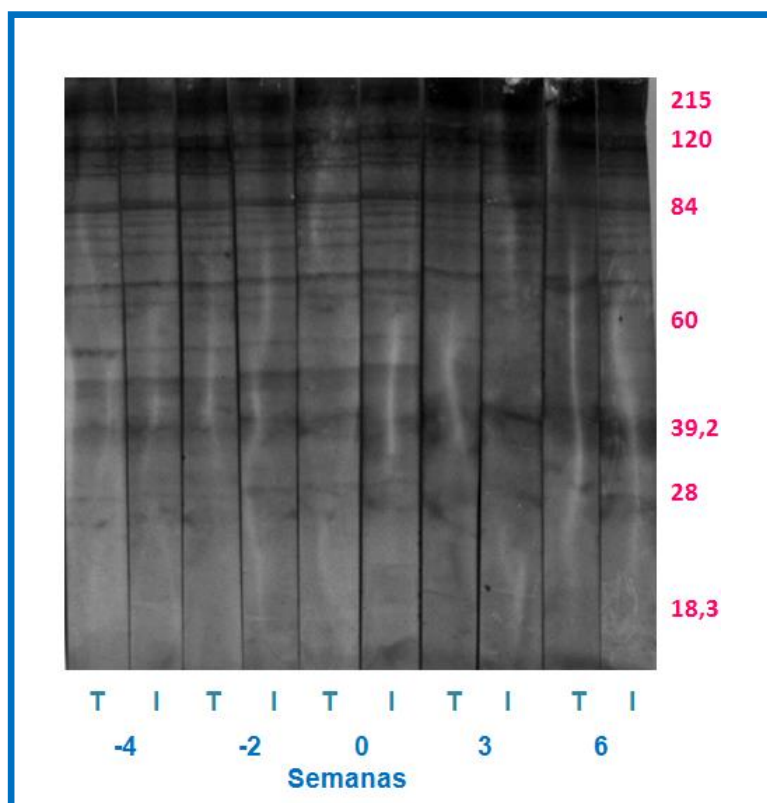
**Fig 11:** Valores medios a lo largo del estudio de la concentración de IgA específica en suero (Densidades Óptica Relativa, ODR). (Valor medio  $\pm$  ES).  $\downarrow$  Semana de la inoculación.  $\circ$  Inmunización

### 7.3. ESTUDIO MEDIANTE WESTERN-BLOT DE IgG ESPECÍFICAS

Las mezclas de sueros “pool” que se utilizaron como muestras problema se obtuvieron a partir de las muestras recogidas las semanas -4, -2, 0, 3 y 6 respecto al desafío con el parásito, coincidiendo las dos primeras muestras con las semanas en las que se llevaron a cabo las inmunizaciones.

En general se observó un patrón complejo en el reconocimiento de los distintos péptidos. Todos los animales en las 5 semanas testadas detectaron varias fracciones peptídicas entre los 215 y 60 kDa, así como varias bandas más tenues entre 60-39,2 kDa. Se observaron otras tres bandas no muy nítidas, con pesos moleculares de aproximadamente 39,2, 36 y 27 kDa. En cualquier caso, en

este experimento no se observaron diferencias en los perfiles proteicos reconocidos por las IgG séricas entre los dos lotes de animales evaluados, salvo una ligera reacción con fracciones de peso molecular bajo (< 39 kDa) al final del experimento en las muestras procedentes de animales inmunizados (**Figura12**).



**Fig12:** Western blotting. Reacción inmunoenzimática de IgG sérica frente a homogeneizado somático de *T. circumcineta*. T, testigos; I, inmunizados.

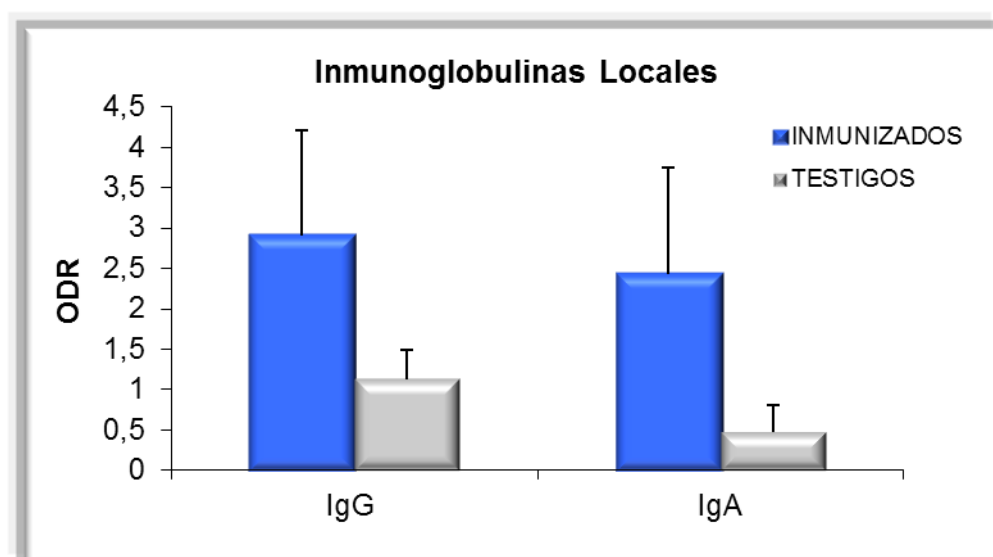
## 8. RESPUESTA INMUNE LOCAL

### 8.1. DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS EN EL MUCUS

Los valores promedio  $\pm$  el error estándar de los niveles de densidad óptica relativa de IgA e IgG anti-*T. circumcineta* (antígeno somático) de todos los grupos de animales se encuentran recogidos en la **Figura 13**.

El nivel medio en el lote de animales inmunizados fue de  $2,906 \pm 1,312$  ODR para la IgG y de  $2,437 \pm 1,3$  ODR para la IgA. Respecto a los testigos estos valores fueron de  $1,125 \pm 0,367$  ODR de IgG y  $0,5 \pm 0,3$  ODR de IgA.

Ambas inmunoglobulinas (IgG e IgA) mostraron mayores recuentos en el grupo de animales inmunizados en relación al lote testigo, sin embargo los niveles individuales mostraron una gran variabilidad, lo que determinó que la comparación estadística entre los valores medios de ambos lotes no fuera significativa.



**Fig 13:** Niveles medios de inmunoglobulinas específicas anti-homogenizado de vermes adultos (IgG e IgA) en el mucus gástrico (Valor medio  $\pm$  ES) expresados en densidades ópticas relativas (ODR)

## 8.2. CORRELACIONES DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS LOCALES ESPECÍFICAS

Tras el análisis de las relaciones existentes entre las variables parasitológicas estudiadas y los niveles de IgA e IgG locales específicas, cabe destacar que el lote inmunizado mostró relaciones negativas mayores que los animales pertenecientes al lote testigo, dentro de estas relaciones están: la asociación entre los niveles de IgA locales específicas y el número total de

vermes hallados en el contenido abomasal, la longitud de los vermes hembras y el número de huevos intrauterinos. Estas asociaciones no llegaron sin embargo a ser estadísticamente significativas en ninguno de los dos lotes estudiados. Por su parte, los niveles de IgG mostraron una misma tendencia que en el caso anterior, el lote inmunizado mostró relaciones negativas mayores que los animales pertenecientes al lote testigo, destacando las relaciones con la longitud de los vermes hembras y el número de huevos intrauterinos. Al igual que en el caso anterior, ninguna de estas asociaciones llegaron a la significación estadística en los dos lotes estudiados.

		Vermes	Longitud	Nº Huevos intrauterinos
<b>IgA</b>	<b>Inm.</b>	-0,800	-0,600	-0,600
	<b>Test.</b>	-0,400	-0,400	-0,400
<b>IgG</b>	<b>Inm.</b>		-0,800	-0,800
	<b>Test.</b>		-0,400	-0,400

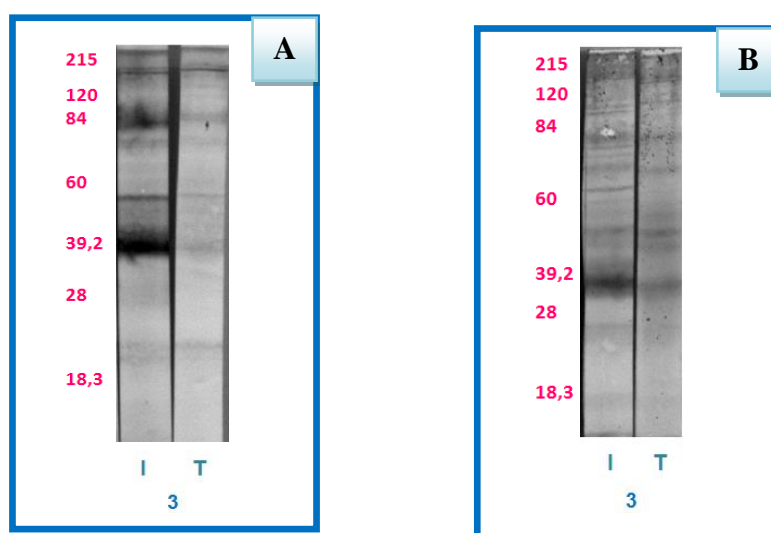
**Tabla 3:** Correlaciones entre variables parasitológicas y niveles de Ig locales específicas anti-homogenizado somático de vermes adultos. (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

### 8.3. ESTUDIO MEDIANTE WESTERN-BLOT DE IgG e IgA ESPECÍFICAS EN EL MUCUS

En La **Figura 14** podemos observar la reacción inmunoenzimática desarrollada por una mezcla de mucus de animales inmunizados y testigos, correspondiente a las tres semanas después del desafío.

Como se puede observar, las IgG del mucus de los animales testigos e inmunizados detectaron de forma muy tenue varias bandas peptídicas cuyos pesos moleculares estuvieron comprendidos entre 215-60 kDa, tres bandas tenues entre 60-39,2 kDa. Por su parte el lote inmunizado, destacó una fuerte reacción con un polipéptido de 36 kDa aproximadamente.

Respecto al perfil proteico reconocido por las IgAs del mucus del lote testigo, dicho reconocimiento fue por lo general muy débil, estableciéndose con varios péptidos entre los 215-60 kDa, destacando dos bandas de aproximadamente 101 y 143 kDa. Alrededor de los 60 kDa se detectó una tenue banda proteica, así como otras dos con 36 y 19,6 kDa aproximadamente. En el lote de cabritos inmunizados, el perfil proteico reconocido fue muy similar, pero también en esta ocasión, destacó una fuerte reacción con una fracción proteica de 36 kDa.



**Fig 14:** Western-blotting IgA (A) e IgG (B) del mucus abomasal frente a homogeneizado de vermes adultos de *T. circumcincta*. I, inmunizado; T, testigo.

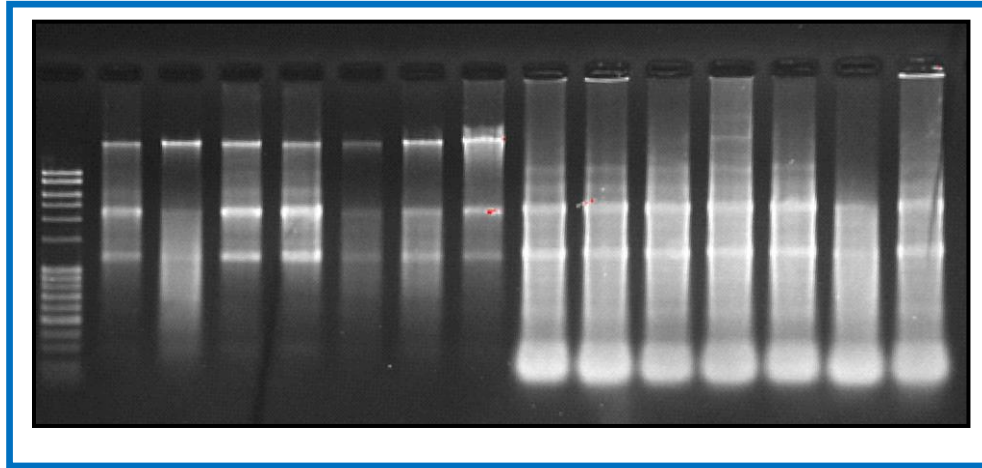
#### 8.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

En este caso, tanto la extracción de ARN de la mucosa como de los nódulos linfáticos abomasales fue satisfactoria, obteniéndose ratios de pureza (DO ratio 260/280nm) de ARN entre 1.8-2, con una buena integridad, según se observó en los geles de agarosa realizados (**Fig 15**). Tras la realización de la PCR-Real Time, se constató mediante las curvas de melting que la reacción fue específica (**Fig 16**).

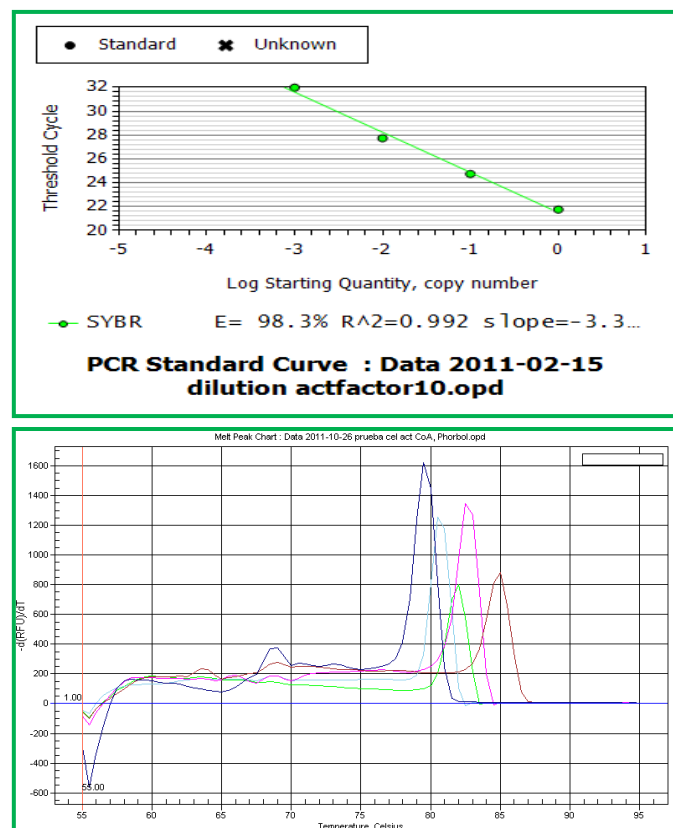
Los niveles de expresión relativa de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  e IL-17 están presentes en las **Figuras 17 y 18**. En el análisis de los datos,



debido a la alta variabilidad de los resultados entre individuos, solo fue posible determinar tendencias de las respuestas observadas.



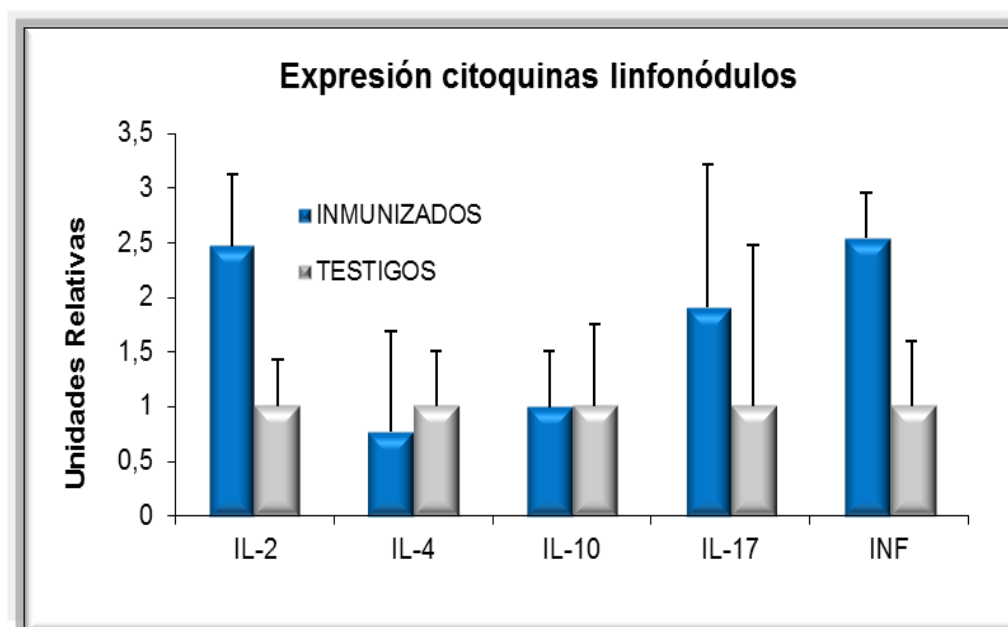
**Fig 15:** Gel MOPS del chequeo de la extracción de ARN de los nódulos linfáticos. Se observan las dos fracciones ribosómicas (28S y 18 S) y en la parte superior una banda de ADN genómico



**Fig 16:** Recta patrón de la  $\beta$ -Actina y distintas temperaturas de melting para distintos productos amplificados. En azul oscuro IL-4, en azul celeste IL-2, en rosado INF $\gamma$  y en marrón  $\beta$ -Actina.

#### 8.4.1. Expresión relativa de citoquinas de nódulos linfáticos abomasales

En la **Figura 17** se encuentra la gráfica correspondiente a la expresión relativa de las citoquinas estudiada en los nódulos linfáticos abomasales. Como se puede apreciar, la expresión relativa de las citoquinas IL-2, IL-17 e INF- $\gamma$  mostraron una tendencia a tener unos niveles mayores de expresión en los animales inmunizados respecto a los testigos. En este sentido, destacó la expresión de la IL-2 e INF- $\gamma$ , bastante más elevada que la observada en animales testigos. En relación a las restantes citoquinas analizadas, las diferencias fueron menos patentes entre ambos grupos (IL10, IL-17), e incluso en algunos casos menores (IL-4).

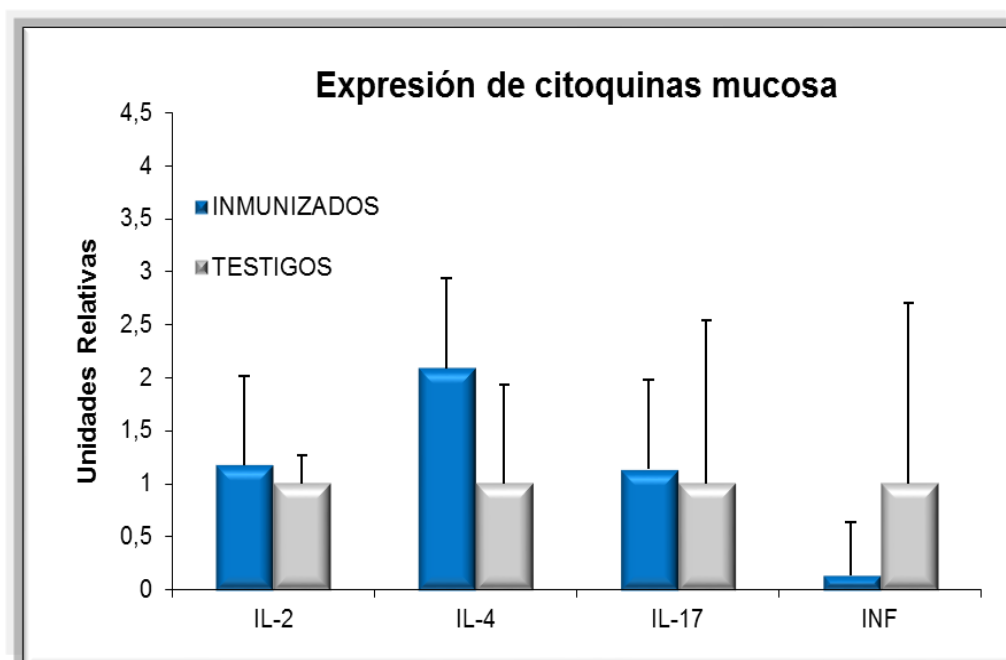


**Fig 17:** Niveles relativos (respecto a los niveles de  $\beta$ -Act) de expresión de citoquinas en los nódulos linfáticos abomasales.

#### 8.4.2. Expresión relativa de citoquinas de la mucosa abomasal

Como se muestra en la siguiente figura (**Figura 18**), se observa una tendencia similar (IL-2 e IL-17) e incluso una reducción (INF- $\gamma$ ) de expresión de citoquinas analizadas en la mucosa de los animales inmunizados respecto a los testigos. Sin embargo, esta tendencia general no se mostró, en el caso de la

IL-4, cuya expresión fue bastante más elevada en la mucosa de los animales inmunizados.



**Fig 18:** Niveles relativos (respecto a los niveles de  $\beta$ -Act) de expresión de citoquinas en las células de la mucosa abomasal.

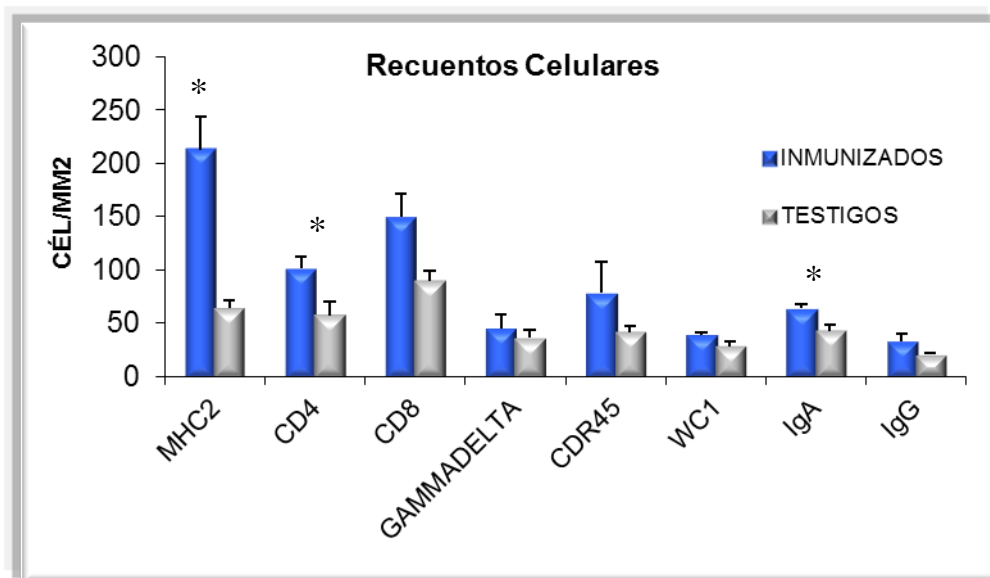
### 8.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA MUCOSA ABOMASAL

La tinción inmunohistoquímica del tejido con anticuerpos monoclonales permitió el recuento de diferentes poblaciones de linfocitos (CD4+, CD8+, CD45R+,  $\gamma\delta$ +, WC1+, IgA+ e IgG+) y células presentadoras de antígeno (MHCII+). Las células marcadas mediante esta técnica inmunohistoquímica se contabilizaron en los tercios superior e inferior de la mucosa.

El recuento de células/mm<sup>2</sup> de estas subpoblaciones en los diferentes lotes en el momento del sacrificio se encuentra recogido en la **Tabla 4**. Del mismo modo, se puede observar su representación gráfica en la **Figura 19**.

Cél/mm <sup>2</sup>	MHCII+	CD4+	CD8+	γδ+	CDR45+	WC1+	IgA+	IgG+
Lote inmunizado	213	101	149	45	78	39	64	33
Lote testigo	64	57	89	36	41	28	43	20

**Tabla 4:** Recuento de subpoblaciones linfocitarias y células presentadoras de antígenos en la mucosa abomasal (cél/mm<sup>2</sup>)



**Fig 19:** Estudio inmunohistoquímico de la mucosa abomasal, célula/mm<sup>2</sup>. (Valor medio ± ES).

Todas las poblaciones celulares estudiadas tuvieron unos recuentos medios mayores en los animales inmunizados que en los que sólo recibieron la infección con las L3 del parásito. El análisis estadístico mediante el test no paramétrico U-Mann Whitney reveló diferencias significativas entre los dos grupos en los recuentos de células que expresaron antígenos MHCII<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>.

## 8.6. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITÓLOGICAS Y POBLACIONES CELULARES LOCALES

Entre todas las relaciones halladas cabe destacar aquellas asociaciones observadas entre las variables parasitológicas y las poblaciones celulares de linfocitos T CD4+, Gamma Delta+ y WC1+. En el caso de las poblaciones de CD4+, el lote inmunizado mostró relaciones negativas mientras que los animales pertenecientes al lote testigo mostraban relaciones positivas, dentro de estas destacan la asociación con la longitud de los vermes hembras, el número de huevos intrauterinos y los recuentos de huevos en heces el día de sacrificio (EPG 14), no siendo en ninguno de los casos estadísticamente significativa.

Por su parte, los recuentos de linfocitos T Gamma Delta se correlacionaron de forma negativa con la longitud de los vermes hembras en el lote de animales inmunizados, observándose significación estadística ( $r=-1$ ;  $p<0.001$ ). Esta asociación en el caso del lote testigo no llegó a la significación estadística.

Asimismo, el número de linfocitos T WC1+ se correlacionó de forma negativa con parámetros de fecundidad del parásito en el lote de animales inmunizados, mientras que en los animales testigos estas relaciones fueron positivas.

