

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

***Caracterización de la proteína recombinante rHc23
y mejora de su capacidad inmunizante frente a la
hemoncosis ovina***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Elena González Sánchez

Directores

Montserrat Cuquerella Ayensa

José María Alunda Rodríguez

Madrid, 2019

A mi tía Mari

A mis padres

A mis hermanos

*“La humanidad también necesita soñadores,
para quienes el desarrollo de una tarea sea tan
cautivante que les resulte imposible dedicar su
atención a su propio beneficio”*

Marie Curie

Agradecimientos

Muchos años han pasado desde que entré por primera vez en este laboratorio en el que ahora me encuentro escribiendo estas últimas frases de mi tesis, y muchas las experiencias vividas. En ellas he aprendido no solo lo que plasmo en esta tesis, sino un gran aprendizaje personal que no se enseña en los libros. Y ahora, tras este largo recorrido cargado de buenos y malos momentos, las mayores alegrías y las más profundas decepciones, aquí me hallo, en esta silla, sin saber por dónde empezar a agradecer a toda la gente que me ha ayudado académicamente durante estos años y sin poder olvidarme de quienes me han apoyado incondicionalmente día y noche.

A las primeras personas que quiero agradecer esta tesis es a mis tutores José María Alunda y Montserrat Cuquerella, quienes, sin su ayuda y conocimientos, no hubiese sido posible. A Alunda, por haberme apoyado cuando más lo he necesitado, por su paciencia y disponibilidad, por su alta valía profesional y personal, y por haber compartido conmigo este camino. A Montse, quien tanto ha creído en esta vacuna y quien ha sabido inculcarme ese sentimiento. Quien no ha dudado ni un momento en calzarse unas botas y un mono cuando lo he necesitado. Por su apoyo frente a todas las adversidades. A todo el grupo de investigación ICPVet, por haber estado siempre que les he necesitado. En especial a Concha de la Fuente, por todos sus consejos y su gran ayuda. A Chus y Shaima, con las que he compartido los momentos más duros de esta tesis pero también los más felices. Esos días de horas interminables de trabajo que siempre acababan con una dosis de energía de risas y canciones. Y a Lola y Anabel, por compartir conmigo esos ratos de comidas y cafés, instantes de aire fresco y relajación que tanto he disfrutado. Y por dejarme ser vuestra guía del ocio de Madrid.

A los alumnos internos María García, Pablo Feijoo, Millán Frías, Sergio Álvarez, Marta Pezzella, Ester Gómez, Marta García, Sonia Domínguez, Laura González, Pablo Gómez, Álvaro Betancor, Alejandro Salvador, Lara Prado y Marina Pérez, no solo por haberme ayudado con el manejo de los animales sino por haber sido capaces de sacarme una sonrisa todas las mañanas, a 0°C o a 40°C.

Quisiera agradecer a la Facultad de Veterinaria de la UCM por aceptarme para la realización de mis estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Y en especial al Departamento de Sanidad Animal y a todos sus integrantes, por su ayuda material y apoyo recibido. Y a Reyes, por estar siempre ahí para solucionarnos todas las dudas y problemas, gracias por hacernos más fácil el trabajo del día a día.

Al laboratorio de Genética de nuestra Facultad de Veterinaria, UCM, Por su inestimable colaboración en este trabajo.

A todo el personal de la Granja de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria, en especial a Mariano y a Ito, quienes han estado siempre ahí para ayudarme, facilitándome enormemente el trabajo con los animales. Trabajo que requiere de un gran esfuerzo físico y que gracias a vosotros he podido realizar, ya fuera ayudándome a mover unas pacas de paja como arreglando una fuga de agua. Y a Jesús, por la limpieza de los animales durante todos estos años y por estar siempre que lo he necesitado.

A la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y en especial a todos sus integrantes, Dra. Mercedes Domínguez, Dr. Alfredo Toraño y Dra. Inmaculada Moreno, sin poderme olvidar de Ana y Sole. Gracias por haberme enseñado a trabajar con *Leishmania* spp., y sobre todo por vuestro tiempo, generosidad y paciencia.

Al profesor Stefano Mangani de la Universidad de Siena y a Cecilia, por la ayuda prestada y su tenacidad para la caracterización de esta proteína.

También me gustaría agradecer la colaboración del matadero de Villarejo de Salvanés (Madrid), siempre dispuestos a ayudarnos en la toma de muestras y empatizando con nosotros en el sacrificio de nuestros animales.

Quisiera agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación parcial de esta tesis gracias a la concesión del proyecto AGL2014-54049-R.

Esta tesis se la quiero agradecer de manera muy especial a toda mi familia. A mis padres, por haberme apoyado durante todos estos años de duro trabajo y no presionarme en ninguna toma de decisiones. Por haber hecho posible mi acceso a una buena formación académica y haberme inculcado la cultura desde pequeña, pero sobre todo por haberme preparado para ser una buena persona por encima de todo. Por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue, y que en esta vida nadie te regala nada. Por enseñarme a encontrar la felicidad en las pequeñas cosas de la vida, por todo el amor que me habéis dado y todos los sacrificios que habéis hecho por mí y mis hermanos. No podríamos haber tenido unos padres mejores.

A mis hermanos Cristina y Pablo. Me faltan palabras para poder agradeceros todo lo que me habéis dado, todo lo que me habéis enseñado y todos los buenos y malos momentos que hemos compartido juntos. Me habéis cuidado como hermanos mayores y apoyado como mejores amigos en todos los pasos que he dado. Me habéis enseñado a levantarme cuando me he caído y me habéis guiado cuando no he sido capaz de hacerlo sola. Sois ese apoyo incondicional del que mucha gente carece y que por suerte yo tengo por partida doble en forma de hermanos.

A David, mi Ave Fénix. Por muchos escalones que nos ponga la vida, siempre sacaremos fuerza para subir el siguiente peldaño. Y lo hemos dejado más que demostrado este último año.

A mis sobrinos Ariadna y Víctor, que con una sonrisa o una de sus elocuencias hacen que un día malo se transforme en bueno sin darse cuenta. A mis cuñados, no solo por hacer felices a mis hermanos, si no por dejarme compartir esa felicidad con ellos. A todos mis familiares, en especial a mis tías, por vuestro apoyo, una ayuda que nunca falla y un amor siempre presente. Quienes tantos rezos han dedicado a mí y a este trabajo. Aquí tenéis el resultado de todas esas peticiones. Abuelilla, tú que tanto has rezado con ellas durante estos años, por desgracia no has podido ver el resultado de todo este esfuerzo, pero sé que estarías muy orgullosa de tu nieta. No podría haber tenido una abuela mejor. A mi abuela Mercedes, nunca te olvidaré. Ojalá hubiese tenido tu apoyo en este duro camino, lo he echado mucho en falta.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado. En especial a las “Vets” y a “las del cole”, con las que he ido creciendo en todos los aspectos de la vida y con las que tantas experiencias me quedan por vivir.

Y esta tesis se la quiero dedicar de una manera muy especial a mi tía Mari. Me has abandonado justo al final de este largo camino, y sé lo orgullosa que hubieses estado de mí. Has sido un pilar todos estos años, una segunda madre, y parte de lo que soy es gracias a ti. Has sido un amor incondicional y dejás en mi recuerdo millones de momentos especiales, pero un vacío que no encuentra consuelo por todos los momentos que nos han quedado por vivir juntas. Te quiero y siempre te querré.

A todos y cada uno de vosotros, muchísimas gracias.

Índice

ÍNDICE	i
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: Revisión bibliográfica y objetivos	5
1. Nematodosis gastrointestinales. Hemoncosis ovina	7
1.1. Etiología y ciclo biológico	8
1.2. Mecanismos patogénicos y formas clínicas	12
2. Respuesta frente a las helmintosis	14
2.1 Respuesta inmunitaria frente a las helmintosis. Resistencia innata y respuesta adaptativa	15
2.2 Respuesta del ganado ovino a <i>H.contortus</i>	20
2.3 Factores que influyen en la respuesta del ganado ovino a <i>H.contortus</i>	21
2.3.a. Influencia de la edad	21
2.3.b. Influencia de la raza	22
2.3.c. Influencia del estado fisiológico de los animales	23
3. Sistemas de control: Quimioterapia	23
3.1 Resistencia antihelmíntica	25
3.2. Manejo de la resistencia antihelmíntica	26
4. Sistemas alternativos de control	28
5. Inmunización frente a la hemoncosis	31
5.1. Inmunización con antígenos privados u ocultos	32
5.2. Inmunización con antígenos públicos	35
5.3. Inmunización con antígenos recombinantes	36
6. Modelos experimentales de las infestaciones por <i>H.contortus</i> : valor y limitaciones	38
7. Referencias	40
8. Objetivos	57
CAPÍTULO 2: LPS de <i>E.coli</i> y <i>Propionibacterium acnes</i> inactivado inducen una respuesta protectora parcial en primoinfestaciones por <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	59
2.1. Resumen	61
2.2. Introducción	62
2.3. Material y métodos	63
a. Parásitos	63

b.	Ratones y diseño experimental	63
c.	Enzimoimmunoensayo (ELISA) y Western Blot	64
d.	Linfoproliferación	65
e.	Estudio histológico	65
f.	Análisis estadístico	66
2.4.	Resultados	66
a.	Recuento fecal de huevos	66
b.	Respuesta de anticuerpos frente a <i>H.polygyrus</i> (ELISA y WB)	67
c.	Carga parasitaria y respuesta linfoproliferativa local	68
d.	Estudio histológico	70
2.5.	Discusión	72
2.6.	Referencias	73

CAPÍTULO 3: La coinfección por *Leishmania* visceral agrava la

	respuesta frente a <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	77
3.1.	Resumen	79
3.2.	Introducción	80
3.3.	Material y métodos	81
a.	Parásitos	81
b.	Ratones, diseño experimental y seguimiento	81
c.	Antígenos	82
d.	Linfoproliferación	83
e.	Enzimoimmunoensayo (ELISA)	83
f.	Análisis estadístico	84
3.4.	Resultados	84
a.	La coinfección por <i>L.infantum</i> provoca una mayor eliminación fecal de huevos en ratones infestados con <i>H.polygyrus</i>	84
b.	La coinfección con <i>L.infantum</i> no afecta al establecimiento de <i>H.polygyrus</i> aunque aumenta la supervivencia del helminto	85
c.	La esplenomegalia en los ratones coinfectados se relaciona con la infestación por <i>H.polygyrus</i>	86
d.	La inmunosupresión inespecífica inicial provocada por <i>H.polygyrus</i> no es afectada por la coinfección con <i>L.infantum</i>	87
e.	La coinfección con <i>L.infantum</i> incrementó la respuesta de	

anticuerpos frente a <i>H.polygyrus</i>	89
3.5. Discusión	90
3.6. Referencias	94
CAPÍTULO 4: Caracterización de la proteína nativa Hc23 y recombinante rHc23	97
4.1. Resumen	99
4.2. Introducción	100
4.3. Material y métodos	101
a. Caracterización de las proteínas Hc23 y rHc23 mediante electroforesis de dos dimensiones y secuenciación por espectrometría de masas (“huella peptídica”)	101
b. Estudio cristalográfico preliminar de rHc23	102
4.4. Resultados y discusión	103
a. Caracterización de las proteínas Hc23 y rHc23 mediante electroforesis 2D y secuenciación por espectrometría de masas (“huella peptídica”)	103
b. Estudio cristalográfico de rHc23	109
4.5. Referencias	110
CAPÍTULO 5: Vacunación de corderos frente a <i>Haemonchus contortus</i> con la proteína recombinante rHc23. Efecto del adyuvante y la dosis de antígeno	113
5.1. Resumen	115
5.2. Introducción	116
5.3. Material y métodos	117
a. Extracto soluble de adulto de <i>H.contortus</i>	117
b. Producción de la proteína recombinante rHc23	118
c. Parásitos	118
d. Corderos y diseño experimental	118
e. Seguimiento, punto final y criterios de eficacia	120
i. Muestras de sangre	120
ii. Enzimoimmunoensayo (ELISA) y Western Blot	120
iii. Determinaciones parasitológicas	121
iv. Criterios de eficacia	121
f. Análisis estadístico	121

5.4.	Resultados	122
a.	Respuesta sérica de anticuerpos	122
b.	Recuento de eosinófilos y valor hematocrito (PCV)	124
c.	Eliminación fecal de huevos	124
d.	Carga parasitaria adulta en abomaso	126
5.5.	Discusión	127
5.6.	Referencias	131
CAPÍTULO 6: Protección parcial de corderos frente a infestaciones seriadas por <i>Haemonchus contortus</i> con la proteína recombinante rHc23		135
6.1.	Resumen	137
6.2.	Introducción	138
6.3.	Material y métodos	139
6.4.	Resultados	141
6.5.	Discusión	144
6.6.	Referencias	147
CAPÍTULO 7: Discusión global y conclusiones		151
1.	Producción ovina y hemoncosis	153
2.	Valor del modelo <i>Heligmosomoides polygyrus</i> -ratón en el estudio de las relaciones helminto gastrointestinal-ganado ovino. Papel protector del inmunomodulador (Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> + <i>Propionibacterium acnes</i>)	154
3.	Las coinfecciones (Protista - helminto) agravan el curso de las infestaciones por <i>H.polygyrus</i>	156
4.	La proteína recombinante rHc23. Caracterización	158
5.	La protección inducida por rHc23 frente a la hemoncosis es dependiente del adyuvante empleado	161
6.	La inmunización con rHc23 induce una protección parcial en corderos sometidos a infestaciones seriadas con <i>H.contortus</i>	164
7.	Referencias	167
8.	Conclusiones	175
RESUMEN / SUMMARY		177

Introducción

Introducción

El ganado ovino es una de las especies importantes de animales domésticos en todo el mundo. Esta especie, adaptada por el hombre para su explotación en una gran variedad de climas y localizaciones, es muy eficaz en el aprovechamiento de pastos de reducida productividad y su transformación en productos de alta calidad tales como carne, leche, lana y cueros. En la mayoría de los países el ganado ovino es producido en sistemas extensivos por lo que los animales se encuentran expuestos a lo largo de su vida a parasitosis ligadas a los pastos, entre ellas las nematodosis gastrointestinales.

Haemonchus contortus, nematodo gástrico, es considerado por la FAO el helminto más relevante de este ganado y responsable de alrededor del 15% de todas las pérdidas económicas del sector. Su distribución es cosmopolita y está presente en todas las explotaciones incluyendo regiones septentrionales aunque las infestaciones son más prevalentes en áreas subtropicales. Las infestaciones por este helminto afectan a todas las edades pero las parasitosis más graves se presentan en corderos, tras el destete, con muerte de los animales en su presentación aguda o hiperaguda. Por su parte, en el ganado adulto, las infestaciones tienen un curso crónico con disminución de la producción y actúan como reservorios.

El control de la hemoncosis se ha basado casi exclusivamente en el uso de antihelmínticos, generalmente de amplio espectro. Sin embargo, los regímenes terapéuticos inadecuados junto con el potencial biótico de *H. contortus* han provocado que la resistencia antihelmíntica frente a todos los fármacos disponibles se haya generalizado. Además, la estructura y evolución del sector han provocado que en áreas menos desarrolladas, el coste del control medicamentoso de esta parasitosis no sea asumible. A estos hechos debe unirse la creciente preocupación social sobre la presencia de moléculas con actividad farmacológica en el medio.

En estas condiciones, y en paralelo con otros sistemas no medicamentosos, la inmunoprofilaxis podría ser una adecuada alternativa en el control integrado de la hemoncosis. Nuestro grupo identificó un antígeno de adultos de *H. contortus* con potencial valor inmunoproláctico frente a la hemoncosis y se elaboró una forma recombinante de la misma. Sin embargo, la información sobre esta proteína

recombinante era limitada y su potencial en la vacunación de corderos solo fue ensayado de forma preliminar. Por otra parte, el coste humano y material de los ensayos en ganado ovino limitaba la exploración de algunos aspectos de la respuesta inmunitaria frente al helminto.

En nuestro trabajo hemos pretendido valorar el potencial valor de modelos parásito-hospedador subrogados, profundizar en la caracterización de la proteína recombinante rHc23, y determinar su valor inmunoproláctico, en condiciones controladas, considerando dosis antigénicas, adyuvantes y modalidades de infestación de los corderos.

Capítulo 1

Revisión Bibliográfica y Objetivos

1. Nematodosis gastrointestinales. Hemoncosis ovina

La hemoncosis es una enfermedad parasitaria de ganado ovino y caprino causada por el nematodo gástrico *H. contortus*. Este helminto hematófago tiene una distribución cosmopolita aunque es más prevalente en regiones tropicales y subtropicales, siendo frecuentes Australia, EE.UU., Sudáfrica, Brasil, Argentina, Uruguay, India, sudeste asiático y África central y subsahariana (Meradi et al., 2011; Fitzpatrick, 2013).

En Europa está presente en más de la mitad de todas las explotaciones de ganado ovino (Rinaldi et al., 2015) y se ha observado incluso en el norte de Europa (ej. Escandinavia) (Waller y Chandrawathani, 2005b; Rose et al., 2016). El signo principal en las infestaciones elevadas es la anemia. Otras características son la pérdida de peso y disminución de la producción, siendo la causa de un alto número de muertes, particularmente en animales jóvenes infestados (Soulsby, 1987). Dada su ubicuidad y alto poder patógeno, se le considera el tricostrongílido más importante de pequeños rumiantes (Nisbet et al., 2016). La mayor parte de las infestaciones por nematodos gastrointestinales de rumiantes, y de forma particular de ganado ovino y caprino, son pluriespecíficas estando involucrados, además de *H. contortus*, otras especies del género *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus* y otros (Zajac, 2006).

La ubicación de estas especies en el hospedador y su patogenia son diferentes en dependencia de la/s especie/s presente/s y de la intensidad de las infestaciones. Por ello, las estimaciones de la repercusión económica de estas parasitosis y de la hemoncosis, en particular, son dificultosas. No obstante, los nematodos gastrointestinales son una de las principales limitaciones de la producción ovina, causando un descenso en la producción de carne, leche o lana en infestaciones crónicas, así como la muerte de animales en infestaciones agudas. La disminución de la ganancia de peso vivo oscila entre el 10 y el 47% (pudiendo alcanzar hasta un 60%), siendo la producción de lana la menos afectada (0% - 21%). A estas pérdidas económicas hay que añadirle los costes de profilaxis y tratamiento así como el crecimiento reducido de corderos nacidos de madres infestadas con menor producción láctea y los gastos diagnósticos y veterinarios (Fitzpatrick, 2013; Charlier et al., 2014; Mavrot et al., 2015). Hace más de 20 años, se estimaba que el control de los nematodos gastrointestinales le suponía a la industria ganadera mundial un coste de alrededor de 1.000 M£ anuales

(Newton y Munn, 1999). En el caso concreto del ganado ovino, en Australia se estima que las nematodosis gastrointestinales suponen entre 240 y 280 M€ anuales (Sackett et al., 2006, Lane et al., 2015). Hace más de una década los costes anuales invertidos solo en el tratamiento de la hemoncosis ascendían a 103 M USD en India, 46 M USD en Sudáfrica y 26 M USD en Kenia (Waller y Chandrawathani, 2005b).



Figura 1.

Sello de los servicios postales de la República de Cuba ilustrando el ciclo biológico de *Haemonchus* spp.

1.1. Etiología y ciclo biológico

El género *Haemonchus* (Cobb, 1898) (Nematoda: Trichostrongylidae) se originó, probablemente, en África como parásito de antílopes. Su adaptación a distintas especies de rumiantes silvestres y domésticos habría dado lugar, a través de la especiación, a las especies actuales del género. La diferenciación de las especies del género mediante estudios morfológicos de los helmintos adultos (espículas, bolsa copuladora, sinlofio) o de larvas (longitud de la cola, longitud total, morfología cefálica, número de células intestinales, entre otras características) identificó nueve especies válidas (Gibbons, 1979). La aplicación de técnicas moleculares (ITS-2) ha permitido distinguir 12 especies de *Haemonchus* en 40 hospedadores diferentes (Hoberg y Zarlenga, 2016; Zarlenga et al., 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Haemonchus* reconocidas y hospedadores a los que afectan (Hoberg y Zarlenga, 2016).

<i>Haemonchus</i> spp.	Hospedadores	
<i>H.contortus</i> (Rudolphi, 1803)	Camelidae	Peleinae
<i>H.placei</i> (Place, 1893)	Suidae	Reduncinae
<i>H.similis</i> (Travassos, 1914)	Tayassuidae	Aepycerotinae
<i>H.longistipes</i> (Railliet y Henry, 1909)	Tragulidae	Antolipini
<i>H.mitchelli</i> (Le Roux, 1929)	Antilocapridae	Neotragini
<i>H.bedfordi</i> (Le Roux, 1929)	Giraffidae	Alcelaphinae
<i>H.vegliali</i> (Le Roux, 1929)	Cervidae	Hippotraginae
<i>H.lawrencei</i> (Sandground, 1933)	Moschidae	Pantholopinae
<i>H.okapiae</i> (Van der Berghe, 1937)	Bovini	Caprini
<i>H.krugeri</i> (Ortlepp, 1964)	Boselaphini	Ovibovini
<i>H.dinnik</i> (Sachs, Gibbons y Lweno, 1973)	Tragelaphini	Rupicaprini
<i>H.horaki</i> (Lichtenfels et al., 2001)	Cephalophinae	

Se admite que la especificidad de hospedador de este género no es muy estricta y depende en buena medida de los hospedadores disponibles. Así, las especies del género *Haemonchus* pueden ser generalistas (capacidad de infestación de diversos hospedadores) como *H.contortus* o especialistas (especificidad de hospedador muy estricta) como *H.dinniki* o *H.horaki* (Hoberg y Zarlenga, 2016). Por otra parte, son frecuentes las infestaciones por varias especies de *Haemonchus* en un mismo hospedador. Esta especificidad está, además, influida por las condiciones ambientales. Las especies de este género han experimentado un proceso de adaptación para

sobrevivir en condiciones climáticas desfavorables. Por ello, en regiones semiáridas, son comunes las infestaciones cruzadas por especies de este género (Achi et al., 2003; Akkari et al., 2013), mientras que en situaciones climatológicas óptimas la especificidad de hospedador es mayor (siendo poco comunes las infestaciones cruzadas) (Brasil et al., 2012).

Las especies más abundantes son *H. placei*, que afecta de forma preferente a bovinos y, especialmente *H. contortus*, presente en ganado ovino y caprino, aunque se pueden presentar infestaciones mixtas (Fávero et al., 2016). Las migraciones animales y el transporte por el hombre de los animales domésticos ha dado lugar a su distribución actual (Santos et al., 2014). Asimismo, los sistemas de producción intensivos han provocado una mayor exposición de los hospedadores como consecuencia de la concentración de animales en los rebaños, del mayor número de animales receptivos (hembras gestantes, en lactación y animales jóvenes o con déficit nutricional) y de la restricción del movimiento del ganado (Waller, 2005a).

Los adultos de *H. contortus* son nematodos cilíndricos de cuerpo fino. La epidermis presenta 4 invaginaciones longitudinales hacia el pseudoceloma que forman 4 cordones hipodérmicos: dorsal y ventral donde se localizan los cordones nerviosos y dos laterales con los conductos excretores. Estos cordones separan las fibras musculares longitudinales en cuatro bandas. En el extremo anterior posee una lanceta bucal y dos papilas cervicales. La hembra (20-30 mm) presenta solapa vulvar y los úteros de color blanco enrollados alrededor del intestino rojizo, consecuencia de la ingesta de sangre en el proceso de alimentación, lo que le da el nombre de “barber pole” (Soulsby, 1987; Angulo-Cubillán et al., 2007).



Figura 2.

Hembra de *Haemonchus contortus*. Intestino de color rojo por la hematofagia (Gilleard Lab. - University of Calgary).

Los machos miden 10-20 mm y presentan una bolsa copuladora formada por dos lóbulos laterales y un lóbulo dorsal asimétrico más pequeño en el que se identifica un radio en forma de “Y”. Poseen dos espículas cuyo tamaño y forma permite la diferenciación entre especies. Los huevos, de forma elíptica y polos aplanados, miden 70x55 μm y poseen en su interior numerosos blastómeros (Soulsby, 1987; Bowman, 2014).

Su ciclo biológico es directo y la infestación tiene lugar por vía oral (Figura 3). La alta fertilidad de las hembras (5.000-10.000 huevos/hembra/día) ocasiona una rápida contaminación de los pastos. Los huevos son excretados a través de las heces y la larva 1 (L1) eclosiona en el medio, que muda a larva 2 (L2). Ambas fases larvianas preinfestantes se alimentan de las bacterias presentes en el contenido fecal. En condiciones óptimas de temperatura y humedad (25-26°C, >85% humedad relativa), la L2 muda a larva de 3^{er} estadio (L3), que es la fase infestante para el hospedador. La L3 es una larva envainada que mantiene la cutícula de la L2 para protegerse de las condiciones ambientales desfavorables y de la acción enzimática en el tracto digestivo del hospedador, lo que imposibilita su alimentación. El periodo de desarrollo de huevo a L3 es variable, de una semana a varios meses en dependencia de las condiciones climatológicas. La L3 migra a la parte apical del pasto y, una vez ingerida por el hospedador, pierde la cutícula como consecuencia de los altos niveles de CO₂ y temperatura elevada del animal. La larva invade la mucosa del abomaso y muda a larva 4 (L4) y estas a larva 5 (L5) o preadultos, que emergen de la mucosa y, tras un proceso de maduración, dan lugar a los adultos y comienza la puesta de huevos. El periodo de prepatencia es de 17 a 21 días (Bowman, 2014).

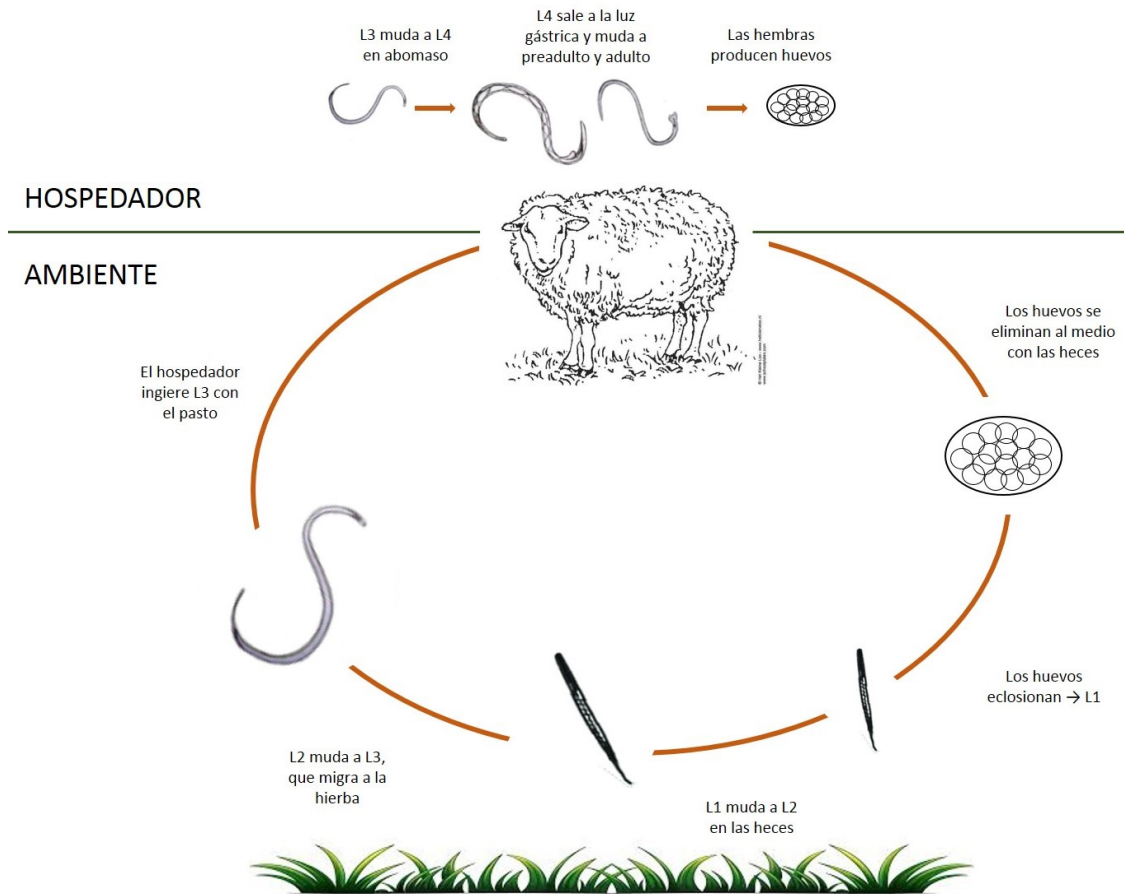


Figura 3.

Ciclo biológico de *H. contortus*.

1.2. Mecanismos patogénicos y formas clínicas

En general, las tricostrongilidosis provocan un estado de malnutrición en el hospedador con pérdida de apetito, adelgazamiento, letargia, alteraciones en la función gastrointestinal y disminución del metabolismo energético, de proteínas y de minerales. En el caso de la hemoncosis, el mecanismo patogénico principal se debe a la hematofagia. Las fases preadultas y adultas se alimentan de sangre e ingieren *ca.* 50 μ L de sangre/parásito/día, lo que puede suponer en infestaciones bien establecidas 1/5 de los eritrocitos circulantes totales en corderos y 1/10 en ovejas adultas (Bowman, 2014). Si la carga parasitaria es elevada, se produce una fuerte caída en los valores de hematocrito, palidez de mucosas y ulceración de la pared del abomaso con lesiones hemorrágicas en la región de la mucosa gástrica fúndica. En infestaciones agudas, esta anemia puede llegar a ser grave y provocar la muerte del animal, principalmente en

animales jóvenes (Coop y Kyriazakis, 2001; Bowman, 2014). El edema es un signo habitual en la hemoncosis y con frecuencia se suele apreciar en los animales vivos a nivel submandibular. En la necropsia los animales muestran líquido en tejido, con acumulación de fluidos en cavidad peritoneal (ascitis) y torácica (hidrotórax).

H. contortus es un patógeno primario capaz de provocar cuadros clínicos *per se*. No obstante, existe una gran variedad de presentaciones clínicas en los animales infestados en dependencia de las condiciones ambientales, de la intensidad y duración de la infestación y de características individuales del hospedador tales como la edad, su estado fisiológico y la resistencia genética (Besier et al., 2016). De forma genérica se suelen distinguir tres tipos de presentaciones clínicas: hiperaguda, aguda y crónica. La forma *hiperaguda* es la menos común.

Se produce fundamentalmente en los trópicos, donde las condiciones climáticas de temperatura y humedad son óptimas para el desarrollo de un alto número de fases infestantes del parásito en el ambiente. Se presenta en animales jóvenes y en ovejas durante el periodo periparto. Estos animales sufren una infestación masiva en un corto intervalo de tiempo que produce la muerte súbita del animal en el periodo prepatente. No suelen llegar a evidenciar signos clínicos, pudiéndose observar una anemia grave y gastritis hemorrágica intensa, relacionadas con un número elevado de helmintos adultos y formas inmaduras en abomaso. Por su parte, se consideran *formas agudas* a las presentes en animales jóvenes expuestos a altas cargas infestantes pero menos intensas que en las formas hiperagudas. La mortalidad es inferior y los signos clínicos son muy variables, siendo la anemia el principal. Como consecuencia se produce una hipoproteinemia con edemas subcutáneos. Por último, las *formas crónicas* son las más frecuentes y de carácter esencialmente económico. Se presentan especialmente en animales adultos sometidos a bajas dosis infestantes mantenidas en el tiempo. Se produce un cuadro subclínico con anorexia, menor ganancia de peso vivo, caída progresiva de lana y una disminución en la producción láctea. La anemia, gastritis hiperplásica, edema submandibular y palidez de mucosas son menos evidentes que en las formas anteriores, así como menores cargas parasitarias (100-1.000 parásitos) y escasa mortalidad (Soulsby, 1987).

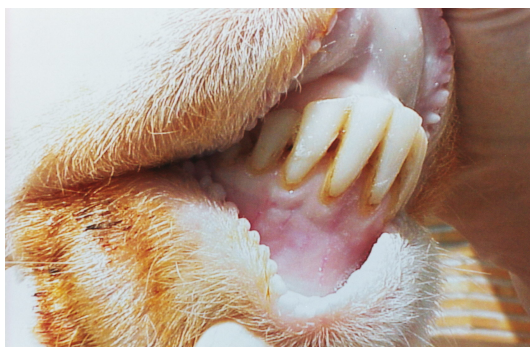


Figura 4.