		CD4+	Gamma Delta+	WC1+
<b>Vermes</b>	<b>Inm.</b>	-0,400		
	<b>Test.</b>	-0,200		
<b>Longitud</b>	<b>Inm.</b>	-0,400	-1,000**	-0,316
	<b>Test.</b>	0,800	-0,400	0,200
<b>Huevos intrauterino</b>	<b>Inm.</b>	-0,400		-0,316
	<b>Test.</b>	0,800		0,200
<b>EPG 14</b>	<b>Inm.</b>	-0,800		
	<b>Test.</b>	0,200		

**Tabla 5:** Correlaciones entre variables parasitológicas y las poblaciones linfocitarias y células presentadoras de antígeno estudiadas en la mucosa abomasal. (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

## 8.7. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA MUCOSA ABOMASAL

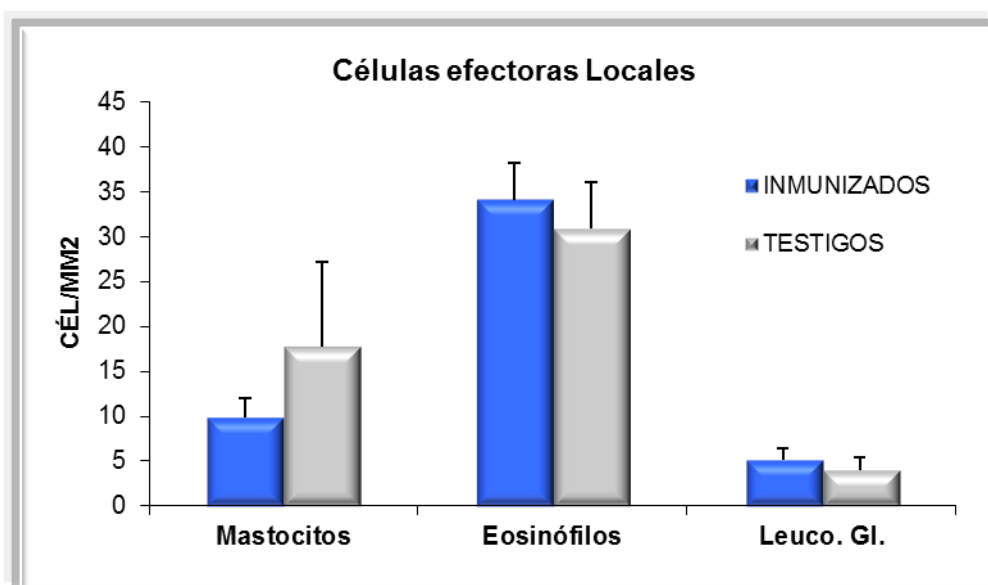
El recuento medio  $\pm$  la desviación estándar de las poblaciones tisulares de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares en los diferentes lotes del experimento se encuentra recogido en la **Tabla 6** y se puede observar su representación gráfica en la **Figura 20**.

Los cabritos que fueron inmunizados con la fracción antigénica ES-thiol y posteriormente desafiados con 8000 L3 de *T. circumcincta*, mostraron un recuento medio de eosinófilos en la mucosa abomasal ligeramente mayor que el de los cabritos que sólo recibieron el desafío (34 y 31 cél/mm<sup>2</sup>, respectivamente).

Respecto a las poblaciones de leucocitos globulares, el lote inmunizado también mostró un recuento medio ligeramente mayor que el del lote testigo, y por su parte en relación a la población celular de mastocitos, el lote inmunizado presentó un menor recuento en relación al lote testigo (10 y 18 cél/mm<sup>2</sup>, respectivamente). En ninguno de los casos, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes.

Cél/mm <sup>2</sup>	Inmunizados	Testigos
Eosinófilos	34 $\pm$ 4,18	31 $\pm$ 5,23
Mastocitos	10 $\pm$ 2,12	18 $\pm$ 9,44
Leucocitos gl.	5 $\pm$ 1,36	4 $\pm$ 1,49

**Tabla 6:** Recuento de células efectoras en la mucosa abomasal (cél/mm<sup>2</sup>)



**Fig.20:** Recuento de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares en la mucosa abomasal,  $\text{cél}/\text{mm}^2$ . (Valor medio  $\pm$  ES).

#### 8.8. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITÓLOGICAS Y CÉLULAS EFECTORAS ABOMASALES

Con el fin de correlacionar las variables parasitológicas con estos parámetros inmunológicos, que pudieran indicar alguna relación entre el nivel de inmunoprotección adquirido y el desarrollo de la respuesta inmune, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Se observó que en el lote de animales inmunizados hubo una asociación negativa entre los recuentos de eosinófilos en la mucosa y la carga de vermes adultos en el momento del sacrificio de los animales y con parámetros de fecundidad del parásito que no se observó en los animales que sólo recibieron la infección las L3 del parásito (asociaciones positivas en todos los casos).

Por su parte la población de leucocitos globulares mostró una tendencia similar a la de los eosinófilos, una asociación negativa entre los recuentos de leucocitos globulares en la mucosa y la carga de vermes adultos en el momento del sacrificio de los animales y con parámetros de fecundidad del parásito que no

se observó en los animales que sólo recibieron la infección las L3 del parásito (asociaciones positivas en todos los casos).

Asimismo, ninguna de estas relaciones observadas tanto en las poblaciones de eosinófilos como de leucocitos globulares llegó a la significación estadística, salvo en el caso del lote testigo, en los recuentos de vermes adultos del contenido abomasal y la población de eosinófilos en el ( $r=1$ ;  $p<0.001$ ) y en el caso del lote inmunizado, en los recuentos de leucocitos globulares de la mucosa abomasal y el número de vermes adultos ( $r=-1$ ;  $p<0.001$ ).

		Eosinófilos	Leucocitos gl.
<b>Vermes</b>	<b>Inm.</b>	-0,800	-1,000**
	<b>Test.</b>	1,000**	0,632
<b>Longitud</b>	<b>Inm.</b>	-0,800	-0,600
	<b>Test.</b>	0,400	0,949
<b>Huevos intrauterino</b>	<b>Inm.</b>	-0,800	-0,600
	<b>Test.</b>	0,400	0,949

**Tabla 7:** Correlaciones entre variables parasitológicas y células efectoras locales.

(\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).



# **DISCUSIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

En los rumiantes domésticos y, en concreto, en el ganado caprino, uno de los géneros más prevalentes es el género *Teladorsagia*, constituyendo algunas especies como *T. circumcincta* el hallazgo parasitario más frecuente en muchas regiones geográficas (Cordero del Campillo *et al.*, 1994; Stear *et al.*, 2007) incluida la Comunidad Canaria (Molina *et al.*, 1997). A esta elevada frecuencia de presentación en la cabaña ganadera se le une un importante potencial patógeno derivado del ciclo endógeno del parásito en la mucosa gástrica (Urquart *et al.*, 1996), lo que lo convierte en una de las especies parásitas más relevantes desde el punto de vista económico entre las que afectan a esta especie ganadera.

Actualmente, el control de las nematodosis gastrointestinales, se realiza mediante la aplicación de tratamientos con antihelmínticos y medidas de manejo de pastos, cuando es posible. Los antihelmínticos han sido y continúan siendo una importante medida de control (Miller *et al.*, 2012), pero la aparición de cepas resistentes a estos productos (Magona y Musisi, 1999 FAO, 2004; Wolstenholme *et al.*, 2004; Paraud *et al.*, 2009) y los problemas medioambientales y de salud alimentaria que originan sus residuos han estimulado la búsqueda de otras medidas de control, como aquellas que tratan de potenciar la respuesta inmunológica del hospedador frente a determinado antígenos parasitarios (Newton y Munn, 1999; Knox y Smith, 2001; Newton y Meeusen, 2003).

En el desarrollo de estrategias de inmunización frente a nematodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes ha tenido un papel protagonista el nematodo gástrico *Haemonchus contortus* (especialmente en ganado ovino), estos estudios han ido encaminados a inducir una respuesta inmunitaria frente al parásito usando antígenos naturales y recombinantes tanto de larvas 3 como de

origen somático y E/S de vermes adultos (**Jacobs *et al.*, 1999; Domínguez-Torano *et al.*, 2000; Vervelde *et al.*, 2002**).

Entre los antígenos con propiedades inmunoprotectoras que se ha investigado, tanto en *H. contortus* como en otros nematodos gastrointestinales, destacan determinadas enzimas proteolíticas o proteinasas.

Dentro de los diferentes tipos de proteinasas, unas de las que parecen jugar un papel más relevante en las relaciones parásito-hospedador, y por tanto constituyen buenas candidatas para el desarrollo de protocolos de inmunoprotección son las cisteína proteinasas. Se sugiere que dichas enzimas podrían intervenir en la penetración del parásito a través de los tejidos, en su nutrición y en la defensa frente a los mecanismos efectores del sistema inmune del hospedador (**Tort *et al.*, 1999**). A estas propiedades funcionales, se une una elevada actividad inmunógena por su carácter glicoproteico (**Cox *et al.*, 1990**).

Estos mismos planteamientos están siendo objeto de estudio en el caso de los nematodos del género *Ostertagia/Teladorsagia*, donde a pesar de incluir especies con un tipo de nutrición no hematófaga (se reconoce que el efecto inmunoprotector inducido por estas enzimas se debe en gran medida a la ingestión de sangre por parte del parásito), también cuentan con este y otros tipos de enzimas proteolíticas (**Murray y Smith, 1994; Geldhof *et al.*, 2000**), que en determinadas condiciones han mostrado la posibilidad de producir un efecto protector frente a la infección. Así la inmunización con productos de E/S de vermes adultos de *Ostertagia ostertagi* en ganado bovino determinó una reducción de la eliminación de huevos fecales y del tamaño de los vermes, así como un aumento del porcentaje de larvas inhibidas (**Geldhof *et al.*, 2002, 2004; Claerebout *et al.*, 2005**).

Del mismo modo, las proteinasas tipo cisteína (Catepsina F) presentes en productos de ES de larvas 4 y vermes adultos de *T. circumcincta* (**Redmond et al., 2006; Craig et al., 2006**), se han descrito como componentes capaces de inducir una respuesta humoral protectora frente a infecciones por *T. circumcincta* como demuestra el hecho de que ovinos con resistencia adquirida a la infección, generen una respuesta humoral (con protagonismo de inmunoglobulinas IgA), caracterizadas por su correlación negativa en animales resistentes con los recuentos fecales, así como, la longitud y fecundidad de los vermes (**Redmond et al., 2006**). Sin embargo, este potencial protector no ha sido evaluado hasta la fecha en ganado caprino (**Knox et al., 1995; Nisbet et al., 2013**).

Aunque se han realizado importantes avances los mecanismos inmunológicos que se manifiestan cuando llega a desarrollarse una protección frente a las infecciones parasitarias por nematodos GI o, incluso, si tales respuestas son comunes para todos los nematodos gastrointestinales, son cuestiones que requieren un mayor conocimiento científico (**Balic et al., 2000**). Se comprende por ello, que sea más escasa la información cuando se valoran como inmunógenos distintos antígenos parasitarios como, por ejemplo las enzimas proteolíticas objeto de estudio de la presente tesis doctoral, esta información podría ser de gran interés a la hora de potenciar los mecanismos defensivos inducidos por este tipo de enzimas, todo ello sin olvidar que a algunas de estas especies parásitas podrían estar implicadas en el desarrollo de mecanismos moduladores de la respuesta inmune del hospedador (**González, et al., 2006; Gómez-Muñoz et al., 2004**), fenómeno que podría enmascarar las respuestas protectoras.

En el presente trabajo, se han utilizado como inmunógenos fracciones thiol-proteinasa procedentes de productos de excreción/secreción (E/S) de

vermes adultos de *T. circumcincta*, de forma similar a las empleadas por **Knox et al. (1999)** y **Geldhof et al. (2002)** en ensayos vacunales frente a *H. contortus* y *O. ostertagi*, respectivamente. En nuestro caso, las fracciones fueron inoculadas a caprinos de 6 meses de edad utilizando adyuvante de Freund tanto completo como incompleto, posteriormente se realizó un desafío con 8000 L3 de *T. circumcincta*.

La edad elegida para los cabritos del estudio fue de 6 meses para asegurar que se trataban de animales con capacidad de desarrollar convenientemente la inmunidad a la inmunización (**Vervelde et al., 2002; Martín, 2011**).

Al seleccionar la dosis larvaria infectante para el desafío de los animales inmunizados, así como para los del grupo testigo (8.000 L3 del parásito) se trató de reproducir las cargas medias y recuentos fecales observados en condiciones de campo (**Molina et al., 1997**) en nuestro entorno, y para lo cual se consideraron los resultados de inoculaciones experimentales previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio (**González, 2002**). La infección experimental se realizó en una sola inoculación, como en otros ensayos de inmunización similares (**Schallig et al., 1997; Jacobs et al., 1999; Knox et al., 1999; Smith et al., 2000a; b; Ruiz et al., 2004a; Redmond y Knox, 2004; 2006; Hernández, - datos sin publicar-; Martín, 2011; Halliday y Smith, 2011**).

## **2. ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DEL INMUNÓGENO**

En el presente estudio se ha realizado por primera vez el análisis del perfil proteico de los productos de ES de *T. circumcincta* enriquecidos para thiol-proteinasas, utilizado como inmunógeno, por lo que sólo ha sido posible contrastar los resultados obtenidos con otros similares procedentes de

homogenizados de vermes adultos o bien extraídos y purificados de forma similar, pero aislados de otras especies y estadios larvarios (*H. contortus* y *O. ostertagi*).

El extracto proteico utilizado en las inmunizaciones (ES-thiol) mostró un patrón complejo de fracciones proteicas con pesos moleculares >120 kDa aproximadamente, así como dos fracciones prominentes con un peso molecular de 80 kDa aprox. y una muy tenue de 31 kDa aprox. Sin embargo, el perfil proteico observado fue claramente distinto al obtenido al analizar fracciones enriquecidas para thiol-proteinasas a partir de productos de ES de *Ostertagia ostertagi*, donde se observó una prominente banda con peso molecular de 30kDa aprox. y tres fracciones de entre 45-92 kDa (**Geldhof et al., 2002**). Si comparamos nuestros resultados con los hallados por **Ortega (2015)**, observados grandes diferencias en cuanto al perfil proteico enriquecido para este tipo de proteinasas a partir de homogenizados somáticos de vermes adultos, al contener numerosas bandas peptídicas desde 215 a 35 kDa aprox., entre las que destacaron tres más prominentes de aproximadamente 73, 64 y 60 KDa y otra más tenue con un peso molecular de 36 KDa aprox., aun siendo aislados ambos a partir del mismo parásito *T. circumcincta* y utilizando idéntico protocolo de extracción. Esta escasa similitud entre extractos enriquecidos de homogenizados y de productos de ES también ha sido observada en *O. ostertagi* (**Geldhof et al., 2002**), lo que parece indicar que los componentes que integran las membranas (donde se ha descrito la presencia de estos productos) y los que son excretados/secretados por este tipo de nematodos, presentan unas notables diferencias de conformación, bien porque aparecen como precursores en los homogenizados somáticos o porque se tratan realmente de proteínas distintas, circunstancia que debería ser analizada

---

### 3. ESTUDIO DE PARÁMETROS PARASITOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS Y DE RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA GENERADOS TRAS LA INMUNIZACIÓN.

Tal y como quedó detallado en el apartado “Introducción”, el objetivo de esta experiencia fue evaluar la protección inducida en caprino por proteínas tipo cisteína procedentes de productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcincta*, para los cuales se analizaron una serie de parámetros parasitológicos, recuento total de vermes inmaduros y adultos en abomaso, longitud y fecundidad de vermes hembras, así como recuentos fecales de huevos tras el desafío con L3 del parásito. Adicionalmente, se determinaron de distintos parámetros sanguíneos en el curso de la inmunización y tras el posterior desafío con L3 infectantes del parásito. Por último, se valoró la respuesta inmune humoral (local y sistémica) mediante el análisis de los niveles de anticuerpos específicos en suero y mucus gástrico a lo largo de la experiencia.

#### 3.1. NIVEL DE INMUNOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LA FRACCIÓN INMUNÓGENA

La utilización de este tipo de antígenos, productos E/S, con fines inmunoproliféricos, viene valorándose por la aparición de cepas resistentes a los tratamientos antihelmínticos (**Magona y Musisi, 1999**) y los problemas medioambientales y de salud alimentaria que originan sus residuos. Estos estudios han ido encaminados a inducir una respuesta inmunitaria frente al parásito usando diferentes antígenos, a partir de extractos proteicos de productos de E/S de vermes adultos (**Jacobs et al., 1999; Vervelde et al., 2002**). En el desarrollo de estas estrategias de inmunización, ha tenido un papel protagonista los ensayos llevados a cabo en *Haemonchus contortus* (en ganado ovino) (**Schalling, et al., 1997; Bakker et al., 2004; De Vrie, et al., 2007**) y los

desarrollados en y *Ostertagia. ostertagi* (en vacuno), (**Geldhof et al., 2002, 2004, 2008; Clarebout, et al., 2005**), debido a los resultados alentadores en cuanto a protección obtenidos con este tipo de antígenos

Buena prueba de la eficacia de los productos de E/S como inmunógenos son los resultados observados por **Bakker et al. (2004)** y **Schalling et al. (1997)**, quienes, tras aislar 3 tipos de extractos proteicos con actividad cisteína en función del eluyente empleado (cisteína, DTT o los productos de E/S simplemente concentrados) a partir de vermes adultos de *H. contortus*, consiguieron inducir una importante inmunoprotección en ovinos. La protección fue especialmente evidente en los ensayos donde se había utilizado como inmunógeno los productos de E/S concentrados, llegándose a obtener una reducción de los recuentos fecales de huevos del el 89 %, y del 72.9 %, y una reducción de los recuentos de vermes del 70 y el 85 % (**Bakker et al., 2004; Schalling, et al., 1997**).

En el caso de *O. ostertagi*, los mejores resultados descritos hasta la fecha han sido los obtenidos por **Geldhof et al. (2002,2004, 2008)**, quienes, observaron reducciones del 60-74% en los recuentos fecales de huevos, de un 18% en el número de vermes, así como una menor longitud de los mismos, un aumento en los recuentos de larvas (9,8%), y una tendencia a la reducción del número de huevos intrauterinos de las hembras. En base a sus resultados, estos autores concluyeron que el antígeno experimental tendría un efecto inmunoprotector relacionado con la alteración de la fecundidad de los vermes hembras.

El presente trabajo presentado aquí constituye el primer estudio de inmunoprotección realizado en ganado caprino, utilizando como inmunógeno productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcincta* mediante protocolos similares a los utilizados en otras especies rumiantes (ovino y bovino) frente a *H.*



---

*contortus* y *O. ostertagi*, respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con la protección descrita tanto en *H. contortus* (**Bakker *et al.*, 2004; Schalling, *et al.*, 1997**) como en *O. ostertagi* (**Geldhof *et al.*, 2002,2004, 2008**), se observó que el número total de vermes del lote inmunizado no experimentó reducción significativa en relación con el lote testigo en el momento de sacrificio. Del mismo modo, atendiendo al porcentaje de vermes machos y hembras, estas se muestran con un porcentaje más elevado (61 %), de la misma manera que se observa habitualmente en infecciones primarias con este parásito (**W.D. Smith *et al.*, 2001; G. Henderson and J. Stear, 2006; D. Beraldi *et al.*, 2008; A.M. Halliday and W.D. Smith, 2011**). Este hecho contrasta con los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio en los que, utilizando como inmunógeno fracciones enriquecidas para thiol-proteinasas de homogenizados de vermes adultos de *T. circumcincta* en ganado caprino, llegó a observarse una reducción en relación al número de vermes presentes en el abomaso de los animales inmunizados, siendo esta reducción mucho más patente en los vermes hembras, con lo que la relación machos/hembras observada en infecciones primarias se vio modificada (**Meana y Rojo, 2000; Ortega, 2015**). Sin embargo, no se trata de un hallazgo generalizado, ya que en otras especies de nematodos gástricos como *H. contortus*, la reducción de vermes mediada por efecto inmunoprotector de determinado inmunógeno tampoco produjo una modificación de la relación entre el número de vermes machos y hembras (**Hernández –datos no publicados**).

Tras analizar los resultados obtenidos en relación a la influencia de la inmunización sobre la fecundidad (longitud de los vermes hembras y número de huevos intrauterinos), observamos al igual que en el caso anterior (recuento del número de vermes) que los resultados observados en los estudios llevados a cabo en terneros inmunizados con thiol-proteinasas de productos E/S de *O. ostertagi*

(Geldhof *et al.*, 2002,2004, 2008), no fueron observados en nuestro estudio, al no poder determinar diferencias significativas entre estos parámetros de ambos grupos experimentales (inmunizado y testigo).

Los mecanismos responsables de la disminución de la longitud de los vermes pueden ser dependientes de la densidad de vermes que provocan una competencia intraespecífica, y también se ha asociado al efecto de inmunidad adquirida por parte del hospedador (Balic *et al.*, 2000b). Dicha longitud parece estar muy relacionada con el número de huevos en el útero de los vermes hembra, y por ende con la fecundidad que presentan estas especies de nematodos, pudiéndose establecer correlaciones estadísticas positivas entre ambos parámetros en infecciones primarias con *T. circumcincta* tanto en ovinos (Stear *et Bishop*, 1999) como en caprinos (Ortega, 2015). Esta relación también quedó patente en nuestro trabajo entre los vermes recogidos en el grupo testigo (test de correlación de Spearman), lo que parece a contribuir a la idea de la utilización de la longitud de vermes hembras como parámetro para valorar la fecundidad de esta especie.

Como ya indicábamos, si bien ambos parámetros (longitud/número de huevos en útero) pueden verse afectados por densidad de vermes en el abomaso, también se ha establecido que podrían verse reducidos por la acción de diversos mecanismos inmunológicos como los relacionados con los niveles de IgA específica frente a determinados antígenos parasitarios presentes en el mucus abomasal (Stear *et al.*, (1995a). De hecho, el efecto inmunoprotector (traducido en una reducción de los recuentos fecales de huevos) de distintos antígenos parasitarios de nematodos gastrointestestinales (*O. ostertagi* y *H. contortus*) ha ido acompañado por una disminución en la longitud de los vermes (Geldhof, 2002, 2004; Redmond y Knox, 2004; Meyvis 2007). Sin embargo, al igual que en nuestro caso, también se ha podido observar cierto grado de protección en ensayos vacunales –en términos de reducción de recuentos fecales de huevos- sin

que se haya determinado ninguna alteración de la longitud de los vermes procedentes de animales inmunizados en relación con los obtenidos en animales testigo (Nisbet *et al.*, 2013). Por tanto, cabría considerar la posibilidad de que pudieran establecerse otros mecanismos inmunes protectores que no afectaran a este tipo de parámetros parasitológicos.

Al analizar el efecto de la inmunización sobre la evolución de los estadios larvarios tisulares, se observó que en los animales inmunizados presentaron valores medios de larvas en la mucosa más elevados que las observadas en los animales testigos, estando estas diferencias próximas a la significación. El mayor número de formas inmaduras presentes en la mucosa gástrica de los cabritos inmunizados podría explicarse en base a fenómenos de secuestro larvario o hipobiosis de los estadios tempranos de la cuarta etapa larvaria, los cuales podrían quedarse retenidos en las glándulas gástricas, cuando las condiciones para su desarrollo son adversas, bien por factores ambientales (Georgi y Georgi, 1990; Anderson, 1992), bien por un aumento de la sensibilización, debido a una exposición larvaria previa (Dunsmore, 1963), o bien por fenómenos de resistencia natural de determinados individuos (Michel, 1963; Smith *et al.*, 1985a; Seaton *et al.*, 1989a). El fenómeno de hipobiosis o secuestro larvario también se ha asociado a uno de los efectos de la protección conferida por diversos antígenos de nematodos gastrointestinales en diferentes ensayos de inmunización (Vercauteren *et al.*, 2007; Nisbet *et al.*, 2013).

Un aumento del número de larvas en la mucosa también se observó en los trabajos desarrollados por Geldhof *et al.* (2002; 2004; 2008) en bovinos inmunizados con esta misma fracción ES-thiol de *O. ostertagi*, sin que dicho incremento estuviera acompañado de una reducción significativa en el número de vermes adultos en el contenido abomasal respecto a los animales testigo. En contraste a lo observado en nuestro trabajo así como en los citados anteriormente, en determinados estudios donde se emplearon como inmunógeno

fracciones proteicas enriquecidas para thiol-proteinasas de *O. ostertagi* no se observaron diferencias en el número de larvas encontradas en la mucosa abomasal, a pesar de que se demostró una reducción significativa en el número de huevos fecales (Meyvis *et al.*, 2007).

De todo lo comentado con anterioridad se desprende que uno de los parámetros más importantes a la hora de valorar la actividad protectora del inmunógeno utilizado en nuestro estudio fue el análisis de los recuentos de huevos fecales. Dicho análisis demostró una reducción global del 42,2% en el grupo inmunizado frente al grupo testigo al final del estudio.

Sin embargo, al estudiar la evolución de los recuentos fecales durante el curso de la infección experimental, no se apreció ningún efecto de la inmunización sobre el periodo prepatente, situándose éste en torno a las 2 semanas post-infección en ambos grupos experimentales, y por tanto dentro de los rangos observados para esta especie de nematodo en ganado caprino (González, 2002; Molina *et al.*, 2009).

Al analizar en su conjunto todos los datos parasitológicos obtenidos en los dos grupos de animales estudiados, la protección parcial conferida por la inmunización con fracciones enriquecidas para thiol-proteinasas, y reflejada por una reducción de huevos fecales, podría explicarse por un cierto retraso en la evolución de los estadios larvarios parasíticos, o bien por una menor evolución hacia la madurez de los vermes. Los mecanismos inmunes relacionados con estos hallazgos, podrían no afectar a otros parámetros parasitológicos, como los relacionados tradicionalmente con la fecundidad de los vermes (Niesbet *et al.*, 2013), o incluso el número total de vermes adultos. Alguna explicación que pudiera contribuir a explicar estas observaciones podría incluir la actividad directa de algunos anticuerpos presentes en el mucus sobre los órganos reproductores de los vermes, y/o la presencia en el inmunógeno utilizado de antígenos capaces de interaccionar con las formas inmaduras del parásito,

presentes en la mucosa gástrica produciendo cierto retraso en su maduración (Niesbet *et al.*, 2013)

A tenor de los resultados obtenidos en el presente estudio, la inmunización con fracciones enriquecidas de cisteína-proteinasas, aislada a partir de productos excreción-secreción de vermes adultos de *Teladorsagia circumcincta* según el protocolo detallado en el apartado Material y Métodos, confiere una inmunoprotección parcial en cabras que resulta complicado comparar con otros ensayo a pesar de que los procedimientos de obtención puedan ser similares. La revisión de la información bibliográfica que tenemos hasta el momento apunta que pueden intervenir en los resultados finales un gran número de factores, lo que hace complicado llegar a conclusiones definitivas sobre el potencial protector de un determinado antígeno. La ausencia de diferencias aparentes entre animales inmunizados y testigo podría estar incluso motivada por las dificultades que supone la experimentación animal con grupos de animales que permitan la obtención de resultados con significación estadística.

Como ya indicábamos, a parte del procedimiento seguido para obtención de los extractos proteicos usados como inmunógeno, el protocolo de inmunización seguido o el adyuvante utilizado en cada caso también parecen constituir factores determinantes a la hora de valorar la posible actividad protectora. De este modo, Piedrafita *et al.* (2012), utilizando un mismo inmunógeno, demostraron distintos efectos inmunoprotectores en base a diferentes concentraciones de antígeno y número de inmunizaciones. De forma similar, distintos ensayos llevados a cabo tanto *H. contortus* como *O. ostertagi*, demostraron un grado de protección variable en función de las concentraciones de inmunógeno utilizado. (Smith, *et al.*, 2000; Knox, *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 004; Halliday *et al.*, 2010). Otro factor relacionado con el diseño experimental y que podría interferir en el grado de protección generado por el inmunógeno

podría ser el momento de sacrificio. En nuestro estudio ambos grupos de animales se sacrificaron a los 41 días post infección (41 dpi), no obstante, las mayores diferencias entre los dos lotes experimentales (inmunizados y testigos) en cuanto a recuentos fecales de huevos, se observaron en torno a los 22 y 26 dpi, y no a los 41 dpi. circunstancia que podría explicar las escasas diferencias observadas en algunos parámetros parasicológicos entre ambos grupos experimentales. Estos hallazgos sugerirían la necesidad de adelantar el sacrificio de los cabritos en experiencias futuras, utilizando este inmunógeno.

La elección del adyuvante parece ser crucial en los ensayos vacunales (**Geldhof et al., 2004**), debido a que se trata de agentes heterogéneos e inespecíficos que asociados a los antígenos utilizados como inmunógenos parecen inducir una respuesta inmunitaria más potente y prolongada, o bien orientarla en el sentido deseado (**Cox et al., 1997**). Entre los diferentes tipos de utilizados en ensayos en animales, destacan las sales de aluminio, saponinas como el Quil A o adyuvantes oleosos (ej. Adyuvante completo e incompleto de Freund) (**Cox et al., 1997**). En rumiantes resistentes a este tipo de infecciones si la orientación de la respuesta inmune hacia los tipos Th1/Th2 no se encuentra del todo dilucidada (**Gill et al., 2000; Lacroux et al., 2006**), como demuestra el hecho de que el desarrollo de respuestas protectoras pueda ir acompañado de un patrón de citoquinas caracterizado como Th2 en el que, además se detectan también importantes incrementos en el interferón (IFN)  $\gamma$ , una citoquina vinculada a respuestas del tipo Th1 (**Almería et al., 1997a,b; Canals et al., 1997; Pernthaner et al., 1997, 2005, 2006; Brown et al., 1998; Miller y Horohov, 2006**). Por todo ello, a pesar de que pudiera tener una mayor relevancia las respuestas Th2, cabría la posibilidad de que los adyuvantes capaces de potenciar ambos tipos de respuestas fueran los complementos ideales para el inmunógeno utilizado en el presente estudio.

Además debe de tenerse en consideración la posibilidad de, que otros

tipos de mecanismos inmunológicos, al margen de las respuestas clásicas (Th1 o Th2), pudieran intervenir de manera importante en la protección conferida por el inmunógeno. Es el caso de respuestas consideradas de forma más recientemente (Treg o Th17) (**Taams et al., 2005; Gómez-Lucía et al., 2007; Quesniaux 2009**), de las que se tiene menos información sobre su papel real en la inmunidad frente al parásito, así como el efecto de cada adyuvante en relación a este tipo de respuestas (**Solano-parada et al., 2010; Hang L et al., 2011; Osuna et al., 2011**).

Atendiendo a toda esta información, en el presente trabajo decidimos utilizar un protocolo de inmunización en el que se incluyó el uso de adyuvantes oleosos (completo e incompleto de Freund), dado que podría facilitar la generación de respuestas de ambos tipos (Th1, Th2), además con este tipo de adyuvante se habían obtenido resultados prometedores en ganado caprino en experiencias previas utilizando extractos similares de *H. contortus* (**Ruiz et al., 2004**). No obstante, después de analizar los resultados obtenidos, utilizando el protocolo referido, cabría pensar la posibilidad de que tal vez el uso de otros adyuvantes, bien que generaran respuestas más potentes (Quil A) (**Geldhof et al., 2004**) o que indujeran desviaciones hacia respuestas Th2 podrían mejorar la protección inducida por estas proteínas incluidas en el extracto utilizado como inmunógeno (**Cox et al., 1997**).

Otro factor determinante para explicar la variabilidad de los resultados obtenidos en distintos estudios, está relacionado con la especie hospedadora. Son numerosas las referencias que ponen de manifiesto las diferencias desde el punto de vista fisiológico que se establecen entre el ganado caprino y ovino (**Huntley et al., 1995; Macaldowie et al., 2003; González, 2002; Hoste et al., 2008**), incluyendo las respuestas inmunes que se desarrollan frente a los parásitos (**Pomroy, et al., 1985, 1989a, 1989b; Hoste, et al., 1998**), esta circunstancia justificaría el desarrollo de trabajos como el presente, dado que, hasta la fecha, la inmensa mayoría de la información que disponemos se ha establecido a partir de

estudios realizados en otras especies rumiantes. También son patentes las diferencias interraciales en cuanto la susceptibilidad frente a parásitos similares (**Baker, et al., 1998; Mandonnet et al., 2001; Chiejina, et al., 2002; Behnke, et al., 2006 Bambou et. al., 2009**). En nuestro caso, se utilizó como modelo experimental una raza autóctona canaria, caracterizada por una escasa influencia externa, dada la prohibición de la importación de caprinos de otras razas al Archipiélago (**Directiva 91/68/CE**).

Dentro de los factores relacionados con el hospedador, la edad de los animales inmunizados, parece ejercer una influencia clara en la susceptibilidad de distintas especies rumiantes a las infecciones por nematodos gastrointestinales (**Kassai, 1999; Schallig, 2000**), por lo que es de suponer que también influya a la hora de valorar la eficacia protectora de distintos antígenos parasitarios. Así, algunos estudios han demostrado que la protección inducida por un mismo extracto antigénico en distintos lotes de ovinos con distintas edades, era mucho más eficiente en animales con edades superiores a los 6 meses (**Tavernor et al., 1992; Munn et al., 93 y 93a; Knox et al., 1999; Smith et al., 1999; Vervelde et al., 2001; Martin et al., 2011**). En nuestro caso, los caprinos incluidos en nuestro estudio contaban con seis meses de edad al principio del ensayo, por lo que, aun tratándose de otra especie hospedadora no cabría esperar ninguna deficiencia en las respuestas inmunes desarrolladas, además, los niveles de inmunoprotección alcanzados en animales inmunizados frente *H. contortus* con esa misma edad también fueron satisfactoria (**Ruiz et al., 2004**).

En cualquiera de los casos, a pesar de que es difícil establecer comparaciones con otros ensayos de inmunización, parece claro que los resultados de protección obtenidos con el producto utilizado en nuestro estudio son menos manifiestos que los que se observan cuando se llevan a cabo inmunizaciones con extractos similares de *H. contortus*, tanto en caprino (**Ruiz et al., 2004a**) como en otras especies (**Schalling et al., 1997; Knox et al., 1999;**



**Knox y Smith, 2001; Bakker *et al.*, 2004**). Los resultados son mucho más parejos a los obtenidos en ensayos de inmunización frente a especies del género *Ostertagia/Teladorsagia* (**Geldhof *et al.*, 2002,2004, 2008; Halliday y Smith, 2010; Ortega, 2015**), lo que se ha explicado por el tipo de nutrición hematófaga llevada a cabo por *H. contortus* que no se produce en estas otras especies, lo que facilitaría los mecanismos protectores inducidos por la inmunización (**Andrews *et al.*, 1995; Knox *et al.*, 1999**).

### 3.2. EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

A la hora de interpretar los resultados hematológicos obtenidos, se considera fundamental establecer comparación con los valores de referencia descritos para la especie caprina, sin despreciar las variaciones entre individuos. En este sentido, resulta determinante comparar con los valores que presentan los testigos de la inmunización, animales de la misma edad, procedencia y criados en las mismas condiciones pero no expuestos al inmunógeno.

A diferencia de lo que sucede con otros tricostrongílidos, como es el caso de *H. contortus*, pocos trabajos recogen valores hematológicos referidos a infestaciones con *T. circumcincta*, y particularmente en ganado caprino. Lo que dificulta la realización de unos análisis comparativos basados en la bibliografía.

Los niveles de hematocrito de ambos lotes, inmunizados y testigos, mostraron ligeras fluctuaciones a lo largo del estudio, pero sin llegarse a observar diferencias estadísticas entre lotes. Los valores medios (28%) coinciden en general con lo descrito en la bibliografía como fisiológico para la especie caprina en edades comprendidas entre los 6 y 12 meses de edad (**Nangia *et al.*, 1968; Oduye, 1976**). Resultados similares también se encontraron en infecciones experimentales realizadas en nuestro laboratorio con este nematodo

gástrico realizado en ganado caprino de la misma raza (**González, 2002; Ortega, 2015**).

La concentración de proteínas plasmáticas en ambos lotes de animales (inmunizados y testigos) fue muy similar, desde el inicio del estudio hasta el momento del sacrificio. En este caso, los valores considerados fisiológicos para la proteínas plasmáticas en cabras se encuentra entre los 6.4-7 gr /dl según **Kaneko, 1980** y 6.1-7.4 g /dl según **Boyd, 1984**, por lo que los valores encontrados en el presente trabajo estarían dentro del rango fisiológico. La pérdida de albúmina sérica descrita en la ostertagiosis clínica, (**Soulsby, 1988; Kassai, 1999**), suele conducir a una importante reducción de las proteínas séricas y puede acompañarse de edemas subcutáneos evidentes (**Mulligan et al., 1963**), en la forma subclínica, como en la que se encuentra habitualmente en Gran Canaria, no conlleva cambios significativos en los niveles séricos de proteínas plasmáticas (**González, 2002**), coincidiendo con los resultados del presente trabajo

La inoculación con larvas 3 de *T. circumcincta* originó un aumento de los recuentos totales de leucocitos, siendo más patente este aumento en los animales inmunizados, aunque las diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística. Esta tendencia general también ha sido observada en corderos infectados experimentalmente con este mismo parásito, (**Beraldi, et al., 2008**). En cualquier caso, debido al amplio rango fisiológico considerado para este parámetro ( $18.18 \pm 3.84 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu$ l) (**Holman y Dew, 1965**), todos los valores de leucocitos en sangre periférica de los animales de nuestro estudio estarían dentro de los valores considerados como normales para ganado caprino.

Los incrementos encontrados en los recuentos totales de leucocitos estuvieron acompañados por un aumento de los niveles de linfocitos y neutrófilos, siendo este incremento también mayor en el lote inmunizado. También en esta ocasión, todos los valores se encuentran dentro del rango

fisiológico para esta especie (**Jain 1993b**). Un incremento en los resultados celulares de linfocitos también ha sido observado en infecciones experimentales con este nematodo gástrico (**Ortega, 2015; González, 2002, Hernández –datos sin publicar-**).

En cuanto a la otra población celular analizada (eosinófilos periféricos), son muchos los autores que le atribuyen un papel relevante en la generación de resistencia frente a los nematodos gastrointestinales (**Dawkins et al., 1989; Buddle et al., 1992; Balic et al., 2000**). En condiciones experimentales, lo habitual es que tras una infección por helmintos los eosinófilos en sangre sufran un incremento (**Balic et al., 1999c**). Así, en infecciones primarias con nematodos gastrointestinales llevada a cabo en corderos, es posible observar una eosinofilia con picos entre los 5-9 días post-infección, y que podría prolongar hasta un mes después de ésta (**Dawkins et al., 1989; Buddle et al., 1992; Dobson et al., 1992; Stevenson et al., 1994; Balic et al., 1999a; Balic et al., 2000; D. Beraldi, et al., 2008**). Sin embargo, aun aceptando que esta es la situación más frecuente, diversos autores en ocasiones no han encontrado esta eosinofilia, lo que puede plantear dudas sobre su utilidad como método para evaluar la respuesta inmunitaria del hospedador (**Sutherland et al., 1999; Yong et al., 1985**). Tampoco en nuestro caso se apreciaron incrementos significativos de estos valores, lo que podría estar relacionado con la infección moderada-baja llevada a cabo con el desafío.

En nuestro estudio, los animales inmunizados presentaron una media de eosinófilos periféricos ligeramente menor que el lote testigo y alcanzaron el valor máximo la última semana de experiencia. Por su parte, los animales testigos registraron un aumento de los recuentos desde la semana -3 hasta la semana -1, coincidiendo con las dos últimas semanas de las inmunizaciones, (los animales testigos solo recibieron adyuvante) tras estas semanas hasta el final del estudio los valores se mantuvieron con pequeñas fluctuaciones. El análisis

estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por su parte al analizar las relaciones de los niveles de eosinófilos observados con los parámetros parasitológicos que indicaran algún grado de resistencia frente a la infección, no llegó a observarse ninguna correlación negativa lo que no parece contribuir a la idea del posible uso de estas células como marcador de resistencia frente a esta especie parásita en esta raza caprina, tal y como apuntan otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio (**Ortega, 2015**).

Si bien los niveles plasmáticos de proteínas no reflejan de forma clara el efecto del parásito en el hospedador, no ocurre lo mismo con la concentración de pepsinógeno sérico. Las larvas L3 de *T. circumcincta*, así como los de otros nematodos gástricos, penetran en las glándulas gástricas, donde mudan y se transforman en L4 y posteriormente a L5 o preadultos. En este proceso tiene lugar la destrucción de las glándulas gástricas productoras de HCl. La reducción de la secreción de HCl provoca una subida del pH gástrico que puede alcanzar valores próximos a 7, lo que tiene importantes repercusiones sobre la activación del pepsinógeno para su conversión en pepsina. Como consecuencia el pepsinógeno que no se transforma en pepsina, se acumula en el abomaso y finalmente, pasa al torrente sanguíneo (**Soulsby, 1988; Cordero del Campillo, 1999**).

En nuestro estudio, tras el desafío, ambos lotes experimentaron un incremento de la concentración de pepsinógeno en sangre, alcanzando el punto máximo la tercera semana post-infección (0,51+0,086 Utyr) en los animales inmunizados y la primera semana post-infección (0,50+0,077 Utyr) en los animales testigos, de forma similar a lo publicado en los trabajos realizados por **Terefe et al. (2007)**. A partir de la semana 4, los niveles séricos de pepsinógeno de ambos lotes empezaron a descender hasta llegar a sus valores iniciales. Los valores de pepsinógeno sanguíneo en ninguno de los casos se asociaron con un cuadro clínico de ostertagiosis. Por lo tanto, estos datos parecen confirmar el

valor del micrométodo utilizado en este estudio, incluso en infecciones subclínicas, como método complementario para el seguimiento de las infecciones por *T. circumcincta*, como proponen algunos autores (**Dorny y Vercruyse, 1998**).

Al comparar los niveles de pepsinógeno entre ambos grupos experimentales durante el curso de la infección, no llegaron a diferencias, a pesar de haberse observado cierto grado de protección en término del recuento fecal de huevos. Esta circunstancia podría estar relacionada con el hecho de que no se apreciaran diferencias en cuanto al número de vermes adultos, dada la relación positiva que suele establecerse entre la concentraciones de pepsinógeno y carga parasitaria en ovinos y caprinos infectados con *T. circumcincta* (**Stear *et al.*, 1995d; Bishop y Stear, 2000; Hoste *et al.*, 2001; Gutiérrez-Gil *et al.*, 2009**).

### 3.3. EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL SISTÉMICA

Dado el incremento de los niveles de anticuerpos séricos específicos que se produce en animales que han estado previamente sensibilizados por nematodos gastro- intestinales (**Canals y Gasbarre, 1990; Balic *et al.*, 2000b; Schallig *et al.*, 1995a; Sutherland *et al.*, 1999; Terefe *et al.*, 2007**), ha llegado a proponerse la determinación de este parámetro como marcador de resistencia en infecciones experimentales por este tipo de parásitos (**Strain *et al.*, 2002**).

En nuestro estudio, la respuesta serológica de IgGs específicas en los animales del grupo testigo fue muy ligera, solo se observó un tenue aumento tras la infección experimental y a partir de este momento, los valores se mantuvieron ligeramente aumentados. En cambio, en el grupo inmunizado pudo observarse un aumento más significativo de los niveles séricos de IgG, con un perfil

similar al descrito en infecciones naturales con el parásito (**González et al., 2002**). El incremento de los niveles de IgG fue mucho más patente tras el desafío, lo que sugiere la presencia de componentes antigénicos en el extracto inmunógeno que son reconocidos en el curso de la infección. Estos antígenos serían “no ocultos” al sistema inmune y por lo tanto, estarían sujetos a un proceso selectivo natural por parte del hospedador (**Molina et al., 2011**).

El incremento de IgG específica, si bien fue patente si lo comparamos con los niveles observados al principio del experimento, no fue tan elevado como los niveles en ensayos de inmunización con antígenos similares, especialmente frente a *H. contortus* (**Ruiz et al., 2004; Hernández –datos sin publicar- de Vries et al., 2009**), circunstancia que podría estar relacionada con la concentración de inmunógeno utilizada en cada caso, mucho menor en nuestro estudio, ante las dificultades para la obtención de extractos enriquecidos a partir de productos de E/S de *T. circumcincta*.

El aumento de los niveles de anticuerpos específicos (IgGs) tras el desafío en estudios vacunales frente a *H. contortus* se han relacionado con el grado de protección inducido por el antígeno (**Smith y Smith, 1993; Smith et al., 1994b; Andrews et al., 1995; Knox et al., 1999**), se ha considerado incluso, que estos anticuerpos serían responsables de la inmunidad adquirida por estos inmunógenos mediante la ingestión de los mismos durante su actividad hematófaga. La menor respuesta humoral generada en nuestro estudio, así como el carácter no hematófago de *T. circumcincta* podría explicar el menor efecto generado sobre algunos parámetros parasitológicos, como el número de vermes (**Halliday y Smith, 2011**).

Por lo general la IgA suele tener una mayor presencia a nivel de los tejidos, observándose niveles mucho más bajos en el suero sanguíneo (**Balic et al., 2000b**). A pesar de ello, en el lote de animales inmunizados, los niveles de IgA específica experimentaron un ligero incremento, observándose los niveles máximos una semana después de la última inmunización. Sin embargo, tras el

desafío, los valores medios descendieron llegando a ser similares a los observados en el grupo testigo. Este resultado contrasta con lo descrito en otros trabajos, en los que animales que han adquirido cierta resistencia natural o inducida por diversos antígenos, muestran niveles de IgA elevados que se correlacionan negativamente con parámetros asociados con la resistencia a la infección como la fecundidad de los vermes (**Smith et al., 1985a; Stear et al., 1995a; Halliday et al., 2007**), la carga parasitaria o los recuentos fecales (**Gill et al., 1994; Stear et al., 1995a; Beraldi et al., 2008; Smith et al., 2009**). En ensayos previos llevados a cabo por nuestro laboratorio utilizando extractos similares, pero procedentes de homogenizados de vermes adultos, sí llegó a constatarse un aumento de IgAs séricas específicas que se relacionó con la resistencia al desafío (**Ortega, 2015**), pero observándose como este caso que el incremento se manifestó especialmente durante el periodo de inmunización, guardando relación con parámetros de resistencia como la longitud de los vermes hembra. La ausencia de correlación con parámetros parasitológicos observado en nuestro estudio pudo deberse a la menor especificidad del antígeno somático del parásito realizados en los ELISAS.

Los resultados del *Western-blot* mostraron que, ambos lotes de animales (inmunizados y testigos) reconocían varias bandas peptídicas comprendidas entre 215 y 60 KDa, así como varias bandas más tenues entre 60-27 kDa. En cualquier caso, no se observaron diferencias en los perfiles proteicos reconocidos por las IgG séricas entre los dos lotes de animales evaluados, salvo una ligera reacción con fracciones de peso molecular bajo (< 39 kDa) al final del experimento que se detectó en las muestras procedentes de animales inmunizados pero no en los testigos. Por tanto, parecen estas últimas las únicas fracciones proteicas que podrían considerarse diferenciadoras entre ambos lotes, y precisamente es en el rango de 30-40 kDa donde se produce un reconocimiento más intenso en pequeños rumiantes inmunizados con *H. contortus* (**Schallig et al., 1995; Knox et al., 1999; 2005; Ruiz et al., 2004**) y *T. circumcincta* (**Nisbet et al., 2013;**

**Ortega, 2015**), así como en bovinos inmunizados con *O. ostertagi* (**Geldhof et al., 2002**), fracciones que podrían ser de interés en el desarrollo de inmunógenos frente a este parásito.

#### 3.4. EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE LOCAL

Al analizar la respuesta humoral local, lo más común en las infecciones por nematodos GI es que se genere un aumento de los niveles de anticuerpos específicos, tanto del isotipo G como del A (**Balic et al., 2000b; Lacroux et al., 2006; Halliday et al., 2007**). Este aumento se ha observado en nuestro laboratorio en inmunizaciones con fracciones enriquecidas para tiol-proteinasas frente a *T. circumcincta* en caprinos, al comparar los niveles de IgG e IgA del mucus gástrico entre animales inmunizados y testigos (**Ortega, 2015**).

Entre ambos isotipos, la inmunoglobulina A es la que suele encontrarse en concentraciones más elevadas en las mucosas infectadas por nematodos GI (**Amarante et al., 2005**), asociándose a menudo con la regulación de la fecundidad de *T. circumcincta* en ganado ovino (**Smith et al., 1985a; Stear et al., 1995a; Halliday et al., 2007**), y caprino (**Ortega, 2015**).

En el presente trabajo el incremento de los niveles en el mucus de IgA e IgG específicas fue mucho más pronunciado que en el lote testigo, cual podría estar relacionado con el efecto ejercido por el extracto enriquecido para tiol-proteinasas utilizado como inmunógeno. El reducido número de animales experimentales, la variabilidad de las respuestas individuales y la utilización de homogenizado somático de adultos de *T. circumcincta* como antígeno en las determinaciones de la respuesta humoral local, podrían explicar el que las diferencias aparentes entre grupos no tuvieran significación estadística, aunque ambos isotipos fueran más del doble en el grupo inmunizado. Estos resultados



concuerdan con los obtenidos en otros trabajos, en los que animales que fueron sometidos a un protocolo de inmunización con fracciones antigénicas purificadas o recombinantes, y en los que se obtuvo cierto grado de protección, también presentaron mayores niveles de inmunoglobulinas tanto del isotipo A como G en el mucus abomasal (**Geldhof *et al.*, 2002; 2004; Bakker *et al.*, 2004; Nisbet *et al.*, 2013; Hernández, -datos sin publicar-**).

Al evaluar la asociación de los niveles de inmunoglobulinas con distintos parámetros parasitológicos, se observó que los niveles locales de IgA específica se asociaron de forma negativa con la longitud de los vermes hembras y con el número de huevos intrauterinos, sin llegar a la significación. Este resultado podría explicar los recuentos fecales de huevos más bajos observados en el grupo de animales inmunizados en el curso del desafío, a pesar de que al final del estudio tales diferencias no quedarán patentes. La mayor respuesta humoral local de IgA asociada a alteraciones de la fecundidad de esta especie de nematodo gástrico también se ha observado también en otros estudios de inmunización (**Smith *et al.*, 1985a; Stear *et al.*, 1996; Halliday *et al.*, 2007**), lo que parece indicar que se trata de un mecanismo inmunoprotector.