Palidez de mucosas de corderos infestados por *H. contortus*. Imágenes ICPVet, UCM.

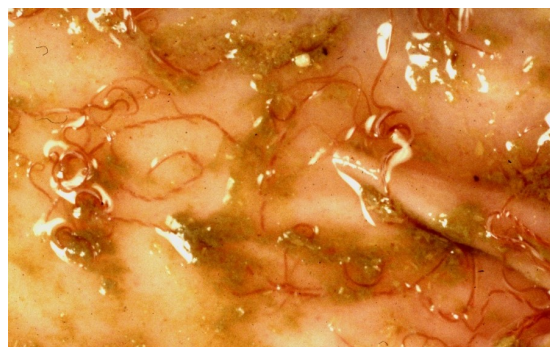


Figura 5.

Adultos de *H. contortus* en abomaso de corderos. Imágenes ICPVet, UCM.

2. Respuesta frente a las helmintosis

La respuesta desarrollada por el hospedador frente a una parasitosis, entre ellas las nematodosis gastrointestinales, es multifactorial incluyendo la respuesta inmunitaria así como su capacidad de resistencia fisiológica frente a la agresión. Ambos fenómenos suelen aparecer de forma simultánea en el curso de una infestación por helmintos, pero representan diferenciales sustanciales. La capacidad de respuesta fisiológica de un hospedador para compensar las alteraciones patológicas provocadas por las parasitosis manteniendo los parámetros productivos en la normalidad suele denominarse *resiliencia*. Por su parte, el término *resistencia* se reserva para el proceso que conlleva el inicio y mantenimiento de una respuesta inmunitaria protectora que previene, reduce o elimina la infestación así como la regulación del tamaño o fecundidad del parásito, pudiendo controlar de esta manera la población parasitaria (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). En este apartado nos centraremos especialmente en la resistencia desarrollada por el ganado ovino frente a las infestaciones por helmintos y, de forma particular, por *H. contortus*.

2.1. Respuesta inmunitaria frente a las helmintosis. Resistencia innata y respuesta adaptativa

Los nematodos parásitos, con independencia de la complejidad de sus ciclos biológicos (CB), se reproducen sexualmente en su hospedador (CB directo) u hospedador definitivo (CB indirecto), eliminando huevos/larvas que deben ser transferidos al medio o a otro hospedador. Así, el número máximo de adultos en un hospedador será siempre igual o menor que el de las formas infestantes ingresadas. Además de ello, y como consecuencia de la coevolución parásito-hospedador, se ha alcanzado en numerosas ocasiones un equilibrio en la respuesta inmunitaria beneficioso para ambos elementos del binomio. De manera contraria a lo que ocurre en infecciones bacterianas o víricas, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria que controla al parásito sin llegar a eliminarlo por completo, provocando infestaciones crónicas asintomáticas o subclínicas en la mayoría de los casos, a la vez limita el daño que produce el parásito y mantiene la capacidad de responder frente a otros patógenos. De este modo, el parásito mantiene vivo al hospedador el tiempo suficiente para completar su ciclo de vida (Maizels et al., 2012).

En infestaciones por nematodos gastrointestinales, la principal defensa del hospedador es el sistema inmunitario, con componentes tanto de la respuesta innata como adquirida. Tras un primer contacto con el parásito, se produce la activación de defensas no específicas de la inmunidad innata. Reconocidos los antígenos parasitarios, se inicia una respuesta específica adaptativa humoral y celular, que a su vez amplifica la respuesta inmunitaria innata. De esta manera se produce una compleja colaboración entre componentes del sistema inmunitario innato y adaptativo que puede llegar a neutralizar o eliminar la infestación (Anthony et al., 2007).

Dentro de la defensa inmediata inespecífica existen diferentes mecanismos y tipos celulares involucrados que, de manera general, favorecen la expulsión del parásito. Las funciones de esta respuesta innata comprenden: la *regulación de la respuesta inmunitaria* mediante la producción de citoquinas que promueven y amplifican una respuesta adaptativa de tipo Th2, disminuyendo las respuestas Th1 y Th17; la *reparación de la lesión tisular* provocada por los agentes parasitarios (Anthony et al., 2007); y el *control de la infestación*, induciendo la modificación de la función intestinal con hiperplasia celular que induce una mayor secreción de moco rico en mucina y de

moléculas bioactivas, intensificación del peristaltismo intestinal e inflamación con aumento de permeabilidad vascular y flujo sanguíneo local. Esta modificación de la fisiología intestinal provoca un daño directo a los helmintos, lo que se traduce en una reducción del crecimiento, motilidad y fertilidad parasitaria (Maizels et al., 2012).

Los principales tipos celulares implicados en la respuesta innata son eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos activados por la vía alternativa (MAA), neutrófilos y basófilos (Anthony et al., 2007). Los *eosinófilos* activados de manera innata producen un efecto independiente de los mecanismos adaptativos (IL-5). Para ello, las larvas activan la vía alternativa del complemento, uno de los principales mecanismos innatos desarrollados frente a las infestaciones por nematodos gastrointestinales. Los péptidos C3a y C5a inducen el aumento de eosinófilos en sangre, su movilización a abomaso y degranulación, produciendo su efecto citotóxico local así como la reparación de la lesión, remodelación tisular y la regulación de la respuesta inmunitaria (Meeusen y Balic, 2000; Hogan et al., 2008). Los péptidos C3a y C5a también inducen la activación de *mastocitos* (Stone et al., 2010), que aumentan y, al igual que los eosinófilos, actúan directamente sobre el parásito o a través de la modulación de la respuesta inmunitaria (Emery et al., 2016; Motran et al., 2018). Las *células dendríticas* procesan los antígenos parasitarios y los presentan a las células T iniciando una respuesta inmunitaria celular Th2 adaptativa. Los *macrófagos activados por la vía alternativa (MAA)*, estimulados por las citoquinas producidas por las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2s), también llamadas nuocitos o “natural helper” (IL-4 e IL-13), producen un aumento de arginasa 1, secretan citoquinas con función antiinflamatoria e inmunorreguladora (IL-10 y TGF- β) y son células efectoras directas en la resistencia a helmintos (Maizels et al., 2004; Jackson et al., 2009; Motran et al., 2018).

La primera línea de defensa de la respuesta innata frente a los nematodos gastrointestinales es la barrera intestinal de células epiteliales. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y asociados a peligro (DAMPs) son reconocidos por los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), sistema temprano de reconocimiento de patógenos que incluye los CLR (receptores de lectina tipo-C) y los TLRs (receptores Toll-like). Tras la infestación por el helminto, este es reconocido por los PRRs de las células epiteliales gastrointestinales, que liberan alarminas [IL-1, IL-25,

IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP)] e inician la respuesta inflamatoria (Hammad y Lambrecht, 2015; Motran et al., 2018). Las alarminas activan las ILC2s, que producen citoquinas de tipo Th2, siendo una fuente temprana de citoquinas, e inician los mecanismos efectores de la respuesta (Allen y Maizels, 2011; Hammad y Lambrecht, 2015; Grecis, 2015).

La inmunidad adquirida se desarrolla de manera específica con el tiempo y genera memoria inmunológica. Puede actuar sobre las diferentes fases de la infestación, provocando la expulsión del parásito, interfiriendo en su crecimiento o disminuyendo la fecundidad de las hembras (Miller y Horohov, 2006; Zaph et al., 2006; Lacroux et al., 2006; Ortolani et al., 2013). Los mecanismos celulares efectores son similares a los observados en la respuesta inmunitaria innata, pero activados de manera específica por anticuerpos desarrollados tras una respuesta protectora de tipo Th2. Las células T derivadas del timo, caracterizadas por la presencia de receptores TCR, juegan un papel fundamental en la respuesta celular. Las células presentadoras de antígeno procesan los antígenos parasitarios y migran a los linfonódulos regionales donde los presentan vía complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a las células T por medio de los receptores TCR. Se produce una liberación de citoquinas que impulsa la diferenciación de las células T nativas en células CD4⁺, células helper o células Th y su polarización hacia un tipo de respuesta u otra (Th1, Th2 o Treg) (Van Riet et al., 2007; Balic et al., 2009). El papel de la inmunidad humoral en la protección frente a nematodos gastrointestinales genera controversia, habiéndose relacionado numerosas inmunoglobulinas con la resistencia en ovejas: IgA, IgG e IgE (Ben-Smith et al., 1999; Miller y Horohov, 2006; Anthony et al., 2007; McRae et al., 2015).

Este esquema genérico de respuesta inmunitaria no necesariamente es funcional en todas sus ramas y en todos los casos, ni en todas las especies de helmintos parásitos o de hospedadores. El papel relativo de los mecanismos efectores implicados en cada caso particular es variable y de su integración dependerá la receptividad a un agente parasitario por parte de un hospedador, la tolerancia inmunitaria, el establecimiento de una relación parásito-hospedador en equilibrio inestable o bien el control inmunitario eficaz de la infestación. Por ello, es posible hallar respuestas muy diferentes en los mismos hospedadores a nematodos muy próximos (ej. *H. contortus* vs.

Te.circumcincta) (Emery et al., 2016), en dependencia del curso de la infestación (Boitelle et al., 2005) o del órgano diana (McClure et al., 1998), entre otros factores.

De manera general, se ha aceptado que la receptividad a los nematodos está ligada a una respuesta de tipo Th1, típica de infecciones por parásitos intracelulares, mientras que la resistencia se relaciona con un patrón de citoquinas Th2, tal y como ocurre en las infestaciones por *Heligmosomoides polygyrus* y *Nippostrongylus brasiliensis*. Este patrón dicotómico tan sencillo no refleja, sin embargo, la complejidad de la interacción helminto/hospedador y parece claro en la actualidad que el desarrollo de un tipo de respuesta no antagoniza el otro, pudiendo ocurrir de manera simultánea una respuesta Th1 y Th2 (Dahl et al., 2004; Boitelle et al., 2005). El desarrollo de la inmunología ha permitido conocer que estas variaciones de la respuesta están profundamente interrelacionadas. De esta forma se sabe que el principal mecanismo de regulación es desempeñado por las células Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) (Ohkura et al., 2013; Grecis, 2015). Estas células producen citoquinas supresoras IL-10 y TGF-β con efectos antiinflamatorios que previenen el desarrollo de fuertes respuestas inmunitarias frente al parásito, permitiendo su supervivencia durante largos periodos de tiempo y limitando la patología inducida. Este tipo de respuesta predominante de tipo Th2 con activación de células Treg, llamada *respuesta Th2 modificada*, se observa en primoinfestaciones por *H.polygyrus*, con fallo en la expulsión del helminto y la consecuente cronificación del proceso (MacDonald et al., 2002; Doligalska et al., 2006; Allen y Maizels, 2011).

De forma esquemática, la respuesta inmunitaria protectora frente a nematodos gastrointestinales incluye la producción de elevados niveles de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), eosinofilia periférica y local, mastocitosis en mucosa, hiperplasia de células caliciformes, leucocitosis y aumento de anticuerpos IgE, IgG e IgA (Figura 6) (Anthony et al., 2007; Nisbet et al., 2016). Además, se ha señalado el papel de otros tipos celulares en la producción de citoquinas para amplificar la respuesta de tipo Th2, como las células Be2 (Harris et al., 2005). Las citoquinas IL-4 e IL-13 promueven la contracción del músculo liso intestinal; un aumento de permeabilidad de células epiteliales; la activación de MAA (Anthony et al., 2007; Filbey et al., 2014); y la producción de IgE, que desencadena la degranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos (Stone et al., 2010). IL-13 estimula la hiperplasia de células caliciformes,

con aumento en la secreción de moco y producción de moléculas anti-helminthos, como el RELM- β (Motran et al., 2018). IL-5 promueve la eosinofilia (Anthony et al., 2007) y la síntesis de IL-9 el reclutamiento y activación de los mastocitos en la mucosa (Faulkner et al., 1997).

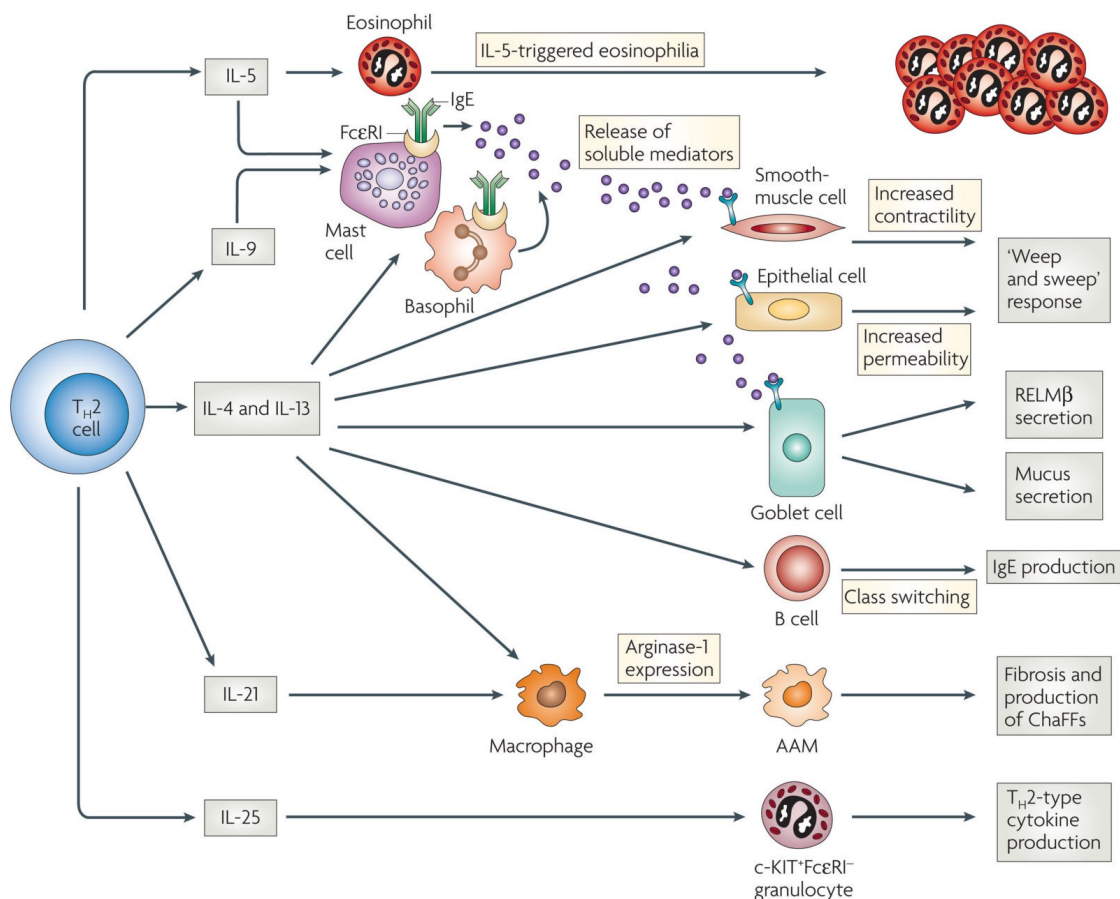


Figura 6.

Producción de citoquinas en la respuesta inmunitaria celular Th2 (Anthony et al., 2007). FcεRI: Receptor de alta afinidad para la región Fc de la IgE, AAM: Macrófagos activados por la vía alternativa, RELM β : Molécula similar a resistina- β (*resistin-like molecules*), ChAFFs: Proteínas de la familia de las quitinasas y FIZZ.

Los nematodos gastrointestinales pueden sintetizar y secretar sustancias inmunomoduladoras que pueden actuar sobre la respuesta innata o adaptativa, así como de manera directa o indirecta, bloqueando la inflamación producida por la respuesta Th1/Th17 o limitando las patologías resultantes de una respuesta Th2 excesiva. Dentro de estas moléculas encontramos la galectina, la cistatina y las proteínas VAL/ASP/SCP (McSorley et al., 2013). También se incluyen la superóxido dismutasa y la glutatión-S-

transferasa, que neutralizan los radicales libres de oxígeno liberados en el mecanismo de defensa del hospedador (Else, 2005). Por otra parte, la propia infestación provoca una respuesta de tipo Th2 modificada (Th2 + inmunorregulación por parte del hospedador) (*vide supra*).

2.2. Respuesta del ganado ovino a *H. contortus*

En condiciones naturales, el ganado ovino adulto es capaz de responder frente a las primoexposiciones y reinfestaciones por *H. contortus*. El tipo de respuesta es variable y depende de distintos factores tales como la raza, edad, estado nutricional, dosis infestante y el estatus inmunitario de los animales, entre otros. Con independencia de la respuesta adaptativa clásica, como consecuencia de las reinfestaciones de los animales, en las infestaciones por *H. contortus* se han descrito dos fenómenos cuya relación con el sistema inmunitario ha sido discutido: exclusión inmune y autocuración.

La *expulsión rápida/inmediata de larvas* o *exclusión inmune* se produce antes de que las formas larvarias se establezcan en la mucosa gástrica (<48 horas), dando lugar a una reacción local de hipersensibilidad de tipo I con presencia de mastocitos y altos niveles de leucocitos globulares. Es necesaria una estimulación antigénica previa para que se produzca la reacción y expulsión del parásito, con hipermotilidad del músculo abomasal, aumento del peristaltismo intestinal, mayor permeabilidad vascular y flujo sanguíneo local, hipersecreción gástrica, aumento en la producción de moco y un mayor número de células efectoras innatas (Balic et al., 2002; Meeusen et al., 2005; Miller y Horohov, 2006; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). Este mecanismo de expulsión rápida de L3, a pesar de presentar una base inmunitaria, es de carácter inespecífico ya que también puede producir la eliminación de otras especies de nematodos gastrointestinales establecidos en zonas adyacentes.

La *autocuración* fue descrita por Norman R. Stoll en 1929, en *H. contortus*, y consiste en la eliminación de la población adulta como consecuencia de una reinfestación. Ha sido descrita en otras especies de helmintos (ej. *N. brasiliensis*) y recibido distintas interpretaciones; entre ellas ha sido considerada como un sistema de control de poblaciones parasitarias. En la actualidad se estima que tiene una base

inmunitaria y que los sistemas efectores de esta expulsión de las poblaciones adultas de *H. contortus* son similares a los indicados para la exclusión inmune.

En el caso de una respuesta inmunitaria adaptativa, los mecanismos efectores pueden actuar tanto frente a las fases larvarias como frente a los adultos del helminto. Frente a las larvas, la respuesta incluye mecanismos de inmunidad innata y adquirida, con aumento de linfocitos T CD4⁺, elevación de los niveles de anticuerpos IgA e IgE, activación del complemento por la vía clásica, y el reclutamiento de eosinófilos y su implicación en mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Balic et al., 2002; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013; Nisbet et al., 2016). Cuando la inmunidad se desarrolla frente a estadios adultos, puede producirse la expulsión del parásito, una disminución en la eliminación de huevos basada en la reducción del número de hembras o de su fertilidad, o producirse cambios en la morfología parasitaria. Los mecanismos específicos involucrados en la eliminación de los estadios adultos no están completamente aclarados (Nisbet et al., 2016).

2.3. Factores que influyen en la respuesta del ganado ovino a *H. contortus*

La respuesta del ganado ovino frente a *H. contortus* y, eventualmente, del desarrollo de resistencia frente al helminto presenta una gran variabilidad y está relacionada especialmente con la edad de los animales, el genotipo de estos y su estado fisiológico, además de otros factores tales como la presencia de infecciones e infestaciones intercurrentes o, incluso, los sistemas de manejo por su impacto en la epidemiología de las infestaciones.

2.3.a. Influencia de la edad

De forma general los corderos, y en especial los machos (Barger, 1993), son más receptivos a las nematodosis gastrointestinales que los animales adultos, siendo incapaces de desarrollar una respuesta inmunitaria protectora y presentando, por ello, signos clínicos más notables. Esta dependencia de la edad, ya sea cronológica o metabólica (Greer y Hamie, 2016), en la respuesta de los animales se relaciona, principalmente, con el desarrollo y maduración del sistema inmunitario. Este proceso, iniciado en la vida fetal, se completa al año de vida. Los corderos pueden empezar a

mostrar capacidad de resistencia a partir de los 4 meses de edad (Santos et al., 2014). Esto puede ser consecuencia de una inmunidad celular deficiente, que tarda en desarrollarse en rumiantes al menos 6 meses, y los animales jóvenes carecen de una respuesta de tipo Th2 protectora presentando un menor número de mastocitos y eosinófilos a nivel local (Bethony et al., 2006).

No obstante, la capacidad de expulsión del agente por parte del hospedador depende de la especie parasitaria. Así, la resistencia natural frente a la hemoncosis se empieza a desarrollar ligeramente a partir de los 4 meses produciéndose una disminución gradual no específica de la carga parasitaria dependiente de la dosis infestante (Barger et al., 1985; Barger y Le Jambre, 1988). No obstante, hasta los 7 meses de edad no aparece una respuesta inmunitaria específica frente a la infestación, siendo más receptivos hasta el año de edad (Urquhart et al., 1966a, b). Este retraso en la capacidad de respuesta protectora no se observa en las infestaciones por otros tricostrongílidos próximos: los corderos son capaces de desarrollar una respuesta protectora parcial frente a *T.colubriformis*, a los 3 meses de edad (McClure et al., 1998), y frente a *Te.circumcincta*, a los 4 meses y medio (Smith et al., 1985).

2.3.b. Influencia de la raza

La oveja (*Ovis aries*) es una de las especies animales domesticadas más tempranamente, probablemente hace más de 6.000 años. El ganado ovino, desde su domesticación, ha sido explotado con objetivos multi-propósito (carne, leche, lana) en condiciones muy diversas (ej. recursos vegetales disponibles, climatología) y, como consecuencia, se han seleccionado un número elevado de genotipos/fenotipos bien adaptados a las condiciones particulares de explotación. Por ello, en la actualidad se reconocen según la FAO más de 1.300 razas bien establecidas. Existen evidencias que apuntan a la diferente resiliencia y resistencia inmunitaria de algunas razas a las infestaciones por *H.contortus*. Así, por ejemplo, se ha observado que la raza Merina es más resistente que la Rhön (Gauly et al., 2002); que los corderos de raza Red Maasai son más resistentes que los de raza Dorper (Mugambi et al., 1996); los de raza Santa Inés más que los de raza Île de France (Rocha et al., 2011); los de raza St. Croix más resistentes que los corderos Dorset (Gamble y Zajac, 1992); que la Canaria de Pelo es más resistente que la raza Canaria (Guo et al., 2016); o que existen variaciones notables

en la receptividad y capacidad de respuesta protectora en las razas Churra, Castellana o Manchega (Cuquerella et al., 1994; Gómez-Muñoz et al., 1999; Gómez-Muñoz et al., 2001). No obstante, se observa una gran variabilidad individual (Bambou et al., 2009).

2.3.c. Influencia del estado fisiológico de los animales

Durante el periodo de gestación y lactación se produce una “relajación periparto” de la inmunidad, con pérdida temporal de la inmunidad adquirida, como consecuencia de una priorización de las funciones de reproducción sobre la expresión de la inmunidad. Asimismo, el estado nutricional de los animales influye de forma relevante en el grado de resistencia (Coop y Kyriazakis, 1999, 2001; Rocha et al., 2011). Teniendo en cuenta la alteración de la digestión y metabolismo de proteínas, la menor ingestión de alimento, su priorización hacia la reparación del tejido dañado y el elevado gasto de nutrientes necesario para el desarrollo de una respuesta protectora, una suplementación de oligoelementos (cobre, zinc) (Schafer et al., 2015) y de proteínas facilita el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz frente a la hemoncosis, así como el mantenimiento de la homeostasis y de los índices productivos (Fox, 1997; Hoste et al., 2005; Miller y Horohov, 2006).

3. Sistemas de control: quimioterapia

El control de las nematodosis gastrointestinales en general, y de la hemoncosis en particular, se ha basado principalmente en el uso de antihelmínticos. Su alta eficacia (>99%) y seguridad han permitido durante décadas el control de las helmintosis de forma satisfactoria mediante tratamientos estratégicos. El desarrollo de antihelmínticos de amplio espectro fue espectacular en la segunda mitad del siglo XX. En la década de los '60 se introdujo en el mercado el tiabendazol, un benzimidazol, grupo químico al que pertenecen el albendazol, fenbendazol, oxfendazol y mebendazol y que incluye antiparasitarios eficaces, seguros y de fácil administración (Gordon, 1961; McKellar y Jackson, 2004). Sus precursores químicos, los probenzimidazoles, se emplean en algunos países pero el alto desarrollo de resistencias frente a ellos hace que se usen principalmente en combinación (Besier et al., 2016). Muchos de estos compuestos siguen en uso en la actualidad.

Los segundos antihelmínticos de amplio espectro comercializados fueron los imidazotiazoles (levamisol y tetramisol) y tetrahidropirimidinas (morantel, oxantel y pirantel) (Robertson y Martin, 1993; Martin, 1997; Kaplan, 2004). El levamisol es un fármaco muy eficaz y seguro, con escaso efecto residual, que se está utilizado mundialmente.

El último grupo farmacológico de amplio espectro en salir al mercado fue el de las lactonas macrocíclicas (MLs), *ca.* 20 años después de la comercialización del primer antihelmíntico de amplio espectro. La actividad antiparasitaria de estos antibióticos a bajas concentraciones y su eficacia frente a ecto- y endoparásitos, dieron lugar a un grupo enteramente nuevo denominado endectocidas. Dentro de esta familia se encuentran las avermectinas (ivermectina, abamectina, doramectina y eprinomectina) y las milbemicinas (moxidectina y milbemectina) (McKellar y Jackson, 2004). La ivermectina, principal representante de este grupo, es eficaz frente a una gran variedad de especies, pero se han desarrollado resistencias a nivel mundial (Le Jambre et al., 1999; Kaplan, 2004).

Además de estos tres grupos principales, el arsenal terapéutico incluye antihelmínticos de espectro más reducido. Entre ellos, los organofosforados (ej. naftalofós, triclorfón, piraclifós), de elevada especificidad y notable toxicidad, cuya utilización ha sido limitada a pesar de las escasas resistencias desarrolladas frente a ellos (Kotze y Prichard, 2016). Las salicilanilidas son fármacos de actividad prolongada entre los que destacan el closantel, rafxanida, disofenol y nitroxinil. No obstante, la aparición de resistencias es frecuente (McKellar y Jackson, 2004). Otro fármaco de espectro reducido es el derquantel, perteneciente a la familia de los espiroindoles e introducido en el mercado en el año 2010. Se emplea en combinación con otros fármacos, principalmente con abamectina (Little et al., 2011) y a pesar de no haberse descrito resistencias (Rose et al., 2015; McRae et al., 2015) se ha observado una disminución de su eficacia (Lamb et al., 2017).

En la situación actual se emplean fármacos de todas las familias químicas señaladas. Sin embargo, existen algunos factores limitantes esenciales de esta aproximación exclusivamente química para el control de las nematodosis gastrointestinales, y de la hemoncosis en especial. La investigación y desarrollo de nuevos fármacos con actividad antihelmíntica por parte de la industria farmacéutica es

un proceso largo y costoso (Waller, 2006) y el control de estas helmintosis supone *ca.* 20% del gasto anual que ocasionan estas parasitosis (<http://www.wormboss.com.au/worms/roundworms/the-cost-of-roundworms.php>). Pese a ello, el menor peso relativo de la industria farmacéutica veterinaria frente a la humana así como la facilidad de aparición de resistencias crean un escenario en el que la introducción de nuevos productos con actividad antihelmíntica no parece factible en los próximos años.

Como consecuencia de los escasos beneficios esperables, así como del coste creciente del desarrollo de antihelmínticos, no es sorprendente que hasta la aparición del monepantel (Novartis) en 2009 (seguido del derquantel en 2010), derivado del amino-acetonitrilo (ADDs) de amplio espectro, no había llegado al mercado ningún fármaco desde hacía 30 años (Torres-Acosta et al., 2012). Sin embargo, a pesar de los pocos años de uso, ya se han desarrollado resistencias frente al monepantel (Van den Brom et al., 2015; Lamb et al., 2017).

Con todo, el principal reto del control medicamentoso de las nematodosis gastrointestinales es el fenómeno de la aparición de resistencias, aspecto que será tratado en la siguiente sección.

3.1. Resistencia antihelmíntica

El concepto de resistencia fue definido por Prichard et al. (1980) como “la resistencia está presente cuando hay una mayor frecuencia de individuos dentro de una población capaces de tolerar dosis de un compuesto que en una población normal de la misma especie y es heredable”. Esta definición fue mejorada posteriormente por Kotze y Prichard (2016) como la “habilidad de un organismo para sobrevivir a una dosis de un fármaco que de manera normal mataría a un organismo de la misma especie y estadio”. Posiblemente hayan existido observaciones, por ganaderos y veterinarios, que indicaban una reducida eficacia antiparasitaria de un antihelmíntico que previamente era capaz de controlar las infestaciones. Sin embargo, el primer caso de resistencia publicado se describió en infestaciones por *H. contortus* a finales de los años ‘50 del siglo pasado frente al antihelmíntico de espectro reducido fenotiazina (Kaplan, 2004), comercializado en 1940 (McKellar y Jackson, 2004). En el caso concreto de fármacos

de amplio espectro, el primer caso fue descrito en 1964 en EE.UU. frente al tiabendazol, introducido en el mercado tan solo 3 años antes. En 1979 se describió frente al levamisol, cuya distribución había comenzado en el año 1970. Se han detectado otros casos de resistencia, en 1988 frente a la ivermectina, comercializada 7 años antes, o la moxidectina en 1995, cuya administración comenzó en el año 1991. Este comportamiento ha sido observado con todos los antihelmínticos de amplio espectro introducidos en el mercado de aplicación en ganado ovino y frente a las especies de mayor relevancia (*H.contortus*, *Te.circumcincta*, *T.colubriformis*) (Kaplan, 2004).

La resistencia antihelmíntica, de carácter generalizado y ya anticipada por Waller (1997), está presente, en mayor o menor medida, en todo el mundo (Sudáfrica, Malasia, Brasil, Paraguay, EE.UU., Reino Unido, España, Nueva Zelanda y Australia), con cierre de explotaciones y tasas de mortalidad anuales en ocasiones superiores al 20% (Kaplan, 2004; Waller, 2005a; Coles et al., 2006; Torres-Acosta et al., 2012; Martínez-Valladares et al., 2013; Rose et al., 2015; Lamb et al., 2017).

Se considera que las causas principales de su aparición han sido el uso masivo, principalmente en zonas endémicas, de antihelmínticos; su empleo inapropiado consecuencia de la infradosificación en el tratamiento y el carácter no estratégico de las medicaciones; la elección del fármaco no adecuado; una mayor predisposición genética de algunas poblaciones parasitarias y la elevada fertilidad de algunas especies. En este sentido, *H.contortus* presenta mayor predisposición a desarrollar resistencias que otros nematodos gastrointestinales, mostrando tolerancia a todos los grupos farmacológicos empleados frente a él, incluyendo el último fármaco introducido en el mercado, monepantel (Kotze y Prichard, 2016; Lamb et al., 2017).

3.2. Manejo de la resistencia antihelmíntica

Con objeto de disminuir o retrasar la aparición de resistencias, se han sugerido diferentes estrategias tales como el uso combinado de antihelmínticos (Little et al., 2011); rotación entre familias de fármacos con diferentes mecanismos de acción (Van Wyk, 2001); limitación de la frecuencia de tratamientos mediante el empleo de medicaciones selectivas de los animales con mayores cargas parasitarias (Leathwick y Besier, 2014); control de la infradosificación del rebaño (Jackson y Coop, 2000);

elección del antihelmíntico adecuado, preferiblemente de espectro reducido y de vida media corta, frente al que no se hayan desarrollado resistencias (Besier et al., 2016); reducción de la exposición a los fármacos mediante el mantenimiento de “refugios” de poblaciones de helmintos no resistentes (Van Wyk, 2001; Besier, 2008); prevención de la introducción de nematodos resistentes sometiendo a los animales adquiridos a un periodo de cuarentena (Peña-Espinoza et al., 2014; Leathwick y Besier, 2014); y sensibilización de los ganaderos acerca de la importancia de realizar un buen manejo de estos fármacos (Van Wyk, 2001; Besier, 2008).