Las relaciones entre la respuesta humoral local y otros parámetros parasitológicos como los recuentos de vermes adultos obtenidos al final del experimento fueron menos relevantes que a observadas en animales inmunizados con este tipo de antígeno (thiol-proteinasas), pero obtenido a partir de homogenizados de vermes adultos (**Ortega, 2015**). Esta circunstancia podría estar determinada por las escasas diferencias en este parámetro entre grupo inmunizado y testigo. No obstante, los niveles de IgA de la mucosa gástrica de los animales inmunizados se relacionó de forma positiva con el número de larvas inmaduras, lo cual podría constituir un mecanismo adicional relacionado con el desarrollo de inmunidad natural o inducida por inmunizaciones con antígenos de este tipo de parásitos (**Stear *et al.*, 2004; Geldhof *et al.*, 2002; Amarante *et al.*, 2005, Lacroux *et al.*, 2006**). En contraste, otros autores han descrito un

aumento en el porcentaje de larvas inhibidas y un descenso en la carga de vermes antes de que se produzca un incremento en los niveles de IgA específica local (Halliday *et al.*, 2007).

Las IgGs también podrían alterar la actividad nutritiva y reproductora de los nematodos GI, al unirse a antígenos solubles o ejerciendo una acción directa sobre el parásito (Salinas, 2007). En nuestro trabajo, las asociaciones negativas detectadas entre los niveles de IgG específico local de y los distintos parámetros de fecundidad (longitud de los vermes hembras y el recuento de número de huevos intrauterinos), también apuntan cierto efecto sobre la capacidad reproductora de estos vermes, aunque no alcanzaron significación estadística, probablemente por las circunstancias ya mencionadas con anterioridad.

Respecto al reconocimiento de antígenos en el homogeneizado somático de vermes adultos de *T. circumcincta* por parte de las IgG específicas del mucus, ambos lotes reconocieron fracciones peptídicas en un rango de 215-60 KDa. Por su parte el lote inmunizado, destacó una fuerte reacción con un polipéptido de 36 kDa aproximadamente.

El perfil proteico reconocido por las IgAs del mucus del lote testigo dicho reconocimiento fue, por lo general, muy débil. Se marcaron varios péptidos entre 215-60 kDa, destacando dos bandas de aproximadamente 101 y 143 kDa. Alrededor de los 60 kDa también se detectó una tenue reacción, así como otras dos fracciones proteicas de 36 y 19,6 kDa aproximadamente. En el lote de cabritos inmunizados, el perfil proteico reconocido fue muy similar, pero en esta ocasión destacó una fuerte reacción con una fracción proteica de 36 kDa.

Un reconocimiento más intenso de algunas fracciones peptídicas por parte de Ig locales de los animales inmunizados, también se ha observado en otros trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio. En tales trabajos se utilizó como inmunógeno antígeno somático de vermes adultos y se originó también una protección parcial frente *T. circumcincta* en caprino. En concordancia a lo

anterior, otras experiencias de inmunización llevadas a cabo en ovinos y bovinos y con los que se han alcanzado distintos niveles de protección (**Knox et al., 1999; Geldhof et al., 2002; Nisbet et al., 2013**) han demostrado también un mayor reconocimiento antigénico en el grupo los animales inmunizados.

Entre todas las fracciones peptídicas encontradas en nuestro estudio cabría destacar, la fracción de peso molecular de aproximadamente 36 KDa, similar a la encontrada en nuestro laboratorio utilizando como inmunógeno somático de adulto de *T. circumcincta* (**Ortega, 2015**). Varios son los trabajos en los que el reconocimiento por parte de anticuerpos séricos de una fracción de 36 KDa aprox. de vermes adultos de *T. circumcincta*, se ha relacionado con la fecundidad de los vermes hembras (**McCrie et al., 1997; Strain y Stear, 1999**). Componentes con este mismo peso molecular de los vermes adultos fueron detectados en el suero de los animales investigados, por lo que estos datos nos podrían llevar a pensar que algún componente proteico de esta fracción peptídica, podría jugar algún papel en la protección conferida por el inmunógeno en el presente trabajo, con cierto potencial inmunoproliférico.

Como se mencionó anteriormente, en las infecciones por nematodos gastrointestinales se producen generalmente respuestas de tipo Th2 (**Claerebout y Vercruyssen, 2000; Balic et al., 2000b; Craig et al., 2007; McNeilly et al., 2009**), aunque, en algunos casos, se ha observado la presencia conjunta de éstas junto con respuestas clasificadas tradicionalmente como Th1 (**Almería et al., 1997b; 1998; Canals et al., 1997; Pernthaner et al., 1997; Schallig, 2000; Craig et al., 2007**), así como la expresión de otras citoquinas asociadas a otros tipos de respuestas (Th17, Treg) (**Taams et al., 2005; Gómez-Lucía et al., 2007; Quesniaux 2009; Venturina et al., 2013**), indicando con ello que las respuestas inmunitaria frente a este tipo de nematodos en rumiantes puede ser muy compleja y variable en el curso de la infección (**Balic et al., 2000b**), de ahí que, en la mayoría de las ocasiones, los ensayos experimentales solamente muestren una panorámica parcial de la situación, sujeta además a –lo mismo que

ocurriera con otras variables analizadas- a importantes variaciones individuales, aún tratándose de grupos experimentales relativamente homogéneos. Es por ello, que los niveles de expresión de las citoquinas estudiadas (IL-4, IL-10, IL-2, IL-17A e INF $\gamma$ ) en los ganglios y mucosa abomasales de los animales testigos e inmunizados, no presentaran diferencias significativas, pero si consistentes tendencias, tal y como se discutirán a continuación.

La expresión relativa de las citoquinas IL-2, IL-17 e INF $\gamma$  a nivel de los nódulos abomasales mostró unos niveles mayores de expresión en los animales inmunizados que en los testigos. Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios realizados en nuestro laboratorio de inmunización de caprinos con fracciones enriquecidas de thiol-proteinasas a partir de vermes adultos de *T. circumcincta* (Ortega, 2015). No obstante, nuestros resultados, contrastan con los observados en inmunizaciones de bovinos, con fracciones thiol-proteinasas procedentes de productos de ES de *O. ostertagi*, donde no se apreciaron variaciones significativas en ninguna de las citoquinas estudiadas al comparar los lotes inmunizados y testigos (Claerebout *et al.*, 2005 Craig *et al.*, 2007), aun cuando se halló cierto grado de resistencia al desafío en parámetros relacionados con la fecundidad de las hembras.

En este sentido, destacó la expresión de la IL-2, bastante más elevada que la observada en animales testigos. Esta citoquina es producida fundamentalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y se relacionan con la proliferación linfocitos T y B (García, 2007). D este modo en los animales inmunizados el aumento de los niveles de IL-2 estuvo acompañado por un incremento significativo de los recuentos de varias subpoblaciones de linfocitos T y B en la mucosa gástrica. La discrepancia con las observaciones encontradas en otros estudios similares en los que se llevó a cabo infecciones experimentales con nematodos GI (niveles de expresión de IL-2), podrían estar influenciadas por factores relacionados con la especie hospedadora y parásita, el contacto previo con antígenos parasitarios, así como el momento del muestreo (42 dpi, en nuestro estudio), debido a que la

expresión de citoquinas puede ser rápidamente regulada, sin olvidar la posibilidad de que el adyuvante utilizado en cada caso podría modular las respuestas inmunes desarrolladas tras el desafío (Cox y Coulter, 1996; Balic *et al.*, 2000b; Claerebout *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2011).

Como se consideró previamente el desarrollo de respuestas protectoras frente a las infecciones por nematodos GI genera fundamentalmente respuestas inmunes clasificadas como Th2 (McNeilly *et al.*, 2009), aunque algunos estudios han puesto en evidencia que este tipo de respuestas podrían ir acompañadas por respuestas Th1 (Almería *et al.*, 1998; Craig, *et al.*, 2007), circunstancia que podría explicar este incremento de expresión de INF- $\gamma$  a nivel de ganglios regionales, que en cualquier caso no parece determinar un desvío hacia este tipo de respuestas a nivel local, tal y como comentaremos posteriormente.

Las diferencias entre lotes respecto a las restantes citoquinas analizadas (IL10, IL-17 e IL-4) fueron menos patentes, coincidiendo con los resultados observados en ovinos sensibilizados con antígenos parasitarios (Lacroux *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007).

En la mucosa abomasal la expresión de las citoquinas mostró un perfil distinto al observado en los ganglios abomasaes. En la mucosa abomasal se observó una expresión similar para las IL-2 y IL-17 y una menor expresión del INF- $\gamma$  en los animales inmunizados en relación al lote testigo. Sin embargo esta tendencia general no se mostró, en el caso de la IL-4, cuya expresión fue bastante más elevada en la mucosa de los animales que recibieron una inmunización previa. Estos niveles de IL-4 en la mucosa abomasal ya han sido observados en ovinos previamente infectados con *H. contortus*, acompañado por un descenso en los de INF $\gamma$  e IL-10 (Lacroux *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007), siendo incluso superior en aquellos animales resistentes de forma natural a la infección, así como en estudios de inmunización con fracciones enriquecidas de thiol-proteinasas a partir de vermes adultos de *T. circumcincta* en caprino

(Ortega, 2015), circunstancia que podría estar relacionada con la protección parcial observada tras la inmunización. Esta observación contrasta con las determinaciones llevadas a cabo en bovinos inmunizados con thiol-proteinasas derivadas de vermes adultos de *O. ostertagi*, donde no se observaron modificaciones en la expresión de las citoquinas estudiadas (Claerebout *et al.*, 2005).

Esta mayor expresión de IL-4 en los animales inmunizados a nivel local, estuvo relacionado con un aumento los recuentos de células IgA<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> en la mucosa abomasal, hallazgo observado también en ovinos resistentes a *H. contortus* (Lacroux *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007) y en animales inmunizados con fracciones enriquecidas de thiol-proteinasas a partir de vermes adultos de *T. circumcincta* en caprino donde se obtuvo una protección parcial frente a la infección (Ortega, 2015).

Al analizar los recuentos de las diferentes poblaciones celulares efectoras estudiadas a nivel de la mucosa abomasal (eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares), observamos que, el número de eosinófilos, y el de leucocitos globulares fueron ligeramente mayores en los animales inmunizados, no observándose este mismo patrón en las poblaciones de mastocitos, donde los recuentos fueron menores. En ninguno de los casos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes.

Según las fuentes bibliográficas sobre el estudio de las poblaciones celulares de mastocitos y leucocitos globulares observamos que, ambos tipos de células juegan un papel importante en la protección y resistencia frente a las infecciones por nematodos GI (Miller, 1984,1996; Gamble, H.R. *et al.*, 1992; Gill, H.S. 1991), considerándose por lo general que la relación entre los leucocitos globulares y la resistencia adquirida es mayor para el caso de los mastocitos, al tratarse estos leucocitos de mastocitos que han liberado sus mediadores, y por tanto, células activadas (Stear, M.J. *et al.*, 1995a; Miller,

**1996; José Pérez, et al 2001; Balic et al 2003**). Sin embargo en nuestro estudio, no se llegó a demostrar una relación clara con la posible protección inducida por la inmunización. Son muchos los argumentos que parecen indicar este papel predominante que juegan estas poblaciones celulares en la resistencia natural frente a infecciones por nematodos gastrointestinales (**Snider, et al., 1981; Huntley, et al., 1982; Miller, 1984; Wiggins y Gibbs, 1989; Stear, et al., 1995a**), probablemente porque estos mediadores inducen cambios en el intestino y generan un ambiente hostil para la supervivencia del nematodo, debido a procesos inflamatorios en la mucosa gastrointestinal (**Rothwell, 1989**). Estos cambios podrían incluso inducir una rápida expulsión de las larvas antes de infectar los tejidos (**Huntley et al., 1992; McClure et al., 1992; McClure y Emery, 1994; Huntley et al., 1995; Douch et al., 1996; Meeusen y Balic, 2000; José Pérez et al., 2001**).

Las diferencias observadas frente a los hallazgos obtenidos en otros estudios, también podrían deberse a que en la mayoría de las ocasiones estos resultados han sido obtenidos en ganado ovino, mientras que en caprinos, estas células parecen desarrollar una actividad menos importante en las infecciones por nematodos gastrointestinales (**Huntley et al., 1995; Macaldowie et al., 2003**). Las discrepancias también podrían justificarse por el de especie parásita implicada, ya que algunos autores sugieren que los leucocitos globulares podrían jugar un importante rol en la respuesta frente adultos de *H. contortus* en cabras (**Pérez et al., 2001; Hernández, -datos sin publicar-**).

La infiltración de eosinófilos en la mucosa abomasal, se ha asociado con la inmunidad frente a los nematodos GI (**Balic et al., 2002; Meeusen et al., 2005**), como demuestra el hecho de que en infecciones secundarias con este tipo de nematodos el incremento de eosinófilos en tejido es sensiblemente superior a los detectados en animales primoinfectados (**Balic et al., 2000b**), tanto en ovinos (**Stevenson et al., 1994; Balic et al., 2003; Lacroux et al., 2006; Terefe et al.,**

2007) como en caprinos (Pérez *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2003). Así mismo, en varios trabajos de inmunización con antígenos procedentes de vermes adultos, se ha observado un aumento de los niveles de eosinófilos a nivel local (Geldhof *et al.*, 2002; 2004; Redmond y Knox, 2004; Ortega, 2015).

En ovinos infectados con *H. contortus*, la actividad protectora ejercida por los eosinófilos parece centrarse sobre los estadios larvarios del parásito (Rainbird *et al.*, 1998; Meeusen y Balic, 2000; Balic *et al.*, 2006), sin que se descarte cierta actividad sobre la fecundidad de los vermes adultos, como demuestran algunos estudios llevados a cabo en ovinos resistentes a esta especie parásita (González *et al.*, 2011). Sin embargo la actividad de estas células no parece tan clara en el caso de *T. circumcincta* (Klesius *et al.*, 1989; Stear *et al.*, 1995a), no obstante, aunque algunos autores han sugerido que podrían ser responsables de respuestas indirectas mediadas por factores que los propios eosinófilos liberan, ya que se han observado larvas rodeadas de infiltrados eosinofílicos en ovinos infectados con *T. circumcincta* (Balic *et al.*, 2003) o inmunizados con antígenos cuticulares de L3 de este parásito (McGillivray *et al.*, 1992). Así mismo, al analizar ovinos resistentes a *T. circumcincta* se ha demostrado una correlación negativa entre la carga de vermes y la actividad de los eosinófilos tisulares (Stevenson *et al.*, 1994). Todos estos estudios parecen indicar que los eosinófilos jugarían un papel importante en la obtención de una respuesta inmune protectora, fundamentalmente tras infecciones sensibilizantes.

En nuestro estudio, el lote de animales inmunizados mostró unos recuentos medios de eosinófilos mayores que los del lote testigo y pudo constatarse una asociación negativa con distintos parámetros parasitológicos, recuento de vermes y parámetros relacionados con fecundidad (como la longitud de los vermes hembras y el número de huevos intrauterinos), todo lo cual sugiere que dicha población podría estar jugando algún papel en la protección parcial conferida por el inmunógeno. Estos resultados, junto con la observación en los



lotes de animales inmunizados de un 45,7% más de larvas inmaduras, así como una de reducción de un 42,2% en el recuento fecal de huevos, podría relacionar la presencia y actividad de los eosinófilos con cierto retraso en el desarrollo de las fases larvarias en los animales inmunizados, tal vez por compartir antígenos con epítomos comunes entre vermes adultos y estadios larvarios, circunstancia que podría determinar una reducción de los recuentos fecales acumulados obtenidos en el estudio, todo ello sin descartar la posibilidad de que, los eosinófilos pudieran llevar a cabo un efecto directo sobre los vermes adultos, circunstancia que no se detectó en el momento del sacrificio, pero que podría haber tenido lugar en el curso de la infección.

En relación a la evolución de los linfocitos en infecciones por nematodos gastrointestinales, se considera de forma general que tiene lugar un incremento en su número tanto en la mucosa gástrica como en los linfonódulos locales, constatándose ciertas diferencias en función de determinados factores relacionados con la especie parasitaria implicada, el hospedador y el tipo de infección (primaria o secundaria), observándose también variaciones importantes en el curso de la misma (**Balic *et al.*, 2000b**).

El estudio inmunohistoquímico del tejido abomasal reveló un aumento en los recuentos de todas las poblaciones linfocitarias analizadas en el grupo de animales inmunizados en relación al lote testigo, llegando las diferencias a ser estadísticamente significativas para las poblaciones celulares MHCII<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>e IgA<sup>+</sup>.

Al correlacionar las diferentes poblaciones celulares con parámetros parasitológicos, una observación interesante fue la asociación negativa entre las células CD4<sup>+</sup> y el número de vermes totales presentes en el abomaso, así como con los parámetros de fecundidad (huevos intrauterinos y longitud de los vermes hembras) en los animales inmunizados, mientras que en el lote testigo estas asociaciones fueron positivas. Por su parte, los recuentos de linfocitos T  $\gamma\delta$

también se correlacionaron de forma negativa con la longitud de los vermes hembras en el lote de animales inmunizados, observándose significación estadística ( $r=-1$ ;  $p<0.001$ ), mientras que en el caso del lote testigo, no llegó a ser significativa. Otra población relacionada con este último tipo de células (linfocitos T WC1<sup>+</sup>) también mostró correlaciones negativas con parámetros de fecundidad del parásito en el grupo inmunizado, mientras que la relación fue positiva en los animales testigos.

En base a los resultados anteriores, podemos concluir que, tras la inmunización con thiol-proteinasas procedentes de productos de excreción/secreción de vermes adultos de *T. circumcincta* en ganado caprino, se desarrolla una respuesta inmune adquirida en la que predominan infiltrados tisulares de linfocitos tipo MHCII<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e IgA, por lo que estas poblaciones celulares podría participar en los diferentes tipos de mecanismos de defensa adquiridos por el hospedador tras las inmunizaciones.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios de inmunización similares, o que analizan la resistencia adquirida tras sucesivas infecciones con nematodos GI, parece claro que la sensibilización previa con antígenos parasitarios determina una mayor presencia en la mucosa gástrica de células presentadoras de antígeno (MHCII<sup>+</sup>) (Balic *et al.*, 2002; Ortega, 2015; Hernández, -datos sin publicar), tal y como observamos en nuestro estudio. Otra población celular que también parece estar aumentada en la mucosa gástrica de animales resistentes a las infecciones por nematodos GI son las de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esta observación también ha sido constatada, además de en nuestro estudio, en ovinos re infectados con *T. circumcincta*, así como en ganado caprino inmunizado con thiol-proteinasas a partir de vermes adultos de *T. circumcincta*, y en reinfecciones de *H. contortus* (Balic *et al.*, 2002; 2003; Halliday *et al* 2009; 2010; Ortega, 2015). En caprinos inmunizados con thiol-proteinasas de *H. contortus*, también se ha constatado una respuesta inmune local caracterizada por

un aumento significativo de las células tras el desafío con L3 del parásito (**Hernández, -datos sin publicar**), lo que nos sugiere que este tipo de células podría jugar un papel inmunoprotector importante frente a nematodos GI.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no parecen tener especial relevancia en el desarrollo de respuestas protectoras frente a nematodos GI, al menos en ovino (**Balic et al., 2003; Halliday et al 2009; 2010**), como demuestra el hecho de que la depleción de esta subpoblación no afecta de forma significativa la resistencia de ovinos frente a *H. contortus* (**Gill et al., 1993b**). Del mismo modo, en caprinos de raza majorera inmunizados y desafiados con L3 de *H. contortus*, y donde se observaron reducciones del número de vermes y recuentos fecales, se detectaron niveles de linfocitos CD8<sup>+</sup> menores en los animales inmunizados con respecto a los testigos (**Hernández, -datos sin publicar-**). Sin embargo, en nuestro trabajo, aun utilizando el mismo adyuvante que el empleado en el estudio anterior, esta población celular apareció en mayor proporción en los animales inmunizados que en los testigos, aunque dicho aumento no llegó a la significación estadística, tal y como sucedió con las linfocitos MHCII<sup>+</sup> y las CD4<sup>+</sup>. Dado que este tipo de células –CD8<sup>+</sup>– podrían ser responsables de la inhibición de mecanismos defensores basados en respuestas humorales, tal vez podría estar detrás de que no se observaran respuestas protectoras más llamativas, constituyendo un aspecto a evaluar a posteriori a fin de que la protección conferida por este tipo de antígenos fuera más significativa, evaluación que podría ir orientada a la utilización de otros adyuvantes que potenciaran las respuestas hacia la producción de anticuerpos específicos a nivel local, y el que se analizaran la posibilidad de que antígenos de *T. circumcincta* ejercieran un efecto inmunomodulador como parte del arsenal de mecanismos de evasión de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador (**Nisbet et al., 2010, McNeilly et al., 2013**)

Por otra parte, suele ser común que en animales resistentes a la infección por distintos nematodos gástricos se genera un aumento de linfocitos B en la

mucosa gástrica (**Balic et al., 2002; 2003; Pérez et al., 2003; Halliday et al., 2009**). Una tendencia similar se ha observado en inmunizaciones de ganado caprino con thiol-proteinasas procedentes tanto de vermes adultos (**Ortega, 2015**), como de productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcincta* (el presente estudio), lo que, junto con otros hallazgos antes referidos, parece indicar que la protección inducida por este tipo de antígenos se orienta hacia la producción de anticuerpos específicos a nivel local.

# **CONCLUSIONES**

1. La inmunización, utilizando fracciones enriquecidas de cisteína-proteinasas aisladas a partir de productos excreción-secreción de vermes adultos de *Teladorsagia circumcincta*, confiere una protección parcial en cabras, reflejada en una reducción del 42.2% en el número de huevos en heces y en un aumento del número de formas inmaduras en la mucosa gástrica.
2. Los animales inmunizados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el momento del sacrificio en el recuento total de vermes adultos en el abomaso ni en los parámetros de fecundidad analizados (longitud de los vermes hembras y número de huevos intrauterinos). Aunque estos datos indicarían que la protección inducida por el inmunógeno no influiría sobre dichos parámetros, no debería descartarse un posible efecto, no detectado en el momento del sacrificio, sobre los vermes adultos a lo largo de la infección.
3. El protocolo de inmunización utilizado no originó cambios significativos en los parámetros biopatológicos estudiados (hematocrito, proteínas plasmáticas y recuentos de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos).
4. En relación con la respuesta humoral local, se produjo un aumento de los niveles de IgA e IgG específicas en el mucus en los animales inmunizados en relación al lote testigo. Sin embargo, la gran variabilidad individual determinó que la comparación entre los valores medios de ambos lotes no fuese estadísticamente significativa.
5. El aumento de los niveles de IgG e IgA específicas generado tras la inmunización y posterior desafío, produjo una intensa reacción frente a una fracción proteica con un peso molecular aproximado de 36 KDa, que parece jugar un papel en la protección conferida por el inmunógeno en el presente trabajo.

6. La inmunización y posterior desafío origina un marcado aumento de la expresión de IL-2 y, en menor medida, de IL-17 e  $\text{INF}\gamma$  en los nódulos linfáticos abomasales y de IL-4 en la mucosa abomasal en los animales inmunizados respecto a los testigos.
7. Los animales inmunizados experimentaron un aumento de todas las poblaciones linfocitarias analizadas en la mucosa abomasal, destacando las subpoblaciones de linfocitos T  $\text{CD4}^+$ , células  $\text{IgA}^+$  y  $\text{MHCII}^+$ .
8. Los parámetros que mostraron relación con la inmunoprotección inducida fueron los niveles de anticuerpos específicos ( $\text{IgA}$  e  $\text{IgG}$ ) y los recuentos de eosinófilos y de leucocitos globulares, lo que sugiere que las respuestas protectoras desarrolladas tras la inmunización son predominantemente de tipo Th2. Sin embargo, también se detectó incremento en la población de linfocitos  $\text{T}\gamma\delta$ , que se correlacionó de forma negativa con la longitud de los vermes hembras en el lote de animales inmunizado, y cuyo papel debería ser dilucidado en futuros trabajos.

# **RESUMEN**



Los problemas derivados al uso de antihelmínticos en el control de la nematodosis gastrointestinales, tales como la presencia de residuos en alimentos de origen animal como la aparición de resistencias, han estimulado el estudio del control inmunológico de diversas parasitosis. Entre los antígenos con propiedades inmunoprotectoras que se han investigado, tanto en *T. circumcincta* como en otros NGI, destacan determinadas enzimas proteolíticas. Las importantes funciones biológicas de este tipo de enzimas en el desarrollo del ciclo endógeno de estos nematodos las convierten en candidatos idóneos para el desarrollo de vacunas que impidan, o al menos dificulten, la penetración, asentamiento y supervivencia del parásito dentro del hospedador. De todos esos tipos de proteinasas, las que parecen jugar un papel más importante en las relaciones parásito-hospedador, y por tanto, las mejores candidatas para el desarrollo de protocolos de inmunoprotección, son las tiol-proteinasas. En el presente estudio se ha evaluado el valor inmunoprotector en ganado caprino de proteinasas tipo cisteína presentes en los productos de E/S de vermes adultos de *T. circumcincta*, así como la respuesta inmune generada tras la inmunización con estos productos. Con tales objetivos, se inmunizaron baifos de raza mayorera de 6 meses de edad en el inicio de experimento. El lote inmunizado recibió tres dosis del inmunógeno vía intramuscular durante tres semanas consecutivas (43 µg/dosis cisteína-proteinasa procedentes de productos de excreción-secreción (E/S) de vermes adultos de *T. circumcincta*). Por su parte, el lote testigo sólo recibió tres inoculaciones con el adyuvante y el diluyente del inmunógeno. Ambos lotes fueron desafiados con 8000 L3 de *T. circumcincta*. Todos los animales del estudio se sacrificaron a las 6 semanas del desafío. Los resultados mostraron una inmunoprotección parcial de este tipo de enzimas frente a *T. circumcincta* en ganado caprino, que se tradujo en una reducción del número de huevos fecales del 42.2% a lo largo del estudio, así como de un aumento del porcentaje de formas inmaduras en la mucosa abomasal en los animales inmunizados en relación al lote testigo. La respuesta inmune inducida se caracterizó por un aumento de las inmunoglobulinas específicas tanto del isotipo

IgG como de IgA, a nivel local y sistémico. También se observó un incremento significativo de eosinófilos, leucocitos globulares y linfocitos CD4+ e IgA+, así como de células presentadoras de antígeno (MHCII+), a nivel de la mucosa abomasal. Los resultados del estudio de la expresión de citoquinas revelaron un destacado aumento de la expresión de la IL-2 en los animales inmunizados a nivel de linfonódulos, así como un incremento en la expresión de la IL-4 a nivel de la mucosa abomasal. El análisis del perfil proteico del extracto utilizado en las inmunizaciones (ES-thiol) reveló un patrón complejo de fracciones proteicas con pesos moleculares >120 kDa, destacando dos fracciones prominentes con un peso molecular de 80 kDa aprox. y una muy tenue de 31 kDa aprox. La respuesta humoral generada tras la inmunización mostró una reacción muy manifiesta frente a polipéptidos de unos 36 kDa.

# **SUMMARY**

Gastrointestinal nematodes (GI) control relies upon different anthelmintic compounds that can remain as drug residues in food producing animals and have also contributed to parasite drug-resistance all over the world. Hence, alternative methods of nematode control as immunological ones have been developed. Different proteolytic enzymes have been used as antigens in *T. circumcincta* and others GI nematodes. Due to, these proteases play an important role in the endogenous GI nematodes life cycle, these can be used as candidate vaccine antigens to prevent or to reduce the development of this parasite in the host. The importance of thiol-proteases in host-parasite interaction has made these enzymes one of the best candidates in immunization strategies against GI nematodes. In this study, we have evaluated the protective immunity and the immune response against cysteine thiol-proteases from adult *T. circumcincta* ES antigens in goats. Groups of 6-month-old canarian goat kids were inoculated. Cysteine thiol-proteases from adult *T. circumcincta* ES antigens (43  $\mu$ g) were administrated intramuscular three times, one dose per week, for three weeks. Control animal received three immunizations with adjuvant and buffer. Both animal groups were challenged with 8000 *T. circumcincta* L3. All animals were slaughtered 6 weeks after challenge. The immunization of goats against *T. circumcincta* with cysteine thiol-proteases induced partial levels of protection, representing a 42.2% reduction in fecal egg counts and higher percentage of abomasal juvenile nematode burdens in immunized goats than in the control group. Analysis of the immunological responses showed an increase in specific IgG and IgA levels, from local site and serum, in addition to a significant increase in eosinophils, globule leukocytes, CD4+ and IgA+ lymphocytes and antigen-presenting cells (MHC II+) in abomasal mucosa. Cytokine responses in immunized goats showed an increase in IL-2 expression in lymphatic nodes in addition to an increase in IL-4 expression in abomasal mucosa. The analysis of the cysteine thiol-proteases extract showed a complex pattern of antigen recognition with approximate molecular weights >120 kDa. Two antigens with approximate molecular weights 80 kDa and 31 kDa were also detected. The

antibody immune response after the immunization showed the recognition of a band of approximate 36 kDa.

# **AGRADECIMIENTOS**

Durante estos años muchas han sido las personas que de un modo u otro han colaborado a que este proyecto haya sido posible. Para poder nombrarlos a todos necesitaría más de un tomo, pero sin duda hay algunas que siempre llevaré en mi corazón y a las cuales estaré eternamente agradecida, tanto por su apoyo y comprensión, como por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.

En primer lugar quisiera hacer una especial mención a mi tutor de tesis José Manuel Molina, no solo por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran equipo de investigación y poner siempre todos sus conocimientos y experiencia a mi disposición, sino también, por la gran calidad humana y comprensión para conmigo en estos último años de tesis, por todo ello y más, solo decirte GRACIAS.

En segundo lugar a Leire Ortega, mi compañera y amiga, porque no ha habido momento en el que no haya tenido tu ayuda, amistad y compañía. Guardando un especial recuerdo de cada uno de nuestros experimentos, y lo bien que nos lo pasábamos con nuestros baifos (Hamilton, Obama, Murgo, Tricolor,...entre otros). Quién nos iba a decir que dos personas tan diferentes se iban a complementar tan bien, y acabaríamos en la otra parte del mundo de Congreso, Australia, por todo ello y más, GRACIAS.

A todo el profesorado de parasitología y Anatomía Patológica, Antonio Ruíz, Jorge González, Francisco Guisado entre otros y con gran cariño a Eligia Rodríguez, que siempre entraba al laboratorio con una gran sonrisa alegrándonos el día, a todos y cada uno de ellos, GRACIAS.

Tampoco me olvido de todos mis compañeros y compañeras del laboratorio, Lorena, Adassa, Julia, Davinia, Arantzazú, Sara, Ada, Álvaro, Sergio y Yeray, porque han sido muchas horas compartidas de trabajo duro, pero tampoco nos faltaron risas y celebraciones, GRACIAS.

A Irene Cabello, por siempre estar ahí, ya fueras técnico u oficial de laboratorio, sabes que para mí, en estos años de tesis fuiste mucho más que eso, como te decía, mi mamá del laboratorio, siempre te asegurabas que estuviera bien tanto en el terreno profesional como sentimental, GRACIAS, siempre tendrás un huequito especial en mi corazón.

Agradecer también a una persona muy especial para mí, José María López, quién más sufrió mis frustraciones y ataques de nervios, quién más me animó y apoyó en todo momento. GRACIAS por soportarme todo este tiempo, sé que no ha sido fácil. Recordar, como fuiste capaz de quedarte toda la noche rehaciendo conmigo la presentación del DEA porque se me había borrado..., solo me sale del corazón decirte una y otra vez, GRACIAS, sin ti nada de esto hubiera sido posible, porque no sólo me has ayudado con toda la tesis, en cada uno de sus capítulos (baifos, matadero, laboratorio, y por última redactándola), sino también a superar un mal trago en mi vida y poder seguir con todo este proyecto hacia adelante.

A MIS PADRES, PAQUI RODRÍGUEZ AFONSO Y LUIS QUESADA GONZÁLEZ, SOLO DECIROS GRACIAS, GRACIAS por hacerme la persona que soy hoy, por apoyarme y ayudarme en todo momento y nunca dejarme caer. GRACIAS por estar horas escuchándome hablar de ese “bichito” (*Teladorsagia circumcincta*) como lo llamábais ustedes y al final hasta aprenderos el “nombre y apellido del bichito”. Sé que estaréis muy orgullosos de mí en el cielo y que os sentaréis en primera fila el día de la presentación, TODO ESTE TRABAJO SE LO DEDICO A USTEDES, MAMÁ Y PAPÁ, OS QUIERO, Y SIEMPRE ESTAREMOS JUNTOS.

Finalmente me gustaría agradecer al Dr. Uriarte del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón por haberme cedido amablemente las larvas y vermes adultos de *T. circumcincta*, gracias a los cuales ha sido posible este trabajo. Y a la Prof. Els Meeusen



de la Monash, University (Melbourne, Australia) por haberme dejado los anticuerpos monoclonales primarios, sin cuales me hubiera sido imposible llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de este proyecto.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- **Adams, D.B. (1978):** The induction of selective immunological unresponsiveness in cells of blood and lymphoid tissue during primary infection of sheep with the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56, 107-118.
- **Adams, D.B. (1988):** The effect of dexamethasone on a single and a superimposed infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int J Parasitol.* 18, 575-9.
- **Adams, D.B. (1989):** A preliminary evaluation of factors affecting an experimental system for vaccination-and-challenge with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int J Parasitol.* 19, 169-75.
- **Adams, D.B., Colditz, I.G. (1991):** Immunity to *Haemonchus contortus* and the cellular response to helminth antigens in the mammary gland of non-lactating sheep. *Int J Parasitol.* 21, 631-9
- **Abbott, E.M., Parkins, J.J., Holmes, P.H. (1984):** Studies on the pathophysiology of chronic ovine haemonchosis in Merino and Scottish Blackface lambs. *Parasitology* 89, 585–596
- **Abbott, E.M., Parkins, J.J., Holmes, P.H. (1986):** The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. *Veterinary Parasitology* 20, 275–289.
- **Abbott, E.M., Parkins, J.J., Holmes, P.H. (1988):** Influence of dietary protein on the patho-physiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. *Research in Veterinary Science.* 45, 41–49.
- **Aiello, S.E. (2000):** El manual merk de veterinaria. Merk and CO. INC. *New York. USA.*

- 
- **Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998):** Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89
  - **Almería, S., Canals, A., Zarlenga, D.S., Gasbarre, L.C. (1997a):** Isolation and phenotypic characterization of abomasal mucosal lymphocytes in the course of a primary *Ostertagia ostertagi* infection in calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 57, 87–98
  - **Almería, S., Canals, A., Zarlenga, D.S., Gasbarre, L.C. (1997b):** Quantification of cytokine gene expression in lamina propria lymphocytes of cattle following infection with *Ostertagia ostertagi*. *J Parasitol.* 83, 1051–1055.
  - **Álvarez-Sánchez, M.A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M.A., Rojo-Vázquez, F.A. (2006):** Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitol Res.* 99, 78-83.
  - **Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Huntley, J.F., Mazzolin, L.P., Gomes, J.C. (2005):** Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol.* 128, 99-107.
  - **Anderson, N., Armour, J., Jarrett, W.F., Jennings, F.W., Ritchie, J.S., Urquhart, G.M. (1965):** A field study of parasitic gastroenteritis in cattle. *Vet. Rec.*, 77(41): 1196-204.**Anderson, R.C. (1992):** Nematode parasites of vertebrates. Wallingford, UK. *CAB International.*
  - **Andrews, S.J., Hole, N.J., Munn E.A., Rolph T.P. (1995):** Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. *Int J Parasitol.* 25(7), 839-46.
  - **Anonymous (1959):** A vaccine against *Dictyocaulus viviparus*. *Vet Rec.* 71, 153-4.

- 
- **Anthony, R.M., Rutitzky L.I., Urban Jr. J.F., Stadecker M.J., Gause W.C. (2007):** Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 7, 975–987.
  - **Aparicio, P. (2007):** Respuesta inmune de base celular y mecanismos de activación celular. En: Gómez-Lucía E., *et al.* Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación.*
  - **Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen K.F., Akashi K. (2005):** Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 18105-10.
  - **Arjona, A. (2007):** Células implicadas en la respuesta inmune. En: Gómez-Lucía E., *et al.* (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación.*
  - **Armour, J., Jarrett, W.F., Jennings, F.W. (1966):** Experimental *Ostertagia circumcincta* infection in sheep: development and pathogenesis of single infection. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1267-1278.
  - **Askenasy, N., Kaminitz, A., Yarkoni, S. (2008):** Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev,* 7(5): 370-5.
  - **Aumont, G., Gruner, L., Hostache, G. (2003):** Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Vet Parasitol.* 116, 139–150
  - **Auriault, C., Quassi, M.A., Torpier, G., Eisen, H., Capron, A. (1981):** Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 1981; 3: 33-44.
  - **Bain, R.K. (1999):** Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *Int J Parasitol.* 29: 185–191.

- 
- **Balic, A., Bowle, S V.M., Meeusen, E.N. (2000):** The immunobiology of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181-241.
  - **Balic, A., Bowle, S V.M., Meeusen, E.N. (2000a):** Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* 75, 109-20.
  - **Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N. (2000b):** The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in sheep. *Adv Parasitol.* 45, 182-241.
  - **Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T. (2002):** Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39-46.
  - **Balic, A., Bowles, V.M., Liu, Y.S., Meeusen, E.N. (2003):** Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 25, 375–381.
  - **Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N. (2006):** Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-15.
  - **Bahirathan, M., Miller, J.E., Barras, S.R., Kearney, M.T. (2000):** Variation in susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infections. *Veterinary Parasitology* 65, 259–268.
  - **Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W. (1998):** Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in faecal egg counts. *Vet Parasitol.* 79: 53-64.
  - **Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W. (1999):** Genetic resistance to gastro-intestinal nematode parasites in Red Maasai, Dorper and Red MaasairDorper ewes in the sub-humid tropics. *Animal Science*

---

69, 335–344.

- **Bakker, N., Vervelde, L., Kanobana, K., Knox, D.P., Cornelissen, A.W., De Vries, E., Yatsuda, A.P. (2004):** Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine*. 22:618-28.
- **Bambou, J.C., Aruqt, R., Archimède, H., Alexandre, G., Mandonnet, N., González García, E. (2009):** Intake and digestibility of naive kids differing in genetic resistance and experimentally parasitized (indoors) with *Haemonchus contortus* in two successive challenge. *J. Anim. Sci.* 87, 2367-2375.
- **Bancroft, A.J. y Grencis, R.K. (1998):** Th1 and Th2 cells and immunity to intestinal helminths. *Chemical Immunology*. 71: 192-208.
- **Barker, I.K. (1973):** A study of the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* infection in lambs with observations on the contribution of gastrointestinal plasma loss. *Int. J. Parasitol.* 3, 743-757.
- **Barger, I.A. (1993):** Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int J Parasitol.* 23, 463-9.
- **Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Georgi, J.R., Davies, H.I. (1985):** Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *Int J Parasitol* 15, 529-33.
- **Barnes, E.H., Dobson, R.J. (1990):** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: mathematical model of worm fecundity. *Int J Parasitol.* 20, 375-80.
- **Barnes, E.H., Dobson, R.J. (1993):** Persistence of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *Int J Parasitol.* 20, 365-73.

- 
- **Barrett, M., Jackson, F., Huntley, J.F. (1998):** Pathogenicity and immunogenicity of different isolates of *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Parasitol.* 76, 95-104.
  - **Behnke, J.M., Barnard, C.J., Wakelin, D. (1992):** Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *Int J Parasitol.* 22, 861-907.
  - **Behnke, J.M., Chiejina, S.N., Musongong, G.A., Fakae, B.B., Ezeokonkwo, R.C., Nnadi, P.A., Ngongeh, L.A., Jean, E.N., Wakelin, D. (2006):** Naturally occurring variability in some phenotypic markers and correlates of haemonchotolerance in West African Dwarf goats in a subhumid zone of Nigeria. *Vet Parasitol.* 141:107-21.
  - **Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, T. (2006):** Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*, 126(1): 15-24.
  - **Belkaid, Y., Oldenhove, G. (2008):** Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29, 362-71.
  - **Beraldi, D., Craig, B.H., Bishop, S.C., Hopkins, J., Pemberton J.M. (2008):** Phenotypic analysis of host- parasite interactions in lambs infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitology.* 38, 1567-1577.
  - **Berghen, P., Dorny, P., Vercruysse, J. (1987):** Evaluation of a simplified blood pepsinogen assay. *American Journal of Veterinary Research.* 59, 234-237.
  - **Berghen, P., Hilderson, H., Vercruysse, J., Dorny, P. (1993):** Evaluation of pepsinogen gastrin and antibody response in diagnosing ostertagia-sis. *Veterinary Parasitology.* 46, 175-195.
  - **Biffa, D., Jobre, Y., Chakka, H. (2007):** Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Anim Health Res Rev.* 7, 107–118.



- 
- **Bisset, S.A., Vlassoff, A., Morris, C.A., Southey, B.R., Baker, R.L., Parker, A.G.H. (1992):** Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 35, 51–58.
  - **Bisset, S.A., Vlassoff, A., Douch, P.G., Jonas, W.E., West, C.J., Green, R.S. (1996):** Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet Parasitol.* 61, 249-63.
  - **Blitz, N.M., Gibbs, H.C. (1971):** An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep. *Can J Comp Med.* 35, 178-80.
  - **Blattman, A.N., Hulme, D.J., Kinghorn, B.P., Woolaston, R.R., Gray, G.D., Beh, K.J. (1993):** A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Animal Genetics* 24, 277–282.
  - **Blitz, N.M., Gibbs, H.C. (1971):** An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep. *Can J Comp Med.* 35, 178-80.
  - **Boag, B., Thomas, R.B. (1985):** The effect of temperature on the survival of infective larvae of nematodes. *J. Parasitol.* 71: 383-384.
  - **Boisvenue, R.J.; Seiff, M.I.; Tonkinson, L.V.; Cox, G.N.; Hageman, R. (1992):** Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 1263-1265.
  - **Borgsteede, F.H.M. (1981b):** Experimental cross-infections with gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *Z. Parasitenk.* 65: 1-10.
  - **Bowles, V.M.; Brandon, M.R.; Meeusen E. (1995):** Characterisation of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*.

---

*Immunology* 84: 669–674.

- **Bowman, D.D. (1995):** Georgis' Parasitology For Veterinarians. 6<sup>th</sup> edition. Editado: *Dwight D. Bowman. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA.*
- **Boyd, J. W. (1984):** The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals. *Veterinary Clinical Pathology.* 13, 2.
- **Brandtzaeg, P. (1974):** Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. *J Immunol.* 112, 1553-9.
- **Brandtzaeg, P. (2009):** Mucosal Immunity: Induction, Dissemination and Effector functions. *Scand J Immunol.* 70, 505-15.
- **Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Oliveira-Sequeira, T.C. Vaz, C.M., Gonçalves de Gonçalves, I., Echevarria, F.A. (2002):** Response of Corriedale and Crioula Lanada sheep to artificial primary infection with *Haemonchus contortus*. *Vet Res Commun.* 26, 447-57.
- **Bricarello, P.A, Gennari, S.M., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Vaz, C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves, I., Echevarria, F.A.M. (2004):** Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Rumin Res.* 51, 75–83.
- **Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdijk, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M. (2005):** Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet Parasitol.* 134, 99–109.
- **Brand T. von. (1973):** Proteases. En: *Biochemistry of Parasites. Academic Press, New Yor* 268-275.
- **Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C., Estes, D.M. (1998):** Bovine type 1 and type 2

---

responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 63, 45–55.

- **Buddle, B.M., Jowett, G., Green, R.S., Douch, P.G.C., Risdon, P.L. (1992):** Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22, 955-960.
- **Burger, H. J. and A. Pfeiffer (1969).** Experimental vaccination of calves with irradiated larvae of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. *Zentbl. Vet-Med.* 16B: 357-367.
- **Campos, A.K., Araújo, J.V., Guimaraes, M.P. (2008):** Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *J Helminthol*, 82(4): 337-41.
- **Canals, A., Gasbarre, L.C. (1990):** *Ostertagia ostertagi*: isolation and partial characterization of somatic and metabolic antigens. *Int J Parasitol.* 20, 1047-1054
- **Canals, A., Zarlenga, D.S., Almeria, S., Gasbarre, L.C. (1997):** Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet Immunol. and Immunopathol.* 58, 63–75
- **Capitini, L.A., McClure, K.E., Herd, R.P. (1990):** Effect of environmental stimuli on pre-infective and infective stages of *Haemonchus contortus* in the northern United States for the induction of hypobiosis. *Vet Parasitol.* 35, 281-93.
- **Charles I. Muleke, Ruofeng Yan, Yanning Sun, Guangwei Zhao, Lixin Xu, Xiangrui Li (2007):** Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with a recombinant cysteine protease. *Small Ruminant Research.* 73, 95-102.
- **Charleston, W.A.G. (1965):** Pathogenesis of experimental haemonchosis in sheep with special reference to the development of the resistance. *J. Comp. Pathol.* 75, 55-66.
- **Charon, K. M., Moskwa, B., Rutkowski, R., Gruszczynska, J. Y Swiderek,**

- 
- W. (2002):** Microsatellite polymorphism in DRB1 gene (MHC class II) and its relation to nematode faecal egg count in Polish Heath Sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences* 11, 47–58.
- **De la Chevrotière, C., Bambou, J.C., Arquet, R., Jacquiet, P., Mandonnet, N. (2012):** Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. *Vet Parasitol*, 186(3-4): 337-43
  - **Chiejina, S.N., Fakae, B.B., Behnke, J.M., Nnadi, P.A., Musongong, G.A., Wakelin, D. (2002):** Expression of acquired immunity to a local isolate of *Haemonchus contortus* by the Nigerian West African Dwarf goat. *Vet. Parasitol.* 104: 229–242.
  - **Chiejina, S.N., Sewell, N.N. (1974):** Worm burdens, acquired resistance and live weight gains in lambs during prologed daily infections with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitology* 69, 315-327.
  - **Claerebout, E. (2002):** The effects of chemoprophylaxis on acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle. *Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* 64, 137-49.
  - **Claerebout, E., Vercruyse, J. (2000):** The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology*. 120, 25-42.
  - **Claerebout, E., Hilderson, H., Meeusen, P., De Marez, T., Behnke, J., Huntley, J., Vercruyse J. (1996):** The effect of truncated infections with *Ostertagia ostertagi* on the development of acquired resistance in calves. *Vet Parasitol.* 66, 225-239.
  - **Claerebout, E., Vercruyse, J., Dorny, P., Demeulenaere, D., Dereu, A. (1998a):** The effect of different infection levels on acquired resistance to

- 
- gastrointestinal nematodes in artificially infected cattle. *Vet Parasitol.* 75, 153-67.
- **Claerebout, E., Dorny, P., Vercruyse, J., Agneessens, J., Demeulenaere, D. (1998b):** Effects of preventive anthelmintic treatment on acquired resistance to gastrointestinal nematodes in naturally infected cattle. *Vet Parasitol.* 76, 287-303.
  - **Claerebout, E., Dorny, P., Agneessens, J., Demeulenaere, D., Vercruyse, J. (1999a):** The effect of first season chemoprophylaxis in calves on second season pasture contamination and acquired resistance and resilience to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 80, 289-301
  - **Claerebout, E., Agneessens, J., Shaw, DJ, Vercruyse, J. (1999b):** Larval migration inhibition activity in abomasal mucus and serum from calves infected with *Ostertagia ostertagi*. *Res Vet Sci.* 66, 253-7
  - **Claerebout, E., Vercauteren, I., Geldhof, P., Olbrechts, A., Zarlenga, D.S., Goddeeris, G.M., Vercruyse, J.(2005):** Cytokine responses in immunized and non immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infections. *Parasite Immunol.* 27: 325-331.
  - **Colditz, I.G. (2008):** Six costs of immunity to gastrointestinal nematode infections. *Parasite Immunol.* 30, 63-70.
  - **Coltman, D.W., Wilson, K., Pilkington, J.G., Stear, M.J., Pemberton, J.M. (2001):** A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology* 122, 571–582.
  - **Colville, J. (1991):** Common Laboratory Procedures for Diagnosing Parasitism. En: *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. Ed. Paul W. Pratt. American Veterinary Publications, Inc. California. USA; pp: 7-50.
  - **Coop, R.L., Kyriazakis, I. (2001):** Influence of host nutrition on the

- development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17, 325-30.
- **Cooper, D.W., Van Oorschot, R.A.H., Piper, L.R.A., Lejambre, L.F. (1989):** No association between the ovine leucocyte antigen (OLA) system in the Australian Merino and susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *International Journal for Parasitology* 19, 695–697.
  - **Cordero del Campillo, M., Castañón, L., Reguera, A. Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos.** Secretariado de Publicaciones. Universidad de León. 1994.
  - **Cordero del Campillo M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I., Díez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. (2000):** Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongiloidosis y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria.* McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.
  - **Costa, J.J., Weller, P.F., Galli, S.J. (1997):** The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. *J Am Med Assoc.* 278, 1815-22.
  - **Coyne, M.J., Smith, G. (1992):** The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naive and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *Int J Parasitol.* 22, 315-25.
  - **Coyne, M.J., Smith, G., Johnstone, C. (1991):** A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. *Int J Parasitol.* 21, 847-53.
  - **Cox, J.C., Alan, R.C. (1997):** Adjuvants a classification and review of their modes of action. *Vaccines.* 3, 248-256.
  - **Cox, G.N.; Pratt, D.; Hageman, R.; Biosvenue, R.J. (1990):** Molecular cloning and sequencing of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult

---

worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 25–34.