En condiciones de campo, el manejo de las resistencias no ha permitido obtener resultados claros (Kaplan, 2004). Sin embargo, se ha señalado que una mejor gestión del tratamiento antihelmíntico (combinaciones de fármacos, tratamiento selectivo, rotación de antihelmínticos) podría revertir la resistencia (Charlier et al., 2017). De hecho, se han detectado resistencias frente a la combinación de los tres grupos principales de fármacos (BZs + imidazotiazoles + MLs) en infestaciones por *H. contortus*, lo que pone de manifiesto la necesidad de confirmar la eficacia individual de cada producto antes de usarlos en combinación (Lamb et al., 2017). Parece que, a pesar de que la aparición de resistencias se produce de manera lenta, el establecimiento de los genes de resistencia resulta en un aumento exponencial de su presentación (Barnes et al., 1995; De Graef et al., 2013).

Los primeros antihelmínticos de síntesis datan de mediados del siglo pasado. Eso quiere decir que los helmintos responsables de las nematodosis gastrointestinales, y *Haemonchus* en particular, solo han estado expuestos a dichos compuestos durante 70 años. Desde un punto de vista médico-clínico y económico, su introducción fue un éxito. Sin embargo, los helmintos parásitos han sido capaces de seleccionar poblaciones resistentes a todos los antihelmínticos disponibles. En una escala evolutiva este periodo es casi instantáneo y la rapidez de la aparición de resistencias constituye, además de un grave inconveniente para el futuro de la explotación de ganado ovino, una evidencia de la necesidad de 1) realizar un correcto seguimiento del empleo de antiparasitarios, 2) refinar su aplicación, 3) diseñar y desarrollar adecuados sistemas de monitorización de las resistencias, 4) emplear sistemas de control integrado con las herramientas disponibles (preventivas y curativas) y 5) cambiar el objetivo de la erradicación por el del control sostenible de las poblaciones parasitarias.

4. Sistemas alternativos de control

Además de los fenómenos de resistencia y la escasez de “nuevas entidades químicas” y su elevado coste, el desarrollo social ha llevado a una mayor preocupación por parte del consumidor sobre la presencia de residuos con actividad farmacológica en alimentos de origen animal y una mayor sensibilidad acerca del cambio climático, centrándose en la búsqueda de una agricultura sostenible y, todo ello, dentro de un marco con demanda creciente de proteínas por la población humana, que excede los 7.000 millones. Por ello, existe la necesidad de sistemas alternativos con el objetivo de reducir la dependencia de los antihelmínticos de síntesis.

Los programas preventivos de control están formados por un conjunto de medidas integradas que disminuyen el riesgo de infestación de los animales, como son el manejo nutricional y de pastos, el tratamiento antihelmíntico selectivo, la cría selectiva basada en la selección genética, el control biológico o la vacunación. Esta serie de estrategias (químicas o no químicas) dependen de las características ambientales, del tipo de producción (extensivo vs. intensivo), del parásito a controlar, de la especie animal de destino y de los recursos económicos disponibles, entre otras. No obstante, la mayoría de estos métodos no están bien adaptados para su uso en granjas (Charlier et al., 2017) y dado el alto coste que suponen algunos de ellos, hay que buscar un equilibrio coste-beneficio tolerable por el ganadero.

Entre las medidas, de desigual importancia, que se han señalado se pueden destacar el *manejo nutricional adecuado*, basado en el empleo de piensos suplementados con proteínas con el objetivo de incrementar la resistencia y resiliencia de los animales a las infestaciones (Coop y Kyriazakis, 1999). Asimismo, los *sistemas de pastoreo racional* (óptimo crecimiento herbáceo + menores riesgos de transmisión de formas parasitarias), mediante el empleo rotacional de pastos o de especies animales (dobles/triples), pueden reducir los riesgos de parasitosis intensas (Bailey y Brown, 2011; Fávero et al., 2016).

Los patrones estacionales de infestación, al menos en las zonas templadas del mundo, permiten el uso de prácticas de control estandarizadas con un calendario fijo de tratamientos. No obstante, la distribución parasitaria en los colectivos, de carácter sobredisperso, sugiere el *tratamiento selectivo de los animales* que albergan las mayores

cargas y son responsables de la contaminación ambiental con formas de transmisión. De esta forma, se reducen los riesgos de aparición de resistencias y se logra un control más eficaz de las infestaciones (Leathwick y Besier, 2014; Charlier et al., 2017).

La heredabilidad de la resistencia natural (ej. ganado ovino) a las nematodosis gastrointestinales es relativamente alta por lo que, en principio, la *selección genética* de líneas resistentes/resilientes sería factible. Se han valorado algunos marcadores genéticos (ej. marcadores moleculares, inmunológicos y hematológicos) y existen métodos comercializados, como el test de resistencia de ADN “Wormstar” de Zoetis Genetics (Besier et al., 2016). Su utilización no está muy generalizada, aunque parámetros fenotípicos sencillos (ej. recuento fecal de huevos, peso vivo del animal, anemia) permiten en el caso de la hemoncosis identificar individuos y poblaciones resistentes (Leathwick y Besier, 2014; Zvinorova et al., 2016; Charlier et al., 2017).

Una aproximación interesante es la constituida por el *control biológico*, ya sea mediante patógenos naturales de los helmintos (ej. *Bacillus thuringiensis*) o mediante hongos depredadores de las fases de transmisión. Este último apartado ha recibido gran atención, particularmente *Duddingtonia flagrans*, *Dactylaria* spp. y *Arthrobotrys oligospora* (Flores-Crespo et al., 2003). Su mecanismo se basa en la formación de hifas que atrapan y digieren las larvas del parásito para su alimentación, disminuyendo la carga infestante en el pasto (Hein et al., 2001; Peña et al., 2002). A pesar del interés de estas propuestas su aplicación, particularmente en la ganadería extensiva, suscita dudas acerca de su eficacia.

El empleo de *plantas bioactivas* se ha basado tanto en las propiedades físicas de algunas plantas que reducen la migración de las larvas infestantes como, principalmente, en el estudio de pastos con alto contenido en taninos condensados (metabolitos secundarios fenólicos) u otros flavonoides (Kearney et al., 2016). Este tipo de compuestos con actividad antihelmíntica directa reduce la carga parasitaria adulta sin llegar a eliminarla por completo y mejora los índices productivos como consecuencia de sus efectos positivos en la nutrición del animal. Entre las plantas más estudiadas se encuentran la achicoria (*Cichorium intybus*), zulla (*Hedysarum coronarium*), alfalfa chilota (*Lotus pedunculatus*) y pipirigallo o esparceta (*Onobrychis viciifolia*) (Arroyo-López et al., 2014), plantas que en ocasiones forman parte del pasto natural. Los resultados obtenidos han sido variables y, en algunos casos, la eficacia frente a parásitos

gástricos como *H. contortus*, escasa o ausente (Athanasiadou et al., 2001; Zvinorova et al., 2016).

Entre las plantas con potencial antihelmíntico y mayores posibilidades de empleo, particularmente en zonas áridas y de escasos recursos, se encuentran las hojas de “neem” (*Azadirachta indica*) (Figura 7). Las hojas de este árbol, de mediano porte y originalmente del subcontinente indio, tiene actividad antihelmíntica frente a *H. contortus* (Radhakrishnan et al., 2007; Avinash et al., 2017), además de constituir una fuente de alimentación para los pequeños rumiantes. De hecho, este árbol ha sido introducido en zonas áridas de África (Adjorlolo et al., 2016).



Figura 7.

Azadirachta indica (neem). Tomado de Neem Foundation.

No es infrecuente el uso, en algunas partes del mundo, de *partículas de óxido de cobre (COWP)*, tratamiento de elección hasta la aparición de los antihelmínticos modernos (Besier et al., 2016; Kearney et al., 2016), mientras que la *manipulación genética* para silenciar genes con el objetivo de disminuir la fecundidad de las hembras o el desarrollo del parásito (Knox, 2012) probablemente aún necesita mucho trabajo experimental.

En términos de coste/beneficio y “sostenibilidad”, la *vacunación* constituye una de las estrategias más prometedoras dada la posible protección prolongada y la ausencia de residuos químicos. Dado el objeto de nuestro estudio, este apartado será expuesto de forma más precisa en el siguiente apartado.

5. Inmunización frente a la hemoncosis

A pesar de las potenciales ventajas de la inmunoprofilaxis en el control de helmintosis, y de forma particular de la hemoncosis, la vacunación frente a estos agentes no ha sido fácil y hasta hace poco tiempo, la única vacuna eficaz y comercializada frente a un nematodo era Dictol (Bovilis[®] Huskvac) frente a *Dictyocaulus viviparus*, nematodo pulmonar del ganado bovino, y consistente en una suspensión de larvas irradiadas (Benitez-Usher et al., 1976). La eficacia de los antiparasitarios comercializados, en ausencia de resistencias, es muy elevada (>98%), aceptándose como eficaces niveles hasta del 90% (Wood et al., 1995). Por su parte, en la vacunación sería adecuado un 60% de eficacia en el 80% de los animales del rebaño (Barnes et al., 1995).

Se ha considerado que una vacuna ideal frente a *H. contortus* en ganado ovino debe reunir una serie de características: ser segura, económica, proporcionar una protección prolongada, reducir los signos clínicos, ser eficaz frente a los diferentes estadios parasitarios, en animales jóvenes y frente a los principales nematodos gastrointestinales que puedan encontrarse en coinfección (*Teladorsagia* y *Trichostrongylus*) (Knox y Redmond, 2006). Sin embargo, estos criterios tan restrictivos seguramente no puedan cumplirse en su integridad y las expectativas deban ser menores, considerándose eficaces las vacunas que inducen niveles “útiles” de protección capaces de reducir el parasitismo a niveles inferiores a los causantes de una pérdida significativa de producción (Klei, 1997). De hecho, a pesar de los estudios iniciados en los años 60 del pasado siglo con L3 atenuadas irradiadas, las vacunaciones fueron ineficaces en corderos (2-5 meses de edad), la edad más afectada y en la que las manifestaciones clínicas pueden ser más notables (Urquhart et al., 1966a, b; Smith y Angus, 1980). Solo en 2014 (50 años más tarde) se comercializó en Australia, Barbervax[®] WormVax, y empleando como antígeno proteína nativa.

El desarrollo, de forma natural, de algún grado de resistencia frente a las infestaciones por *H. contortus* tras la primoexposición de los animales al agente en el pastoreo constituye una evidencia de la posibilidad de lograr una inmunización artificial (Adams y Beh, 1981). Esta resistencia inmunitaria parcial en el caso de la hemoncosis ha sido reconocida y requiere la adquisición gradual de la inmunidad en el pasto

mediante una estimulación antigénica continuada (Bethony et al., 2006; Santos et al., 2014; McRae et al., 2015).

En los estudios para el desarrollo de una vacuna eficaz frente a la hemoncosis se han empleado dos estrategias diferentes: formulaciones con *antígenos públicos* (naturales o expuestos), proteínas parasitarias reconocidas por el sistema inmunitario del hospedador, capaces de inducir una respuesta inmunitaria a lo largo de la infestación por lo que la revacunación se produce de manera natural en el pasto; *antígenos privados* (ocultos), componentes parasitarios no reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador en una infestación natural. Ambas aproximaciones tienen posibles ventajas e inconvenientes que serán desarrolladas a continuación (Bassetto y Amarante, 2015).

5.1. Inmunización con antígenos privados u ocultos

La mayoría de los estudios tendentes a lograr la inmunización de rumiantes frente a la hemoncosis han empleado antígenos ocultos. La racionalidad de esta selección está basada en su independencia de la respuesta inmunitaria natural desarrollada por los animales tras una infestación. Se asume que los antígenos naturales, al estar expuestos, estarían sometidos a la acción de la selección natural mientras que los antígenos ocultos, al no estar de forma natural expuestos al sistema inmunitario de los animales, no sufrirían presión de selección. Así, ya en los años '80 del siglo pasado, se utilizó un polímero presente en las microvellosidades intestinales de L4 y adultos de *H. contortus* ("contortin") con el que se obtuvieron niveles de protección *ca.* 75% en la carga parasitaria adulta en abomaso (Munn, 1977; Munn et al., 1987; Newton y Munn, 1999). Posteriormente, esta aproximación se perfeccionó utilizando proteínas de unión a tiales (TSBP) presentes en las microvellosidades de las células intestinales del parásito adulto, logrando una protección del 77% en el recuento fecal de huevos y del 47% en el número de helmintos en abomaso (Knox et al., 1993; Knox et al., 1999). Estudios posteriores, sin embargo, no lograron reproducir los niveles previos de protección alcanzados, quizás por la inestabilidad de estas enzimas, ya que la inmunización con una fracción purificada con actividad enzimática cisteín proteasa indujo niveles intermedios de protección (Redmond y Knox, 2004).

La inmunización de los hospedadores con componentes del tubo digestivo del agente parasitario fue empleada con éxito en el desarrollo de las vacunas frente al ixódido del ganado vacuno *Boophilus microplus*. Así, la inmunización de los animales con la proteína del tubo digestivo Bm86 (y posteriormente ortólogos de otras especies de Ixodidae) indujo niveles de anticuerpos muy elevados en los animales vacunados que impedían la alimentación de los ectoparásitos. Ello permitió la comercialización de las vacunas existentes en la actualidad (Gavac, Tickgard) (Willadsen et al., 1995; Guerrero et al., 2012; Rodríguez-Valle et al., 2012). El éxito de esta estrategia provocó su empleo en el caso de la hemoncosis ovina. Se identificaron en *H. contortus* dos complejos localizados en la superficie de las microvellosidades: H-gal-GP y H11, proteasas probablemente relacionadas con la digestión de la hemoglobina (Hewitson y Maizels, 2014). Los anticuerpos desarrollados por los animales inmunizados, ingeridos durante el proceso de alimentación hematófaga del helminto, bloquean la actividad de estas enzimas (Knox et al., 2003). Dado su mecanismo de acción, el nivel de protección está relacionado con los niveles de anticuerpos séricos IgG específicos frente a H11 y H-gal-GP (Smith et al., 1999).

La caracterización posterior de estos complejos ha mostrado que H-gal-GP, con una masa molecular aproximada de 981 ± 10 KDa, está formado por al menos 12 proteínas que incluyen aspartilproteasas (PEPs), metaloproteasas (MEPs) y cisteín proteasas (Smith et al., 1999). Dentro de la gran variedad de proteínas que lo forman, las únicas responsables de su capacidad de protectora son las MEPs-3 y las PEPs. Este antígeno ha sido eficaz en corderos entre 4 y 10 meses de edad, con niveles de protección del 90% en la eliminación fecal de huevos y del 70% en la carga parasitaria adulta en abomaso (Smith et al., 1994, 1996, 2003a, b).

Por su parte, H11 es una aminopeptidasa, proteína integral de membrana de las microvellosidades intestinales de adultos y L4 de masa 110 KDa, capaz de inducir protección en corderos (Tavernor et al., 1992; Munn et al., 1993; Newton y Munn, 1999). Se han realizado diversos estudios de vacunación con diferentes fracciones de este complejo H11 obteniéndose altos porcentajes de protección en todos ellos (Munn et al., 1993). Además de estos, se han ensayado otros antígenos ocultos tales como el complejo glicoproteico H-sialgal-GP (Smith et al., 2000) y la proteína antígeno

intestinal 1 (GA1) (Jasmer et al., 1996) con altos porcentajes de reducción en la eliminación fecal de huevos.

Estos estudios han permitido que en el año 2014, se c en Australia una vacuna formada por una combinación de las formas nativas de H11 + H-gal-GP, “Barbervax”. Los estudios llevados a cabo en distintas localizaciones (EE.UU., Australia y Sudáfrica) han mostrado que la inmunización de animales con esta vacuna reduce la anemia, previene la muerte del ganado en infestaciones agudas y disminuye los parámetros parasitológicos (eliminación fecal de huevos, carga parasitaria) (Kabagambe et al., 2000; Smith et al., 2001; Le Jambre et al., 2008). La vacunación requiere una baja cantidad de antígeno (5µg/dosis) y, aparentemente, es una alternativa viable económicamente (Bassetto et al., 2014a; Bassetto y Amarante, 2015). Otras ventajas de esta vacuna son su eficacia frente a diversas razas y edades de ganado ovino (Kabagambe et al., 2000; Smith et al., 2001; Le Jambre et al., 2008) y frente a poblaciones de helmintos resistentes a antihelmínticos (Smith y Smith, 1993; Le Jambre et al., 2008), la transferencia pasiva de cierto grado de protección de las madres vacunadas a los corderos a través del calostro (Andrews et al., 1995) y su falta de interferencia con el desarrollo de la inmunidad natural adquirida frente al parásito (Smith y Smith, 1993).

A pesar de esta actividad protectora, el empleo de antígenos nativos y, de forma especial, de antígenos ocultos presenta notables limitaciones:

- a. Al ser un antígeno oculto, son necesarias revacunaciones periódicas para mantener el título de anticuerpos elevado (Knox et al., 2003; Le Jambre et al., 2008).
- b. Las vacunas de proteínas nativas son costosas en términos económicos y materiales y no permiten una producción estandarizada del antígeno.
- c. Requieren la infestación de animales vivos para la obtención del antígeno, hecho cuestionable desde un punto de vista ético.
- d. Necesitan cadena de frío para su distribución y almacenaje, lo que limita la expansión en su comercialización así como la vacunación en condiciones de campo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales donde este parásito es más prevalente (Knox y Redmond, 2006).

Otros inconvenientes son la ineficacia en la inmunización de ovejas en periodo periparto (Bassetto et al., 2014a), la falta de protección en ganado caprino (Meier et al., 2016) y su eficacia restringida a parásitos hematófagos, limitando su empleo en infestaciones mixtas (Bassetto et al., 2014b).

5.2. Inmunización con antígenos públicos

Los estudios con antígenos expuestos han sido menos numerosos. Uno de los primeros fue la molécula de superficie Hc-sL3, de masa molecular 70-90 KDa y específica de L3 (Ashman et al., 1995; Raleigh y Meeusen, 1996b), obteniéndose niveles de protección óptimos en los diversos ensayos realizados (Jacobs et al., 1999; Piedrafita et al., 2012, 2013). Dicho antígeno no es exclusivo de *H. contortus*, estando presente su equivalente antigénico en otras especies de tricostrongílidos como *Te. circumcincta* y *T. vitrinus* (Raleigh et al., 1996a; Meeusen et al., 2005). Dentro de los productos de E/S, los niveles de protección obtenidos con las proteínas 15/24 KDa en animales de 6 a 9 meses han sido elevados, observándose una relación entre la edad y la protección alcanzada con la vacunación (Schallig et al., 1997; Kooyman et al., 2000, Vervelde et al., 2001). No obstante, en los ensayos llevados a cabo en corderos de 3 meses la vacunación no tuvo éxito (Kooyman et al., 2000; Vervelde et al., 2001). Las inmunizaciones realizadas con productos de E/S mostraron que las fracciones obtenidas con ditioneitol-DTT indujeron una mayor protección que las eluidas con cisteína, con valores del 52% y 36% en la eliminación fecal de huevos y del 50% y 34% en la carga parasitaria adulta, respectivamente (Bakker et al., 2004). Otro de los antígenos estudiados ha sido la cisteín proteasa AC5, obteniéndose niveles de protección *ca.* 30% (De Vries et al., 2009). Otra cisteín proteasa aislada del adulto de *H. contortus* (PBS-TSBP) ha demostrado su eficacia en ganado ovino y caprino, con porcentajes de protección de *ca.* 80% en la eliminación fecal de huevos y *ca.* 60-90% en la carga adulta en abomaso (Ruiz et al., 2004; Molina et al., 2012; Martín et al., 2015).

Asimismo, se han realizado ensayos de vacunación con diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto soluble del parásito adulto (ESA), con niveles de protección en torno al 40% (Alunda et al., 2003). Otra molécula aislada del ESA de *H. contortus* ha sido la proteína somática de masa molecular aproximada de 23 KDa,

Hc23. Los resultados obtenidos con este antígeno expuesto han mostrado porcentajes de protección variables en dependencia del adyuvante empleado, con una reducción en los parámetros parasitológicos de *ca.* 70% con hidróxido de aluminio y de *ca.* 85% al emplear un adyuvante de origen bacteriano (Fawzi et al., 2014).

5.3. Inmunización con antígenos recombinantes

El menor coste de producción unido a la ausencia de contaminantes, menor variabilidad entre lotes y la falta de requerimiento de animales infestados como fuente de material antigénico (*vide supra*), han provocado el interés en la obtención de antígenos recombinantes con el fin de desarrollar vacunas rentables y asequibles. La posibilidad de obtención de antígenos recombinantes eficaces parecía real ya que la inmunización frente al nematodo próximo *Te.circumcincta* con una vacuna formada por 8 proteínas recombinantes indujo una protección *ca.* 70% (Nisbet et al., 2013; Bassetto y Amarante, 2015).

De forma paralela a los estudios con H11 y H-gal-GP nativas, se clonaron y expresaron algunos de sus componentes sin lograrse protección (Newton y Meeusen, 2003; Smith et al., 2003a, b; Cachat et al., 2010; Roberts et al., 2013). Estos resultados, en comparación con la alta eficacia obtenida con sus formas nativas, sugieren la importancia de algunos epítomos conformacionales en su capacidad protectora (Newton y Meeusen, 2003; Smith et al., 2003a, b; Knox et al., 2003; Cachat et al., 2010). Dicha diferencia conformacional se ha observado en el cóctel de componentes recombinantes pertenecientes al complejo H-gal-GP (rMEP1, rMEP3, rMEP4 y rPEP1) (Cachat et al., 2010).

De igual modo, las variantes recombinantes de los antígenos E/S de 15 y 24 KDa (rec15/24) han mostrado resultados no concluyentes en animales de 9 meses de edad, con valores entre el 0% y el 50% de protección en la eliminación fecal de huevos (Vervelde et al., 2002). La vacunación con la enolasa HcENO ha resultado parcialmente eficaz en ensayos de inmunización en animales de 6 meses de edad con valores de protección del 50% (Kalyanasundaram et al., 2015); las galectinas rHco-gal-m y rHco-gal-f aparentemente inducen protección parcial en animales de 9-10 meses de edad (Yanming et al., 2007); la combinación de 3 cisteín proteasas recombinantes aisladas

del TSBP (hmcpl, 4 y 6) han provocado reducciones en la carga parasitaria en abomaso del 38%, con una reducción fecal de huevos de solo el 10% (Redmond y Knox, 2004); y la cisteína proteasa Hc-CPL-1 no mostró ninguna protección (Murray et al., 2007). La proteína recombinante PP2A ha sido ensayada en infestaciones mixtas por tricostrongídeos, con una disminución en la carga parasitaria de *H. contortus* adultos del 78% (Fawzi et al., 2013).

Debe destacarse la protección inducida por la proteína rHc23 de adultos de *H. contortus*, con porcentajes de reducción de los parámetros parasitológicos superiores al 80% (Fawzi et al., 2015), disminuyendo tanto la carga parasitaria del hospedador como la contaminación ambiental. Actualmente, se considera la única vacuna recombinante eficaz frente a la hemoncosis (Matthews et al., 2016).

De la descripción de la situación actual cabe deducir que, de forma general, los niveles de protección inducidos por las proteínas recombinantes han sido inferiores a los logrados con sus formas nativas. Esta reducción de la eficacia se ha relacionado con plegamientos incorrectos de las formas recombinantes, modificaciones secundarias como los errores de glicosilación, baja avidéz de los anticuerpos en las vacunas con antígenos ocultos o fallos en la elección de los antígenos responsables de la protección. Los sistemas de expresión tradicionales basados en bacterias producen proteínas no glicosiladas o de conformación defectuosa. Por ello, se han propuesto sistemas de expresión en eucariotas (ej. levaduras) o en Baculovirus, aunque los resultados han sido insatisfactorios, lo que puede ser debido a que la glicosilación inducida por estos sistemas dé lugar a glicanos diferentes a los producidos por helmintos, pudiendo enmascarar los epítomos protectores. También se están estudiando otros sistemas como *Pichia pastoris* o *Caenorhabditis elegans* (Knox et al., 2001, 2003; Knox y Redmond, 2006; Roberts et al., 2013; Matthews et al., 2016).

6. Modelos experimentales de las infestaciones por *H.contortus*: valor y limitaciones

Los estudios experimentales sobre distintos aspectos de la biología, patología, inmunología y quimioterapia de la hemoncosis han empleado, habitualmente, ganado ovino. No obstante, el elevado coste material y humano que supone el estudio en sus especies de destino, el tiempo necesario para la obtención de resultados y la mayor dificultad de obtención de reactivos biológicos, ha impulsado la *búsqueda de modelos subrogados de la infestación*. Entendemos el empleo de modelos tanto utilizando animales de laboratorio (en particular roedores) hospedadores receptivos de *H.contortus* como la utilización de modelos paralelos con diferentes especies de helmintos y hospedadores. Desafortunadamente, en el caso de la hemoncosis no ha sido posible lograr el ciclo biológico completo en ninguna especie de roedor. Solo ha sido posible alcanzar el estadio de L4 en jerbo (*Meriones unguiculatus*) que, además, deberían ser inmunodeprimidos a fin de lograr la implantación del helminto (Conder et al., 1992; Yang et al., 2017). Claramente este modelo, de reducida utilidad para algunos ensayos (ej. antihelmínticos), no es adecuado para explorar de forma comparada otros aspectos de la relación parásito-hospedador tales como la respuesta inmunitaria.

Por ello, como solución alternativa, se han utilizado otros sistemas con el objetivo de identificar los posibles mecanismos comunes que regulan las poblaciones de helmintos, la respuesta tras infestaciones primarias o la respuesta inmunitaria adaptativa. Se han empleado, habitualmente, *Trichuris muris* (Nematoda, Trichuridae) en ratón, *Trichinella spiralis* en ratón para el cribado de antihelmínticos, *Litosomoides sigmodontis* (Nematoda, Filarioidea) en ratón y *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda, Trichostrongyloidea) en ratón para el estudio de la respuesta inmunitaria. El modelo más utilizado, probablemente, es *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda, Trichostrongyloidea) en ratón. De una parte está relacionado filogenéticamente con *H.contortus* y, además, el ratón es su hospedador natural. No es por ello sorprendente que se hayan estudiado en este sistema los mecanismos involucrados en las infestaciones crónicas por nematodos gastrointestinales (Hewtison y Maizels, 2014); inmunomodulación (Doligalska et al., 2006; Maizels et al., 2012); eficacia de antihelmínticos; infecciones/infestaciones intercurrentes y desarrollo de vacunas. El interés de este modelo *H.polygyrus*-ratón, en nuestro caso particular, radica en la

similitud de sus ciclos biológicos, la capacidad de estimulación de una respuesta inmunitaria humoral y celular, el desarrollo de infestaciones de curso crónico tras un primer contacto con el parásito, la respuesta protectora Th2 de memoria inducida en reinfestaciones, la similitud de sus mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria y las lesiones producidas a nivel gastrointestinal (Gause et al., 2003; McSorley et al., 2013). Asimismo, es un helminto de fácil conservación, pudiendo ser mantenido largos periodos de tiempo en condiciones de laboratorio.

No obstante, todos los modelos incluyendo *H.polygyrus* presentan inconvenientes. En la mayoría de los casos, los mecanismos inmunitarios de resistencia difieren entre el modelo y la especie objeto de estudio. Hay factores específicos de hospedador como la galectina-11 (característica de rumiantes), lo que limita el estudio de todos los factores implicados en la respuesta protectora en el hospedador definitivo (Nisbet et al., 2016). En rumiantes requiere generalmente de infecciones previas repetidas para que elimine o limite la población de helmintos (Balic et al., 2002; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013) mientras que en algunos modelos la expulsión está asociada a la inflamación inducida por la activación de la vía alternativa del complemento y mediada por mastocitos y eosinófilos. Asimismo, se han observado diferencias en el papel protector de la respuesta humoral. Los anticuerpos específicos IgG₁ se han relacionado con la protección y la resistencia genética en infestaciones por *H.polygyrus* (Filbey et al., 2014) mientras que en *H.contortus* no está claro su papel en la protección (Gómez-Muñoz et al., 1998, 1999, 2001; Amarante et al., 2005). Es por ello que, aunque valiosos, la interpretación de los resultados y su traslación al binomio helminto-hospedador natural deben ser realizadas con cautela.

7. Referencias

- Achi YL, Zinsstag J, Yao K, Yeo N, Dorchies P, Jacquet P (2003). Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Vet. Parasitol.* 116, 151–158.
- Adams DB, Beh KJ (1981). Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 11 (5), 381–386.
- Adjorlolo LK, Timpong-Jones EC, Boadu S, Adogla- T (2016). Potential contribution of neem (*Azadirachta indica*) leaves to dry season feeding of ruminants in West Africa. *Livestock Research for Rural Development* 28.
- Akkari H, Jebali J, Gharbi M, Mhadhbi M, Awadi S, Darghouth MA (2013). Epidemiological study of sympatric *Haemonchus* species and genetic characterization of *Haemonchus contortus* in domestic ruminants in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 193, 118–125.
- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA (2013). Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *BioMed Res. Int.*, 1–11.
- Allen JE, Maizels RM (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–388.
- Alunda JM, Angulo-Cubillan F, Cuquerella M (2003). Immunization against ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*. *J. Vet. Med. B* 50, 70–74.
- Amarante AF, Bricarello PA, Huntley JF, Mazzolin LP, Gomes JC (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.
- Andrews SJ, Hole NJ, Munn EA, Rolph TP (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), 389–346.
- Angulo-Cubillán FJ, García-Coiradas L, Cuquerella M., de la Fuente C, Alunda JM (2007). *Haemonchus contortus*-Sheep relationship: a review. *Revista Científica FCV-LUZ* 17 (6), 577–587.

- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975–987.
- Arroyo-Lopez C, Manolaraki F, Saratsis A, Saratsi K, Stefanakis A, Skampardonis V, Voutzourakis N, Hoste H, Sotiraki S (2014). Anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed to lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasite* 21, 71.
- Ashman K, Mather J, Wiltshire C, Jacobs HJ, Meeusen E (1995). Isolation of a larval surface glycoprotein from *Haemonchus contortus* and its possible role in evading host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 175–179.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop R (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.
- Avinash B, Supraja N, Charitha VG, Adeppa J, Prasad TNVKV (2017). Evaluation of the Anthelmintic Activity (in- vitro) of Neem Leaf Extract-Mediated Silver Nanoparticles against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Pure App. Biosci.* 5 (2), 118–128.
- Bailey DW, Brown JR (2011). Rotational grazing systems and livestock grazing behavior in shrub-dominated semi-arid and arid rangelands. *Rangeland Ecology & Management* 64, 1–9.
- Bakker N, Vervelde L, Kanobana K, Knox DP, Cornelissen AW, de Vries E, Yatsuda AP (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22, 618–628.
- Balic A, Bowles VM, Meeusen EN (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39–46.
- Balic A, Smith KA, Harcus Y, Maizels RM (2009). Dynamics of CD11c+ dendritic cell subsets in lymph nodes draining the site of intestinal nematode infection. *Immunol. Lett.* 127, 68–75.
- Bambou JC, González-García E, de la Chevrotière C, Arquet R, Vachiéry N, Mandonnet N (2009). Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Rumin. Res.* 82, 34–39.
- Barger IA, Le Jambre LF, Georgi JR, Davies HI (1985). Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *Int. J. Parasitol.* 15 (5), 529–533.

- Barger IA, Le Jambre LF (1988). Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep: mortality of established worms. *Int. J. Parasitol.* 18 (2), 269–273.
- Barger IA (1993). Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int. J. Parasitol.* 23 (4), 463–469.
- Barnes EH, Dobson RJ, Barger A (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11 (2), 56–63.
- Bassetto CC, Amarante AF (2015). Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *J. Helminthol.* 89, 517–525.
- Bassetto CC, Picharillo MÉ, Newlands GF, Smith WD, Fernandes S, Siqueira ER, Amarante AF (2014a). Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *Int. J. Parasitol.* 44, 1049–1054.
- Bassetto CC, Silva MR, Newlands GF, Smith WD, Ratti Júnior J, Martins CL, Amarante AF (2014b). Vaccination of grazing calves with antigens from the intestinal membranes of *Haemonchus contortus*: effects against natural challenge with *Haemonchus placei* and *Haemonchus similis*. *Int. J. Parasitol.* 44, 697–702.
- Benitez-Usher C, Armour J, Urquhart GM (1976). Studies on immunisation of suckling calves with dictol. *Vet. Parasitol.* 2, 209–222.
- Ben-Smith A, Wahid FN, Lammas DA, Behnke JM (1999). The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG₁ and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunol.* 21, 383–395.
- Besier RB (2008). Targeted treatment strategies for sustainable worm control in small ruminants. *Trop. Biomed.* 25, 9–17.
- Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA (2016). Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Adv. Parasitol.* 93, 181–238.
- Bethony JM, Loukas A, Hotez PJ, Knox DP (2006). Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology* 133, S63.
- Boitelle A, Di Lorenzo C, Scales HE, Devaney E, Kennedy MW, Garside P, Lawrence CE (2005). Contrasting effects of acute and chronic gastro-intestinal helminth infections on a heterologous immune response in a transgenic adoptive transfer model. *Int. J. Parasitol.* 35, 765–775.

- Bowman DD (2014). *Georgis' parasitology for veterinarians*. Ed 10. Elsevier, St Louis, 326–398.
- Brasil BS, Nunes RL, Bastianetto E, Drummond MG, Carvalho DC, Leite RC, Molento MB, Oliveira DA (2012). Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 42 (5), 469–479.
- Cachat E, Newlands GF, Ekoja SE, Mcallister H, Smith WD (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunol.* 32, 414–419.
- Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, Hoste H, Williams AR, Sotiraki S, Höglund J, Chartier C, Geldhof P, Van Dijk J, Rinaldi L, Morgan ER, von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J, Claerebout E (2017). Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transbound. Emerg. Dis.*
- Charlier J, Van der Voort M, Kenyon F, Skuce P, Vercruysse J (2014). Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* 30 (7), 361–367.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
- Conder GA, Johnson SS, Hall AD, Fleming MW, Mills MD, Guimond PM (1992). Growth and development of *Haemonchus contortus* in jirds, *Meriones unguiculatus*. *J. Parasitol.* 78, 492–497.
- Coop RL, Kyriazakis I (1999). Nutrition–parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84, 187–204.
- Coop RL, Kyriazakis I (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17 (7), 325–330.
- Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM (1994). Partial protection of Manchego sheep against *Haemonchus contortus* after 6-month postpriming period. Preliminary note. *J. Vet. Med. B.* 41 (1-10), 399–406.
- Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB (2004). Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5 (3), 337–343.

- De Graef JD, Claerebout E, Geldhof P (2013). Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82 (3), 113–123.
- De Vries E, Bakker N, Krijgsveld J, Knox DP, Heck AJ, Yatsuda AP (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.
- Doligalska M, Rzepecka J, Drela N, Donskow K, Gerwel-Wronka M (2006). The role of TGF- β in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.* 28, 387–395.
- Else KJ (2005). Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunol.* 27, 407–415.
- Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* 46, 755–769.
- Faulkner H, Humphreys N, Renauld JC, Van Snick J, Grecis R (1997). Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 27 (10), 2536–2540.
- Fávero FC, Buzzulini C, Cruz BC, Felippelli G, Maciel WG, Salatta B, Teixeira WF, Soares VE, de Oliveira GP, Lopes WD, da Costa AJ (2016). Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus*: Assessment of parasitological parameters. *Vet. Parasitol.* 217, 25–28.
- Fawzi EM, Cruz Bustos T, Gómez Samblas M, González-González G, Solano J, González-Sánchez ME, De Pablos LM, Corral-Caridad MJ, Cuquerella M, Osuna A, Alunda JM (2013). Intranasal immunization of lambs with serine/threonine phosphatase 2A against gastrointestinal nematodes. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1352–1359.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015). Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211, 54–59.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *Int. J. Parasitol.* 44, 429–436.
- Filbey KJ, Grainger JR, Smith KA, Boon L, Van Rooijen N, Harcus Y, Jenkins S, Hewitson JP, Maizels RM (2014). Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection. *Immunol. Cell Biol.* 92, 436–448.

- Fitzpatrick JL (2013). Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. *Vet. Parasitol.* 195, 233–248.
- Flores-Crespo J, Herrera-Rodríguez D, Mendoza de Gives P, Liébano-Hernández E, Vázquez-Prats VM, López-Arellano ME (2003). The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces. *J. Helminthol.* 77 (4), 297–303.
- Fox MT (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.* 72, 285–308.
- Gamble HR, Zajac AM (1992). Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet. Parasitol.* 41 (3-4), 211–225.
- Gauly M, Kraus M, Vervelde L, Van Leeuwen MA, Erhardt G (2002). Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 106 (1), 55–67.
- Gause WC, Urban JF Jr, Stadecker MJ (2003). The immune response to parasitic helminths: Insights from murine models. *Trends Immunol.* 24 (5), 269–277.
- Gibbons LM (1979). Revision of the genus *Haemonchus* Cobb 1898 (Nematoda: Tricoststrongylidae). *Syst. Parasitol.* 1 (1), 3–24.
- Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, de la Fuente C, Gómez-Iglesias LA, Alunda JM (1998). Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in merino and manchego sheep. Relationship to serum antibody response. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 45(8), 449–59.
- Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Gómez-Iglesias LA, Méndez S, Fernández-Pérez FJ, de la Fuente C, Alunda JM (1999). Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81, 281–293.
- Gómez-Muñoz MT, Gómez-Iglesias LA, Fernández-Pérez FJ, Méndez S, Domínguez IA, de la Fuente C, Alunda JM, Cuquerella M (2001). Experimental *Haemonchus contortus* infection and challenge in the Churra sheep breed: immunological and pathophysiological parameters. *Rev. Ibér. Parasitol.* 61 (3-4), 83–89.
- Gordon HM (1961). Thiabendazole: a highly effective anthelmintic for sheep. *Nature* 191, 1409–1410.

- Greer AW, Hamie JC (2016). Relative maturity and the development of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep: an overlooked paradigm? *Parasite Immunol.* 38, 263–272.
- Grencis RK (2015). Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 201–225.
- Guerrero FD, Miller RJ, Pérez de León AA (2012). Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int. J. Parasitol.* 42, 421–427.
- Guo Z, González JF, Hernandez JN, McNeilly TN, Corripio-Miyar Y, Frew D, Morrison T, Yu P, Li RW (2016). Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. *Sci. Rep.* 6, 26200.
- Hammad H, Lambrecht BN (2015). Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity* 43, 29–40.
- Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE (2005). Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J. Immunol.* 175, 7103–7107.
- Hein W, Shoemaker C, Heath A (2001). Future technologies for control of nematodes of sheep. *N. Z. Vet. J.* 49, 247–251.
- Hewitson JP, Maizels RM (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev. Vaccines* 13, 473–487.
- Hoberg EP, Zarlenga DS (2016). Evolution and biogeography of *Haemonchus contortus*. *Adv. Parasitol.* 93, 1–30.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy* 38, 709–750.
- Hoste H, Torres-Acosta JF, Paolini V, Aguilar-Caballero A, Etter E, Lefrileux Y, Chartier C, Broqua C (2005). Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Rumin. Res.* 60, 141–151.
- Jackson F, Coop RL (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, 95–107.

- Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 126, 18–27.
- Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashman K, Meeusen EN (1999). Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 28 (17), 362–368.
- Jasmer DP, Perryman LE, McGuire TC (1996). *Haemonchus contortus* GAI antigens: Related, phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein and released from the nematode during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (16), 8642–8647.
- Kabagambe EK, Barras SR, Li Y, Peña MT, Smith WD, Miller JE (2000). Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. *Vet. Parasitol.* 92, 15–23.
- Kalyanasundaram A, Jawahar S, Ilangopathy M, Palavesam A, Raman M (2015). Comparative immunoprophylactic efficacy of *Haemonchus contortus* recombinant enolase (rHcENO) and Con A purified native glycoproteins in sheep. *Exp. Parasitol.* 154, 98–107.
- Kaplan RM (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20, 477–481.
- Kearney PE, Murray PJ, Hoy JM, Hohenhaus M, Kotze A (2016). The ‘Toolbox’ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’s in and what’s out. *Vet. Parasitol.* 220, 93–107.
- Klei TR (1997). Immunological control of gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.* 72, 507–523.
- Knox DP (2012). Developments in RNA interference and genetic transformation to define gene function in parasitic helminths. *Parasitology* 139, 557–559.
- Knox DP, Redmond DL (2006). Parasite vaccines – recent progress and problems associated with their development. *Parasitology* 133, S1.
- Knox DP, Redmond DL, Jones DG (1993). Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology* 106, 395–404.

- Knox DP, Redmond DL, Newlands GF, Skuce PJ, Pettit D, Smith WD (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 DP, Redmond DL, Skuce PJ, Newlands GF (2001). The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 101, 311–335.
- Knox DP, Smith SK, Smith WD (1999). Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 21, 201–210.
- Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, MacKellar A, Huntley JF, Cornelissen AW, Vervelde L (2000). Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG₁ antibody: Serum IgE in vaccinated sheep. *Parasite Immunol.* 22, 13–20.
- Kotze AC, Prichard RK (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. *Adv. Parasitol.* 93, 397–428.
- Lacroux C, Nguyen TH, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud JP, Gruner L, Brunel JC, Francois D, Dorchies P, Jacquet P (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607–622.
- Lamb J, Elliott T, Chambers M, Chick B (2017). Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet. Parasitol.* 241, 48–51.
- Lane J, Jubb T, Shephard R, Webb-Ware J, Fordyce G (2015). Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Final Report. Meat and Livestock Australia, Sydney, Australia
- Leathwick DM, Besier RB (2014). The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences. *Vet. Parasitol.* 204, 44–54.
- Le Jambre LF, Dobson RJ, Lenane IJ, Barnes EH (1999). Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1101–1111.
- Le Jambre LF, Windon RG, Smith WD (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet. Parasitol.* 153, 302–312.

- Little PR, Hodge A, Maeder SJ, Wirtherle NC, Nicholas DR, Cox GG, Conder GA (2011). Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet. Parasitol.* 181, 180–193.
- MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ (2002). Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect. Immun.* 70, 427–433.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE (2004). Helminth parasites - masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89–116.
- Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 459–466.
- Martin RJ (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11–34.
- Martín S, Molina JM, Hernández YI, Ferrer O, Muñoz MC, López A, Ortega L, Ruiz A (2015). Influence of immunoprotection on genetic variability of cysteine proteinases from *Haemonchus contortus* adult worms. *Int. J. Parasitol.* 45, 831–840.
- Martínez-Valladares M, Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Cordero-Pérez C, Famularo MR, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Rojo-Vázquez FA (2013). The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *Vet. Parasitol.* 191, 177–181.
- Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E (2016). Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol.* 38, 744–753.
- Mavrot F, Hertzberg H, Torgerson P (2015). Effect of gastrointestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasit. Vectors* 8, 557.
- McClure SJ, Emery DL, Bendixsen T, Davey RJ (1998). Attempts to generate immunity against *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* in young lambs by vaccination with viable parasites. *Int. J. Parasitol.* 28, 739–746.
- McKellar QA, Jackson F (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* 20, 456–461.
- McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol.* 37, 605–613.

- McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301–310.
- Meeusen EN, Balic A (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16, 95–101.
- Meeusen EN, Balic A, Bowles V (2005). Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 121–125.
- Meier L, Torgerson PR, Hertzberg H (2016). Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet. Parasitol.* 229, 15–21.
- Meradi S, Bentounsi B, Zouyed I, Cabaret J (2011). The steppe species of gastrointestinal nematodes of small ruminants, with a focus on *Marshallagia*: climate as a key determinant. *Parasite* 18, 261–269.
- Miller JE, Horohov DW (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84, E124–E132.
- Molina JM, Martín S, Hernández YI, González JF, Ferrer O, Ruiz A (2012). Immunoprotective effect of cysteine proteinase fractions from two *Haemonchus contortus* strains adapted to sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 188, 53–59.
- Motran CC, Silvano L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, Celas DP, Cervi L (2018). Helminth infections: Recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. *Front. Immunol.* 9, 664.
- Mugambi JM, Wanyangu SW, Bain RK, Owango MO, Duncan JL, Stear MJ (1996). Response of Dorper and red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Res. Vet. Sci.* 61, 218–221.
- Munn EA (1977). A helical, polymeric extracellular protein associated with the luminal surface of *Haemonchus contortus* intestinal cells. *Tissue Cell* 9, 23–34.
- Munn EA, Greenwood CA, Coadwell WJ (1987). Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 94, 385–397.
- Munn EA, Smith TS, Graham M, Greenwood CA, Tavernor AS, Coetzee G (1993). Vaccination of merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. *Parasitology* 106, 63–66.

- Murray L, Geldhof P, Clark D, Knox DP, Britton C (2007). Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 37, 1117–1125.
- Newton SE, Meeusen EN (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol.* 25, 283–296.
- Newton SE, Munn EA (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15, 116–122.
- Nisbet AJ, McNeilly TN, Wildblood LA, Morrison AA, Bartley DJ, Bartley Y, Longhi C, McKendrick IJ, Palarea-Albaladejo J, Matthews JB (2013). Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine* 31, 4017–4023.
- Nisbet AJ, Meeusen EN, González JF, Piedrafita DM (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Adv. Parasitol.* 93, 353–396.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38, 414–423.
- Ortolani EL, Leal ML, Minervino AH, Aires AR, Coop RL, Jackson F, Suttle NF (2013). Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 196, 230–234.
- Peña MT, Miller JE, Fontenot ME, Gillespie A, Larsen M (2002). Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Vet. Parasitol.* 103, 259–265.
- Peña-Espinoza M, Thamsborg SM, Demeler J, Enemark HL (2014). Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet. Parasitol.* 206, 208–215.
- Piedrafita D, Preston S, Kemp J, de Veer M, Sherrard J, Kraska T, Elhay M, Meeusen E (2013). The effect of different adjuvants on immune parameters and protection following vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *PLoS ONE* 8, e78357.
- Piedrafita DP, de Veer MJ, Sherrard J, Kraska T, Elhay M, Meeusen EN (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, 7199–7204.

- Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martin IC, Donald AD (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56 (5), 239–251.
- Radhakrishnan L, Gomathinayagam S, Balakrishnan V (2007). Evaluation of anthelmintic effect of neem (*Azadirachta indica*) leaves on *Haemonchus contortus* in goats. *Res. J. Parasitol.* 2 (1), 57–62.
- Raleigh JM, Brandon MR, Meeusen EN (1996a). Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 18, 125–132.
- Raleigh JM, Meeusen EN (1996b). Developmentally regulated expression of a *Haemonchus contortus* surface antigen. *Int. J. Parasitol.* 26 (6), 673–675.
- Redmond DL, Knox DP (2004). Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252–4261.
- Rinaldi L, Catelan D, Musella V, Cecconi L, Hertzberg H, Torgerson PR, Mavrot F, De Waal T, Selemetas N, Coll T, Bosco A, Biggeri A, Cringoli G (2015). *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospat. Health* 9, 325.
- Roberts B, Antonopoulos A, Haslam SM, Dicker AJ, McNeilly TN, Johnston SL, Dell A, Knox DP, Britton C (2013). Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet. Res.* 44, 111.
- Robertson SJ, Martin RJ (1993). Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.* 108, 170–178.
- Rocha RA, Bricarello PA, Silva MB, Houdijk JG, Almeida FA, Cardia DF, Amarante AF (2011). Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 181, 229–238.
- Rodríguez-Valle M, Taoufik A, Valdés M, Montero C, Hassan I, Hassan SM, Jongejan F, de la Fuente J (2012). Efficacy of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. *Vaccine* 30, 3453–3458.
- Rose H, Caminade C, Bolajoko MB, Phelan P, Van Dijk J, Baylis M, Williams D, Morgan ER (2016). Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, in sheep in Europe. *Glob. Chang. Biolo.* 22, 1271–1285.

- Rose H, Rinaldi L, Bosco A, Mavrot F, de Waal T, Skuce P, Charlier J, Torgerson PR, Hertzberg H, Hendrickx G, Vercruyse J, Morgan ER (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet. Rec.* 176, 546–546.
- Ruiz A, Molina JM, González JF, Conde MM, Martín S, Hernández YI (2004). Immunoprotection in goats against *Haemonchus contortus* after immunization with cysteine protease enriched protein fractions. *Vet. Res.* 35, 565–572.
- Sackett DM, Holmes PW, Abbott KA, Jephcott S, Barber M (2006). Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. Final Report Project Code AHW.087. Meat and Livestock Australia Ltd, North Sydney.
- Santos MC, Xavier JK, Amarante MR, Bassetto CC, Amarante AF (2014). Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. *Vet. Parasitol.* 203, 127–138.
- Schafer AS, Leal MLR, Molento MB, Aires AR, Duarte MMMF, Carvalho FB, Tonin AA, Schmidt L, Flores EMM, França RT, Grandó TH, Minho AP, Krause A, Antoniazzi AQ, Lopes STA (2015). Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. *Small Rumin. Res.* 123, 183–188.
- Schallig HD, Van Leeuwen MA, Verstrepen BE, Cornelissen AW (1997). Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88, 203–213.
- Smith SK, Pettit D, Newlands GF, Redmond DL, Skuce PJ, Knox DP, Smith WD (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 SK, Smith WD (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 WD, Angus KW (1980). *Haemonchus contortus*: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. *Res. Vet. Sci.* 29 (1), 45–50.
- Smith WD, Jackson F, Jackson E, Williams J (1985). Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4 1/2 and 10 month-old lambs. *J. Comp. Pathol.* 95, 235–245.

- Smith WD, Newlands GF, Smith SK, Pettit D, Skuce PJ (2003a). Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunol.* 25, 313–323.
- Smith WD, Skuce PJ, Newlands GF, Smith SK, Pettit D (2003b). Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunol.* 25, 521–530
- Smith WD, Smith SK (1993). Evaluation of aspects of the protection afforded to sheep immunised with a gut membrane protein of *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 55, 1–9.
- Smith WD, Smith SK, Murray JM (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16 (5), 231–241.
- Smith WD, Smith SK, Pettit D, Newlands GF, Skuce PJ (2000). Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 22, 63–71.
- Smith WD, Van Wyk JA, Van Strijp MF (2001). Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. *Vet. Parasitol.* 98, 285–297.
- Soulsby EJJ (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Interamericana. México.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S73–S80.
- Tavernor AS, Smith TS, Langford CF, Munn EA, Graham M (1992). Vaccination of young Dorset lamb against haemonchosis. *Parasite Immunol.* 14 (6), 645–655.
- Torres-Acosta JF, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89–96.
- Urquhart GM, Jarrett WF, Jennings FW, McIntyre WI, Mulligan W (1966a). Immunity to *Haemonchus contortus* infection: relationship between age and successful vaccination with irradiated larvae. *Am. J. Vet. Res.* 27 (121), 1645–1648.

- Urquhart GM, Jarrett WF, Jennings FW, McIntyre WI, Mulligan W, Sharp NC (1966b). Immunity to *Haemonchus contortus* infection. Failure of x-irradiated larvae to immunize young lambs. *Am. J. Vet. Res.* 27 (121), 1641–1643.
- Van den Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P (2015). *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* 209, 278–280.
- Van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* 212, 475–490.
- Van Wyk JA (2001). Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68 (1), 55–67.
- Vervelde L, Kooyman FN, Van Leeuwen MA, Schallig HD, MacKellar A, Huntley JF, Cornelissen AW (2001). Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. *Parasite Immunol.* 23, 419–426.
- Vervelde L, Van Leeuwen MA, Kruidenier M, Kooyman FN, Huntley JF, Van Die I, Cornelissen AW (2002). Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 24 (4), 189–201.
- Waller PJ (1997). Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 72 (3-4), 391–405.
- Waller PJ (2005a). Domestication of ruminant livestock and the impact of nematode parasites: possible implications for the reindeer industry. *Rangifer* 25, 39–50.
- Waller PJ, Chandrawathani P (2005b). *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop. Biomed.* 22(2), 131–137.
- Waller PJ (2006). From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 139, 1–14.
- Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, S43–50.
- Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J (1995). World Association for the Advancement of Vet. Parasitol. (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181–213.

Yang Y, Guo X, Zhang H, Huang Y, Chen X, Du A (2017). Characterization of the development of *Haemonchus contortus* ZJ strain from gerbils. *Parasit. Vectors* 10, 505.

Yanming S, Ruofeng Y, Muleke CI, Guangwei Z, Lixin X, Xiangrui L (2007). Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29, 319–326.

Zajac AM (2006). Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 529–541.

Zaph C, Rook KA, Goldschmidt M, Mohrs M, Scott P, Artis D (2006). Persistence and function of central and effector memory CD4⁺ T cells following infection with a gastrointestinal helminth. *J. Immunol.* 177, 511–518.

Zarlenga DS, Hoberg EP, Tuo W (2016). The identification of *Haemonchus* species and diagnosis of haemonchosis. *Adv. Parasitol.* 93, 145–180.

Zvinorova PI, Halimani TE, Muchadeyi FC, Matika O, Riggio V, Dzama K (2016). Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes – the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Vet. Parasitol.* 225, 19–28.

8. Objetivos

- I. Utilización de un modelo subrogado. Efecto de un adyuvante bacteriano (Lipopolisacárido de *Escherichia coli* + *Propionibacterium acnes*) sobre la infestación por nematodos gastrointestinales en un modelo murino (*Heligmosomoides polygyrus*/ratón BALB/c).
- II. Estudio de la inmunomodulación inducida por un protista (*Leishmania infantum*) sobre la infestación por *H.polygyrus* en ratón BALB/c.
- III. Caracterización de la proteína nativa Hc23 de *Haemonchus contortus* y el homólogo recombinante rHc23, incluyendo su secuenciación y estudio cristalográfico preliminar.
- IV. Evaluación de la capacidad inmunoprotectora de la proteína recombinante rHc23 en corderos sometidos a una infestación por *H.contortus* y su relación con la dosis antigénica y adyuvante.
- V. Valoración de la protección inducida por rHc23 + inmunomodulador bacteriano (LPS + *P.acnes*) en corderos expuestos a infestaciones seriadas (“*trickle infections*”) con dosis bajas (1.000 L3/administración) y altas (2.000 L3/administración) de *H.contortus*.

Capítulo 2

Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) y *Propionibacterium acnes* inactivado inducen una respuesta protectora parcial en primoinfecciones por *Heligmosomoides polygyrus*

2.1. Resumen

Las nematodosis gastrointestinales son enfermedades parasitarias frecuentes y de gran importancia económica en animales domésticos. Los tratamientos disponibles son limitados y la resistencia antihelmíntica es la norma en algunas especies hospedadoras. Este escenario favorece la exploración de medidas alternativas de control, entre ellas el uso de inmunomoduladores. Estos compuestos actúan a través de la modulación de la respuesta inmunitaria innata y adquirida, con mejora los parámetros parasitológicos y fisiológicos. Se ha estudiado el efecto de Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) y células inactivadas de *Propionibacterium acnes* en primoinfestaciones por *Heligmosomoides polygyrus* (Trichostrongyloidea) en ratón.

La infestación por el helminto induce un aumento de los niveles séricos e intestinales de IgG₁ parásito-específicos y una reducción significativa de la respuesta linfoproliferativa inespecífica (ConA). El tratamiento con el inmunomodulador (días -2, 0, 7 y 14 postinfestación) provoca un aparente retraso del desarrollo larvario en la mucosa. Asimismo, la eliminación fecal de huevos en los animales tratados fue significativamente menor, con una contaminación ambiental de huevos de casi la mitad que los animales solo infestados. La infestación con el helminto provocó una respuesta inflamatoria local, no relacionada con el tratamiento inmunomodulador, así como la presencia de lesiones intestinales moderadas o leves al inicio de la infestación (días 7 y 16 pi), menores en el grupo inmunomodulado.

Los resultados preliminares obtenidos apuntan hacia el interés de los inmunomoduladores para el control de las nematodosis gastrointestinales, reduciendo la contaminación ambiental con huevos del parásito y retrasando su desarrollo en el interior de la mucosa. El tratamiento de los animales evitó de manera parcial la inmunosupresión temprana característica de las infestaciones por helmintos. No se observó relación entre los niveles de IgG₁ y la reducción de los parámetros parasitológicos, lo que apunta al escaso papel protector de esta inmunoglobulina en las infestaciones por *H. polygyrus*.

2.2. Introducción

Las infestaciones por helmintos son frecuentes en la mayoría de los animales domésticos y la norma en animales de renta en sistemas de producción extensivos. Los fármacos disponibles para el tratamiento de las nematodosis gastrointestinales (NGI) son limitados. Asimismo, se han desarrollado resistencias frente a una amplia gama de estos productos (Waller, 1997). Por otra parte, los ensayos de inmunización de animales domésticos frente a NGI de importancia económica, en general, no han mostrado resultados satisfactorios (Newton y Meeusen, 2003; Hein y Harrison, 2005).

Heligmosomoides polygyrus (Nematoda, Trichostrongyloidea), parásito natural de ratón, es una especie próxima a las que causan procesos de relevancia en salud y producción animal (ej. *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Haemonchus*). Este nematodo ha sido empleado como modelo para el estudio de la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador inducida por los NGI (Doligalska et al., 2006; Maizels et al., 2012; Reynolds et al., 2012). Una primoexposición del hospedador a *H. polygyrus* induce una respuesta predominante de tipo Th2 (Wahid et al., 1994) acompañada de la activación de células T reguladoras (Treg), lo que impide la expulsión efectiva del parásito y da lugar a una infestación crónica en la mayoría de las estirpes de ratón. La ausencia de respuesta protectora tras primoinfestaciones está relacionada con la actividad inmunosupresora de los NGI, ya que tras la eliminación de la infestación primaria (ej. con tratamiento antihelmíntico) se desarrolla una respuesta inmunitaria eficaz (Maizels et al., 2012).

Las bacterias inactivadas o los extractos y componentes bacterianos han sido utilizados como adyuvantes desde el primer cuarto del siglo XX. Recientemente, numerosas preparaciones han sido empleadas para la mejora de los parámetros parasitológicos y fisiológicos en animales domésticos (Hein et al., 2001) y como moduladores de la respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida. *Propionibacterium* ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, una potente actividad inmunomoduladora, aumentando el número de macrófagos y su actividad fagocitaria vía Toll-like Receptor 9 (TLR9) con la consecuente producción de IFN- γ (Ananias et al., 2007; Kalis et al., 2005). Por su parte, los lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS) provocan la activación de células dendríticas vía TLR4 (Yadav et al., 2006). Asimismo, *Propionibacterium* induce hipersensibilidad a otros componentes bacterianos, lo que

contribuye a una activación adicional del sistema inmunitario innato (Tchaptchet et al., 2012). La asociación de *Propionibacterium* inactivado con LPS de *E.coli* causa una mejora significativa de la respuesta inmunitaria en corderos infestados por *Haemonchus contortus* (Abel et al., 2009). Ya que los mecanismos inmunitarios protectores están presentes pero no son estimulados en primoinfestaciones por *H.polygyrus*, hemos explorado de forma preliminar el efecto de la administración de *P.acnes* + LPS *E.coli* en primoinfestaciones de ratones BALB/c con *H.polygyrus*.

2.3. Material y métodos

a. Parásitos

Los aislados de *H.polygyrus* fueron donados inicialmente por la Dra. M. Grueiro (Facultad de Farmacia, UCM) y mantenidos en nuestro laboratorio mediante pases sucesivos en ratón cada 6 meses. Las fases infestantes (L3), fueron obtenidas mediante la incubación del material fecal en discos de papel de filtro depositados sobre placas de Petri con agua destilada a 22°C durante 7 días.

b. Ratones y diseño experimental

Las hembras de ratón BALB/c de 2 meses de edad fueron adquiridas en Harlan Laboratories Models SL (Barcelona, España) y mantenidas en nuestras instalaciones (n° ES280790000155) en grupos de 7-8 animales/jaula a temperatura controlada de 22-25°C, ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h, y agua y pienso comercial para ratones *ad libitum*. Los animales fueron distribuidos al azar en 3 grupos experimentales (G1: 15 ratones, G2: 15 ratones, G3: 9 ratones).

Los animales del G1 recibieron 4 dosis intramusculares de 0,2µg de LPS de *E.coli* + 2,5µg de extracto de *P.acnes* (Infervac®, Lab Calier, España) los días -2, 0, 7 y 14 postinfestación (pi). En el día 0 pi, los animales de los grupos G1 y G2 fueron infestados con 300 L3 de *H.polygyrus* en 0,2mL de agua destilada usando un catéter bucoesofágico. Se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena submandibular los días -10, -1, 6, 13 y 25 pi. Se realizaron análisis coprológicos cada 3 días desde el día 9 pi en adelante. Para ello los ratones fueron aislados individualmente durante 30

minutos, se recogieron sus heces y se realizó el recuento de huevos mediante una técnica de flotación modificada. Los resultados fueron expresados como huevos por gramo de heces (hpg). Los ratones fueron eutanasiados por inhalación de CO₂ los días 7, 16 y 25 pi: 5 animales de G1 y G2 y 3 animales del grupo testigo (G3) en cada punto de sacrificio. El intestino se extrajo y se colocó en tampón fosfato salino (PBS) frío y los helmintos adultos fueron recuperados y contados. Asimismo, 1 gramo de muestra de intestino fue congelado (-20°C), homogeneizado, centrifugado (15 y 10 min) a 3.000 xg, 4°C y los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C. Se tomaron muestras representativas de duodeno (0,5 cm) para el estudio histológico. El diseño y los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de la UCM y la Comunidad de Madrid.

c. Enzimoimmunoensayo (ELISA) y Western Blot

Se lavaron ejemplares adultos de *H.polygyrus* en PBS frío (4°C) suplementado con inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania) y fueron sometidos a ciclos de congelación/descongelación (-80°C/temperatura ambiente), homogeneizados y centrifugados a 3.000 xg durante 30 min a 4°C. La concentración de proteínas del extracto soluble (ESA) fue determinada por el método de Bradford (1976). Se valoró la respuesta de anticuerpos específicos en muestras de suero (IgG₁) e intestino (IgG₁ e IgA) mediante ELISA. Las condiciones óptimas del ensayo para la IgG₁ fueron: dilución sérica de 1/800, dilución intestinal de 1/4 y dilución de conjugado anti-mouse IgG₁-HRP (Nordic, Países Bajos) de 1/2500. La IgA se estimó con una dilución intestinal de 1/4 y una dilución de conjugado (anti-mouse IgA-AP, Sigma, EE.UU.) de 1/30000. Las microplacas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) se tapizaron con ESA de *H.polygyrus* (5µg/mL). ESA fue separado en gel SDS-PAGE al 12,5%. Las condiciones del Western Blot (WB) fueron las descritas por Cuquerella et al. (1991) empleando una dilución sérica de 1/50 y 1/1000 de conjugado (anti-mouse IgG₁-HRP, Nordic, Países Bajos). Los marcadores de peso molecular empleados fueron de Bio-Rad (Alemania) y GE Healthcare (Reino Unido).

d. Linfoproliferación

La proliferación linfocitaria fue determinada empleando el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (MTT) (Plumb, 2004) con algunas modificaciones. Los linfonódulos mesentéricos fueron diseccionados y homogeneizados en medio RPMI-1640 (Lonza, Suiza). La suspensión fue filtrada (100 μm), centrifugada a 300 xg, 10 min, 4°C y los sedimentos fueron resuspendidos en el mismo medio con 10% de suero bovino fetal (Sera Laboratories International, Reino Unido), 100 U/mL de penicilina + 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 1% de L-glutamina. Las células viables (4×10^5 , 200 μL) fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, EEUU) con 5 $\mu\text{g/mL}$ de ESA *H.polygyrus* y cultivadas 96 horas a 37°C y atmósfera de 5% CO_2 . La proliferación celular fue determinada añadiendo 50 μL de MTT (5mg/mL) (Sigma, EE.UU.) + 200 μL de medio e incubando las placas en cámara húmeda a 37°C, 4 horas y 5% CO_2 . Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado; se incluyeron testigos positivos (Concanavalina A, 5 $\mu\text{g/mL}$) (GE Healthcare, Reino Unido) y negativos. Los resultados fueron expresados como Índices de Estimulación (IE): Densidad óptica (DO) de los cultivos celulares estimulados / DO de los testigos no estimulados. Se consideraron positivos los $\text{IE} \geq 1,5$.

e. Estudio histológico

Las secciones de duodeno fueron fijadas en formaldehído al 4%, incluidas en parafina, teñidas con hematoxilina-eosina y examinadas. El grado de inflamación y daño tisular fue clasificado con valores de 0 a 3: grado 0, tejido normal; grado 1, presencia de alguna de las siguientes características: atrofia o acortamiento de células epiteliales, hiperplasia o dilatación de criptas, linfangiectasia, fibrosis, edema, presencia de infiltrado de eosinófilos, neutrófilos, histiocitos o linfocitos y granulomas parasitarios; grado 2, presencia moderada y grado 3, presencia intensa. Los valores medios fueron determinados en animales representativos de cada grupo experimental los días 7, 16 y 25 pi.

f. Análisis estadístico

Los resultados (media \pm error estándar) fueron analizados usando el paquete estadístico Graph-Pad. El nivel de significación se indica en cada experimento. Los perfiles de WB fueron analizados con el programa Image J (NIH).