- **Craig, N.M., Miller, H.R.P., Smith, W.D., Knight, P.A. (2007):** Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Immunology and Immunopathology*, 120: 47-54.
- **Crawford, A., Mcewan, J.C., Dodds, K.G., Wright, C.S., Bisset, S. A., Macdonald, P.A., Knowler, K.J.J., Greer, G.J., Green, R.S., Shaw, R.J., Paterson, K.A., Cuthbertson, R.P., Vlassoff, A., Squire, D.R., West, C.J., Phua, S.H. (1997):** Resistance to nematode parasites in sheep: How important are the MHC genes? *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 12, 58–62.
- **Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V. y Capelli, G. (2003):** Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematode infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 112, 203-209.
- **Crofton, H. D. (1965):** Ecology and biological plasticity of sheep nematodes. I. The effects of temperature on the hatching of some parasites of sheep. *Cornell Veterinarian.* 55: 242-250.
- **Crofton, H.D. and Whitlock, J. H. (1965):** Ecology and and biological plasticity of sheep nematodes. III. Studies on *Ostertagia circumcincta* (Stadelman, 1894). *Cornell Veterinarian.*55: 259-262.
- **Cutuli, M.T. (2007):** Inmunidad innata. En: Gómez-Lucía E., *et al.* (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación.*
- **Dalton, J.P., Brindley, P.J., Knox, D.P., Brady, C.P., Hotez, P.J., Donnelly, S., O’neill, S.M., Mulcahy, G., Loukas, A. (2003):** Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal for Parasitology* 33, 621–640.

- 
- **Dargie, J.D. (1975):** Application of radioisotopic techniques to the study of red cells and plasma protein metabolism in helminth disease of sheep. *Symp. Br. Soc. Parasit.* 13: 1-26.
  - **Dawkins, H.J.S., Windon, R.G., Eagleson, G.K. (1989):** Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 19, 199-205.
  - **De Marez, T., Cox, E., Claerebout, E., Vercruyse, J., Goddeeris, B. (1997):** Induction and suppression of lymphocyte proliferation by antigen extracts of *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57: 69-77
  - **De Veer M.J., Kemp, J.M., Meeusen, E.N.T. (2007):** The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunol.* 29, 1-9.
  - **De Vries, E., Bakker, N., Krijgsveld, J., Knox, D.P., Heck, A.J. y Yatsuda, A.P. (2009):** An AC-5 cathepsin B-like protease purified from *Haemonchus contortus* excretory secretory products shows protective antigen potential for lambs. *Vet Res.* 40:41.
  - **Diane L. Redmond, David P. Knox (2004):** Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine.* 22, 4252-4261.
  - **Diebold, S.S. (2008):** Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 86, 389-97
  - **Díez-Baños, P., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Francisco, I., Suárez, J.L., Díaz, P., Panadero, R., Arias, M., Paineira, A., Paz-Silva, A., Morrondo, P. (2008):** Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by in vitro and in vivo assays. *J Parasitol.* 94, 925-8



- 
- **Dikmans, G. and Andrews, J. S. (1933):** A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of the sheep. *Transactions of the American Microscopical Society*. 52: 1-25.
  - **Dineen, J.K., Wagland, B.M. (1966):** The dynamics of the host-parasite relationship. IV. The response of sheep to graded and to repeated infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 56, 639-50.
  - **Dineen, J.K., Gregg, P., Windon, R.G., Donald, A.D., Kelly, J.D. (1977):** The role of immunologically specific and non specific components of resistance in cross-protection to intestinal nematodes. *Int J Parasitol.* 7, 211-215.
  - **Dobson, R.J., Waller, P.J., Donald, A.D. (1990a):** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of infection rate on the establishment of infective larvae and parasites fecundity. *Int J Parasitol.* 20, 347-352.
  - **Dobson, R.J., Donald, A.D., Barnes, E.H., Waller, P.J. (1990b):** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: model to predict the worm population over time as a function of infection rate and host age. *Int J Parasitol.* 20, 365-73.
  - **Dobson, R.J., Barnes, E.H., Windon, R.G. (1992):** Population dynamics of *Thichostrongylus colubriformes* an *Ostertargia circumcincta* in single and concurrent infections. *Int. J. Parasitol.* 22, 997- 1004.
  - **Dominguez-Toraño, I.A., Cuquerella, M., Gómez-Munoz, M.T., Méndez, S., Fernández-Pérez F.J. y Alunda, J.M. (2000):** Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasite. *Parasite Immunol.* 22: 131-138.
  - **Dominguez-Toraño, I.A., Fernández-Pérez F.J., Gómez-Munoz, M.T., Alunda, J.M., y Cuquerella, M. (2003):** Humoral and cellular response in lambs

---

vaccinated against *Haemonchus contortus* with p26/23. *Vet. Parasitol.* 50:29-37.

- **Dominik, S. (2005):** Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep: a review. *Genetics, selection, evolution* 37, 83-96.
- **Donald, A.D., Morley, F.H.W., Waller, P.J., Axelsen, A., Dobson, R. J., Donnelly, J.R. (1982):** Effects of reproduction, genotype and anthelmintic treatment of ewes on *Ostertagia* spp. populations. *International Journal for Parasitology* 12, 403–411.
- **Dorchies, P., Jacquet, P., Bergeaud, J.P., Duranton, C., Prévot, F., Alzieu, J.P. y Gossellin, J. (2001):** Efficacy of doramectin injectable against *Oestrus ovis* and gastrointestinal nomatodes in sheep in the southwestern region of France. *Vet. Parasitol.* 96, 147-154.
- **Dorny, P., Symoens, C., Jalila, A., Vercruysse, J., Sani, R. (1995):** Strongyle infections in sheep and goats under the traditional husbandry system in peninsular Malaysia. *Vet Parasitol.* 56(1-3), 121-36.
- **Dorny, P., Vercruysse, J. (1998):** Evaluation of a micromethod for the routine determination of serum pepsinogen in cattle. *Research in Veterinary Science.* 65, 259-262.
- **Douch, P.G. (1988):** The response of young Romney lambs to immunization with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int J Parasitol.* 18, 1035-8.
- **Douch, P.G., Harrison, G.B., Buchanan, L.L., Greer K.S. (1983):** In vitro bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol.* 13, 207-212.
- **Douch, P.G., Harrison, G.B., Elliott, D.C., Buchanan, L.L., Greer, K.S. (1986):** Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity

- 
- with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. *Vet Parasitol.* 20, 315-31.
- **Douch, P.G.C., Green, R.S., Morris, C.A., McEwan, J.C., Windon, R.G. (1996):** Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol.* 26, 899–911
  - **Dunphy, J.L., Balic, A., Barcham, G.J., Horvath, A.J., Nash, A.D., Meeusen, E.N.T. (2000):** Isolation and Characterization of a Novel Inducible Mammalian Galectin. *J Biol Chem.* 275, 32106-13.
  - **Dunphy, J.L., Barcham, G.J., Bischof, R.J., Young, A.R., Nash, A., Meeusen, E.N. (2002):** Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem.* 277, 14916-24.
  - **Dunsmore, J. D. (1960):** Effect of whole body irradiation and cortisone on the development of *Ostertagia* spp. In sheep. *Nature.* 192: 139-140.
  - **Dunsmore, J. D. (1963):** Effect of removal of an adult population of *Ostertagia* from sheep on concurrently existing arrested larvae. *Aust. Vet. J.* 39: 459-463.
  - **Dunsmore, J. D. (1965):** *Ostertagia* spp. In lambs and pregnant ewes. *Journal of Helminthology.* 39: 159-184.
  - **Edwards, K., Jepson, R. P., Wood, K. F. (1960):** Value of plasma pepsinogen estimation. *British Medical Journal.* 1, 30-32.
  - **Else, K.J. & Finkelman, F.D. (1998):** Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int J Parasitol.* 28: 1145-1158.
  - **Emery, D.L., McClure, S.J., Wagland, B.M., Jones, W.O. (1992):** Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep:

---

immunization with adult parasites. *Int J Parasitol.* 22, 221-5

- **Emery, D.L., Wagland, B.M., McClure, S.J., (1993):** Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 23, 841–846.
- **Emery, D.L. (1996):** Vaccination against worm parasites of animals. *Vet Parasitol.* 64: 31–45.
- **Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C, Morales-Montor, J. (2005):** Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21, 588-93.
- **Eysker, M. (1997):** Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. *Vet Parasitol.* 265-283.
- **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Animal Production and Health Division. Agriculture Department. (2002):** Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. Roma. *FAO*.
- **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Animal Production and Health Division. Agriculture Department. (2004):** Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Roma. *FAO*.
- **Fawcett, D.W. (1991):** Tratado de Histología. Madrid, *Ed. McGraw-Hill Interamericana*.
- **Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hisieh, B., Ferlin, W.G., Lepper, H. (1995):** Differential production of interferon gamma and interleukin 4 in response th1 and th2 stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 373, 255-257.
- **Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., Urban, J.F. Jr. (2004):** Interleukin-4- and

interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev.* 201,139-55.

- **Fleming, M.W. (1993):** Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 50, 109-15.
- **Fleming, M.W. (1997):** Cortisol as an indicator of severity of parasitic infections of *Haemonchus contortus* in lambs (*Ovis aries*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 116, 41-4.
- **Fleck, S. L., Moody, A. H. (1988):** Faecal parasites. En: *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*. Ed. Wright. Cambridge. Reino Unido; pp: 8-52.
- **Frankena, K. (1987):** The interaction between *Cooperia spp.* and *Ostertagia spp.* (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle. *Tesis Doctoral*. Agricultural University, Wageningen, (Holanda).
- **Furman, D.P. (1944):** Effects of environment upon the free-living stages of *Ostertagia circumcincta* (Stadelmann) Trichostrongylidae: 1. Laboratory experiments. *Am. J. Vet. Res.* 5, 79-86.
- **Gamble, R.H., Zajac, A.M. (1992):** Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet Parasitol.* 41, 211–225.
- **García Cabrera, J.A., (2007):** Citoquinas, en Gómez-Lucía, E., Blanco, M.M., Doménech, A., (2007): *Manual de Inmunología Veterinaria*. Pearson-Prentice Hall, 12: 209-228.
- **Gasbarre, L. C. (1997):** Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Vet Parasitol.* 72, 327-343.
- **Gasbarre, L.C., Leighton, E.A., Sonstegard, T. (2001):** Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet.*

---

*Parasitol.* 98: 51-64.

- **Gauly, M., Kraus, M., Vervelde, L., van Leeuwen, M.A., Erhardt, G. (2002):** Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol.* 106, 55-67.
- **Gauly, M., Schackert, M., Hoffmann, B., Erhardt, G. (2006):** Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 113, 178-81.
- **Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D.P., Jagneessens, J., Vercruysse, J. (2000):** Proteinases released in vitro by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology* 12, 639-47.
- **Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D., Vercauteren, I., Looszova, A., Vercruysse, J. (2002):** Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Ostertagia ostertagi.* 24: 263–270.
- **Geldhof, P., Vercauteren, I., Vercruysse, J. Knox, D., Van de Broeck, W., Claerebout, E.(2004):** Validation of the protective *Ostertagia ostertagi* ES-Thiol antigens with different adjuvantia. *Ostertagia ostertagi.* 26, 37-3.
- **Geldhof, P., Meyvis, I., Vercauteren, I. y Claerebout, E.(2008):** Vaccine testing of a recombinant activation-associated secreted protein (ASP1) from *Ostertagia ostertagi*. *Parasite Immunology.* 30:57-60.
- **Georgi, J.R. and Georgi, M.E. (1990):** Helminths. Nematodes. *Parasitology for Veterinarians.* W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. Pp: 138-210.
- **Gibbs, H.C. (1986):** Hypobiosis and the periparturient rise in sheep. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 2(2), 345-53.
- **Gibson, T.E., Everett G. (1972):** The ecology of the free-living stages of

---

*Ostertagia circumcincta*. *Parasitology*. 64: 451-460.

- **Gibson, T.E., Parfitt, J.W. (1973):** The development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* by lambs under conditions of continuous infection. *Res Vet Sci*. 15, 220-3.
- **Gill, H.S. (1991):** Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunol*. 13, 617-628.
- **Gill, H.S., Watson, D.L., Brandon, M.R. (1993a):** Monoclonal antibody to CD4- T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 78, 43-49.
- **Gill, H.S., Gray, G.D., Watson, D.L., Husband, A.J. (1993b):** Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol*. 15, 61-67.
- **Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J. (2000):** Induction of Th1 and Th2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99, 458-63.
- **Gómez-Lucía, E., Blanco, M.M., Doménech, A. (2007):** *Manual de Inmunología Veterinaria*. Pearson Educación. Madrid.
- **Gómez-Muñoz, M.T., Cuquerella, M., Gómez-Iglesias, L.A., Méndez, S., Fernández-Pérez, F.J., C. de la Fuente, Alunda, J.M. (1999):** Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Veterinary Parasitology*. 81, 281-293.
- **Gómez-Muñoz, M.T., Canals-Caballero, A., Almeria, S., Pasquali, P., Zarlenga, D.S., Gasbarre, L.C. (2004):** Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach *Word O. ostertagi*. *Vet. Parasitol*. 120: 199-214.

- **Gómez-Rincón, C., Uriante, J., Valderrábano, J. (2006):** Efficiency of *Duddingtonia flagans* against Trichostrongyle infections of sheep on mountain pastures. *Vet. Parasitol.* 141: 84-90.
- **Gómez-Rincón, C., Uriante, J., Valderrábano, J. (2007):** Effect of nematophagous fungus *Duddingtonia flagans* and energy supplementation on the epidemiology of naturally infected kids. *Vet. Res.* 38: 141-50.
- **González, J.F. (2002):** Respuesta inmune celular y humoral en la ostertagiosis experimental caprina. *Tesis Doctoral.* Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- **González, J.F., Molina, J.M., Ruiz, A., Conde de Felipe, M.M., Rodríguez Ponce, E. (2003):** The immune response against gastrointestinal nematodes in ruminants: A review. *Research and Reviews in Parasitology* 63, 97-115.
- **González, J.F., Hernandez, A., Molina, J.M., Fernández, A., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N.T., Piedrafita, D. (2008):** Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. *Veterinary Parasitology* 153, 374–378.
- **González, J.F., Hernández, A., Meeusen, E.N., et al., (2011):** Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and gammadelta T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. *Vet Parasitol.* 178(3-4): 286-92.
- **González Cabo, J.F., (2007):** Inmunidad adaptativa, en **Gómez-Lucía, E., Blanco, M.M., Doménech, A., (2007):** *Manual de Inmunología Veterinaria.* Pearson-Prentice Hall, 5: 85-103.
- **Gorrell, M.D., Willis, G., Brandon, M.R., Lascelles, A.K., (1988):** Lymphocyte phenotypes in the intestinal mucosa of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Clin Exp Immunol.* 72, 274.
- **Gossner, A.G., Venturina, V.M., Shaw, D.J., Pemberton, J.M., Hopkins, J. (2012):** Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia*



---

*circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. *Veterinary Research*, 28: 43-26.

- **Graham, M.; Smith, T.S.; Munn, E.A.; Knox, D.P.; Oliver, J.J.; Newton, S.E. (1993):** Recombinant DNA molecules encoding aminopeptidase enzymes and their use in the preparation of vaccines against helminth infections. *Patent no.* WO 93/23542.
- **Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., et al., (2010):** Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med*, 207(11): 2331-41.
- **Greer, A.W., Huntley, J.F., Mackellar, A., McAnulty, R.W., Jay, N.P., Green, R.S., Stankiewicz, M., Sykes, A.R. (2008):** The effect of corticosteroid treatment on local immune responses, intake and performance in lambs infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 38, 1717-28.
- **Gruner, L., Aumont, G., Bouix, J., Mandonnet, N. (2001):** The genetic resistance to nematode parasites in small ruminants: a more and more well known trait. (In French.) 8emes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, 5–6 Decembre 2001.
- **Gujja, S., Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., et al., (2013):** Effect of supplemental sericea lespedeza leaf meal pellets on gastrointestinal nematode infection in grazing goats. *Vet Parasitol*, 191(1-2): 51-8.
- **Gutiérrez, C.B. (2007):** Inmunoglobulinas. En: Gómez-Lucía E., *et al.* (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid, *Pearson Educación*.
- **Halliday, A.M., Routledge, C.M., Smith, S.K., Matthews, J.B., Smith, W.D. (2007):** Parasite loss and inhibited development of *Teladorsagia circumcincta* in relation to the kinetics of the local IgA response in sheep. *Parasite Immunol.* 29, 425- 434.
- **Halliday, A.M., Morrison, W.I., Smith, W.D. (2009):** Kinetics of the local

cellular response in the gastric lymph of immune and susceptible sheep to infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 31, 402-411.

- **Halliday, A.M., y Smith, W.D. (2010):** Protective immunization of calves against *Ostertagia ostertagi* using fourth-stage larval extracts. *Parasite Immunol.* 32, 656-663.
- **Halliday, A.M., McAllister, H.C., Smith, W.D. (2010):** Kinetics of the local immune response in the gastric lymph of lambs after primary and challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 32, 81-90.
- **Halliday, A.M., y Smith, W.D. (2011):** Attempts to immunize sheep against *Teladorsagia circumcincta* using fourth-stage larval extracts. *Parasite Immunol.* 33, 554-560.
- **Hammenberg, b. (1986):** pathophysiology of nematodiasis in cattle. *Vet. Clin. North Am.* 2(2): 225-224.
- **Henderson, N.G., Stear, M.J. (2006):** Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunol Immunopathol.* 112, 62-66.
- **Hendrix, C. M. (1999):** Pruebas de laboratorio más comunes para el diagnóstico del parasitismo. En “*Diagnóstico parasitológico veterinario*”. Ed. C.M. Hendrix. Harcourt Brace. Madrid. España; pp: 225-263.
- **Hernández, A. (2011):** Estudio de la respuesta inmune frente *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canaria. *Tesis Doctoral*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- **Hertzberg, H., Kohler, L., Deplazes, P., Häcki, W.H., Eckert, J. (1995):** Pathophysiological studies of sheep during the build-up of immunity against *Ostertagia leptospicularis* and after a challenge infection. *Res Vet Sci.* 58, 14-9.

- 
- **Holman, H.H., Dew, S.M. (1965):** The blood picture of the goat. IV. Changes in coagulation time, platelet counts and leucocyte numbers associated with age. *Res Vet. Sci.* 6, 510-521.
  - **Hotez P.J., Cerami, A. (1983):** Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* hookworms. *Journal of Experimental Medicine.* 157, 1594-1603.
  - **Hoste H., Chartier C.(1998):** Goat resistance to trichostrongyle infections of the gastrointestinal tract. *Point Vét.*29, 161–166.
  - **Hoste, H., Torres Acosta, J.F.J., Aguilar Caballero, A.J. (2008):** Nutrition–parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunol.* 30, 79-88.
  - **Howard, C.J., Morrison, W.I. (1994):** The leukocytes: markers, tissue distribution, and functional characteriazation. En: Goddeeris B.M.L., Morrison W.I. (Eds.). Cell-mediated immunity in ruminants. Boca Raton. *CRC Press.*
  - **Hulme, D.J., Nicholas, F.W., Windon, R.G., Brown, S.C., Beh, K. J. (1993):** The MHC class II region and resistance to an intestinal parasite in sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 110, 459–472.
  - **Huntley, J.F., Wallace, G.R., Miller, H.R. (1982):** Quatitative recovery of isolated mucosal mast cells and globule leukocytes from parasitized sheep. *Res. Vet. Sci.* 33, 8-63.
  - **Huntley, J.F., Newland, G., Miller, H.R. (1984):** The isolation and characterisation of globule leukocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasite sheep. *Parasite Immunolol.* 6, 371-390.
  - **Huntley, J.F., Gibson, S., Brown, D., Smith, W.D., Jackson, F., Miller, H.R. (1987):** Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* 9, 603-14.
  - **Huntley, J.F., Newlands, G.F., Jackson, F., Miller, H.R. (1992):** The influence

---

of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. *Parasite Immunol.* 14, 429-40.

- **Huntley, J.F., Patterson, M., Mackellar, A., Jackson, F., Stevenson, L.M., Coop, R.L. (1995):** A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. *Res Vet Sci.* 58, 5-10.
- **Huntley, J.F., Schallig, H.D.F.H., Kooyman, F.N.J., Mackellar, A., Jackson, F., W.D. Smith, W.D. (1998):** IgE antibody during infection with the ovine abomasal nematode, *Teladorsagia circumcincta*: primary and secondary responses in serum and gastric lymph of sheep. *Parasite Immunol.* 20, 565-571.
- **Jackson, F., Miller, H.R., Newlands, G.F., Wright, SE., Hay, L.A. (1988):** Immune exclusion of *Haemonchus contortus* larvae in sheep: dose dependency, steroid sensitivity and persistence of the response. *Res Vet Sci.* 44, 320-3.
- **Jackson, F., Greer, A.W., Huntley, J., McAnulty, R.W., Bartley, D.J., Stanley, A., Stenhouse, L., Stankiewicz, M., Sykes, A.R. (2004):** Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an in vitro direct challenge method using abomasal tissue explants. *Vet Parasitol.* 124, 73-89.
- **Jackson, J.A., Turner, J.D., Kamal, M., Wright, V., Bickle, Q., Else, K.J., Ramsan, M., Bradley, J.E. (2006):** Gastrointestinal nematode infection is associated with variation in innate immune responsiveness. *Microbes Infect.* 8, 487-92.
- **Jacobs, H.J., Wiltshire, C., Ashman, K., Meeusen, EN. (1999):** Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-8.
- **Jain, N.C. (1993b):** Examination the blood and bone marrow. *En Essentials of Veterinary Haematology*. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. USA; pp: 7.

- 
- **Jarrett, W.F.H., Jennings, F.W., McIntyre, W.I.M., Mulligan, W. y Sharp, N.C. (1959):** Studies on immunity to *Haemonchus contortus* infection-vaccination of sheep using a single does of Xirradiated larvae. *Am. J. Res.* 20:527-531.
  - **Jarrett, W.F.H., Jennings, F.W., McIntyre, W.I.M., Mulligan, W., Urquhart, G.M. (1960):** Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection. Immunity produced by the administration of irradiated larvae. *Immunology* 3, 145.
  - **Jarrett, W.F.H. y Sharp, N.C. (1963):** Vaccination against parasitic disease: reaction in vaccinated and immune host in *Dictyocaulus viviparus* infection. *J. Parasitol.* 49: 177-189.
  - **Jarret, E.E.E., Miller, H.R.P. (1982):** Production and activities of IgE in helminths infection. *Prog Allergy.* 31, 178-23.
  - **Jasmer, D.P., Westcott, R.B., Crane, J. W. (1987):** Survival of third-stage larvae of the Washington isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* exposed to cold temperatures. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 54: 48-52.
  - **Jasmer, D.P.; Perryman, L.E.; Conder, G.A.; Crow, S.; McGuire, T. (1993):** Protective immunity to *Haemonchus contortus* induced by immunoaffinity isolated antigens that share a phylogenetically conseverd carbohydrate gut surface epitope. *J. Immunol.* 151: 5450-5460.
  - **Jeffcoate, I.A., Fishwick, G., Bairden, K., Armour, J., Holmes, P.H. (1990):** Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. *Res Vet Sci.* 48, 295-300.
  - **Jennings, F. W., Arwour, J., Lawson, D. D., Roberts, R. (1966):** Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves estudies with abomasal cannulas. *American Journal of Veterinary Research.* 27, 1249-1257.

- 
- **Jhonson, M., Labes, R.E., Taylor, M.J. y Mackintosh, C.G.(2003):** Efficacy trial o fan irradiated cattle lungworm vaccine in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Parasitol.* 117: 131-137.
  - **Jones, D.G., Knox, D.P. (1990):** Evidence for the presence of nematode-derived acetylcholinesterase in sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Res. Vet. Sci.* 48(1): 136-137.
  - **Jones, W.O., Emery, D.L., McClure, S.J., Wagland, B.M. (1994):** Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 24, 519-525.
  - **Jorgensen, L. T., Leathwick, D. M., Charleston, W. A. G , Godfrey, P. L., Vlassoff, A., Sutherland, I. A. (1998):** Variation between hosts in the developmental success of the free-living stages of trichostrongyle infections of sheep. *Internacional Journal for Parasitology* 28, 1347–1352.
  - **Joshi, P. y Singh, B.P. (2000):** Purification and characterization of a cholinesterase from the parasite nematode, *Haemonchus contortus*. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 37: 192–197.
  - **Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S.S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Mäser, P. (2008):** A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176-180.
  - **Kanaya, T., Aso, H., Miyazawa, K., Kido, T., Minashima, T., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M.T., Yamaguchi, T. (2007):** Staining patterns for actin and villin distinguish M cells in bovine follicle-associated epithelium. *Res Vet Sci.* 82, 141-9.

- 
- **Kaneko, J.J. (1980):** Appendix VI. Normal concentrations of blood constituents in domestic animals. *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*. Ed. Kaneko, J.J. pp: 794.
  - **Karanu, F.N.; Rurangirwa, F.R.; Mcguire, T.C.; Jasmer, D.P. (1993):** *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Exp. Parasitol.* 77: 362–371.
  - **Kassai, T. (1999):** Veterinary Helminthology. Oxford. *Butterworth-Heinemann*.
  - **Kelly, J.D., Whitlock, H.V., Thompson, H.G., Hall, C.A., Martin, I.C., Le Jambre, L.F. (1978):** Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. *Res Vet Sci.* 25, 376-85.
  - **Kemp, J.M., Robinson, N.A., Meeusen, E.N., Piedrafita, D.M. (2009):** The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *Int J Parasitol.* 39, 1589-94.
  - **Khan, W.I., Abe, T., Ishikawa, N., Nawa, Y., Yoshimura, K. (1995):** Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti-CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. *Parasite Immunol.* 17, 485-91.
  - **Khan, W.I., Collins, S.M. (2004):** Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol.* 26, 319-26.
  - **Khan, W.I., Collins, S.M. (2006):** Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol* 143, 389-97.
  - **Klesius, P.H., Washburn, S.M., Ciodia, H., Haynes, T.B., Snider T.G. (1984):** Lymphocyte reactivity to *Ostertagia osertagi* antigen in tipe I ostertagiasis. *Am. J.*

---

*Vet. Res.* 45, 230-243.

- **Klion, A.D., Nutman, T.B. (2004):** The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113, 30-37.
- **Kloosterman, A., Borgsteede, F.H.M., Eysker, M. (1985):** The effect of experimental of *Ostertagia Ostertagi* infection in stabled milking cows on eggs output, serum pepsinogen levels, antibody titres and milk production. *Vet. Parasitol.* 17, 299-308.
- **Knox, D.P., Smith, S.K., Smith, W.D., Murray, J.M. y Redmon, D.L. (1995):** Thiol Binding Proteins. Patent Application no.PCT/GB95/00665.
- **Knox, D.P., Smith, S.K., Smith, W.D., Murray, J.M. y Redmon, D.L. (1995b):** Vaccine against helminthic parasites. *International Patent Application* No WO 95;/26402,1995.
- **Knox, D.P., Smith, S.K., Smith, W.D. (1999)** Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Immunol.* 21: 201-210.
- **Knox, D.P., Smith, W.D. (2001):** Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet Parasitol.* 100, 21-32.
- **Knox, D.P., Redmond, D.L., Newlands, G.F., Skuce, P.J., Pettit, D., Smith, W. D. (2003):** The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int J Parasitol.* 33, 1129–1137.
- **Knox, D.P., Redmond, D.L., Jones, D. G. (1993):** Characterisation of proteases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology* 106: 395–404.
- **Knox, D.P., Smith, S.K., Redmont, D.L., Smith, W.D. (2005):** Protection



- 
- induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. *Parasite Immunol.* 27, 121-126.
- **Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009):** IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27:485-517.
  - **Kooyman, F.N.J., Van Kooten, P.J.S., Huntley, J. F., Mackellar, Q.A., Cornelissen, A.W.C.A., Schallig, H.D.F.H. (1997):** Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology* 114, 395-406.
  - **Lacroux, C. (2006):** Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly. *Tesis Doctoral*. Institut National Polytechnique de Toulouse.
  - **Lacroux, C., Nguyen, T.H., Andreoletti, O., Prevo, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquet, P. (2006):** *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res.* 37, 607-22.
  - **Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Drnoff, G., Galli, S.J. (1998):** Role for interleukin-3 in mast-cell and basophile development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90-3.
  - **Lee, D.L. y Martin, J., (1976):** Changes in *Nematodirus battus* associated with the development of immunity to this nematode in lambs. En: H. Van den Bosche (Ed.). *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*. Amsterdam. *Elsevier North Holland*.
  - **Leid R.W. (1987):** Parasite defence mechanisms for evasion of host attack, a
-

---

review. *Vet. Parasitol.* 25, 147-162.

- **Leighton, E. A., Murrell, K. D., Gasbarre, L. C. (1989):** Evidence for genetic control of nematode egg-shedding rates in calves. *Journal of Parasitology* 75, 498–504.
- **Legocki, A.B., Miedzinska, K., Czaplinska, M., Puciniczak, A., Wedrychowicz, H. (2005):** Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica*. *Vaccine*. 23, 1844-1846.
- **Little, p. R., Hodges, A., Watson, T. G., Seed, J. A., Maeder, S. J. (2010):** Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abemectin, in sheep in New Zealand. *NZ. Vet J* 58, 212-129.
- **Lloyd, S., Soulsby, E. J. L. (1987):** Immunobiology of gastro-intestinal nematodes of ruminants. En: *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and immunoprophylaxis*. Vol I, CRC Press. Boca Raton. FL.USA. 1-41.
- **Loukas, A., Bethony, J.M., Williamson, A.L., Goud, G.N., Mendez, S., Zhan, B., Hawdon, J.M., Botazzi, M.E., Brindley, P.J., Hotez, P.J. (2004):** Vaccination of dogs with a recombinant cysteine protease from the intestine of canine hookworms diminishes the fecundity and growth of worms. *J. Inf. Dis.* 189, 1952-1961.
- **Macaldowie, C., Jackson, F., Huntley, J., Mackellar, A., Jacson, E. (2003):** A comparison of larval development and mucosal mast cell response in worm-naïve goat yearlings, kids and lambs undergoing primary and secondary challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 114, 1-13.
- **Machen, R., Craddock, F., Craig, T., Fuchs, T. (1994):** A *Haemonchus contortus* management plan for sheep and goats in Texas. *Texas Agriculture*

---

*Extension.*

- **Mackinnon, M. J., Meyer, K., Hetzel, D. J. S. (1991):** Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. *Livestock Production Science* 27, 105–122.
- **Maclean, J.M., Lewis, D., Holmes, P.H. (1987):** Studies on the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Pathol.* 97, 645-52.
- **Maff (1989):** Helminthology. London: Her Majesty`s Stationery Office. Reino Unido; pp: 1-68.
- **Magona, J.W., Musisi, G. (1999):** Field studies on anthelmintic resistance in village goats in Uganda. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa.* 47: 179-181.
- **Mandonnet, N., Aumont, G., Fleury, J., Arquet, R., Varo, H., Gruner, N., Bouix, J., Khang, J. V. (2001):** Assessment of genetic variability of resistance to gastrointestinal nematode parasites in Creole goats in the humid tropic. *J.Anim. Sci.* 79, 1706-1712.
- **Mandonnet, N., Ducrocq, V., Arquet, R., Aumont, G. (2003):** Mortality of Creole kids during infection with gastrointestinal strongyles: a survival analysis. *J Anim Sci.* 81, 2401-8.
- **Martín, S. (2011):** Ensayos de inmunización en pequeños rumiantes con proteinasas tipo cisteína de vermes adultos de *Haemonchus contortus*: implicaciones en la variabilidad genética del parásito. *Tesis doctoral.*
- **Martín, S., Molina J.M., Hernández, Y.I., Pérez, D., Matos, L., López, A.M., Ortega, L., Quesada, J.(2011):** Inmunoprotección y variabilidad genética de proteinasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* en ovinos inmunizados a

---

diferentes edades. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70, 178-188.

- **Martín, W.B., Thomas, B.A.C., Urquhart, G.M. (1957):** Chronic diarrhoea in housed cattle due to atypical parasitic gastritis. *Vet. Rec.* 69: 736-739.
- **Martínez Valladares, M., Vara del Río, M.P., Cruz Rojo, M.A., Rojo Vázquez, F.J. (2005a):** Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunol.* 27, 213-18.
- **Martínez Valladares, M., Vara del Río, M.P., Cruz Rojo, M.A., Rojo Vázquez, F.J. (2005b):** Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*. 27, 219-25.
- **Martínez Valladares, M., Famulario, M.R., Fernández Pato, N., Cordero Pérez, C., Castañón Ordóñez, L., Rojo Vázquez, F.A. (2011):** Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. *Parasitol Res.* DOI 10.1007/s00436-011-2753-1.
- **Mattheus B.E. (1977):** The passage of larval helminths through tissue barriers. En: *Parasite Invasion, Symposium of the British Society for Parasitology.* Blackwell Scientific, Oxford. 15, 93-119.
- **McClure, S.J., Emery, D.L., Wagland, B.M., Jones, W.O. (1992):** A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int J Parasitol.* 22, 227-234.
- **McClure, S.J., Emery, D.L. (1994):** Cell-mediated responses against gastrointestinal nematode parasite of ruminants. In: *Cell-mediated immunity in ruminants.* (Goddeeris, B.M.L., Morrison, W.I., Ed.)Florida.USA.
- **McClure, S.J., Davey, R.L., Emery, D.L., Colditz, I.G., Lloyd, J.B. (1996):** In vivo depletion of T-cells and cytokines during primary exposure of sheep to parasites. *Vet Immunol Immunopathol.* 54, 83-90.

- 
- **McGillivray, D.J., Yong, W.K., Adler, B. y Riffkin, G.G. (1992):** A purified stage-specific 31kDa antigen as a potential protective antigen against *Ostertagia circumcincta* infection in lambs. *Vaccine* 10, 607-613.
  - **McKay, D.M., Bienenstock, J. (1994):** The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today*. 15, 533-8.
  - **McLeod, R.S. (2004):** Economic impact of worm infections in small ruminants in South East Asia, India and Australia. En: Sani R.A., Gray G.D., Baker R.L. (Eds.). *Worm Control of Small Ruminants in Tropical Asia. ACIAR Monograph*.
  - **McMichael-Philips, D., Munn, E.A., Graham, M. (1995):** Helminth parasite antigen with aminopeptidase-like activity. *International patent Application*. WO 95/12671.
  - **McNeilly, T.N., Devaney, E., Matthews, J.B. (2009):** *Teladorsagia circumcincta* in the sheep abomasums: defining the role of dendritic cells in T cell regulation and protective immunity. *Parasite Immunol*, 31(7): 347-56.
  - **McNeilly, T.N., Rocchi, M., Bartley, Y., et al., (2013):** Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Vet Res*, 44:70.
  - **Meana Mañes, A. et Rojo Vázquez, F.A. (2000).** Parasitosis de los rumiantes. Parasitosis del aparato digestivo. En: **Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., et al., (2000).** Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongiloidosis y otras nematodosis. *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. España, 17: 195-259.
  - **Medzhitov, R., Janeway, Jr. C.A. (1997):** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–298.
  - **Meeusen, E.N.T., Balic, A. (2000):** Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? *Parasitol Today*. 16, 95-101.
  - **Meeusen, E.N.T., Piedrafita, D. (2003):** Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int J Parasitol*. 33, 1285–1290.

- **Meeusen, E.N.T., Gorrell, M.D. Rickard, M.D., Brandon, M.R. (1989):** Lymphocyte subpopulations of sheep in protective immunity to *Taenia hydatigena*. *Parasite Immunol.* 11, 169-181.
- **Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V. (2005):** Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol.* 108, 121-5.
- **Menzies, M., Ingham, A. (2006):** Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 109, 23-30.
- **Meyvis, Y., Geldhof, P., Gevaert, K., Timmerman, E., Vercruyse, J., Claerebout, E. (2007):** Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction. *Vet Parasitol*, 149(3-4): 239-45.
- **Michel, J.F. (1963):** The phenomena of host resistance and the course of infection of *Ostertagia ostertagi* in calves. *Parasitology* 53, 63-84.
- **Michel, J.F. (1969):** Some observations on the worm burdens of calves infected daily with *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology*, 59: 575-595.
- **Michel, J.F. (1973):** Acquired resistance to *Ostertagia* infection. *Proc R Soc Med.* 66, 778.
- **Michel, J.F., Lancaster, M.B., Hong, C., Berrett, S. (1978b):** Plasma pepsinogen levels in some experimental infections of *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Rec.* 103: 370-373.
- **Miller, H.R.P. (1984):** The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet Immunol Immunopathol.* 6, 167-259
- **Miller, H.R.P. (1987):** Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94, 77-100.

- **Miller, H.R.P. (1996):** Mucosal mast cells and allergic response against nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol.* 54, 331-6.
- **Miller, J.E., Horohov, D.W. (2006):** Immunological aspects of nematode control in sheep. *J Anim Sci.* 84 (E sup.), E124-E132
- **Molento, M., Tasca, C., Gallo, A., Ferreira, M., Bonont, R, Stecca, E. (2004):** Método FAMACHA© como parámetro clínico individual de infección por *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes. *Ciencia Rural* 34(4):1139-1145.
- **Molina, J.M., Gutiérrez, A.C., Rodríguez, E., Viera, J.A., Hernández, S. (1997)** Abomasal nematodes in goats from the subtropical island of Grand Canary (Spain) *Vet. Res.* 28, 259-270.
- **Molina, J.M., Ruiz A., Rodríguez, E., Gutiérrez, A.C., Viera, J.A., González J. F., Hernández, S. (1999):** Cross-reactive antigens of *Haemonchus contortus* adult worm in *Teladorsagia circumcincta* infected goats. *Vet. Res.* 30: 393-399.
- **Molina, J.M., Ruiz A., Fuentes, P., González J. F., Martín, S. y Hernández, Y.I. (2005):** Persistent efficacy of doramectin against *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Rec.* 156, 448-450.
- **Molina, J.M., Ruiz A., Hernández, B., González J. F., Martín, S. y Hernández, Y.I. (2008):** Eprinomectin pour-on and the shedding of *Haemonchus contortus* eggs in experimentally infected goats. *Aust. Vet. J.* 86, 444-445.
- **Molina, J.M., Hernández, Y., Ruiz, A., González, J.F., Argüello, A., Ferrer, O., Forbes, A.B. (2009):** Preliminary study on the use of a *Teladorsagia circumcincta* bulk milk ELISA test in dairy goats under experimental conditions. *Vet Parasitol.* 166, 228-34.
- **Morris, C. A., Watson, T. G., Bisset, S. A., Vlassoff, A. Y Douch, P. G. C.**

- 
- (2000): Breeding sheep in New Zealand for resistance or resilience to nematode parasites. 77–98. In *Breeding for Resistance to Infectious Diseases of Small Ruminants*. (ed. Gray, G. D., Woolaston, R. R. and Eaton, B. D.) ACIAR Monograph No 34, Canberra, Australia.
- **Morris, C.A., Green, R.S., Cullen, N.G., Hickey, S.M. (2003):** Genetic and phenotypic relationships among faecal egg count, anti-nematode antibody level and live weight in Angus cattle. *Animal Science* 76, 167–174.
  - **Morton, R.E., Yong, W.K., Alder, B., Bozas, S.E., Spithil, T.W. y Parsons, J.C. (1995):** Inability to reproduce protection against *Teladorsagia circumcincta* in sheep with a purified stage-specific 31 kDa antigen complex. *Vaccine*. 13,1482.
  - **Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Owango, M.O., Duncan, J.L., Stear, M.J. (1996):** Response of Dorper and Red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Research in Veterinary Science* 61, 218–221.
  - **Mulligan, W., Dalton, R.G., Anderson, N. (1963):** Ostertagiasis in cattle. *Vet. Rec.* 75:1014.
  - **Munn, E.A., Greenwood, C.A., Coadwell, W.J. (1987):** Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 94, 385-397.
  - **Munn, E.A., Smith, T.S., Graham, M., Tavernor, A.S., Greenwood, C.A., Coetzee, G.(1993):** Vaccination of merino lambs against haemonchosis with membrane associated proteins from adult parasite. *Parasitology*. 106, 63-66.
  - **Munn, E.A., Smith, T.S., Graham, M., Tavernor, A.S., Greenwood, C.A.(1993):** The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. *Int. Parasitol.* 23, 261-269.
  - **Munn, E.A. y Munn, P.D. (2002):** In *The Biology of Nematodes*, ed. Lee DL.



---

London: Taylor & Francis: 211–232.

- **Murphy, L., Eckersall, P.D., Bishop, S.C., et al., (2010):** Genetic variation among lambs in peripheral IgE activity against the larval stages of *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology*, 137(8): 1249-60.
- **Murray, M., Jennings, F.W., Armour, J. (1970):** Bovine ostertagiasis: structure function and mode of differentiation of the bovine gastric mucosa and kinetics of the worm loss. *Res. Vet. Sci.* 2, 417-427.
- **Murray, J. & Smith, W.D. (1994):** Ingestion of host immunoglobulin by three non-blood-feeding nematode parasites of ruminants. *Res. Vet. Sci.* 57: 387-389.
- **Murray, M., Geldhof, P., Clark, D., Knox, D.P. y Britton, C. (2007):** Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 37: 1117-1125.
- **Nangia, O. P., Agarwal, V.K., Singh, A. (1968):** Studies on blood cellular constituents of female Beetal goats from birth of over five years of age. *Indian J. Anim. Sci.* 38, 616-625.
- **Nawa, Y., Ishikawa, N., Tsuchiya, K., Horii, Y., Abe, T., Khan, A.I., Bing-Shi, Itoh H., Ide, H., Uchiyama, F. (1994):** Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite Immunol.* 16, 333-8.
- **Newlands, G.F.J., Skuce, P.J., Knox, D.P., Smith, S.K. y Smith, W.D. (1999):** Cloning and characterization of a  $\beta$ -galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 119: 483-490.
- **Newlands, G.F.J., Skuce, P.J., Knox, D.P., y Smith, W.D. (2001):** Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 122: 371-378.

- **Newton, S.E., Meeusen, E.N.T. (2003):** Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites in sheep. *Parasite Immunol.* 25, 283-96.
- **Newton, S.E. y Munn, E.A. (1999):** The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol Today.* 15, 116–122.
- **Neyra, V., Chavarry, E. & Espinoza, J. R. (2002):** Cysteine proteases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Veterinary Parasitology.* 105, 21-32.
- **Nguti, R., Janssen, P., Rowlands, G.J., Audho, J. O., Baker, R. L. (2003):** Survival of Red maasai, Dorper and crossbred lambs in the sub-humid tropics. *Animal Science* 76, 3–17.
- **Nicoletti, C. (2000):** Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 47, 735-9.
- **Nicholas, F. W. (1987):** Veterinary Genetics. Oxford. *Oxford University Press.*
- **Nisbet, A.J., Bell, N.E., McNeilly, T.N., et al., (2010):** A macrophage migration inhibitory factor-like tautomerase from *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida). *Parasite Immunol*, 32(7): 503-11.
- **Nisbet, A.J., McNeilly, T.N., Wildblood, L.A., et al., (2013):** Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine*, 31(37): 4017-23.
- **Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Lhweatick, D.M. (1996):** Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology.* 26, 983–992.
- **Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Miller, C.M., Waghorn, T.S.,**

- Robertson, H.A. (1998):** Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasitise sheep. *International Journal for Parasitology* 28, 791–803.
- **Noble, E.R.; Noble G.A.; Schad, G.A.; Macinnes, A.J. (1989):** Section V: Phylum Nematodo. 15. Class Secernentea (= Plasmidia), Orders Tylenchida, Rhabditida, Strongylida. *Parasitology. The Biology of Animal Parasites*. Lea & Feiber. Philadelphia. USA.
  - **Oduye, O.O. (1976):** Haemathological values of nigerina goats and sheep. *Trop. Anim. Health. Prod.* 8, 131-136.
  - **Ortega, L. (2015):** Aportaciones sobre la respuesta immune en infecciones primarias e inmunizaciones con tiol-proteinasas de *T. circumcincta* en ganado caprino. *Tesis doctoral*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
  - **Osuna, A., Alunda, J.M. (2011):** Evaluación de un nuevo antígeno y adyuvante y vías de inmunización en el desarrollo de una vacuna frente a neamtodo gastrointestinales. *Congreso Ibercio de Paraitología*. Pág. 13 (libro de actas).
  - **Ouhelli, H., Benzaouia, T., Pandey, V. S., Dakkak, A. (1981):** Etude épidémiologique de certaines parasitoses du mouton au Maroc atlantique par utilisation de la méthode des “animaux traceurs”. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.* 34, 319-324.
  - **Owen, R.L. (1999):** Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches. A personal and historical perspective. *Semin Immunol.* 11, 157-63.
  - **Pandey, V. S. (1972):** Effects of temperature on survival of the free-living stage of *Ostertagia ostertagi*. *J. Parasitol.* 58: 1042-1046.
  - **Pandey, V. S., Ouhelli, H., Dakkak, A., Cabaret, J. (1990):** Epidemiology of

- gastrointestinal helminths of sheep on the Rabat of Morocco. *Am. Rech. Vét.* 21: 259-266.
- **Paterson, S., Jackson, F., Huntley, J.F., Stevenson, L.M., Jones, D.G., Jackson, E., Russel, A.J. (1996):** Studies on caprine responsiveness to neamtodiasis: segregation of male goats into responders and non-responders. *Int. J. Parasitol.* 26, 187-194.
  - **Paterson, S., Wilson, K., Pemberton, J.M. (1998):** Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 3714–3719.
  - **Paul, W.E. & Seder, R.A. (1994):** Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.
  - **Peck, A. & Mellins, E.D. (2009):** Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol*, 132(3): 295-304.
  - **Peña, M.T., Miller, J.E., Horohov, D.W. (2004):** Effect of dexamethasone treatment on the immune response of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol.* 119, 223–235.
  - **Peña, M.T., Miller, J.E., Horohov, D.W. (2006):** Effect of CD4+ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary parasitology.* 138, 240-246.
  - **Pérez, J., García, P.M., Hernández, S., Martínez-Moreno, A., Martín de las Mulas J., Cámara, S. (2001):** Pathological and immunohistochemical studie of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* 32, 463-473.
  - **Pérez, J., García, P.M., Hernández, S., Mozos, E., Cámara, S., Martínez-Moreno, A. (2003):** Experimental haemonchosis in goats: effects of

---

single and multiple infections in the host response. *Vet Parasitol.* 111, 333-42.

- **Pérez, J., Zafra, R., Buffoni, L., Hernández, S., Cámara, S., Martínez-Moreno, A. (2008):** Cellular Phenotypes in the Abomasal Mucosa and Abomasal Lymph Nodes of Goats Infected with *Haemonchus contortus*. *J Comp Pathol.* 138, 102-7.
- **Pernthaner, A., Vlassof, A., Douch, P.G., Maass, D.R. (1997):** Cytokine mRNA and IFN- $\gamma$  production in nematode resistant and susceptible line lambs artificially infected with gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitol.* 42, 55–61.
- **Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Hein, W.R. (2005):** Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor  $\alpha$  genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect Immun.* 73, 2175–2183.
- **Pernthaner, A., Cole, S.-A., Morrison, L., Green, R., Shaw, R.J., Hein, W.R. (2006):** Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 114, 135-148.
- **Pfeffer, A., Douch, P.G., Shaw, R.J., Gatehouse, T.K., Rabel, B., Green, R.S., Shirer, C.L., Jonas, W.E., Bisset, S. (1996):** Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. *Int J Parasitol.* 26, 765-773.
- **Piedrafita, D.; González, J.F.; Raadsma, H.W.R.; Meeusen, E.N.T. (2010):** Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? *Trends Parasitol.* 26, 568-73.
- **Piedrafita, D.P., de Veer, M.J., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M., Meeusen, E.N. (2012):** Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the

---

gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. *Vaccine*, 30(50): 7199-204.

- **Piedrafita, D., Preston, S., Kemp, J., et al., (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): e78357.
- **Ploeger, H.W., Kloosterman, A., Borgsteede, F.H., Eysker, M. (1990):** Effect of naturally occurring nematode infections in the first and second grazing season on the growth performance of second-year cattle. *Vet Parasitol.* 36, 57-70.
- **Pomroy W.E., Lambert M.G., Betteridge L.(1985):** Comparison of faecal strongylate egg counts of goats and sheep on the same pasture, *N. Z. Vet. J.* 34 (1985) 36–37.
- **Pomroy, W.E., Charleston, W.A. (1989a):** Development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Vet Parasitol.* 33, 283-8.
- **Pomroy, W.E., Charleston, W.A. (1989b):** Failure of young goats to acquire resistance to *Haemonchus contortus*. *N. Z. Vet. J.* 37, 23-26.
- **Pralomkarn, W., Pandey, V.S., Ngampongsai, W., Choldumrongkul, S., Saithanoo, S., Rattananachon, L., Verhulst, A. (1997):** Genetic resistance of three genotypes of goats to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 68: 79-90.
- **Prichard, R. K., Hall, C. A., Kelly, J. D., Martin, I. C.A., Donald, A. D. (1980):** The problem of the anthelmintic. *Aust Vet J* 56,239-250.
- **Pritchard, D.I. (1993):** Immunity to helminths: is too much IgE parasite- rather than host-protective? *Parasite Immunol.* 15, 5-9.
- **Quesneaux, Valère, Bernhard, Ryffel, Franco, Pavoda. (2009):** Th17 cell: Role

---

in inflammation and Autoimmune Disease. Edit: Springer.

- **Rahman, W.A., Collins G.H. (1991):** Changes in liveweight gain and blood constituents in experimental infections of goats with a goat-derived compared with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 38, 145-153.
- **Rainbird, M.A., Macmillan, D., Meeusen, E.N. (1998):** Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* 20, 93-103
- **Raleigh, J.R. y Meeusen, E. (1996):** Developmentally regulated expression of a *Haemonchus contortus* surface antigen. *Int JParasitol.* 26: 673–675.
- **Raleigh, J.R., Brandon, M.R., Meeusen, E. (1996):** Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 18: 125–132.
- **Rathore, D.K., Suchitra, S., Saini, M., Singh, B.P. y Joshi, P. (2006):** Identification of a 66 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory antigen that inhibits host monocytes. *Vet. Parasitol.* 138: 291-300.
- **Redmond, D.L., Smith, S.K.; Halliday, A., Smith, W.D., Jackson, F., Knox, D.P., Matthews, J.B. (2006):** An immunogenetic cathepsin F secreted by the parasite stages of *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.* 36: 277-286.
- **Rinaldi, M., Dreesen, L., Hoorens, P.R., et al., (2011):** Infection with the gastrointestinal nematode *Ostertagia ostertagi* in cattle affects mucus biosynthesis in the abomasums. *Vet Res*, 42:61.
- **Roberts, F.H.S. (1957):** Reactions of calves to infestation with the stomach worm *Haemonchus placei*. *Aust J Agric Res.* 8, 740-747.
- **Robinson, N., Piedrafita, D., Snibson, K.K., Harrison, P., Meeusen, E.N. (2010):** Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following

---

hyperimmunisation and challenge with *H. contortus*. *Vet Res.* 41, 37.