2.4. Resultados

a. Recuento fecal de huevos

Los animales del grupo infestado no tratado (G2) comenzaron a eliminar huevos entre los días 9 y 12 pi, y alcanzaron el pico de eliminación el día 15 pi (8.352 ± 6.306 hpg), seguido de una nueva elevación al final del experimento (día 24 pi) (Figura 1). La mayor diferencia ($P < 0,001$) en los valores de hpg se observaron el día 24 pi cuando el G2 mostró un valor medio de 12.547 ± 5.732 hpg respecto al valor hallado en el grupo de animales tratados con inmunomodulador (2.321 ± 1.220 hpg). Se observó una disminución significativa ($P = 0,0041$) del sumatorio de huevos en el grupo tratado (G1). Por ello, la contaminación ambiental del grupo inmunomodulado solo representó el 54,6 % de los huevos eliminados por el grupo infestado no tratado (G2). El grupo testigo (G3) no mostró eliminación fecal de huevos a lo largo del experimento.

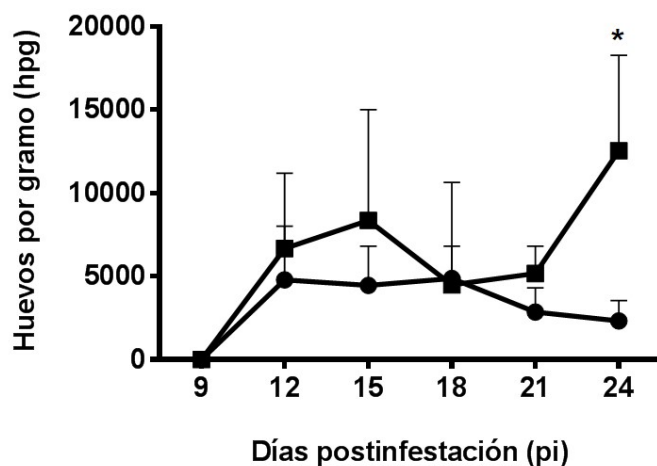


Figura 1.

Recuento fecal de huevos (hpg) de ratones infestados con *H.polygyrus* durante el periodo experimental.

●, Grupo 1, Infestado y tratado con LPS de *E.coli* y *Propionibacterium*.

■, Grupo 2, Infestado y no tratado. Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

b. Respuesta de anticuerpos frente a *H.polygyrus* (ELISA y WB)

La infestación por el helminto provocó una respuesta sérica de anticuerpos específicos IgG₁ significativa (G1: $P<0,01$; G2: $P<0,001$) frente a ESA de *H.polygyrus* con independencia del tratamiento con el inmunomodulador (Figura 2A). La respuesta intestinal IgG₁ mostró un patrón similar (Figura 2B), aunque solo se observaron diferencias significativas entre los animales infestados y no infestados el día 25 pi (G1 y G3, $P<0,05$; G2 y G3, $P<0,01$). Se apreció una correlación positiva entre la respuesta IgG₁ sérica e intestinal frente *H.polygyrus* (G1, $P=0,0004$; G2, $P=0,0069$). Los valores intestinales de IgA mostraron un ligero aumento no significativo en los ratones infestados (resultados no mostrados).

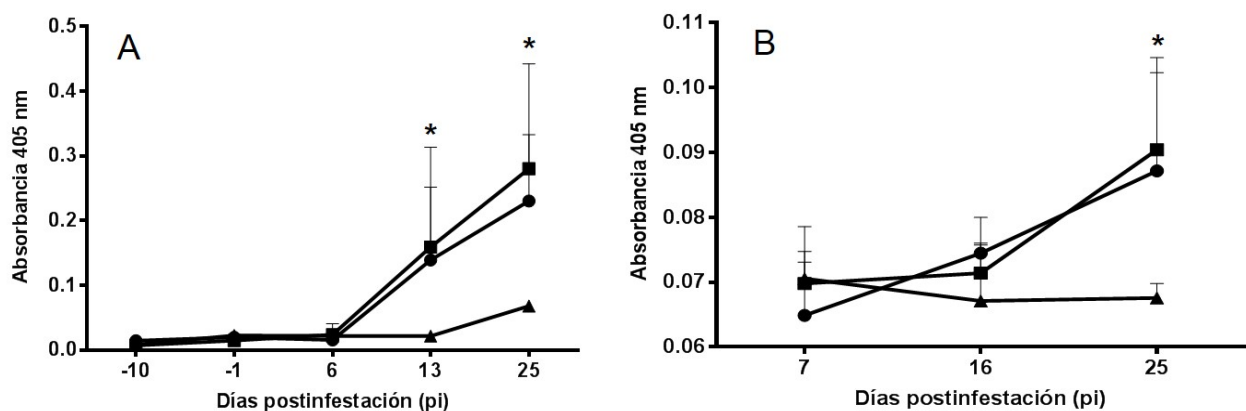


Figura 2.

Respuesta de anticuerpos específicos determinada por ELISA en los grupos de ratones infestados (G2), ratones infestados + tratados (G1) y ratones control no infestados (G3) frente al extracto soluble de *H.polygyrus* (ESA) a lo largo del experimento. (A) IgG₁ sérica; (B) IgG₁ intestinal. ●, Grupo 1; ■, Grupo 2; ▲, Grupo 3. Los datos representados son valores medios \pm error estándar.

El análisis por Western Blot mostró una reactividad limitada en ESA, en la región de peso aproximado 65 KDa, con sueros de animales en la fase patente de la infestación (G1 y G2) así como un débil reconocimiento de una banda de 94 KDa en los sueros de los animales del G2 (Figura 3).

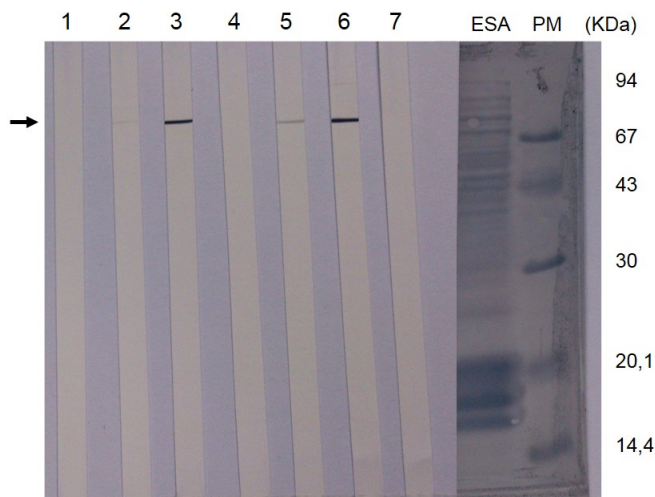


Figura 3.

Western Blot de ESA de *H.polygyrus* con sueros de ratones experimentales. Carriles 1-3: Grupo 1; días 7, 16 y 25 pi. Carriles 4-6: Grupo 2; días 7, 16 y 25 pi. Carril 7: ratones no infestados. PM, marcador de peso molecular en KDa.

c. Carga parasitaria y respuesta linfoproliferativa local

La Figura 4 muestra el número de adultos de *H.polygyrus* obtenidos del intestino de ratones infestados en 3 puntos del experimento (periodo prepatente, patencia inicial, patencia tardía). En todos los casos la población de helmintos fue inferior en el grupo de animales tratados con el inmunomodulador (G1). El número de formas preadultas recuperadas en el primer muestreo (día 7 pi) fue significativamente mayor en el G2 ($100 \pm 6,3$ vs. $14,8 \pm 12,4$ helmintos/ratón) ($P < 0,001$), con una tasa de implantación estimada del 33,34% vs. 4,94% en el G1.

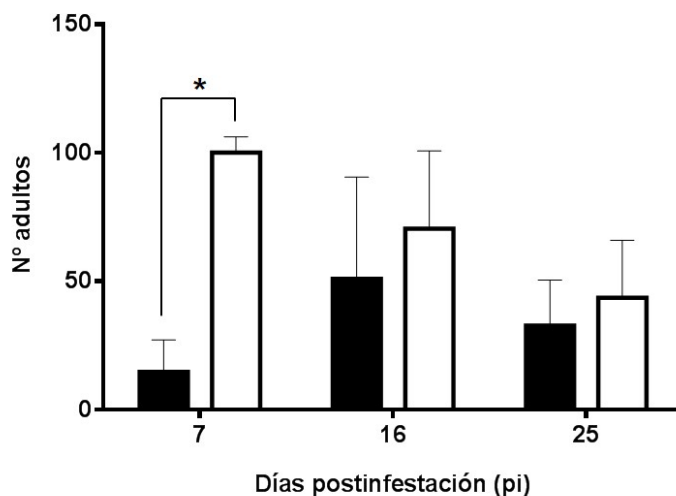


Figura 4.

Número medio de preadultos y adultos de *Heligmosomoides* recuperados en el intestino los días 7, 16 y 25 pi. Barras negras: Grupo 1; barras blancas: Grupo 2. Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

La infestación con *H.polygyrus* indujo una inmunosupresión inespecífica significativa ($P=0,0068$) durante el periodo prepatente en los ratones infestados no tratados (G2). El tratamiento con LPS + *Propionibacterium* provocó una notable recuperación de la capacidad linfoproliferativa (Figura 5). En las muestras obtenidas en el periodo patente (días 16 y 25 pi) ambos grupos infestados se comportaron de manera similar, con valores aproximados del 50% de los obtenidos en los animales no infestados. Los ratones infestados (G1 y G2) presentaron valores de estimulación específica (anti-ESA) más elevados que los ratones no infestados, principalmente en el periodo prepatente de la infestación ($P<0,05$) (datos no mostrados).

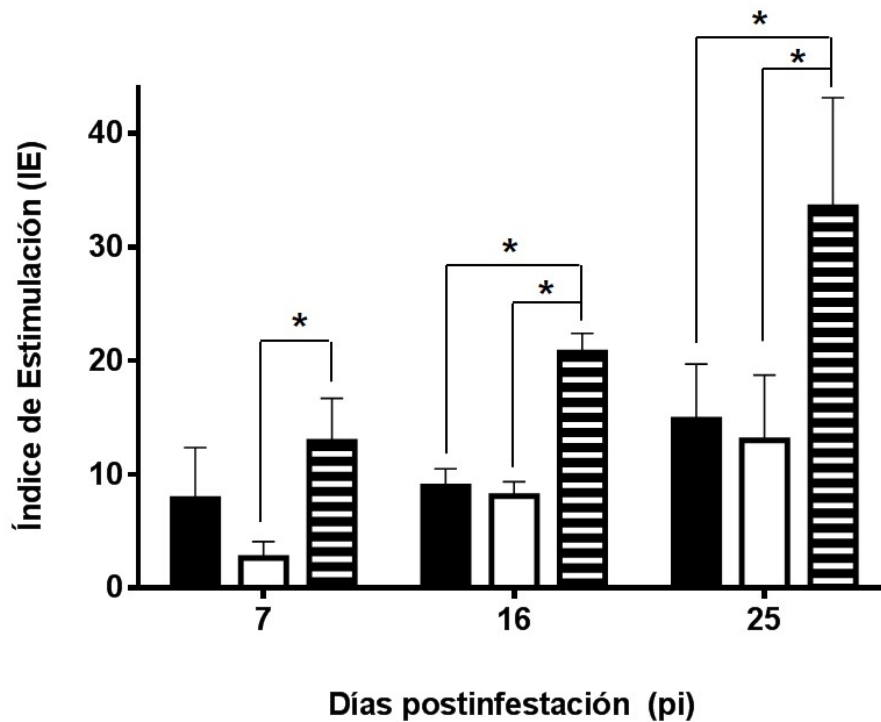


Figura 5.

Respuesta linfoproliferativa inespecífica (ConA) de los grupos experimentales en la prepatencia (día 7 pi), patencia inicial (día 16 pi) y patencia tardía (día 25 pi). Los valores representados (media \pm error estándar) corresponden al Índice de estimulación (IE). Barras negras: Grupo 1; barras blancas: Grupo 2; barras rayadas: Grupo 3.

d. Estudio histológico

Las lesiones intestinales fueron, en general, moderadas y especialmente visibles en la prepatencia (día 7 pi) y patencia inicial (día 16 pi). Las alteraciones fueron más evidentes en el grupo infestado no tratado (G2), con atrofia de las vellosidades y dilatación e hiperplasia de las criptas (Tabla 1).

Tabla 1.

Puntuación de las lesiones (0, 1, 2 y 3)* de la mucosa duodenal de ratones BALB/c infestados con *Heligmosomoides polygyrus* en diferentes días postinfestación (dpi).

Grupo	dpi	Atrofia	Hiperplasia de criptas	Dilatación de criptas	Linfangiectasia	Fibrosis	Edema	Linfocitos intraepiteliales
G1	7	0	1	1	0	1	1	0
G2	7	2	2	2	0	2	1	0
G1	16	1	1	1	0	0	1	1
G2	16	3	1	2	2	2	1	0
G1	25	1	2	1	0	1	1	0
G2	25	1	2	1	0	1	1	0

* 0, Mucosa normal; 1, presencia leve; 2, presencia moderada; 3, presencia intensa. G1, tratado con LPS + *Propionibacterium* e infestado. G2, no tratado e infestado.

Los ratones infestados mostraron una respuesta inflamatoria similar los días 16 y 25 pi, independientemente del tratamiento recibido, con alto número de linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y eosinófilos (Tabla 2) (Figura 6). La única diferencia aparente fue el menor número de neutrófilos observados durante la prepatencia en el grupo de animales tratados con el inmunomodulador (G1).

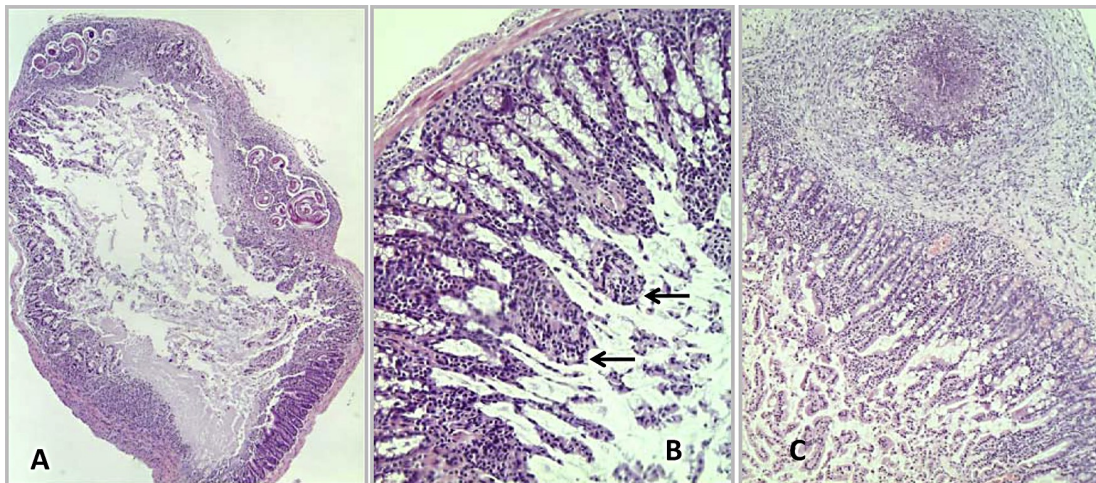


Figura 6.

Lesiones histológicas representativas de ratones infestados con *H. polygyrus*. (A): Periodo prepatente (día 7 pi), pérdida de la capa epitelial, erosiones y úlceras en la mucosa; numerosos neutrófilos y eosinófilos en lámina propia, submucosa y capas musculares. Se observan los estadios larvarios en la mucosa. (B): Periodo de patencia inicial (día 16 pi), infiltración de neutrófilos en lámina propia y ápice de vellosidades (flechas); acumulación de mucus y restos celulares en las criptas e hiperplasia leve. (C): Periodo patente (día 25 pi), granulomas parasitarios con una zona central rodeada de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos; infiltrado difuso en lámina propia.

Tabla 2.

Puntuación (0, 1, 2 y 3)* de la respuesta inflamatoria en la mucosa duodenal de ratones BALB/c infestados con *Heligmosomoides polygyrus* en diferentes días postinfestación (dpi).

Grupo	dpi	Linfocitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Histiocitos	Granulomas intramucosos
G1	7	1 dif	1	2	3	3
G2	7	2 dif	3	2	3	3
G1	16	2 dif	2	1	1	0
G2	16	3	3	2	1	0
G1	25	3 dif	2	1	2	2
G2	25	2	2	1	2	1

* 0, Mucosa normal; 1, presencia leve; 2, presencia moderada; 3, presencia intensa.

Proceso inflamatorio: dif, distribución difusa del infiltrado inflamatorio. G1, tratado con LPS + *Propionibacterium* e infestado. G2, no tratado e infestado.

2.5. Discusión

La eliminación fecal de huevos (hpg) es una de las determinaciones más adecuadas para la estimación *in vivo* del grado de infestación de los animales y de su resistencia a las tricostrongilidosis. En nuestro experimento, el patrón de eliminación de huevos fue dependiente del tratamiento con el inmunomodulador, observándose en los animales tratados (G1) una menor eliminación fecal de huevos. Se ha considerado que a respuesta de anticuerpos IgG₁ está estrechamente relacionada con la protección (Williams y Behnke, 1993; Pritchard et al., 1984). Sin embargo, nuestros resultados mostraron un aumento significativo de los valores séricos e intestinales de IgG₁ en ambos grupos infestados, independientemente de las diferencias en el recuento fecal de huevos. Estos resultados apuntan al escaso papel protector de la IgG₁ en las infestaciones por *H.polygyrus* (Wahid y Behnke, 1993; Harris y Gause, 2011). Asimismo, el análisis mediante Western Blot confirmó el limitado reconocimiento antigénico de *H.polygyrus* en primoinfestaciones (Ben-Smith et al., 1999), observándose una banda (~ 65 KDa) que podría corresponder a la proteína descrita por Hewitson et al. (2011).

La respuesta inmunitaria en ratones frente a las infestaciones por *H.polygyrus* es compleja e involucra una respuesta predominante Th2 acompañada de una activación de células Treg y una inhibición de citoquinas Th1 (Setiawan et al., 2007; Maizels et al., 2012). La reducción de la respuesta linfoproliferativa inespecífica (ConA) observada en nuestro experimento coincide con el efecto inmunosupresor ejercido por este nematodo (Reynolds et al., 2012). No obstante, la administración del inmunomodulador (LPS + *Propionibacterium*) evitó de manera parcial esta inmunosupresión temprana. El menor número de helmintos adultos observado en los ratones tratados con el inmunomodulador (G1) (día 7 pi) sugiere un retraso en el desarrollo larvario en el interior de la mucosa. Los cambios producidos en la mucosa intestinal no fueron concluyentes. Se observó en el estudio histológico una respuesta inflamatoria, acortamiento de las vellosidades e hiperplasia de las criptas (Doligalska et al., 2006), sin diferencias aparentes entre animales tratados (G1) y no tratados (G2). El menor número de neutrófilos determinado en el grupo de animales tratados confirmó el limitado papel de este tipo celular en la protección (Reynolds et al., 2012).

El complejo LPS + extracto de *Propionibacterium* ha mostrado propiedades inmunomoduladoras *in vitro*, *ex vivo* (ej. reclutamiento de células NKT y aumento de toxicidad y diferenciación de fagocitos: Ananias et al., 2007; Mussalem et al., 2012) e *in vivo* (Abel et al., 2009; Tchaptchet et al., 2012). A pesar de ser un estudio preliminar, nuestros resultados han mostrado que la administración del inmunomodulador reduce la contaminación ambiental de huevos el parásito y provoca un retraso en el desarrollo larvario. Claramente, este tratamiento (dosis, calendario) debe ser refinado, pero el elevado coste de los antihelmínticos, el aumento de las resistencias desarrolladas frente a ellos (Waller, 1997) y la ausencia de una inmunoprofilaxis eficaz frente a NGI, sugiere el uso de inmunomoduladores como medida alternativa para el control de las NGI en animales domésticos.

2.6. Referencias

Abel LC, Chen S, Ricca LG, Martins MF, Garcia M, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Shaw RJ, Longo-Maugéri IM (2009). Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunol.* 31, 604–612.

Ananias RZ, Rodrigues EG, Braga EG, Squaiella CC, Mussalem JS, Longhini ALF, Travassos LR, Longo-Maugéri IM (2007). Modulatory effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on peritoneal exudate cells from C57Bl/6 mice: major NKT cell recruitment and increased cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.* 65, 538–548.

Ben-Smith A, Wahid FN, Lammas DA, Behnke JM (1999). The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG₁ and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunol.* 21, 383–395.

Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM (1991). Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. *Vet. Parasitol.* 38, 131–143.

Doligalska M, Rzepecka J, Drela N, Donskow K, Gerwel-Wronka M (2006). The role of TGF- β in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.* 28, 387–395.

Harris N, Gause WC (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminthes. *Trends Immunol.* 32, 80–88.

- Hein WR, Harrison GB (2005). Vaccines against veterinary helminths. *Vet. Parasitol.* 132, 217–222.
- Hein WR, Shoemaker CB, Heath AC (2001). Future technologies for control of nematodes of sheep. *N. Z. Vet. J.* 49, 247–251.
- Hewitson JP, Filbey KJ, Grainger JR, Dowle AA, Pearson M, Murray J, Marcus Y, Maizels RM (2011). *Heligmosomoides polygyrus* elicits a dominant nonprotective antibody response directed against restricted glycan and peptide epitopes. *J. Immunol.* 187, 4764–4777.
- Kalis C, Gumenscheimer M, Freudenberg N, Tchaptchet S, Fejer G, Heit A, Akira S, Galanos C, Freudenberg MA (2005). Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol.* 174, 4295–4300.
- Maizels RM, Hewitson JP, Murray J, Marcus YM, Dayer B, Filbey KJ, Grainger JR, McSorley HJ, Reynolds LA, Smith KA (2012). Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Exp. Parasitol.* 132, 76–89.
- Mussalem JS, Squaiella-Baptistao CC, Teixeira D, Thies FG, Popi AF, Mariano M, Longo-Maugéri I (2012). Adjuvant effect of killed *Propionibacterium acnes* on mouse peritoneal B-1 lymphocytes and their early phagocyte differentiation. *PLoS One* 7.
- Newton SE, Meeusen EN (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol.* 25, 283–296.
- Plumb JA (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Med.* 88, 165–169.
- Pritchard DI, Behnke JM, Williams DJ (1984). Primary infection sera and IgG₁ do not block host-protective immunity to *Nematospiroides dubius*. *Immunology* 5, 73–81.
- Reynolds LA, Filbey KJ, Maizels RM (2012). Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Semin. Immunopathol.* 34, 829–846.
- Setiawan T, Metwali A, Blum AM, Nedim Ince M, Urban Jr JF, Elliott DE, Weinstock JV (2007). *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory T-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. *Infect. Immun.* 75, 4655–4663.
- Tchaptchet S, Gumenscheimer M, Kalis C, Freudenberg N, Hölscher C, Kirschning CJ, Lamers M, Galanos C, Freudenberg MA (2012). TLR9-dependent and independent pathways drive activation of the immune system by *Propionibacterium acnes*. *PLoS One* 7, e39155.

Wahid FN, Behnke JM (1993). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): parasite specific IgG₁ antibody responses and primary response phenotype. *Parasite Immunol.* 15, 401–413.

Wahid FN, Behnke JM, Grecis RK, Else KJ, Ben-Smith AW (1994). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus*: Th2 cytokies and primary response phenotype. *Parasitology* 108, 461–471.

Waller PJ (1997). Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 72, 391–405.

Williams DJ, Behnke JM (1983). Host protective antibodies and serum immunoglobulin isotypes in mice chronically infected or repeatedly immunized with the nematode parasite *Nematospiroides dubius*. *Immunology* 48, 37–47.

Yadav R, Zammit DJ, Lefrancois L, Vella AT (2006). Effects of LPS-mediated bystander activation in the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1251–1261.

Este capítulo ha sido publicado en *Veterinary Parasitology* 203, 231–236.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.02.026. [González-Sánchez et al., 2014.](#)

Capítulo 3

La coinfección con *Leishmania infantum* agrava la respuesta del
hospedador frente a *Heligmosomoides polygyrus*

3.1. Resumen

El poliparasitismo es la norma en todas las especies animales, incluido el hombre, y tiene un importante efecto en la patogenia y curso clínico, diagnóstico y las medidas de control. Las parasitosis por helmintos gastrointestinales y protistas son muy frecuentes en condiciones naturales, pero los estudios experimentales son relativamente escasas. La coinfección por especies viscerales de *Leishmania* y helmintos intestinales es habitual en muchas ocasiones, pero no se ha estudiado experimentalmente. *Heligmosomoides polygyrus*, nematodo intestinal de ratones, está estrechamente relacionado con otros helmintos que causan patologías importantes, siendo un buen modelo para estudios inmunológicos. Los ratones, por su parte, son un buen modelo experimental para la leishmaniosis visceral.

En el estudio llevado a cabo se infestaron ratones BALB/c con *H.polygyrus* (200 L3) y 7 días después fueron infectados con *Leishmania infantum* (10^7 promastigotes). La coinfección con el protista no afectó la tasa de establecimiento del nematodo pero indujo una mayor eliminación fecal de huevos. Las cargas parasitarias en los animales coinfectados fueron significativamente más altas al final del experimento. La infestación por el helminto indujo una esplenomegalia significativa, no relacionada con la coinfección con el protista. La inmunosupresión inespecífica inicial inducida por el nematodo en los ganglios linfáticos mesentéricos no se vio afectada por la infección con *L.infantum*. La coinfección provocó una mayor respuesta sérica de anticuerpos (IgG₁) frente al helminto.

El modelo subrogado de infección helminto/protista empleado en este experimento mostró que la infección con *Leishmania* visceral debilitó la respuesta inmunitaria desarrollada tras la primoinfestación con el nematodo intestinal. Los resultados obtenidos en este experimento apoyan la aparente polarización hacia una respuesta Th1 con disminución de la respuesta protectora Th2 característica de infestaciones por helmintos, consecuencia de la interferencia inmunitaria inducida por la coinfección con el protista. La falta de correlación entre los niveles de IgG1 y la protección frente al helminto, apunta hacia el escaso papel protector de los anticuerpos en estas infestaciones.

3.2. Introducción

Las infestaciones por helmintos están presentes en todas las especies de animales salvajes y domésticas, diferentes prácticas de manejo y climas. En el hombre, las helmintosis de ciclo directo se encuentran entre las infestaciones parasitarias más comunes y persistentes en todo el mundo y se ha estimado que más de tres mil millones de personas están infestadas con una o más especies de helmintos (Hotez et al., 2008). En veterinaria, tienen un fuerte impacto sobre el estado de salud, productividad y, por lo tanto, en la sostenibilidad de la producción animal. La leishmaniosis visceral es la segunda enfermedad parasitaria más letal para el hombre (WHO, 2017). *Leishmania infantum* es responsable de los procesos zoonóticos en el Mediterráneo y Brasil, donde millones de perros están infectados de forma natural.

El poliparasitismo es frecuente y la coexistencia de más de una especie en un hospedador tiene efectos significativos sobre la patología, curso clínico y diseño de sistemas de control (Petney y Andrews, 1998; Moreau y Chauvin, 2010). En la actualidad, la información es relativamente escasa y solo recientemente se ha observado un creciente interés en el estudio de las parasitosis pluriespecíficas (Griffiths et al., 2004; Vaumorin et al., 2015).

Heligmosomoides polygyrus (Nematoda, Strongylida), parásito natural del intestino de ratones, es una especie relacionada con las responsables de procesos de relevancia en medicina humana (ej. *Necator*, *Ancylostoma*) y en salud y producción animal (ej. *Ostertagia*, *Haemonchus*). La primoexposición a *H. polygyrus* provoca una respuesta predominante Th2 (Wahid et al., 1994) acompañada de la activación de células T reguladoras (Treg), dando lugar a infestaciones crónicas (Reynolds et al., 2012; Doligalska et al., 2006; Maizels et al., 2012). La falta de respuesta protectora en primoinfestaciones se relaciona con la capacidad inmunosupresora del nematodo ya que, cuando se elimina la infestación primaria (ej. con tratamiento farmacológico), se desarrolla una respuesta protectora (Valanparambil et al., 2017). Se ha descrito y estudiado experimentalmente la interferencia inmunitaria entre helmintos y protozoos en algunas combinaciones (Rouseau et al., 1997; Su et al., 2005; Kolbaum et al., 2011; Kelada et al., 2013; Coomes et al., 2015). Los hallazgos en estudios realizados en pacientes humanos, infestados por helmintos, con leishmaniosis cutánea (*L. braziliensis*) (O'Neal et al., 2007) y visceral (Tajebe et al., 2017) han sido contradictorios. Sin embargo, el efecto potencial de una infección visceral por *Leishmania* en hospedadores

previamente infestados por un helminto intestinal, no ha sido investigado de forma experimental con anterioridad. Esta falta es sorprendente dada la distribución generalizada de helmintos en todo el mundo y la alta prevalencia de leishmaniosis visceral. Ya que las infestaciones por *H.polygyrus* son un modelo bien establecido de respuesta Th2 en ratones y la infección por *L.infantum* en ratones provoca una respuesta mixta Th1/Th2 (Honoré et al., 1998; Rolão et al., 2007; Loeuillet et al., 2016), hemos provocado una infección por *L.infantum* a ratones BALB/c previamente infestados con *H.polygyrus*. Los resultados obtenidos en este modelo subrogado mostraron que la infección con *Leishmania* visceral agravó la respuesta primaria frente al helminto intestinal.

3.3. Material y métodos

a. Parásitos

El aislado de *H.polygyrus* fue suministrado originalmente por la Dra. M.Grueiro (Facultad de Farmacia, UCM) y se ha mantenido en nuestro laboratorio mediante pases en ratones cada 6 meses. Las larvas infestantes (L3) se obtuvieron mediante la incubación del material fecal en discos de papel de filtro colocados en placas de Petri con agua destilada a 22°C, 7 días. El aislado de *L.infantum* (M/CAN/ES/97/10.445 zimodema MON-1) fue proporcionado por la Dra. M.Domínguez (ISCIII Madrid) y mantenido como promastigotes por pases en medio RPMI 1640 (Lonza Group, Basilea, Suiza) a 26°C, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (30 min, 56°C) (Sera Laboratories International, Reino Unido), 100 U/mL de penicilina + 100µg/mL de estreptomina (BioWhittaker, Bélgica) y 1% de glutamina (medio RPMI-completo).

b. Ratones, diseño experimental y seguimiento

Los ratones BALB/c, hembras, fueron adquiridos en Harlan Laboratories Models SL(Barcelona, España) y alojados en nuestras instalaciones (Nº ES280790000155) en jaulas de poliestireno (4 animales por jaula) a una temperatura controlada de 22-25°C con ciclos de 12h luz-12h oscuridad y agua y alimento comercial para roedores *ad libitum*. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos

experimentales de ocho animales por grupo. Los animales de los grupos G1 y G2 se infestaron con 200 L3 de *H.polygyrus* administradas en 0,2mL de agua, mediante catéter bucoesofágico, en el día 0 del experimento. Los animales de los grupos G1 y G3 fueron infectados el día 7 pi, intraperitonealmente, con 10^7 promastigotes estacionarios de *Leishmania infantum* en 0,1mL de PBS. El G4 fue el grupo testigo.