- **Robinson, N., Pleasance, J., Piedrafita, D., Meeusen, E.N. (2011):** The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol.* 41, 487-493.
- **Rothenberg, M.E., Hogan, S.P. (2006):** The Eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 24, 147-74
- **Rothwell, T.L.W. (1989):** Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int J. Parasitol.* 19, 139-168.
- **Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., Sangster, N. (2008):** *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet Parasitol.* 153, 285-93.
- **Ritchie, J.D.S., Anderson, N., Armour, J., Jarret, W.F.H., Jenninigs W.F., Urquart, G.M. (1966):** Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: parasitology and pathogenesis of single infections. *Am. J. Res.* 27, 659-667.
- **Ruiz, A., Molina, J. M., González, J. F., Conde, M. M., Martín, S., Hernández, Y. I. (2004)** Immunoprotection in goats against *Haemonchus contortus* after immunization with cysteine protease enriched protein fractions. *Vet. Res.* 35: 565–572.
- **Ruiz, A., Molina, J.M., Muñoz, M.C., Gutiérrez-Ravelo, A.D., Zárate, R., MacNaughton-Smith, G.A., Hildebrandt, I (2010):** Utilización de extractos de *Ruta picnata* como antiparasitario, antiséptico y fitosanitario. P201030356, CEAMED SL-Universidad de Las Palmas de GC.
- **Sackett, D., Holmes, P., Abbott, K., Jephcott, S. and M. Barber, M. (2006):** Assessing the economic cost of endemic disease on profitability of Australian beef cattle and sheep producers (final report). Sydney. *Meat and Livestock*



*Australi.*

- **Salma, S.K., Duncan, J.L. (1984):** The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 16, 43-54.
- **Salma, S.K., Duncan, J.L. (1985):** Studie on the abomasal pathology of immunized and non-immunized sheep infected with *Haemonchus contortus*. *J. Helminth.* 59, 351-359.
- **Salinas, J. (2007):** Inmunidad frente a agentes eucariotas patógenos. En: Gómez-Lucía E., *et al.* Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación.*
- **Sangster, N. (2009):** Managing novel anthelmintics. *Pfizer Symposium. 22<sup>nd</sup> international Conference of the World Association in Advances in Parasitology.* Calgary. Canadá,
- **Sayers, G., Sweeney, T. (2005):** Gastrointestinal nematode infection in sheep-a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim Health Res Rev.* 6, 159-71.
- **Schallig, H.D.F.H. (2000):** Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120, S63-72.
- **Schallig, H.D.F.H., van Leeuwen, M.A.W., Hendriks, W.M.L. (1994):** Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 108, 351–357.
- **Schallig, H.D.F.H., van Leeuwen, M.A.W., Hendriks, W.M.L. (1995):** Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol.* 56 149-162.
- **Schallig, H.D., van Leeuwen, M.A., Cornelissen, A.W. (1997):** Protective

---

immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol.* 19: 447–453.

- **Sharp, P. J. y Wagland, B. M. (1996):** *Haemonchus contortus* vaccine. US Patent 5525508.
- **Schillhorn, T. W. (1981):** Ostertagiasis in cattle: pathophysiological and epidemiological considerations. *Compend. Cont. Ed. Prac. Vet.* 3: S175-S181.
- **Schoenian, S. (2005):** Internal Parasite Control (IPM). *Maryland Cooperative Extension. University of Maryland.* USA.
- **Schwaiger, F.W., Gostomski, D., Stear, M.J., Duncan, J.L., Mckellar, Q.A., Epplen, J.T., Buitkamp, J. (1995):** An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *International Journal for Parasitology* 25, 815–822.
- **Scott, I., Hodgkinson, S.M., Khalaf, S., Lawton, D.E.B., Collett, M.G., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E. Simpson, H.V. (1998a):** Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *Int J Parasitol* 28, 1383–92.
- **Scott, I., Stear M.J., Irvine, J., Dick A., Wallace, D. S., Mckellar, Q.A. (1998b):** Changes in the zymogenic cell populations of the abomasa of sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 116, 569–77.
- **Seaton, D.S., Jackson, F., Smith, W.D., Angus, K.W (1989a):** Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with *Ostertagia circumcincta*. *Res Vet Sci.* 46, 241-6
- **Seaton, D.S., Jackson, F., Smith, W.D., Angus, K.W (1989b):** Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with

*Trichostrongylus vitrinus*. *Res Vet Sci*. 46, 22-6.

- **Selman, I.E., Reid J.F.S., Armour, J. (1976):** Type II ostertagiasis in adult cattle. *Vet. Rec.* 99: 141-143.
- **Serrano, E., Uceda A. (2007):** Hipersensibilidad. En: Gómez-Lucía E., *et al.* (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*.
- **Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W. (2009):** A Th2 type of immune response is associated with increased to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet Parasitol*, 163(1-2): 57-66.
- **Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D. (2011):** Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Vet Parasitol*, 181(2-4): 239-47.
- **Shaw, R., Pfeffer A., Bischof, R. (2009):** Ovine IgE and its role in immunological protection and disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 132, 131-40.
- **Shelton, G.C., Griffiths, H.J. (1967):** *Oesophagostomum columbianum*: experimental infections in lambs. Effects of different types of exposure on the intestinal lesions. *Pathol Vet*. 4, 413-34.
- **Siefker, C. & Rickard, L.G. (1998):** Demonstration of shared carbohydrate epitopes in intestinal proteins of some bovine gastrointestinal nematodes. *J Parasitol*, 84(3): 524-8.
- **Skuce, P.J., Newlands, G.F.J., Stewart, M. y Smith, W.D. (2001):** Cloning and characterisation of thrombospondin, novel multidomain glycoprotein found in association with a host protective gut extract from *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 117: 241-244.
- **Sloss, M. W., Demp, R. L., Zaja,c A. M. (1994):** Veterinary Clinical Parasitology. Editado por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L. *American Association of*

---

*Veterinary Parasitologists*. Iowa. USA.

- **Smith, B. P. (1990):** Parasite Control Programs. En: *Large Animal Internal Medicine*. Editado por: Robert W. Reinhardt. Mosby. Missouri. USA.
- **Smith, G. (1990):** Chemotherapy: future problems. In: Schad, G.A., Warren, K.S. (Eds.), *Hookworm Disease: Current Status and New Directions*. Taylor & Francis, London, U.K., pp. 291–303.
- **Smith, S.K. y Smith, W.D. (1996):** Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. *Res Vet Sci*. 60:1-6.
- **Smith, S.K., Pettit, D., Newlands, G.F.J., Redmond, D.L., Skuce, P.J., Knox, D.P., Smith, W.D. (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.
- **Smith, S.K., Nisbet, A.J., Meikle, L.I., Inglis, N.F., Sales, J., Beynon, R.J., Matthews, J.B. (2009):** Proteomic analysis of excretory/secretory products released by *Teladorsagia circumcincta* larvae early post-infection. *Parasite Immunology*. 31, 10-19.
- **Smith, T.S.; Munn, E.A.; Graham, M.; Tavernor, A.S.; Greenwood, C.A. (1993):** Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*. 23: 271–280
- **Smith, T.S.; Graham, M.; Munn, E.A.; Newton, S.E.; Knox, D.P.; Coadwell, W.J.; McMichael-Phillips, Smith, D.H., Smith, W.D., Oliver, J.J. (1997):** Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochim Biophys Acta*. 1338: 295–306.
- **Smith, W.D., Christie, M.G. (1979):** *Haemonchus contortus*: some factors

---

influencing the degree of resistance of sheep immunized with attenuated larvae. *J Comp Pathol.* 89, 141-150.

- **Smith, W.D., Jackson, E. y Jackson, F. (1982):** Attempts to immunise sheep against *Ostertagia circumcincta* with irradiated larvae. *Res. Vet. Sci.* 32: 101-105.
- **Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Williams, J. (1983c):** Local immunity and *Ostertagia circumcincta*: changes in the gastric lymph of sheep after primary infections. *J. Comp. Pathol.* 93, 471-478.
- **Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Williams, J., Willadsen, S.M., Fehilly, C.B. (1984):** Resistance to *Haemonchus contortus* transferred between genetically histocompatible sheep by immune lymphocytes. *Res Vet Sci.* 37, 199-204.
- **Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Williams, J. (1985a):** Ovine ostertagiasis: a natural host parasite interaction for studying protective local immune responses in the gut. En: Morris B. y Miyasaca M. (Eds.) *Immunology of the sheep*. Basilea. *Editiones Roche*.
- **Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Williams, J. (1985b):** Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the immune local responses of 4 1/2 and 10-month old lambs. *J Comp Pathol.* 95, 235-45.
- **Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Graham, R., Williams, J. (1986):** Transfer of immunity to *Ostertagia circumcincta* and IgA memory between identical sheep by lymphocytes collected from gastric lymph. *Res Vet Sci.* 41, 300-306.
- **Smith, W.D. (1999):** Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int. J. Parasitol.* 29:17-24.
- **Smith, W.D., Smith, S.K., Pettit, D. (2000):** Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge

- 
- in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasite Immunology*. 22, 239-247.
- **Smith, W.D., Smith, S.K., Pettit, D., Newlands, G.F., Skuce, P.J. (2000b):** Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 22: 63-71.
  - **Smith, W.D., Pettit, D. y Smith, S.K. (2001):** Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 23, 203-211.
  - **Smith, W.D. (2007):** Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 148: 356-359.
  - **Snider, T.G., Willians, J.C., Sheehan, D.S., Fuselier, S.H. (1981):** Plasma pepsinogen, inhibited larval development, and abomasal lesions and experimental infections of calves with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 8, 176-183.
  - **Snider, T.G., Willians, J.C., Knox, J.W., Marbury, K.S., Crowder, C.H., Willis, E.R. (1988):** Sequential histopathological changes of Type I, pre Type II and Type III Ostertagiasis in cattle. *Vet. Parasitol.* 27, 169-179.
  - **Solano Parada, J., González, J., Pablos Torró, L.M., Brazil Dos Santos, M.F., Espino, A. M., Burgos, M., Osuna, A.(2010):** Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrongylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2. A synthetic peptide and recombinant antigens. *Vaccine.* 28, 5185-5196.
  - **Sommerville, R. I. (1953):** Development of *Ostertagia circumcincta* in the abomasal mucosa of cheep. *Nature.* 171: 482-483.
  - **Sommerville, R. I. (1954):** The histotropic phase of the nematode parasite

---

*Ostertagia circumcincta*, *Australian Journal of Agriculture Research*. 5: 130-140.

- **Sommerville, R. I. (1956):** The histology of the ovine abomasums and the relation of the globule leukocyte to the nematode infestations. *Aust. Vet. J.* 32, 237.
- **Soulsby, E.J.L. (1987):** Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México D.F. *McGraw Hill Interamericana*.
- **Soulsby, E.J.L. (1988):** Parasitología y Enfermedades Parasitarias. 7ª edición. Interamericana, México, D.F. México.
- **Sreter, T., Kassai, T., Takacs, E. (1994):** The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Internacional Journal for Parasitology* 24, 871–876.
- **Stear, M.J., Bishop, S.C. (1999):** The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 29, 777-80.
- **Stear, M.J., Hetzel, D.J.S., Brown, S.C., Gershwin, L.J., Mackinnon, M.J., Nicholas, F.W. (1990):** The relationships among ecto- and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Veterinary Parasitology* 34, 303–321.
- **Stear, M.J., Bairden, K., Duncan, J.L., Murray, M. (1995a):** A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. *Vet Parasitol.* 60, 69- 81.
- **Stear, M.J., Bishop, S.C., Doligalska, M., Duncan, J.L., Holmes, P.H., Irvine, J., McCririe, L., McKellar, Q.A., Sinski, E., Murray, M. (1995b):** Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 17, 643-52.

- 
- **Stear, M.J., Bairden, K., Duncan, J.L., Gettinby, G., Mckellar, Q.A., Murray, M., Wallace, D. (1995c):** The distribution of fecal nematode egg counts in Scottish Blackface lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology* 110, 173-581.
  - **Stear, M.J., Park, M., Bishop, S.C. (1996):** The key components of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Parasitol Today*. 12, 438–441.
  - **Stear, M.J., Strain, S.A.J., Bishop, S.C. (1999):** Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *Int J Parasitol*. 29, 51–56.
  - **Stear, M.J., Mitchell, S., Strain, S., Bishop, S.C., McKellar, Q.A. (2000a):** The influence of age on the variation among sheep in susceptibility to natural nematode infection. *Vet Parasitol*. 89, 31-6.
  - **Stear, M.J., Bairden, K., Duncan, J.L., Eckersall, P.D., Fishwick, G., Graham, P.A., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Mitchell, S., Murray, M., Parkins, J.J., Wallace, D.S. (2000b):** The influence of relative resistance and urea-supplementation on deliberate infection with *Teladorsagia circumcincta* during winter. *Vet Parasitol*. 94, 45–54.
  - **Stear, M.J., Bishop, S.C., Mallard, B.A., Raadsma, H. (2001):** The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res Vet Sci*. 71, 1-7.
  - **Stear, M.J., Innocent, G.T., Buitkamp, J. (2005):** The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex. *Vet Immunol Immunopathol*. 108, 53–57.
  - **Stear, M.J., Doligalska, M., Donskow-Schmelter, K. (2007):** Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134, 139-151.



- 
- **Steel, J.W., Jones W.O., Wagland, B.M. (1990):** The response of immune sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis*: enteric plasma loss and secretion of biogenic amines. *Int J Parasitol.* 20, 1067-73.
  - **Stevenson, L.M., Huntley, J.F., Smith, W.D., Jones, D.G. (1994):** Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections of lambs. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 8, 167-73.
  - **Steward, D.F. (1953):** Studies of the resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus spp.* And on the immunological reactions of sheep exposed to infection. The nature of self-cure phenomenon. *Aust Agric. Res* 4, 1000-1017.
  - **Strain, S.A.J., Stear, M.J. (1999):** The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. *Parasite Immunol.* 21, 163-168.
  - **Strain, S.A.J., Stear, M.J. (2001):** The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 23, 527-31.
  - **Strain, S.A.J., Bishop, S.C., Henderson, N.G., Kerr, A., McKellar, Q.A., Mitchell, S., Stear, M.J. (2002):** The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 124, 545–552.
  - **Suárez Rodríguez, M., (2007):** Regulación del sistema inmune, en **Gómez-Lucía, E., Blanco, M.M., Doménech, A., (2007):** *Manual de Inmunología Veterinaria.* Pearson-Prentice Hall, 14: 255-272.
  - **Suchitra, S. y Joshi, P. (2005):** Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biophys. Biochim. Acta* 1722: 293–303.

- 
- **Sutherland, I.A., Brown, A.E., Green, R.S., Miller, C.M., Leathwick, D.M. (1999):** The immune response of sheep to the larval challenge with *Ostertagia circumcincta* and *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 84, 125-135.
  - **Taams L.S., Akbar A.N. (2005):** Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 293:115-31
  - **Taams L.S., van Amelsfort J.M., Tiemessen M.M., Jacobs K.M, de Jong E.C., Akbar A.N., Bijlsma J.W., Lafeber F.P. (2005):** Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells *Hum Immunol.* 66(3):222-30.
  - **Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2007):** Veterinary Parasitology. Oxford. *Blackwell Publishing.*
  - **Tavernor, A.S., Smith, S.T., Langfor, C.F., Munn, A., Graha..(1992):** Vaccination of young Dorset lambs against haemonchosis. *Parasite Immunol.* 14, 645-655.
  - **Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Bouix, J., Dorchies, P., Jacket, P. (2007):** Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunology.* 29, 415-424.
  - **Terefe, G., Lacroux, C., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Dorchies, P., Foucras, G., Jacquet, P. (2009):** Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. *Vet Parasitol.* 165, 1-4.
  - **Thatcher, E.F., Gershwin, L.J., Baker N.F. (1989):** Levels of serum IgE in response to gastro-intestinal nematodes in cattle. *Vet Parasitol.* 32, 153-61. **Tizard I. (2000):** Inmunología veterinaria. México D.F. *Mcgraw Hill.*

- 
- **Threlkeld, W. L. (1934):** The life history of *Ostertagia circumcincta*. *Technical Bulletin No. 5, Virginia Polytechnic Institute, Virginia Agriculture Experimental Station, Blacksburg, Virginia. USA.* 24 pp.
  - **Thiendepont, D., Rochette, F. and Vanparijs, O.F.J. (1979):** Huevos de lombrices bovinos y ovinos. *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico.* Janssen Research Foundation.
  - **Tizard, I.R., (2009):** Introducción a la inmunología veterinaria. *Elsevier, 2009 (8ª ed.) XIV, 574 pp.*
  - **Torres-Acosta, J.F. y Jacobs, D.E. (1999):** Duration of activity of oral moxidectin against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Vet. Rec.* 144, 648-649.
  - **Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H., Dalton, J.P. (1999):** Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv. Parasitol.* 43: 162-166.
  - **Turner, D.G., Wildblood, L.A., Inglis, N.F., Jones, D.G. (2008):** Characterization of a galectin-like activity from the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, which modulates ovine eosinophil migration in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*, 122(1-2): 138-45.
  - **Tyrrell, K. L., Dobson, R. J., Stein, P. A. y Walkden-Brown, S. W. (2002):** The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 107, 85-93.
  - **Urban, J.F. Jr., Madden, K.B., Svetic, A., Cheever, A., Trotta, P.P., Gause, W.C., Katona, I.M., Finkelman, F.D. (1992):** The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev.* 127, 205–220.
  - **Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1996):** *Veterinary Parasitology.* Oxford. *Blackwell Science Ltd.*

- 
- **Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W (2001):** *Veterinary Parasitology*, Ed. Acribia.
  - **Valderrábano, J., Gómez-Rincón, C., Uriarte, J. (2006):** Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Vet Parasitol.* 141, 122-31.
  - **Vallance, B.A., Croitoru, K., Collins, S.M. (1998):** T lymphocyte-dependent and independent intestinal smooth muscle dysfunction in the *T. spiralis*-infected mouse. *Am J Physiol.* 275, 1157-1165.
  - **Vallance, B.A., Matthaei, Y., Young, S.M. Blennerhassett, K. I. Deng, I.G. Collins, P. A. (1999):** IL-5 contributes to worm expulsion and muscle hypercontractility in a primary *T. spiralis* infection. *Am J Physiol.* 277, 400-8.
  - **Van den Ham, H.J., Andeweg, A.C., de Boer, R.J. (2013):** Induction of appropriate Th cell phenotypes: Cellular decision-making in heterogeneous environments. *Parasite Immunol.*
  - **Van Wyk, J.A. (2001)** Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res.* 68, 55-67.
  - **Van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R. M., Besier, R.B. (2006):** Targeted selective treatment for worm management—How do we sell rational programs to farmers? *Vet Parasitol.* 139, 336-46.
  - **Vanhoutte, F., Breuilh, L., Fontaine, J., Zouain, C.S., Mallevaey, T., Vasseur, V., Capron, M., Goriely, S., Faveeuw, C., Ryffel, B, Trottein, F. (2007):** Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology. *Microbes Infect.* 9, 1606-13.
  - **Venturina, V.M., Gossner, A.G., Hopkins, J. (2013):** The immunology and

- 
- genetics of resistance of sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Res Commun*, 37(2): 171-81.
- **Vercruyse, J., Knox, D. P., Schetters, T. P. M. y Willadsen, P. (2004):** Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends in Parasitology* 20, 488–492.
  - **Vervelde, L., Kooyman, F.N.J., Van Leeuwen, M.A., Schallig, H.D.F, Mackellar, A., Huntley, J.F., Cornelissen, A.W. (2001):** Age related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. *Parasite Immunol.* 23, 419-426.
  - **Vervelde, L., Van Leeuwen, M.A., Kruidenier, M., Kooyman, F.N., Huntley, J.F., Van Die, I., Cornelissen, A.W. (2002):** Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 24, 189-201.
  - **Vlassoff, A., Leathwick, D.M., Heath, A.C. (2001):** The epidemiology of nematode infections of sheep. *N Z Vet J.* 49, 213-21.
  - **Von Sammsen-Himmelstjerna, G., Harder, A., Sangster, N.C., Coles, G.C. (2005):** Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology* 130, 243-7.
  - **Wallace, D.S., Bairden, K., Duncan, J.L., Eckersall, P.D., Fishwick, G., Holmes, P.H., Mckellar, Q.A., Mitchell, S., Murray, M., Parkins, J.J., Stear, M.J. (1999):** The influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. *Animal Science* 69, 457–463.
  - **Waller, P.J., Thomas, R. J. (1978):** Nematode parasitism in sheep in north-east England: the epidemiology of *Otortagia* species. *Int. Parasitol.* 8: 275-283.

- **Waller, P.J. (1997b):** Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet Parasitol.* 71, 195-207.
- **Waller, P.J., Schwan, O., Ljungström, B.L., Rydzik, A., Yeates, G.W. (2004):** Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Vet Parasitol.* 126, 299–315.
- **Waller, P.J., Chandrawathani, P. (2005):** *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed.* 22, 131–137.
- **Wang, H.W., Tedla, N., Lloyd, A.R., Wakefield, D., Mcneil, P.H. (1998):** Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest.* 102, 1132-41.
- **Weller, P.F. (1997):** Human eosinophils. *J All Clin Immunol.* 100, 283-287.
- **Werling, D., Piercy, J., Coffey, T.J. (2006):** Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination. *Vet Immunol Immunopathol.* 112, 2-11.
- **Wiggin, C.J., Gibbs, H.C. (1989):** Studies of immunomodulatory effect of low-level infection with *Ostertagia ostertagi* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1764-1770.
- **Wiggin, C.J., Gibbs, H.C. (1990):** Adverse immune reactions and the pathogenesis of *Ostertagia ostertagi* infections in calves. *Am J Vet Res.* 51, 825-32.
- **Wildblood, L.A., Kerr, K., Clark, D.A.S., Cameron, A., Turner, D.G., Douglas Jones, D.G. (2005):** Production of eosinophil chemoattractant activity by ovine gastrointestinal nematodes. *Vet Immunol Immunopathol.* 107 57–65.

- 
- **Williams, B. y Warren, J. (2004):** Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103, 237–243.
  - **Winter, M.D., Wright, C., Lee, D.L. (1997):** The mast cell and eosinophil response to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitology* 114, 189–93.
  - **Woolaston, R.R., Maueli, P., Eady, S.P., Barguer, I.A., Lejambre, L.F., Banks, D.J., Windon, R.G. (1996):** The value of circulating eosinophil count as a selection criteria of resistance of sheep to thichostrongyle parasites. *Int. J. Parasitol.* 26, 123–126.
  - **Yanming, S., Ruofeng, Y., Muleke, C.I., Guangwei, Z., Lixin, X., Xiangrui, L. (2007):** Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29, 319–26.
  - **Yatsuda, A.P., Krijgsveld, J., Cornelissen, A.W.C.A., Heck, A.J.R., de Vries, E. (2003):** Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem.* 278, 16941–16951.
  - **Yazwinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Morgan, G.W., Linnerud, A.C. (1979):** Parasite resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. *Journal of Animal Science.* 49, 919–926.
  - **Yazwinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Morgan, G.W., Linnerud, A.C. (1981):** *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. *Journal of Animal Science.* 51, 279–284.
  - **Yong, W.K., Edwards, L.D., Hucker, D.A. (1985):** Peripheral blood white cell responses during concurrent copper deficiency and gastro-intestinal nematodiasis

---

in sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 63, 273-281.

- **Yong, W.K., Saunders, M.J., Morton, R. E., Hermon, M. Mcgillivery, D.J., Hooper, I.J., Morgan, P., Riffkin, G.G., Cummins, L.J., Thompson, R.M. (1991).** Immunology of *Ostertagia* resistance. En: Gray, G. D. & Woolaston, R. R. (Eds.). Breeding for Disease Resistance. Melbourne. *Australian Wool Corporation*.
- **Yoshida T., Ikuta K., Sugaya H., Maki K., Takagi M., Kanazawa H., Sunaga S., Kinashi T., Yoshimura K., Miyazaki J., Takaki S., Takatsu K. (1996):** Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity* 4, 483-94.
- **Young, A.R, Meeusen, E.N. (2004):** Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J.* 19, 601-6.
- **Young, C.J., Mc Keand, J. B., Knox, D.P. (1995):** Proteinases released in vitro by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta* an ovine abomasal nematode. *Parasitology* 110, 465-471.
- **Young, A.R., Barcham, G.J., Kemp, J.M., Dunphy, J.L., Nash, A., Meeusen, E.N.T. (2009):** Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconj.* 26, 423-432.
- **Zhao, A., McDermott, J., Urban, J.F., Gause, W., Madden, K.B., Yeung, K.A., Morris, S.C., Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T. (2003):** Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol.* 171, 948–954.