Se obtuvieron muestras de sangre individuales los días -1, 6, 14, 21, 28 y 35 pi con *H.polygyrus* mediante punción de la vena submandibular. El volumen sanguíneo obtenido fue 50 μ L/ratón/día de muestreo, a excepción de los días en que los animales fueron eutanasiados (14 y 35 pi) en cuyo caso se obtuvieron 150 μ L/ratón/día de eutanasia. La sangre se dejó coagular y los sueros se conservaron a -20°C hasta su uso. Las muestras tomadas en el punto final del experimento se emplearon para las determinaciones de ELISA. Se realizaron análisis coprológicos cada 3 días a partir del día 9 pi hasta el final del experimento. Para ello, los animales se aislaron individualmente durante 30 minutos, se recogieron sus heces y se realizaron los recuentos de huevos mediante una técnica de flotación modificada. Los resultados se expresaron como huevos por gramo de heces (hpg). El valor acumulado de hpg a lo largo del experimento se estimó utilizando el método trapezoidal para determinar las áreas bajo la curva (AUC) de los animales y grupos. Los ratones fueron eutanasiados (inhalación de CO₂ - isoflurano) los días 14 y 35 pi, 4 animales por grupo en cada punto y se recogieron intestino, bazo y linfonódulos mesentéricos. Los intestinos de animales individuales se abrieron, se colocaron en solución salina fisiológica y se mantuvieron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se recuperaron y contaron los helmintos adultos. Los bazos se extrajeron en condiciones estériles y se pesaron individualmente. Para evaluar la infección por *L.infantum*, se utilizó una muestra de bazo para preparar frotis, se tiñeron con May Grünwald Giemsa y se examinaron microscópicamente.

c. Antígenos

El extracto soluble de *H.polygyrus* (ESA) se obtuvo a partir de helmintos adultos. Los nematodos se lavaron con PBS frío + inhibidores de proteasas (Roche, Alemania) y fueron tratados con 8 ciclos de congelación-descongelación (-80°C, temperatura ambiente). Posteriormente fueron homogeneizados en Tenbroeck (vidrio en vidrio) y se centrifugaron a 3.000 xg, 30 min a 4°C. El antígeno soluble de *Leishmania*

(ASL) se obtuvo mediante 10 ciclos de congelación-descongelación de promastigotes de *L.infantum*, seguido de centrifugación y recuperación del sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína (Bradford, 1976) y los extractos de antígeno (ESA, ASL) se almacenaron a -80°C hasta su uso.

d. Linfoproliferación

La proliferación de linfocitos se determinó usando el método de la sal de tetrazolio (MTT) (Plumb, 2004) con modificaciones. Los linfonódulos mesentéricos (LNM) y el bazo se disecaron individualmente y se homogeneizaron en medio RPMI 1640. La suspensión fue filtrada (100 µm), centrifugada a 300 xg, 10 min, 4°C y el sedimento fue resuspendido en medio RPMI 1640 completo. Los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis (0,15M de NH₄Cl + 10mM de KHCO₃ + 0,1M de Na₂EDTA, pH 7,2). La viabilidad se determinó con azul tripán. Las células viables de LNM (2×10⁶ células/mL) y bazo (5×10⁶ células/mL) se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, EE.UU.) (200µL/pocillo) y se estimularon con Concanavalina A (GE Healthcare, Reino Unido) (5µg/mL), ASL y ESA (5µg/mL para LNM, 10µg/mL para bazo). Las células se incubaron durante 96 h a 37°C en atmósfera humidificada de 5% CO₂. La proliferación se determinó mediante la adición de 50µL de MTT (5mg/mL) (Sigma, EE.UU.) + 200µl de medio de cultivo durante 4 horas a 37°C y lectura de absorbancia a 570 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se incluyeron testigos negativos. Los resultados se expresaron como Índice de Estimulación (IE) = Densidad óptica (DO) de cultivos celulares estimulados / DO de pocillos testigos no estimulados. Se consideraron positivos IE ≥ 1,5.

e. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Los niveles de anticuerpos específicos en suero (IgG₁ e IgG_{2a}) se determinaron mediante ELISA. Brevemente, las microplacas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) se tapizaron con 5µg/mL de ESA o ASL. Se emplearon los conjugados anti-mouse IgG₁-HRP (Nordic Immunology, Países Bajos) y anti-mouse IgG_{2a}-HRP (Southern Biotech, EE.UU.). Los sueros individuales de ratón se diluyeron 1/800 y el conjugado 1/2500 para determinar IgG₁ frente a ESA; 1/50 de dilución de suero y 1/1000 de dilución de

conjugado para estimar la respuesta IgG₁ anti-ASL. Para la determinación de la inmunoglobulina IgG_{2a} frente a ESA se empleó el suero diluido 1/400 y 1/2000 de dilución del conjugado. Se determinó IgG_{2a} anti-*Leishmania* con 1/25 de dilución de suero y 1/2000 de conjugado.

f. Análisis estadístico

Los valores presentados corresponden a la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante t de Student (test-T) (helminthos adultos, hpg) o ANOVA de 2 vías (hpg, peso del bazo, respuesta linfoproliferativa, ELISA) seguido de la prueba de comparación múltiple HSD de Tukey (HSD). Se muestran los valores exactos de *P*, los grados de libertad (df) y el tipo de análisis realizado siguiendo el formato APA. El nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. Las figuras fueron editadas con Graphpad Prism 5.

3.4. Resultados

a. La coinfección por *L.infantum* provoca una mayor eliminación fecal de huevos en ratones infestados con *H.polygyrus*

Los grupos de animales infestados con *H.polygyrus* (G1 y G2) comenzaron la eliminación de huevos el día 10 post infestación (pi). Sin embargo, el patrón de hpg fue muy variable en dependencia de las infecciones recibidas (Figura 1). Se observó una elevada variabilidad individual dentro de cada grupo y a lo largo del experimento. La eliminación acumulada de huevos, estimada por el método AUC, desde el día 15 hasta el final del experimento, mostró que los ratones infestados solo con *H.polygyrus* eliminaron ca. 25% del valor AUC obtenido en los animales coinfectados (G1: *H.polygyrus* + *L.infantum*), aunque la diferencia no fue significativa. El patrón de eliminación fecal de huevos del helminto fue diferente a lo largo del experimento y la eliminación de huevos (AUC) de los ratones coinfectados fue significativamente mayor entre los días 15 y 21 pi [$t(6)=2,342$; $P=0,0288$]. No se hallaron huevos en los ratones infectados solo con *L.infantum* (G3) y el grupo testigo absoluto.

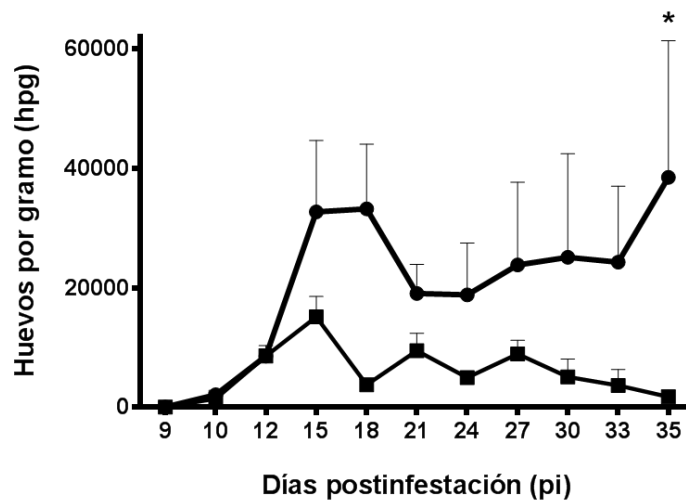


Figura 1.

Eliminación fecal de huevos de *H. polygyrus* (huevos por gramo, hpg) en ratones con (G1) (●) o sin (G2) (■) coinfección por *L. infantum*. Los datos son la media \pm error estándar de la media. * Diferencia significativa ($P < 0,05$).

- b. La coinfección con *L. infantum* no afecta al establecimiento de *H. polygyrus* aunque aumenta la supervivencia del helminto

El día 14 pi, la población de helmintos fue comparable en ambos grupos de ratones (G1: 86,25 y G2: 88,25) (Figura 2) y no existieron diferencias en la ratio hembra/macho. Por el contrario, el día 35 pi las cargas parasitarias fueron significativamente diferentes en dependencia de la presencia de la infección concurrente por *L. infantum*. De forma similar a lo observado en los patrones de eliminación de hpg, los ratones coinfectados (G1) presentaron mayores cargas de helmintos que los animales sometidos a la infestación única por *H. polygyrus* (G1: 40,5 vs. G2: 5,75) [$t(6)=2,188$; $P=0,0357$]. La proporción hembras/machos de la población de helmintos adultos en el punto final del experimento varió de acuerdo con el ciclo de vida del helminto, con una población predominante de hembras (aproximadamente 70%) en ambos grupos de animales.

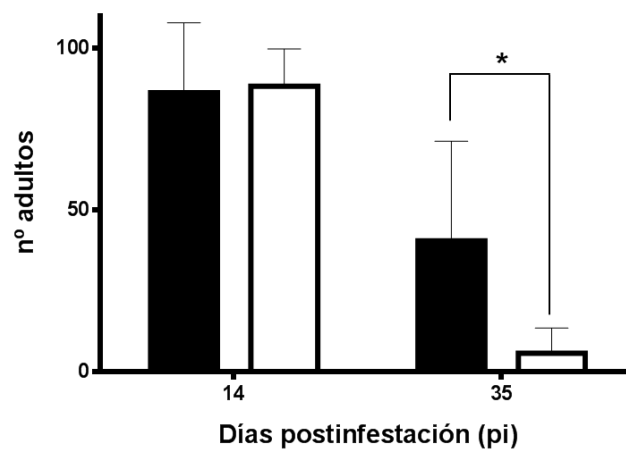


Figura 2.

Número de helmintos adultos en ratones infestados con *H.polygyrus* con (G1) o sin (G2) coinfección por *L.infantum*. Barras sólidas: G1; barras vacías: G2. Los datos son la media \pm desviación estándar. * Diferencias significativas ($P < 0,05$).

- c. La esplenomegalia en los ratones coinfectados se relaciona con la infestación por *H.polygyrus*

Existieron diferencias significativas entre grupos en dependencia del protocolo de infección [$F(3,24)=56,85$; $P < 0,0001$], del punto de muestreo [$F(1,24)=46,20$; $P < 0,0001$] y de la interacción [$F(3,24)=8,48$; $P = 0,0005$] (Figura 3). La prueba de Tukey mostró que la infestación con *H.polygyrus* indujo esplenomegalia ya que los pesos del bazo encontrados en el grupo infestado solo con el nematodo (G2) fueron significativamente más elevados que los observados en el grupo infectado con *L.infantum* (G3) y en el grupo testigo (G4) en los dos muestreos llevados a cabo (días 14 y 35 pi). Este hallazgo fue particularmente evidente el día 14 del experimento, con un peso medio de bazo en los ratones infectados solo con *H.polygyrus* 2,64 veces mayor que el del grupo testigo (G2: $M=0,2565$; $SD=0,0390$ - G4: $M=0,0973$; $SD=0,0112$). En nuestras condiciones experimentales, la infección por *L.infantum* no provocó ningún aumento significativo en el tamaño del bazo. El aumento del peso del bazo se encontró en todos los grupos infestados con el nematodo. Sin embargo, la coinfección con *L.infantum* de ratones infestados por *H.polygyrus* (G1) indujo una reducción del peso del bazo al inicio de la patencia (día 14 pi) (G1: $M=0,2066$; $SD=0,0193$) respecto a los animales infestados solo con el helminto (G2: $M=0,2565$; $SD=0,0390$).

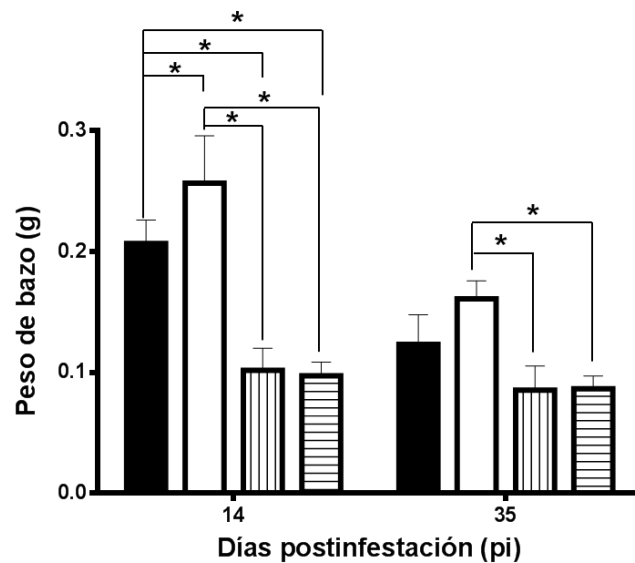


Figura 3.

Peso del bazo (media \pm desviación estándar) de ratones en la patencia inicial (día 14 pi) y al final del experimento (día 35 pi). Barras sólidas: G1; barras vacías: G2; barras rayadas verticales: G3; barras rayadas horizontales: G4. * Diferencias significativas ($P<0,05$).

- d. La inmunosupresión inespecífica inicial provocada por *H.polygyrus* no es afectada por la coinfección con *L.infantum*

Las infecciones por *L.infantum* y *H.polygyrus* provocaron una inmunosupresión inespecífica, evidente por la menor respuesta linfoproliferativa de las células coincubadas con ConA, tanto de ganglios linfáticos mesentéricos (LNM) (Figura 4a) [$F(3,24)=4,096$; $P=0,018$] como de bazo (Figura 4b) [$F(3,24)=3,753$; $P=0,024$] en ambos puntos de muestreo. Sin embargo, existieron variaciones relacionadas con la infección y el tiempo. Se halló, por lo tanto, una inmunosupresión temprana más evidente en LNM en presencia de la infestación por *H.polygyrus* (G1: $M=2,590$; $SD=2,550$ - G2: $M=7,854$; $SD=7,554$) respecto a los ratones no infectados (G4: $M=155,273$; $SD=76,266$). Posteriormente existió una aparente recuperación parcial (día 35 pi) y, de hecho, en ese punto los ratones infestados solo con *H.polygyrus* (G2) no fueron significativamente diferentes de los animales del grupo testigo. Esta inmunosupresión temprana también se observó en células del bazo. En el caso de la infección por *L.infantum*, la inmunosupresión siguió un patrón diferente y solo los animales infectados con este parásito (G3: $M=6,264$; $SD=10,638$), y en menor medida

el grupo coinfectado (G1: $M=83,390$; $SD=54,134$) mostraron valores significativamente más bajos que los animales del grupo testigo ($M=233,145$; $SD=70,318$) al final del experimento. Estos resultados fueron particularmente claros con las células de LMN, aunque el patrón también se observó en las células esplénicas.

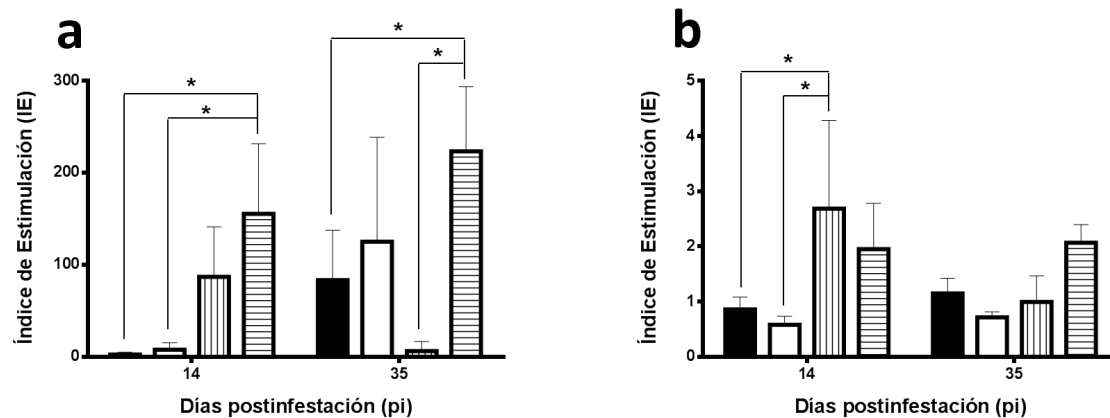


Figura 4.

Respuesta linfoproliferativa en presencia de ConA en los linfonódulos mesentéricos (Figura 4a) y bazo (Figura 4b) los días 14 y 35 pi. Barras sólidas: G1; barras vacías: G2; barras rayadas verticales: G3; barras rayadas horizontales: G4. Los valores son media \pm desviación estándar. * Diferencias significativas ($P < 0,05$).

De forma general, la linfoproliferación específica en presencia del extracto del nematodo fue reducida tanto con células de LMN (Figura 5a) como esplénicas (Figura 5b). No obstante, a pesar de la supresión inespecífica inducida por el helminto, los animales más reactivos en LNM fueron los coinfectados con *L.infantum* [$F(2,18)=8,762$; $P=0,002$], con diferencias significativas en el día 14 pi ($M=2,181$; $SD=0,251$) tanto respecto al grupo testigo ($M=1,032$; $SD=0,376$) como respecto a los animales infestados solo con el helminto ($M=0,904$; $SD=0,104$). Este patrón también se observó en el día 35 pi, aunque las diferencias no fueron significativas. En el bazo (Figura 5b), los ratones coinfectados (G1) también mostraron una mayor respuesta proliferativa en el último muestreo ($M=1,474$; $SD=0,365$). Por su parte, la respuesta frente al antígeno de *Leishmania* fue baja y no relacionada con el calendario de infección de los grupos de animales (datos no mostrados).

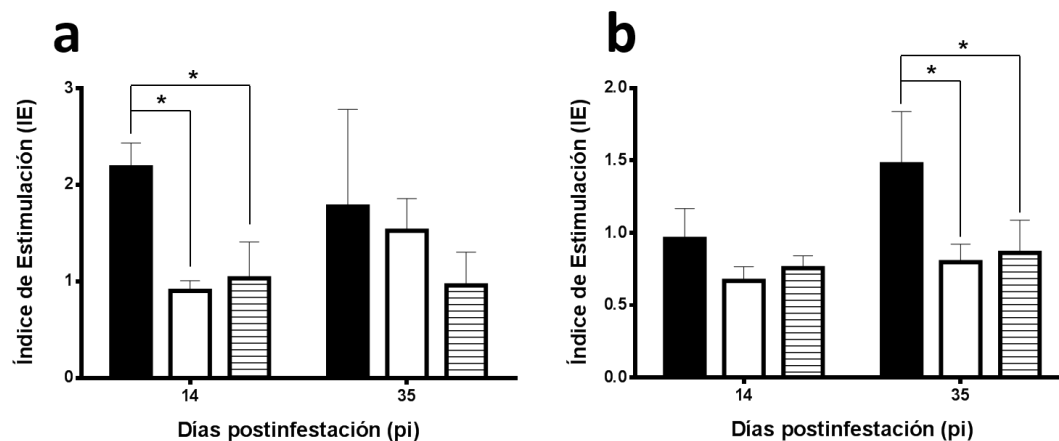


Figura 5.

Respuesta linfoproliferativa específica frente al extracto soluble de adultos (ESA) de *H.polygyrus* en los linfonódulos mesentéricos (Figura 5a) y bazo (Figura 5b). Barras sólidas: G1; barras vacías: G2; barras rayadas horizontales: G4. Los valores son media \pm desviación estándar. * Diferencias significativas ($P < 0,05$).

e. La coinfección con *L.infantum* incrementó la respuesta de anticuerpos frente a *H.polygyrus*

La respuesta de anticuerpos frente a *H.polygyrus* se desarrolló lentamente, y en el día 35 pi se observó una respuesta IgG₁ significativa frente a ESA en los grupos infestados con el helminto (Figura 6a) [$F(3,24)=37,939$; $P < 0.0001$]. La respuesta fue superior en el grupo coinfectado (G1: $M=0,362$; $SD=0,098$) que en los ratones infestados solo con el nematodo (G2: $M=0,311$; $SD=0,054$), aunque las diferencias no fueron significativas. No se observó respuesta IgG_{2a} frente a ESA de *Heligmosomoides* a excepción de un valor atípico (“outlier”) (Figura 6b). La infección monoespecífica por *Leishmania* (G3) provocó una respuesta IgG significativa, aparentemente relacionada con la respuesta IgG_{2a} (día 35 pi), frente al antígeno homólogo (ASL), mientras que no se observó una respuesta específica IgG₁ (no mostrado).

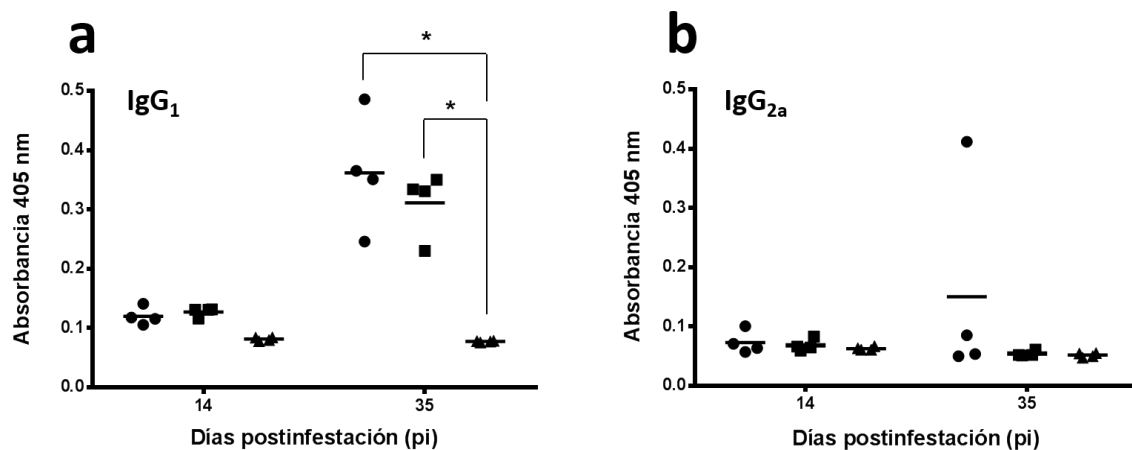


Figura 6.

Niveles individuales de IgG₁ (Figura 6a) e IgG_{2a} (Figura 6b) en suero de ratones experimentales en los días 14 y 35 pi frente al extracto soluble de *H. polygyrus* adulto (ESA) estimados por ELISA. Círculos sólidos: G1; cuadrados sólidos: G2; triángulos sólidos: G4. * Diferencias significativas ($P < 0,001$).

3.5. Discusión

En condiciones naturales, las coinfecciones son la norma en todas las especies hospedadoras, incluidos los seres humanos (Petney y Andrews, 1998), y tienen un impacto significativo en el curso de la enfermedad, el diagnóstico y las medidas preventivas requeridas (Vaumorin et al., 2015). Las interacciones helminto-protista son muy complejas, desde una ausencia de interferencia (Kolbaum et al., 2011) hasta la reducción muy notable de la inmunidad protectora (Su et al., 2005). En la mayoría de las coinfecciones exploradas hasta el momento se ha encontrado algún tipo de modulación/cambio en la respuesta inmunitaria. La comparación directa de los resultados es extremadamente difícil ya que los mecanismos implicados y el resultado final dependen de las especies de parásitos concretos y del protocolo experimental empleado (ej. calendario, dosis administradas). En nuestro experimento, la coinfección con *L. infantum* de ratones previamente infestados con *H. polygyrus* deterioró fuertemente la respuesta inmunitaria frente al helminto. Esta interferencia se evidenció por el empeoramiento de los principales parámetros parasitológicos, tales como la

mayor fertilidad aparente de las hembras adultas en la patencia inicial y las mayores cargas de helmintos al final del experimento.

La tasa de establecimiento de los nematodos fue elevada (ca. 40%), en línea con observaciones previas en primoinfestaciones por *H.polygyrus* (Fakae et al., 1997; González-Sánchez et al., 2014). Estudios recientes han hallado que la infección previa con *Toxoplasma gondii* indujo una mayor fecundidad de las hembras de *H.polygyrus* el día 14 pi (Ahmed et al., 2017). Estos resultados fueron comparables a los obtenidos por nosotros con una especie no relacionada, *L.infantum*. Así, se halló un notable aumento en la eliminación fecal de huevos en ratones coinfectados desde el día 15 al 21 pi, sin diferencias en el número de helmintos, respecto a los animales sometidos a una única infestación por *H.polygyrus* (14 días pi). Por otra parte, en el momento de la eutanasia final (35 días pi) el número de helmintos adultos en los ratones coinfectados fue significativamente más alto. Estos hallazgos son consistentes con la supresión parcial de la respuesta Th2 en infestaciones por *H.polygyrus* (Maizels et al., 2012) y también han sido descritos en otras coinfecciones con esta especie de helminto (Coomes et al., 2015; Ahmed et al., 2017), independientemente del diseño experimental. En coinfecciones *H.polygyrus/Trypanosoma congolense* no se encontraron diferencias en la fertilidad de las hembras (Fakae et al., 1994, 1997). Sin embargo, este experimento no estaba dirigido a la determinación de la respuesta en primoinfestaciones por helmintos, sino a la resistencia adquirida después del reto. Nuestros resultados sugieren que el calendario de infecciones/infestaciones, orden de administración y las especies de protistas son aparentemente menos relevantes y, en ambos casos, la respuesta inmunitaria se polariza hacia Th1, lo que resulta en una mayor fecundidad y longevidad de los helmintos. El mecanismo real de esta interferencia es poco conocido y merece atención ya que es de relevancia en el marco de los hospedadores infectados de forma natural, donde el poliparasitismo es la regla (Griffiths et al., 2014).

La infección única con *L.infantum* no provocó ningún cambio significativo en el peso del bazo en ninguno de los momentos de muestreo (semanas 1 y 4 pi). La infección intravenosa de ratones receptivos (ej. BALB/c) con *Leishmania visceral* conduce a una invasión hepática autolimitada y a un parasitismo esplénico progresivo. Por lo tanto, nuestros resultados podrían estar posiblemente relacionados con el tiempo postinfección transcurrido (Bankoti y Stäger, 2012). Los ratones infestados con *H.polygyrus* o coinfectados además con *L.infantum* mostraron un notable aumento del

peso del bazo, consistente con la respuesta inmunitaria inicial desarrollada frente a la infestación por el nematodo. Cabe señalar que la coinfección con *L.infantum* en realidad causó una reducción inicial de los pesos del bazo (día 14 pi) respecto a los observados en ratones infestados solo por el helminto. Este resultado apoya la interferencia de la coinfección y la disminución de la respuesta protectora Th2 frente al nematodo (Finney et al., 2007; Reynolds et al., 2012). La escasa linfoproliferación específica anti-*H.polygyrus* observada en linfonódulos y bazo fue consistente con la inmunosupresión inespecífica (ConA) provocada por la infestación con el nematodo, particularmente en las primeras etapas parasitarias (<14 días pi). Por el contrario, la inmunosupresión en ratones infectados con *L.infantum* (G3) se observó en etapas posteriores (día 35 pi), tal vez relacionada con el curso de la infección por esta especie (Bankoti y Stäger, 2012). Las infecciones por *Leishmania* visceral inducen una respuesta mixta Th1/Th2 (Honoré et al., 1998; Rolão et al., 2007; Loeuillet et al., 2016) y *H.polygyrus* es altamente eficaz bloqueando la inmunidad protectora Th2 (Maizels et al., 2012). En nuestro experimento, la primoinfestación con el helminto provocó una elevación de los niveles de IgG₁ anti-*H.polygyrus* después de 35 días, mientras que no se detectó IgG_{2a}. Esto sugiere una respuesta polarizada Th2 (Finney et al., 2007) y, en nuestras condiciones, la coinfección con *L.infantum* incluso aumentó la respuesta de anticuerpos contra el helminto. La falta de correlación entre los niveles de IgG₁ y la protección (ej. reducida carga parasitaria o eliminación fecal de huevos) apunta hacia el escaso papel protector de los anticuerpos detectados por ELISA (Hewitson et al., 2011). Aunque no es estrictamente comparable a nuestro enfoque experimental, se ha observado que pacientes humanos coinfectados con *Leishmania* visceral y helmintos no mostraron ninguna alteración del curso de la leishmaniosis (Tajebe et al., 2017) mientras que el resultado clínico de la infección cutánea por *L.braziliensis* se vio significativamente alterado por la coinfección con helmintos (O'Neal et al., 2007). Es posible que el estado clínico inicial de los pacientes, el régimen terapéutico, la respuesta inmunitaria diferencial frente a *Leishmania* spp viscerales y cutáneas y el momento de infección (protista, helminto) puedan explicar la respuesta variable observada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nuestro experimento confirmó la inmunosupresión inespecífica y específica inducida por la primoinfestación por *H.polygyrus* en ratones. Lo que es más importante, la coinfección con *L.infantum* de animales previamente infestados con el helminto agravó la inmunosupresión, lo que dio

lugar a mayores cargas parasitarias, superior eliminación fecal de huevos y mayor longevidad de los helmintos. La coinfección, aparentemente, polarizó la respuesta inmunitaria hacia un tipo Th1 no protector. Sin embargo, no se encontró ningún cambio (“switch”) Th1/Th2 completo ya que los ratones coinfectados desarrollaron una notable respuesta específica de IgG₁ frente a *Heligmosomoides*. La falta de correlación entre la protección y los niveles de IgG₁ sugiere el escaso papel desempeñado por los anticuerpos para hacer frente a la infestación por helmintos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la amable donación de larvas de *H.polygyrus* por parte de M. Grueiro (Facultad de Farmacia, UCM) y de promastigotes de *L.infantum* por parte de M. Domínguez (ISCIH, Madrid). Los autores agradecen el apoyo financiero parcial de MINECO, proyecto AGL2014-54049-R.

Aprobación del Comité Ético

El diseño y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético (UCM) y las autoridades regionales (Comunidad de Madrid) (PROEX 169/15).

3.6. Referencias

- Ahmed N, French T, Rausch S, Kühl A, Hemminger K, Dunay IR, Steinfelder S, Hartmann S (2017). *Toxoplasma* co-infection prevents Th2 differentiation and leads to a helminth-specific Th2 response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 341.
- Bankoti R, Stäger S (2012). Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *Leishmania donovani*. *J. Trop. Med.*; article ID 639304.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Coomes SM, Pelly VS, Kannan Y, Okoye IS, Czieso S, Entwistle LJ, Perez-Lloret J, Nikolov N, Potocnik AJ, Biró 1, Langhorne J, Wilson MS (2015). INF γ and IL-12 restrict Th2 responses during Helminth/Plasmodium co-infection and promote IFN γ from Th2 cells. *PLoS Pathog.* 11: e0004994.
- Doligalska M, Rzepecka J, Drela N, Donskow K, Gerwl-Wronka M (2006). The role of TFG- β in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.* 28: 387-395.
- Fakae BB, Harrison LJ, Ross CA, Sewell MM (1994). *Heligmosomoides polygyrus* and *Trypanosoma congolense* infection in mice: a laboratory model for concurrent gastrointestinal nematode and trypanosome infections. *Parasitology* 108: 61-68.
- Fakae BB, Harrison LJ, Ross CA, Sewell MM (1997). Expression of acquired immunity to *Heligmosomoides polygyrus* in mice concurrently infected with *Trypanosoma congolense*. *Int. J. Parasitol.* 27: 1107-1114.
- Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM (2007). Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 1874-1886.
- González-Sánchez E, Corral MJ, Fawzi EM, Rodríguez-Bertos A, Alunda JM, Cuquerella M (2014). LPS and inactivated *Propionibacterium acnes* elicit a partially protective response in primary infections of *Heligmosomoides polygyrus*. *Vet. Parasitol.* 203: 231-236
- Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL (2014). Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. *Proc. Biol. Sci.* 281: 20132286.
- Hewitson JP, Filbey KJ, Grainger JR, Dowle AA, Pearson M, Murray J, Harcus Y, Maizels RM (2011). *Heligmosomoides polygyrus* elicits a dominant nonprotective antibody response directed against restricted glycan and peptide epitopes. *J. Immunol.* 187: 4764- 4777.

- Honoré S, Grain YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F (1998). Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21: 231-239.
- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 118: 1311-1321.
- Kelada S, Sethupathy P, Okoye IS, Kistasis E, Czieso S, White SD, Chou D, Martens C, Ricklefs SM, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Belkaid Y, Wynn TA, Wilson MS (2013). miR-182 and miR-10a are key regulators of Treg specialisation and stability during *Schistosoma* and *Leishmania*-associated inflammation. *PLoS Pathog.* 9(6): e1003451.
- Kolbaum J, Ritter U, Zimara N, Brewig N, Eschibach ML, Breloer M (2011). Efficient control of *Leishmania* and *Strongyloides* despite partial suppression of nematode induced Th2 response in co-infected mice. *Parasite Immunol.* 33: 226-235.
- Loeuillet C, Bañuls AL, Hide M (2016). Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit. Vectors* 9: 144.
- Maizels RM, Hewitson JP, Murray, J, Harcus, YM, Dayer B, Filbey KJ, Grainger JR, McSorley HJ, Reynolds LA, Smith KA (2012). Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Exp. Parasitol.* 132: 76-89.
- Moreau M, Chauvin A (2010). Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.*; ID 428593.
- O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM (2007). Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195: 142-148.
- Petney TN, Andrews RH (1998). Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* 28:377-393.
- Plumb JA (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Med.* 88: 165-169.
- Reynolds LA, Filbey KJ, Maizels RM (2012). Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Semin. Immunopathol.* 34: 829-846.
- Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L (2007). *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 115: 270-276.

Rousseau D, Le Fichoux Y, Stien X, Suffia I, Ferrua B, Kubar J (1997). Progression of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in BALB/c mice is markedly slowed by prior infection with *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 65: 4978-4983.

Su Z, Segura M, Morgan K, Loredó-Ostí JC, Stevenson MM (2005). Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infect. Immun.* 73: 3531-3539.

Tajebe F, Getahun M, Adem E, Hailu A, Lemma M, Fikre H, Raynes J, Tamiru A, Mulugeta Z, Diro E, Toulza F, Shkedy Z, Ayele T, Modolell M, Munder M, Müller I, Takele Y, Kropf P (2017). Disease severity in patients with visceral leishmaniasis is not altered by co-infection with intestinal parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005727.

Valanparambil RM, Tam M, Jardim A, Geary TG, Stevenson MM (2017). Primary *Heligmosomoides polygyrus bakeri* infection induces myeloid-derived suppressor cells that suppress CD4⁺ Th2 responses and promote chronic infection. *Mucosal Immunol.* 10: 238-249.

Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M (2015). The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasit. Vectors* 8: 545.

Wahid FN, Behnke JM, Grensis RK, Else KJ, Ben-Smith AW (1994). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus*: Th2 cytokines and primary response phenotype. *Parasitology* 108: 461-471.

WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. 2017.

Una versión de este capítulo se ha sometido para su publicación en *Parasites & Vectors*.
González-Sánchez et al., 2018.

Capítulo 4

Caracterización de la proteína Hc23 de *Haemonchus contortus* y
de la recombinante rHc23

4.1. Resumen

Las infestaciones por nematodos gastrointestinales (NGI) están presentes en todo el mundo. Entre ellos, *Haemonchus contortus* es probablemente el nematodo gástrico de mayor importancia económica en pequeños rumiantes. El escenario actual de control de la enfermedad (resistencia a antihelmínticos, ausencia de nuevos fármacos en el mercado, necesidad de implementar una ganadería sostenible) ha llevado a la necesidad de nuevas estrategias de control, incluyendo la inmunoprofilaxis. Algunos antígenos nativos, tanto ocultos como expuestos, han demostrado inducir niveles significativos de resistencia frente a la hemoncosis. No obstante, los intentos de expresión de sus homólogos recombinantes han sido ineficaces en la protección frente a la enfermedad.

Recientemente, se ha demostrado en diversos ensayos de inmunización la eficacia del antígeno recombinante rHc23 en la protección de corderos frente a la hemoncosis ovina. No obstante, la información disponible sobre esta proteína es muy escasa. Por ello, se ha procedido a la secuenciación tanto de su forma nativa (21,6 KDa) como recombinante (24,2 KDa), para determinar la homología entre ellas así como con las proteínas disponibles en las diversas bases de datos, confirmándose la equivalencia entre ambas formas de la proteína así como con la proteína deducida de las bases de datos HCC00515 y con la secuencia de la proteína previamente identificada por Domínguez-Toraño et al. (2000) y García-Coiradas et al. (2010). Esta homología fue confirmada tras el inmunorreconocimiento de la forma recombinante por sueros de animales previamente inmunizados con la proteína nativa Hc23.

Los resultados obtenidos confirman que la proteína recombinante rHc23 y la nativa Hc23, aislada de adultos de *H. contortus*, son la misma proteína. El alto número de “spots” observados sugiere la presencia de posibles isoformas de la proteína, dada la homología entre sus secuencias. Esta homología también fue observada con el “spot” de 46 KDa, lo que podría indicar la dimerización espontánea de la proteína en sus formas tanto nativa como recombinante. Asimismo, se confirma la ausencia de contaminación de la muestra con otras proteínas que pudieran ser las responsables de su capacidad inmunoprotectora.

4.2. Introducción

La hemoncosis es una enfermedad parasitaria de rumiantes causada por las infestaciones con el nematodo gástrico *Haemonchus contortus*. La parasitosis está distribuida en todo el mundo y es responsable de importantes pérdidas económicas (Waller y Chandrawathani, 2005; <http://www.fao.org>). El sistema de control de elección ha sido el uso de antihelmínticos (McKellar y Jackson, 2004). No obstante, la aparición de resistencias frente a todos los fármacos de amplio espectro comercializados y la escasa innovación de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos antihelmínticos, limitan cada vez en mayor medida la utilización de esta única herramienta (Kotze y Prichard, 2016; Lamb et al., 2017). Hay que señalar que, de forma especial en regiones desarrolladas, la presión social hacia una ganadería más sostenible que garantice la conservación del medio a la vez que asegura la ausencia de residuos con actividad farmacológica en los productos de origen animal, hace necesaria la exploración de alternativas de control, entre ellas la inmunoprofilaxis.

Han sido numerosos los intentos de inmunización llevados a cabo en los últimos años por distintos grupos de investigación, tanto con proteínas nativas como recombinantes (Bassetto y Amarante, 2015; Nisbet et al., 2016). No obstante, la protección solo se ha obtenido con las formas nativas de algunos de estos antígenos, habiendo resultado insatisfactorias las vacunaciones con sus homólogos recombinantes (Munn et al., 1993; Smith et al., 1994; Cachat et al., 2010; Roberts et al., 2013). La proteína Hc23 ha sido eficaz en su forma nativa, con niveles de protección del 67-86% (Fawzi et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado la eficacia de su forma recombinante, siendo la primera vacuna recombinante eficaz frente a la hemoncosis (Fawzi et al., 2015; Matthews et al., 2016). No obstante, la información disponible sobre esta proteína es muy escasa. Por ello, se ha procedido a su caracterización mediante secuenciación, electroforesis en 2D y posterior secuenciación de los fragmentos. Además, se han realizado estudios cristalográficos (difracción de rayos X) preliminares con objeto de determinar su estructura tridimensional y posible actividad enzimática.

4.3. Material y métodos

- a. Caracterización de las proteínas Hc23 y rHc23 mediante electroforesis de dos dimensiones y secuenciación por espectrometría de masas (“huella peptídica”)

Se realizó un estudio tanto de la proteína nativa (Hc23) como de la recombinante (rHc23) mediante electroforesis en 2D. Se resuspendieron ambas proteínas liofilizadas en 200µL de agua milliQ y se precipitaron (“kit 2D-Clean Up”, GE Healthcare, Reino Unido). Se centrifugaron en acetona y la proteína se solubilizó en tampón de hidratación [7M urea, 2M tiourea, 4% p/v CHAPS (3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato), 100mM DeStreak y 2% anfolitos pH 3-11] a una concentración final de 50µg/tira IPG (gradientes de pH inmovilizados en soporte de plástico) de 7cm (GE Healthcare, Reino Unido) y se hidrataron durante 15 horas.

Las proteínas se separaron por isoelectroenfoque (IEF) (pH 3-11) mediante a 20°C siguiendo el programa siguiente: 120V-15min, 500V-15min, 500V-1000V en gradiente-2h, 1000V-5000V en gradiente-2h, 5000V-2h. Posteriormente las tiras fueron equilibradas en tampón [50mM Tris-HCl pH 6,8, 6M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS] con solución reductora [2% (p/v) DTT] durante 12min para reducir los puentes disulfuro y con solución alquilante [2,5% (p/v) iodoacetamida] durante 5min para el bloqueo de los grupos tiol. Se realizó una electroforesis 2D de las tiras IEF en geles de poliacrilamida 12,5%T-2,6%C a T^a ambiente 100V-2h con los marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Colours, BioRad, Alemania). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de las proteínas o se transfirieron a una membrana de PVDF (Di-fluoruro de polivinilideno) para su tinción con Rojo Ponceau y la posterior inmunodetección mediante Western Blot (WB). Para ello, tras la visualización de las proteínas, se lavaron las membranas, se bloquearon con leche desnatada al 5% y se volvieron a lavar. Se siguió el protocolo standard de WB. Se incubaron las membranas electrotransferidas con una mezcla de sueros de animales vacunados con la proteína Hc23+Al(OH)₃ e infestados con 15.000L3 de *H. contortus* a una dilución 1/100 (37°C - 3h) y se utilizó el conjugado anti-sheep IgG-HRP (Sigma-Aldrich, EE.UU.) a una dilución 1/1000 (37°C - 1h). La membrana se reveló con 0,5mg/mL del sustrato 4-cloro-1-naftol. Se procedió a la digestión de las proteínas nativa y recombinante con tripsina y *Staphylococcus aureus* Endo V8 para obtener su

huella peptídica mediante espectrometría de masas. Para ello se emplearon tanto las proteínas purificadas y la banda de peso aproximado 23 KDa obtenida en gel SDS-PAGE como los diversos “spots” obtenidos tras la realización del gel 2D. Se determinaron las homologías con Protein Prospector y se compararon con las bases de datos NCBI Resources, NIH, Bethesda MD, USA, Matrix Science y MASCOT.

Los estudios fueron realizados en la Unidad de Proteómica de la UCM, miembro del equipo ProteoRed-ISCIH.

b. Estudio cristalográfico preliminar de rHc23

Para la cristalización se utilizó el método “sitting drop” en placas de 48 pocillos MRC-maxi plates de Jena Bioscience (Jena, Alemania). La proteína liofilizada se resuspendió en agua milliQ a una concentración final de 10mg/mL. En cada pocillo se añadió 1µL de solución de proteína (10µg), 0,5µL de detergente y 1µL de solución de solución tamponada (reservorio) (Benvenuti y Mangani, 2007). Se utilizaron 3 detergentes diferentes (Heptanoil-N-metilglucamida, MEGA-7, N-Octil-β-D-glucósido). Los pocillos se equilibraron a T^a ambiente (20°C) frente a 200µL de solución de reservorio. Se utilizaron diversas soluciones de precipitación en la solución de reservorio: **G1** (0,6M sulfato de magnesio hidratado, 0,1M HEPES sódico pH 7,5 y 4% v/v PEG 400), **C4** (0,1M citrato sódico deshidratado pH 5,6 y 1M sulfato de magnesio heptahidratado) y **E3** (0,1M sulfato de litio monohidratado, 0,1M ADA pH 6,5 y 1M sulfato de magnesio hidratado). Los cristales obtenidos se transfirieron a soluciones crioprotectoras preparadas enriqueciendo cada precipitante con PEG 400 al 20% v/v y se congelaron en nitrógeno líquido. El estudio de los cristales obtenidos se realizó mediante difracción de rayos X en aparato ID30-B (variable focus, tuneable energy beamline) en el European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Francia.

4.4. Resultados y discusión

- a. Caracterización de las proteínas Hc23 y rHc23 mediante electroforesis 2D y secuenciación por espectrometría de masas (“huella peptídica”)

En la electroforesis SDS-PAGE llevada a cabo, la proteína nativa mostró una masa molecular esperada de 21,61 KDa y un punto isoeléctrico de 6,5, siendo de 6,71 para la proteína recombinante con una masa molecular de 24,15 KDa (Figura 1).

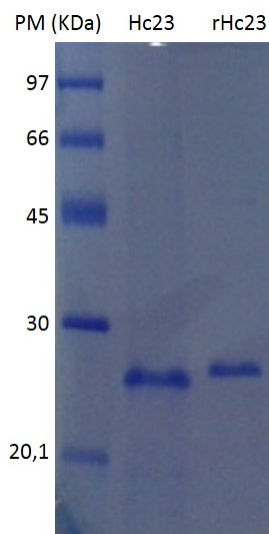


Figura 1.

Análisis electroforético (12,5% SDS-PAGE) de la proteína nativa Hc23 y recombinante rHc23 purificadas y teñidas con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM) en KDa.

La secuenciación de la proteína nativa Hc23 tras su digestión con tripsina y Endo V8, tanto de la proteína purificada como de la proteína aislada a partir del gel, dio lugar a múltiples secuencias peptídicas coincidentes con la secuencia de la proteína hipotética HCC00515 (García-Coiradas et al., 2009) (Figura 2).

```

1  AGLFAHHPPX  EEGLPQFVND  LPADDQAKLK  DIWKNWKEGD  KCYHEQGLTR
51  DLVETLPTEI  RRKISKDALL  PPPVRKAPEE  VQEQFRKIIN  DKTIPVEEKH
101 KKMNELAQKV  LTGDNLKEYN  EFTAHIEDRH  KAVADKAATL  SPEAKAAYDK
151 IAKLEKEKHD  IIASLNEQAQ  EELFQVFKLR  HSKSAKD

```

Figura 2.

Secuencias peptídicas de la proteína nativa Hc23 identificadas por espectrometría de masas y huella peptídica tras su digestión con tripsina y Endo V8 (rojo), coincidentes con la proteína hipotética HCC00515.

Tras teñir el gel 2D de la proteína nativa Hc23 con azul de Coomassie (Figura 3) se visualizaron 7 “spots” de peso molecular similar al esperado, 23 KDa, así como un “spot” adicional de peso aproximado 46KDa.

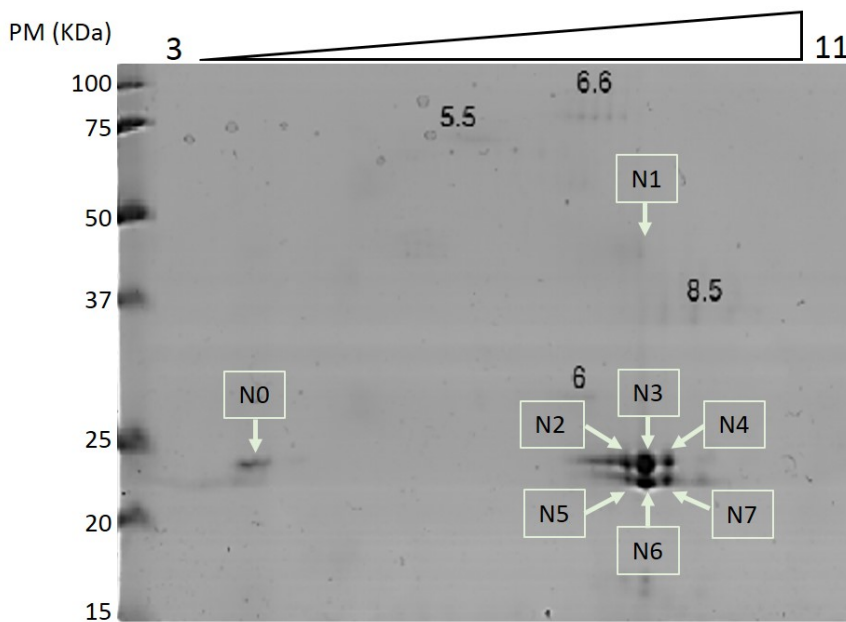


Figura 3.

Análisis electroforético 2D de la proteína nativa Hc23 de *Haemonchus contortus* teñida con azul de Coomassie. Las flechas indican los “spots” identificados (N0 – N7). PM, marcador de peso molecular en KDa. 3-11: escala de punto isoelectrico.

Se procedió al aislamiento y digestión con tripsina de los 8 “spots” obtenidos para su posterior secuenciación, descartando así una posible contaminación de la muestra con otras proteínas. Todos los “spots” mostraron secuencias homólogas a la proteína deducida HCC00515, confirmando y ampliando las secuencias obtenidas previamente. El alto número de “spots” observados hace pensar en posibles isoformas de la proteína Hc23. El “spot” N1 (46 KDa) presentó homología con la secuencia de Hc23, lo que podría indicar la dimerización espontánea de la proteína.

Al realizar el inmunorreconocimiento (WB) con mezclas de sueros de animales vacunados con la proteína Hc23 + Al(OH)₃ (Figura 4), se confirmó el reconocimiento de todos los “spots” obtenidos en la electroforesis de 2D.

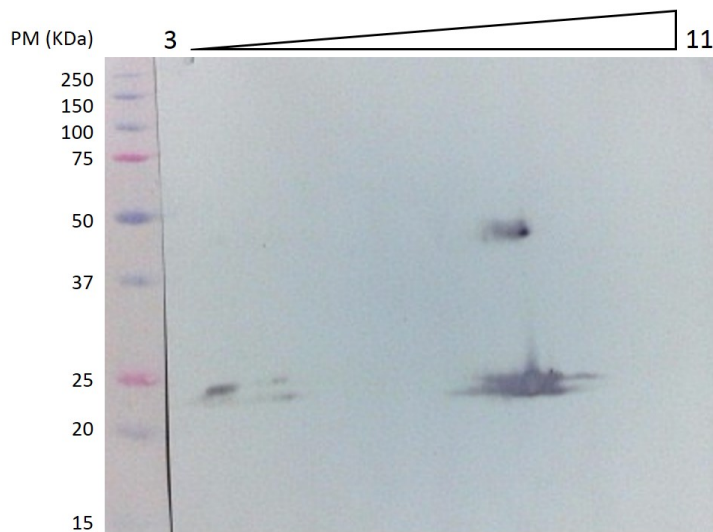


Figura 4.

Western Blot de los “spots” de Hc23 obtenidos tras la electroforesis de 2D y su inmunorreconocimiento mediante el empleo de mezclas séricas de animales vacunados con la proteína nativa + Al(OH)₃. PM, marcador de peso molecular en KDa. 3-11: escala de punto isoeléctrico.

Con todas las secuencias obtenidas en las diversas digestiones y los residuos previamente determinados mediante degradación de Edman (García-Coiradas et al., 2009), se obtuvo la siguiente secuencia final de la proteína nativa Hc23 (Figura 5):

1 **AGLFAHPPX** **EEGLPQFVND** LPADDQAKLK **DIWKNWKEGD** **KCYHEQGLTR**
 51 **DLVETLPTEI** **RRKISKDALL** **PPPVRKAPEE** **VQEQFRKIIN** **DKTIPVEEKH**
 101 **KKMNELAQKV** **LTGDNLKEYN** **EFTAHIEDRH** **KAVADKAATL** **SPEAKAAYDK**
 151 **IAKLEKEKHD** **IIASLNEQAQ** **EELFQVFKLR** HSKSAKD

Figura 5.

Secuencia total de proteína Hc23 obtenida por espectrometría de masas y huella peptídica tras su secuenciación en solución y electroforesis en 2D (rojo). Resaltados en amarillo los aminoácidos previamente determinados por degradación de Edman (García-Coiradas et al., 2009).

Tras la digestión con tripsina y Endo V8 de la proteína recombinante rHc23 y su posterior secuenciación, se obtuvieron las siguientes secuencias coincidentes con la proteína hipotética HCC00515 (Figura 6).

```

1  MRTLVLVVAIS  VAAVSAAGLF  AHHPPPECGL  PPFVNDLPAD  DQAKLKDIWK
51  NWKEGDKCYH EQGLTRDLVE TLPTAIRRKI SKDALLPPPV RKAPPEVQEQ
101 FRKIINDKTI PVEEKHKKMN  ELAQKVLTD NLKEYNEFTA HIEDRHKAVA
151 DKAATLSPEA KAAYDKIAKL EKEKHDIIAS LNEQAQEELF  QVFKLRHSKS
201 AKDLEHHHHH H
  
```

Figura 6.

Secuencias peptídicas de la proteína recombinante rHc23 identificadas por espectrometría de masas y huella peptídica tras su digestión con tripsina y Endo V8 (rojo), coincidentes con la proteína hipotética HCC00515.

La realización del gel de 2D reveló 4 “spots” diferentes (Figura 7), tres de ellos de peso molecular aproximado 24 KDa y un “spot” adicional de 46 KDa, todos con el mismo punto isoeléctrico.

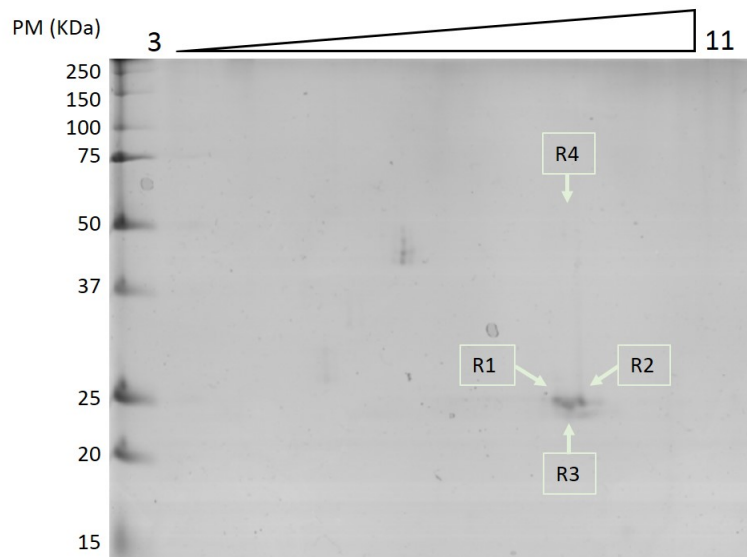


Figura 7.

Electroforesis en 2D de la proteína recombinante rHc23, teñida con azul de Coomassie. Las flechas indican los “spots” identificados (R1 - R4). Marcador de peso molecular (PM) en KDa. 3-11: escala de punto isoeléctrico.

Los “spots” fueron secuenciados individualmente siguiendo el mismo protocolo para descartar una posible contaminación de la muestra, observándose que correspondían a la misma proteína. Este resultado apoya la dimerización espontánea de la proteína en su forma recombinante.

La secuencia final en la proteína recombinante rHc23, obtenida tras las determinaciones realizadas mediante espectrometría de masas y huella peptídica, fue la siguiente (Figura 8):

```

1  MRTLVLVVAIS VAAVSAAGLF AHHPPECGL PPFVNDLPAD DQAKLKDIWK
51  NWKEGDKCYH EQGLTRDLVE TLPTEIRRKI SKDALLPPPV RKAPEEVQEQ
101 FRKIINDKTI PVEEKHKKMN ELAQKVLTDG NLKEYNEFTA HIEDRHKAVA
151 DKAATLSPEA KAAYDKIAKL EKEKHDIIAS LNEQAQEELF QVFKLRHSKS
201 AKDLEHHHHH H
    
```

Figura 8.

Secuencia final de la proteína recombinante rHc23 identificada por espectrometría de masas y huella peptídica tras la digestión con tripsina y EndoV de la proteína en solución, en gel, y de los “spots” obtenidos tras la electroforesis 2D. Resaltadas en rojo las secuencias obtenidas. Amarillo los aminoácidos previamente determinados por degradación de Edman (García-Coiradas et al., 2009).

Se realizó el inmunorreconocimiento de la proteína por WB observándose su reconocimiento tras el empleo de sueros de animales vacunados con Hc23 (Figura 9), confirmando de nuevo que se trata de la misma proteína.

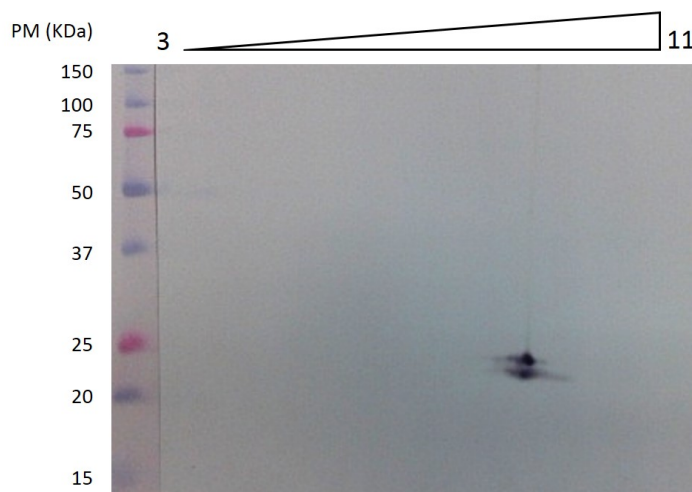


Figura 9.

Inmunorreconocimiento mediante 2D Western Blot de la proteína recombinante rHc23 con sueros de animales vacunados con la proteína Hc23 + Al(OH)₃. PM, marcador de peso molecular en KDa. 3-11: escala de punto isoeléctrico.

Se compararon las secuencias de ambas proteínas, lo que confirmó la homología de la forma recombinante con la secuencia obtenida en la proteína nativa, mostrando la siguiente secuencia final (Figura 10):

```

1  MRTLVLVVAIS VAAVSAAGLF AHHPPECGL PPFVNDLPAD DQAKLKDIWK
51  NWKEGDKCYH EQGLTRDLVE TLPTEIRRKI SKDALLPPPV RKAPEEVQEQ
101 FRKIINDKTI PVEEKHKMN ELAQKVLTD NLKEYNEFTA HIEDRHKAVA
151 DKAAATLSPEA KAAVDKIAKL EKEKHDIAS LNEQAQEELF QVFKLRHSKS
201 AKDLEHHHHH H

```

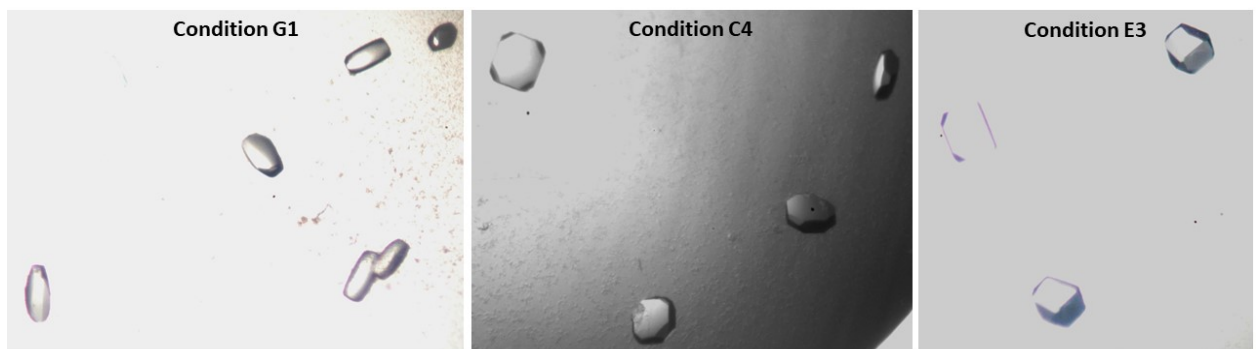
Figura 10.

Alineamiento de los péptidos finales de la proteína Hc23 y rHc23 obtenidos con la proteína hipotética HCC00515 (García-Coiradas et al., 2009) deducida en las bases de datos. En rojo las secuencias obtenidas. En amarillo los aminoácidos previamente determinados por degradación de Edman (García-Coiradas et al., 2009).

El análisis de la secuencia final obtenida con las bases de datos disponibles mostró una alta homología con diversas proteínas de *H. contortus* (CDJ92660.1 y CDJ88397.1 en la base de datos NCBI-Blast; U6P8378 y U6PFC7 empleando Uniprot) cuyas funciones siguen siendo desconocidas. La proteína CDJ92660.1 contiene el dominio DUF148, frecuente en otros nematodos como *Caenorhabditis* and *Ascaris suum*. Asimismo, la secuencia de Hc23 mostró un 58% de homología con la proteína hipotética NECAME_07527 de *Necator americanus*. No se observaron homologías con la proteína de E/S de peso molecular similar empleada en ensayos de vacunación por Schallig et al. (1997), inmunolocalizada en el esófago del parásito adulto. Existió un 100% de homología con la proteína identificada por Domínguez-Toraño et al. (2000) y García-Coiradas et al. (2010) y localizada en los cordones hipodérmicos de *H. contortus* (García-Coiradas et al., 2009). La función de esta proteína es desconocida. No obstante, proteínas antioxidantes pertenecientes a la familia de las peroxirredoxinas, localizadas en esta región en otras especies parasitarias, se han asociado con funciones de defensa. Estas proteínas altamente conservadas, observadas en *Dirofilaria immitis* (Chandrashekar et al., 2000) y *Onchocerca volvulus* (Zipfel et al., 1998), controlan el daño oxidativo generado por los radicales libres producidos en exceso por las células del hospedador.

b. Estudio cristalográfico de rHc23

El estudio realizado permitió la obtención de cristales de rHc23 con el detergente MEGA-7 y tras varios días de precipitación empleando distintas condiciones (Figura 11). Sin embargo, su pequeño tamaño e inestabilidad no permitió, tras su estudio cristalográfico, la elaboración de un modelo tridimensional. Ya que el rendimiento de la producción de proteína recombinante podría ser incrementado, es esperable que posteriores estudios con cantidades superiores permitan obtener cristales de mayor tamaño (refinando el método de precipitación).

**Figura 11.**

Cristales de proteína rHc23 obtenidos tras su cristalización con detergente MEGA-7 bajo tres condiciones diferentes de precipitación (G1, C4, E3).

4.5. Referencias

- Bassetto CC y Amarante AFT (2015). Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *J. Helminthol.* 89, 517–525.
- Benvenuti M, Mangani S (2007). Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nat. Protoc.* 2, 1633-1651.
- Cachat E, Newlands GFJ, Ekoja SE, Mcallister H, Smith WD (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunol.* 32, 414–419.
- Chandrashekar R, Tsuji N, Morales TH, Carmody AB, Ozols VO, Welton J, Tang L (2000). Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Res.* 86, 200–206.
- Domínguez-Toraño IA, Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Fernández-Pérez FJ, Alunda JM (2000). Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunol.* 22, 131–138.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *Int. J. Parasitol.* 44, 429-426.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015). Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211, 54-59.
- García-Coiradas L, Angulo-Cubillán F, Méndez S, Larraga V, de la Fuente C, Cuquerella M, Alunda JM (2009). Isolation and immunolocalization of a putative protective antigen (p26/23) from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 104, 63–369.
- Kotze AC y Prichard RK (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. *Adv. Parasitol.* 93, 397–428.
- Lamb J, Elliott T, Chambers M, Chick B (2017). Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet. Parasitol.* 241, 48–51.
- Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E (2016). Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol.* 38, 744–753.

McKellar QA y Jackson F (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* 20, 456–461.

Munn EA, Smith TS, Graham M, Greenwood CA, Tavernor AS, Coetzee G (1993). Vaccination of merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. *Parasitology* 106, 63-66.

Nisbet AJ, Meeusen EN, González JF, Piedrafita DM (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Adv. Parasitol.* 93, 353–396.

Roberts B, Antonopoulos A, Haslam SM, Dicker AJ, McNeilly TN, Johnston SL, Dell A, Knox DP, Britton C (2013). Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet. Res.* 44, 111.

Schallig HD, van Leeuwen MA (1997). Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology* 114, 293-299.

Smith WD, Smith SK, Murray JM (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16 (5), 231-241.

Waller PJ y 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

Zipfel PF, Schrum S, Bialonski A, Büttner DW (1998). The peroxidoxin 2 protein of the human parasite *Onchocerca volvulus*: recombinant expression, immunolocalization, and demonstration of homologous molecules in other species. *Parasitol. Res.* 84, 623–631.

Este capítulo corresponde a la información publicada en dos artículos:

- International Journal for Parasitology 44, 429–436. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.02.009. Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014).
- Veterinary Parasitology 211, 54–59. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.04.029. Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015).

Capítulo 5

Vacunación de corderos frente a *Haemonchus contortus* con la proteína recombinante rHc23. Efecto del adyuvante y la dosis de antígeno

5.1. Resumen

Haemonchus contortus es el nematodo gastrointestinal más virulento de ganado ovino y caprino. Las infestaciones repetidas naturales o experimentales, así como varios antígenos nativos, confieren una protección parcial frente a las reinfestaciones. En general, los resultados de las vacunaciones con antígenos recombinantes no han sido satisfactorios, aunque los niveles de protección alcanzados con rHc23 han sido prometedores. En este capítulo presentamos los resultados obtenidos en ensayos de vacunación de corderos empleando dos dosis de rHc23 y adyuvantes estándar.

Se vacunaron hembras de 6 meses de edad de raza Manchega con rHc23 (50 o 200µg/dosis) y 1mL de hidróxido de aluminio en las semanas -6, -4 y -2 o con 200µg/dosis de rHc23 + 5mg de QuilA en las semanas -7, -4 y -1. Los corderos de los grupos testigo recibieron el adyuvante en los mismos días. Por otra parte, un grupo no recibió ningún tratamiento ni infestación. En el día 0, se administró una dosis única monoespecífica de 4.000 L3 de *H. contortus* por vía oral. La infestación se mantuvo durante 58 días y el seguimiento incluyó la determinación de la respuesta sérica de anticuerpos específicos (ELISA, Western Blot), parámetros hematológicos (recuento de eosinófilos, hematocrito) y recuentos fecales de huevos (huevos por gramo de heces, hpg). Como criterios de eficacia se consideraron la ausencia de alteraciones del valor hematocrito y la reducción de la eliminación de huevos del helminto y del número de parásitos en abomaso al final del experimento. La inmunización con ambos adyuvantes y dosis de antígeno provocó una fuerte respuesta de anticuerpos específicos, especialmente con QuilA. Los grupos inmunizados mostraron una reducción significativa de la eliminación fecal de huevos y de la carga parasitaria en abomaso. La mayor protección de los corderos frente a la infestación se logró con hidróxido de aluminio + 200µg/dosis de rHc23, con una reducción de la carga de helmintos en abomaso de más del 70% y de más del 80% en la eliminación fecal de huevos.

Estos resultados sugieren que rHc23 podría ser un valioso candidato recombinante para la vacunación frente a la hemoncosis. La falta de correlación observada entre los niveles de anticuerpos y la protección sugiere la participación de componentes tanto humorales como celulares en la respuesta protectora inducida por rHc23.

5.2. Introducción

Las infestaciones de rumiantes por nematodos gastrointestinales están presentes en todo el mundo. Entre ellas la hemoncosis, enfermedad causada por *Haemonchus contortus*, es probablemente la más relevante y representa alrededor del 15% de todas las enfermedades gastrointestinales de pequeños rumiantes (<http://www.fao.org>). La infestación por este nematodo gástrico, aunque presente en todas las áreas con un número significativo de ovejas y cabras, es más frecuente en zonas cálidas y ha sido considerado la “némesis” de los sistemas de producción de pequeños rumiantes en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Emery et al., 2016). La distribución de este parásito se relaciona con su capacidad de adaptación a condiciones ambientales variables, la alta fertilidad de las hembras y su característica relación con el sistema inmunitario de los animales infestados. Dado el impacto económico de la enfermedad y su extensión, el control de la hemoncosis es crítico. Los antihelmínticos, incluida su administración masiva, han sido la principal herramienta para limitar la infestación. Sin embargo, la resistencia frente a estos fármacos es global (Kaplan y Vidyashankar, 2012; Rose et al., 2015) y los costes asociados a la medicación repetida de los animales son difícilmente asumibles para muchos ganaderos. Sin duda, el control eficaz de la hemoncosis requiere un enfoque integrado basado en el empleo de diversos sistemas de control (ej. antihelmínticos, rotación de pastos) de relevancia variable dependiendo de las condiciones ambientales, las razas animales, los sistemas de manejo y los objetivos de producción. Entre estos sistemas, la inmunoprofilaxis podría ser de utilidad. Se sabe que en condiciones naturales o experimentales, los pequeños rumiantes desarrollan resistencia frente a la reinfestación tras una primera exposición al parásito (Gamble y Zajac, 1992; Miller y Horohov, 2006; McRae et al., 2015). Asimismo, en condiciones experimentales, la vacunación con diferentes antígenos larvarios (L3) y de adultos de *H. contortus* induce niveles significativos de protección (Schallig y van Leeuwen, 1997; Newton y Munn, 1999; Cachat et al., 2010). Actualmente, basándose en un enfoque similar al utilizado para desarrollar la vacuna Bm86 frente a garrapatas (Willadsen et al., 1995), se ha comercializado un antígeno nativo de *H. contortus* (Barbervax®), ampliamente utilizado en Australia. Sin embargo, esta aproximación, aunque valiosa, tiene algunas limitaciones tales como el número requerido de revacunaciones (5-6) (Emery et al., 2016; Magalhães et al., 2017), la protección limitada obtenida en ciertas circunstancias (Meier et al., 2016) y las

consideraciones éticas por el uso de animales infestados para la obtención del antígeno nativo. El desarrollo de vacunas de subunidades frente a helmintos para su aplicación práctica sería un avance en el control de las infestaciones por NGI y, en particular, de la hemoncosis (Matthews et al., 2016). Lamentablemente, ningún equivalente recombinante de los antígenos nativos que inducen protección, incluida H-gal-GP, ha demostrado producir niveles significativos de protección frente a la infestación por *H. contortus* (Schallig y van Leeuwen, 1997; Redmond y Knox, 2004; Yanming et al., 2007; Cachat et al., 2010). La vacunación estándar de corderos con un antígeno expuesto de adultos de *H. contortus* (Hc23) y su versión recombinante (rHc23) han logrado reducciones del 70-80% en la eliminación fecal de huevos y la carga parasitaria adulta en abomaso en infestaciones experimentales (Fawzi et al., 2014; Fawzi et al., 2015). El uso de un antígeno recombinante para la vacunación contra la hemoncosis tiene importantes ventajas (ej. producción estandarizada, enfoque ético, fácil manejo y almacenamiento, entre otros). Dado que Hc23 es un antígeno expuesto, una protección superior al 60% sería considerada adecuada como sistema de control (Barnes et al., 1995). La eficacia de las vacunas depende en gran medida, entre otros factores, de la dosis de antígeno administrada y el adyuvante empleado. En este estudio presentamos los resultados obtenidos en ensayos de vacunación con rHc23 frente a la hemoncosis ovina empleando diferentes dosis de antígeno y adyuvantes.

5.3. Material y métodos

a. Extracto soluble de adultos de *H. contortus*

Los adultos de *H. contortus*, principalmente hembras, obtenidos del abomaso de corderos donadores infestados mono-específicamente, fueron lavados en PBS, tratados con inhibidor de proteasas (Roche, Alemania) y almacenados a -80°C . Los helmintos descongelados fueron sometidos a 8 ciclos de congelación-descongelación de 20 min, homogeneizados en un homogenizador de tejido de vidrio-en-vidrio y centrifugados a $30.000 \times g$, 30 min, 4°C . Se recuperó el sobrenadante (extracto soluble de adulto, ESA), se determinó la concentración de proteínas con el método RC/DC (Bio Rad, Alemania) y el extracto se almacenó a -80°C hasta su uso.

b. Producción de la proteína recombinante rHc23

La proteína recombinante rHc23 se obtuvo a partir del inserto ligado al vector de expresión pET29b previamente obtenido en nuestro laboratorio, amplificado en células competentes *E.coli* XL2-blue y almacenado a -80°C (Fawzi et al., 2015). Tras la descongelación, las bacterias fueron cultivadas en medio LB-kanamicina (Sigma, EE.UU.) y el plásmido fue purificado con el kit “QIAprep Spin Miniprep” (Qiagen, Alemania) y transformado en células *E.coli* BL21 (DE3). La proteína se expresó con una concentración final de 0,5mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Roche, Alemania). Las bacterias se lisaron por sonicación y la proteína recombinante (rHc23) fue purificada por cromatografía de afinidad en columna de níquel. El eluato fue dializado frente a PBS, liofilizado y almacenado a -20°C hasta su uso. Para las inmunizaciones de los corderos y las determinaciones inmunológicas, la proteína se resuspendió en PBS y se determinó y ajustó su concentración.

c. Parásitos

La fase infestante (L3) fue obtenida de corderos donadores sometidos a infestaciones monoespecíficas con *H.contortus*. El aislado fue cedido originalmente por Merck, Sharp & Dohme (Madrid, España) y ha sido mantenido en nuestro laboratorio mediante pases sucesivos en corderos desde hace más de 25 años. El material fecal fue cultivado (26°C, 80% humedad relativa, 7 días) y las L3 recuperadas con un aparato de Baermann (MAFF, 1971). Las larvas limpias se mantuvieron en agua a 4°C hasta su uso.

d. Corderos y diseño experimental

Se obtuvieron 45 corderos de raza Manchega de un productor local (Explotación El Navajo, Mondéjar, Guadalajara, España) con 4 meses de edad. Tras su llegada, los animales fueron tratados con albendazol (Albendex 10%, SP Veterinaria SA, España), sometidos a cuarentena y alojados en las instalaciones de la Granja Experimental (ES280790000137) de la Facultad de Veterinaria, UCM (Madrid) en condiciones libres de helmintos. Los animales fueron alimentados con pienso comercial (El Arca de Noé, España) y con paja y agua *ad libitum*. Los corderos se dividieron de

forma estratificada (peso vivo) en 7 grupos. Los grupos 1 (G1) y 2 (G2) fueron inmunizados con rHc23 (50 o 200µg/dosis, respectivamente) + 1mL de hidróxido de aluminio [Al(OH)₃] (Brenntag, Alemania) vía intramuscular las semanas -6, -4 y -2 preinfestación. El grupo 3 (grupo testigo de adyuvante, G3) fue tratado solo con Al(OH)₃. Los corderos del grupo 4 (G4) fueron inmunizados vía intramuscular con 200µg/dosis de rHc23 + 5mg de QuilA (Brenntag, Alemania) las semanas -7, -4 y -1 preinfestación. Los animales del grupo 5 (grupo testigo de adyuvante, G5) recibieron solo QuilA en los mismos días. Los corderos del grupo 6 (G6) no recibieron ningún tratamiento y el grupo 7 (G7) se mantuvo como grupo testigo no tratado y no infestado. El día 0, los animales de los grupos 1 al 6 fueron sometidos al reto con una infestación mono-específica de 4.000 L3 de *H. contortus*. Al final del experimento (día 58 postinfestación, pi) los animales fueron sacrificados en un matadero local (Villarejo de Salvanés, Madrid) y los abomasos fueron recuperados y transportados en refrigeración al laboratorio para la estimación de la carga de parásitos adultos. Los detalles sobre el número de animales y el diseño experimental se muestran en la Tabla 1. El diseño y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la UCM y autorizados por el gobierno regional (Comunidad de Madrid) (PROEX 75/14). Para evitar el uso innecesario de animales, los grupos testigo (G6 y G7) fueron empleados simultáneamente para otros experimentos.

Tabla 1.

Diseño experimental del ensayo de vacunación de corderos con rHc23 frente al reto con *Haemonchus contortus*.

	Al(OH) ₃	Al(OH) ₃ + rHc23	QuilA	QuilA + rHc23	<i>H. contortus</i> (4.000 L3)
Grupo 1 [7]		+ (3 x 50µg rHc23)			+
Grupo 2 [7]		+ (3 x 200µg rHc23)			+
Grupo 3 [6]	+				+
Grupo 4 [7]				+ (3 x 200µg rHc23)	+
Grupo 5 [6]			+		+
Grupo 6 [7]					+
Grupo 7 [5]					-

En corchetes el número de animales de cada grupo experimental.

+: Tratamiento recibido.

e. Seguimiento, punto final y criterios de eficacia

i. Muestras de sangre

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena yugular en tubos al vacío Vacutainer las semanas -7, -3, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 pi. Las muestras para análisis séricos se dejaron coagular, se centrifugaron a 800 xg y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se determinaron el valor hematocrito (PCV) (%) y el recuento de eosinófilos en muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) y técnicas estándar de laboratorio.

ii. Enzimoimmunosayo (ELISA) y Western Blot

Las técnicas de ELISA y Western Blot (WB) se realizaron siguiendo un protocolo previamente publicado (Cuquerella et al., 1991) con ligeras modificaciones. Se fijaron las condiciones óptimas para la realización del ELISA. Brevemente, se tapizaron las microplacas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) con 100µL de ESA (5µg/mL) o rHc23 (1µg/mL) a 4°C durante 16h y se bloquearon con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) (1h, 37°C). Se emplearon muestras séricas individuales a una dilución 1/200 en PBS-Tween durante 1h a 37°C. El conjugado (anti-sheep IgG-AP, Sigma, EE.UU.) se diluyó 1/8000 para las placas tapizadas con ESA y 1/32000 para las tapizadas con rHc23 y se incubaron durante 1h a 37°C. El sustrato fue 1mg/mL de 4-nitrofenil-fosfato (Sigma, EE.UU.) y se determinó la densidad óptica (DO) con el lector de placas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) a 405nm.

La electroforesis del ESA de *H. contortus* (14,7µg/cm de gel) y rHc23 (2,65µg/cm de gel) se realizó en geles de acrilamida-bisacrilamida (Merck, Alemania) al 12,5%. Los marcadores de peso molecular (PM) fueron de GE Healthcare (Reino Unido) y la electroforesis se realizó a 80V - 30 min, seguido de 1h a 150V. Se transfirieron los geles a membranas de Immobilon P (Millipore, EE.UU.) durante 2 ½ h, 400mA. Las membranas se lavaron y bloquearon con leche desnatada al 5% (Sveltesse, Nestlé) durante 1h, se cortaron en tiras (3mm de ancho) y se incubaron con mezclas séricas de cada grupo (dilución 1/100 en TBS-leche desnatada al 5%) correspondientes al día 21pi durante 3h, 37°C, en agitación. El conjugado (anti-sheep IgG-HRP, Sigma, EE.UU.) se empleó a una dilución 1/1000 en TBS-T durante 1h - 37°C. Tras los lavados

(TBS-T, TBS) se añadió el sustrato (84mL TBS + H₂O₂ al 0,05% + 0,5mg/mL 4-cloro-1-naftol + 16,8mL metanol) y se detuvo la reacción con agua destilada.

iii. Determinaciones parasitológicas

Se tomaron muestras fecales individuales del recto semanalmente desde el inicio de la patencia hasta la semana 7pi. Las muestras se analizaron con la técnica de McMaster modificada (MAFF, 1971) y los resultados se expresaron como huevos por gramo de heces (hpg). Se determinaron las medias aritmética y geométrica de los recuentos de huevos en cada punto de muestreo. Los recuentos individuales de hpg fueron transformados para su normalización [$\log(x+1)$]. La eliminación fecal de huevos acumulada se estimó utilizando el método trapezoidal para determinar el área bajo la curva (AUC) de los animales y grupos. El abomaso de los corderos experimentales se abrió por la curvatura mayor, se recogió el 10% de contenido y se conservó en formol al 5% a temperatura ambiente hasta el recuento de los helmintos adultos.

iv. Criterios de eficacia

El éxito de la inmunización de los animales experimentales se determinó mediante la valoración de los niveles séricos de anticuerpos anti-rHc23. La reducción de la eliminación fecal de huevos, de la carga parasitaria en abomaso y del valor hematocrito fueron considerados como estimaciones del nivel de protección logrado con la inmunización con la proteína recombinante rHc23.

f. Análisis estadístico

Los valores mostrados son la media \pm desviación estándar. Las medidas repetidas (ELISA, hpg y PCV) se analizaron con un modelo lineal mixto seguido de una prueba *post hoc* (comparación múltiple Tamhane para ELISA y Bonferroni para hpg y PCV) entre grupos experimentales. La homogeneidad de los grupos fue analizada mediante el test de Tukey. La eliminación fecal de huevos acumulada (AUC), los recuentos de eosinófilos y la carga de helmintos en abomaso se analizaron mediante ANOVA de 1 vía. En todos los casos, la significación se fijó en $P < 0,05$.

5.4. Resultados

a. Respuesta sérica de anticuerpos

La inmunización con rHc23 con ambos adyuvantes (hidróxido de aluminio y QuilA) provocó una fuerte respuesta de anticuerpos IgG específicos frente a la proteína recombinante en los tres grupos vacunados (G1, G2, G4) (Figura 1a). Se observaron diferencias entre los grupos desde la segunda inmunización (semana -3) hasta el final del experimento. Los corderos vacunados mostraron niveles de anticuerpos significativamente más elevados ($P < 0,05$) que el resto de grupos, especialmente los inmunizados con rHc23 + QuilA.

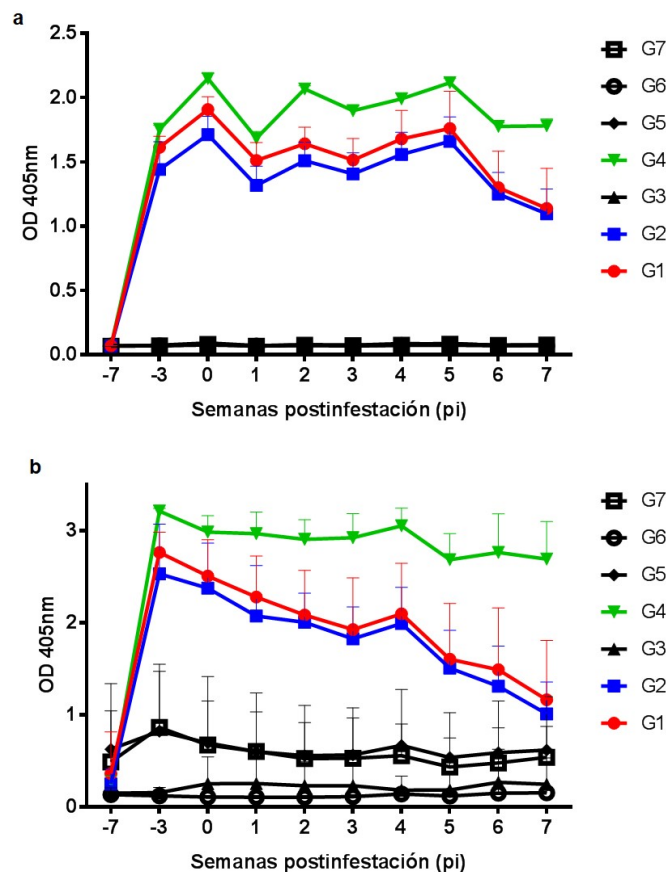


Figura 1.

Respuesta sérica IgG específica de corderos vacunados con rHc23 a lo largo del experimento. **Figura 1a:** Respuesta sérica IgG anti-rHc23 de corderos experimentales. **Figura 1b:** Niveles séricos IgG anti-*H. contortus* (ESA) a lo largo del experimento. Los sueros se diluyeron 1/200 y los datos son la media \pm desviación estándar de los valores de densidad óptica (DO) observados antes de la infestación (semanas -7 y -3), el día de la infestación (semana 0) y postinfestación semanalmente hasta la semana 7pi.

La respuesta sérica IgG frente a ESA (Figura 1b) mostró un patrón similar. Los 3 grupos inmunizados presentaron un fuerte reconocimiento del extracto soluble de *H. contortus*. Los corderos vacunados con QuilA (G4) fueron significativamente diferentes a los no vacunados a lo largo de todo el periodo experimental. Por otra parte, los animales inmunizados con rHc23 + Al(OH)₃ (G1, G2) mostraron una respuesta IgG frente a ESA menos duradera y no se observaron diferencias con los corderos no vacunados en la última semana de muestreo. La primoinfestación sin tratamiento (G6) no indujo ninguna respuesta significativa frente a *H. contortus*.

Los resultados del ELISA confirmaron que la inmunización fue exitosa y se obtuvieron altos niveles de anticuerpos anti-rHc23 independientemente del adyuvante y de la dosis de antígeno empleada en la inmunización con aluminio. Las respuestas de anticuerpos observadas frente a rHc23 o ASE fueron comparables, particularmente con la saponina (Quil A). Esto fue confirmado por WB ya que las mezclas séricas de los grupos inmunizados reaccionaron con rHc23 (Figura 2a) y también con ESA de *H. contortus* (Figura 2b). La reactividad del grupo inmunizado con QuilA (G4) fue aparentemente más evidente. Cabe destacar que en el WB con ESA, además de la reactividad a 23 KDa, existió una débil reacción correspondiente a *ca.* 46 KDa.

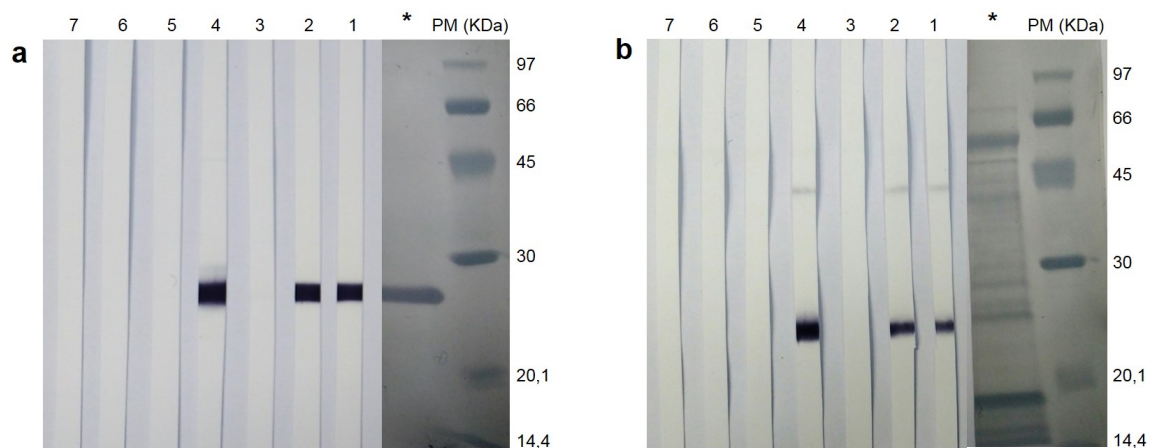


Figura 2.

Inmunorreconocimiento (WB) de rHc23 y extracto soluble de adulto (ESA) por corderos vacunados con rHc23. Figura 2a: Inmunorreconocimiento de rHc23 (2,65µg/cm de gel) por mezclas séricas de los grupos inmunizados en la semana 3pi. Figura 2b: Inmunorreconocimiento del ESA (14,7µg/cm de gel) por mezclas séricas de grupos vacunados en la semana 3pi. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y las mezclas séricas se diluyeron 1/100. Carril 1: G1; carril 2: G2; carril 3: G3; carril 4: G4; carril 5: G5; carril 6: G6; carril 7: G7. PM: marcador de peso molecular. *: Tinción con negro amido de la membrana con la proteína transferida. Ver la Tabla 1 para detalles de los grupos.

b. Recuento de eosinófilos y valor hematocrito (PCV)

Todos los grupos de animales mostraron una elevación en los recuentos de eosinófilos a lo largo del experimento. Se observaron algunas variaciones entre grupos ($P < 0,05$) en el último recuento, aunque todos los valores se encontraban dentro de la horquilla fisiológica. La infestación provocó la reducción de PCV pero, de igual modo que en los recuentos de eosinófilos, sus valores fueron fisiológicos y no se observaron evidencias de anemia (resultados no mostrados).

c. Eliminación fecal de huevos

La Figura 3 muestra la eliminación fecal de huevos de *H. contortus* (hpg) a lo largo del experimento y la Tabla 2 presenta los recuentos acumulados de huevos (AUC) de los grupos experimentales. Se observó una elevada variación entre grupos infestados. El análisis de medidas repetidas mostró significación ($P < 0,05$) tanto al considerar el tiempo de infestación como el grupo experimental. Todos los grupos vacunados (G1, G2 y G4) presentaron un menor número de huevos en las semanas 4, 5, 6 y 7 pi ($P < 0,05$) que los animales no vacunados e infestados. A pesar de las variaciones individuales dentro de cada grupo, en cada momento de muestreo y a lo largo del experimento, la administración del adyuvante (G3, G5) no provocó ninguna reducción de los valores de hpg respecto a los corderos que no recibieron tratamiento ($P > 0,05$). El patrón de eliminación de huevos de *Haemonchus* en los animales vacunados fue comparable, sin ningún efecto aparente de la dosis de antígeno administrada (G1 vs. G2) o adyuvante empleado (G2: aluminio vs. G4: QuilA).

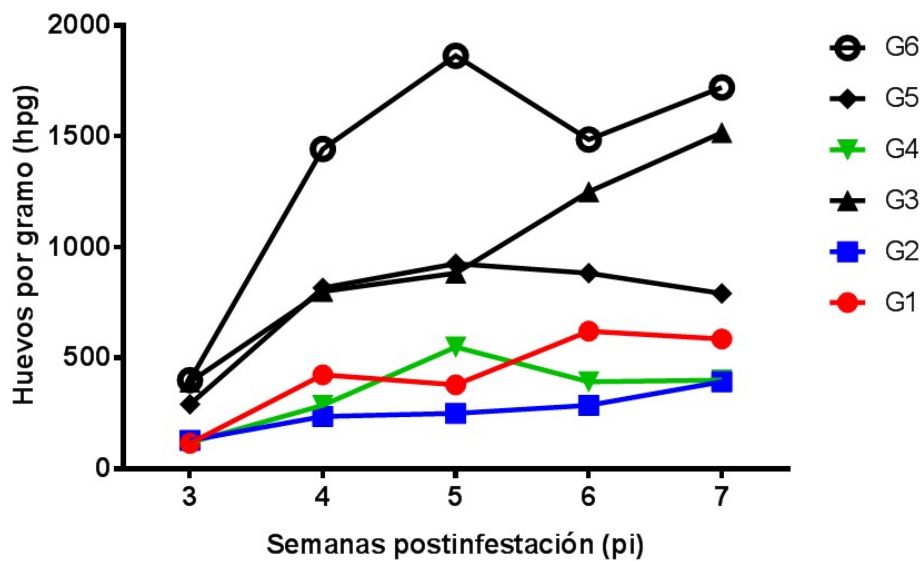


Figura 3.

Recuento fecal de huevos de corderos vacunados con rHc23 tras la infestación. Los valores están expresados como medias geométricas de los datos individuales de eliminación fecal de huevos de *H. contortus* (hpq) transformados ($\log x+1$) desde la semana 3pi. Los análisis fecales individuales fueron realizados con la técnica de McMaster modificada.

Considerando el recuento fecal de huevos acumulado (AUC), los animales vacunados (G1, G2, G4) mostraron valores de AUC significativamente inferiores a los corderos infestados + no tratados (Tabla 2). La menor eliminación se observó en el grupo de animales inmunizados con la dosis alta de rHc23 + Al(OH)₃ (G2). En este grupo, la vacunación provocó una reducción fecal de huevos de más del 80% ($82,37\% \pm 5,98\%$), siendo ligeramente menor en el grupo vacunado con QuilA (G4) ($74,58\% \pm 10,94\%$) y en los animales inmunizados con la dosis baja de rHc23 (G1) ($69,7\% \pm 17,39\%$). El análisis estadístico no mostró ningún efecto significativo de la dosis de antígeno o adyuvante empleado ($P>0,05$). Sin embargo, debe destacarse que la reducción encontrada en los corderos del grupo G2 no estuvo relacionada con el efecto del Al(OH)₃ (G3) ($P<0,05$) mientras que la protección observada en los animales vacunados con rHc23 + QuilA (G4) no fue significativamente diferente de la obtenida en los corderos tratados solo con la saponina (G5) ($P>0,05$).

Tabla 2.

Recuento fecal de huevos de *H. contortus* acumulado (AUC 21-49 dpi) de corderos vacunados con rHc23.

	AUC ± de
Grupo 1	12415 ± 7123,79 ^[6]
Grupo 2	7225 ± 2449,4 ^[3, 6]
Grupo 3	27212,5 ± 13783,4 ^[2]
Grupo 4	10415 ± 4484,87 ^[6]
Grupo 5	22166,67 ± 9541,38
Grupo 6	40975 ± 21142,78 ^[1, 2, 4]

Los datos son la media ± desviación estándar (de). Los superíndices indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

d. Carga parasitaria adulta en abomaso

Se observaron elevadas variaciones, dentro de cada grupo, en la carga de helmintos en abomaso (Tabla 3). El número de adultos de *H. contortus* fue bajo, con una tasa de establecimiento del 7,44% en los animales infestados + no tratados (G6). Se recuperaron un mayor número de hembras en todos los grupos experimentales a excepción de los animales infestados + no tratados. La ratio hembra/macho osciló entre 1,61 (G2) y 0,79 (G6). La inmunización con rHc23 con ambos adyuvantes provocó una reducción significativa ($P < 0,05$) del número de helmintos adultos respecto al grupo testigo infestado (G6). La reducción media osciló entre el 47,3% ± 35,4% en G4 (QuilA) y el 71% ± 14,3% en G2 [Al(OH)₃]. No se observó un efecto significativo de la dosis de antígeno empleada (G1 vs. G2). Los corderos que recibieron solo el adyuvante mostraron una carga inferior aunque las diferencias no fueron significativas. Hay que señalar que el menor número de helmintos adultos se observó en el grupo vacunado con la dosis alta de antígeno y con hidróxido de aluminio como adyuvante (G2). Este grupo fue significativamente diferente ($P < 0,05$) a su grupo testigo de adyuvante (G3) y a los animales tratados con Quil A (G5).

Tabla 3.

Carga parasitaria adulta de *H. contortus* (machos, hembras y total) en corderos vacunados con rHc23

	Machos adultos	Hembras adultas	Helminetos totales	Reducción (%)
Grupo 1	61,3 ± 38,9	85,7 ± 53,5	147 ± 91,1 ^[6]	50,6 ± 30,6
Grupo 2	33 ± 19,6	53,3 ± 25,6	86,3 ± 47,2 ^[3,5,6]	71,0 ± 14,3
Grupo 3	96,5 ± 72,3	123,8 ± 65,1	220,3 ± 137,1 ^[2]	26,0 ± 46,0
Grupo 4	66,4 ± 49,3	90,4 ± 57	156,9 ± 105,5 ^[6]	47,3 ± 35,4
Grupo 5	102,5 ± 60,7	125 ± 69,6	227,5 ± 129 ^[2]	23,6 ± 43,3
Grupo 6	167,2 ± 79	130,7 ± 87,2	297,8 ± 160,2 ^[1,2,4]	-----

Los datos son la media ± desviación estándar.

Solo los corderos infestados (4.000 L3, dosis única) están incluidos.

Valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos.

5.5. Discusión

A pesar de la evidencia de la capacidad de los pequeños rumiantes para desarrollar una respuesta parcialmente protectora tras infestaciones naturales o experimentales por *H. contortus*, y de las ventajas de la vacunación con un producto recombinante, el progreso ha sido moderado. El antígeno recombinante de *H. contortus* rHc23 ha demostrado conferir más de un 80% de protección (eliminación de huevos, carga de helmintos) frente a la infestación en corderos usando hidróxido de aluminio como adyuvante y un programa de inmunización estándar con tres dosis de antígeno (100µg/dosis) (Fawzi et al., 2015). La eficacia de las vacunas depende en gran medida de la elección adecuada del adyuvante para inducir una respuesta inmunitaria eficaz (Stills, 2005). Asimismo, la dosis de antígeno administrada es importante por razones económicas, y se han observado variaciones de la respuesta en dependencia de la dosis empleada en otros sistemas parásito-hospedador (Estcourt et al., 2005; Atmar et al., 2007; Quan et al., 2009; Rojo-Montejo et al., 2011). Los resultados mostraron que la inmunización de corderos empleando ambos adyuvantes (QuilA y aluminio) provocó altos niveles circulantes de IgG anti-rHc23. La respuesta frente a rHc23 y ESA, más

elevada y prolongada observada en el grupo rHc23 + QuilA mediante ELISA, es consistente con la doble activación del sistema inmunitario por la saponina (Th1, Th2) (Spickler y Roth, 2003; Nicholls et al., 2010) y la rápida disminución en el grupo rHc23 + aluminio en ausencia de inmunizaciones repetidas (Stills, 2005). La reactividad comparable de los sueros ovinos frente a la proteína recombinante y ESA en los tres grupos vacunados (ELISA), y los similares patrones de reconocimiento de WB, confirmaron la similitud del antígeno recombinante y el antígeno nativo presente en los adultos de *H. contortus*. Dos de los grupos experimentales (G5, G7) mostraron cierta reactividad inespecífica en el ELISA frente a ESA. No es posible descartar la posibilidad de alguna reactividad cruzada del antígeno recombinante con otros antígenos no relacionados. Sin embargo, no se observó ningún reconocimiento en el WB y la granja de procedencia no presentaba infestaciones por *H. contortus*. La ausencia de anticuerpos específicos anti-*Haemonchus* detectables tras la infestación es consistente con observaciones previas en primoinfestaciones experimentales de corderos (Fawzi et al., 2014). El papel de los eosinófilos se ha relacionado con la destrucción de larvas de *H. contortus* (Meeusen y Balic, 2000). En este experimento se observó una elevación del recuento de eosinófilos periféricos en todos los corderos vacunados con rHc23, aunque los valores estuvieron dentro de los márgenes fisiológicos y no existió correlación entre su valor y los parámetros clave considerados como marcadores de protección. Como criterios de eficacia del ensayo de vacunación con rHc23 consideramos los parámetros parasitológicos *in vivo* y *post mortem* (hpg, carga parasitaria en abomaso) y las variaciones del valor hematocrito. La dosis infestante (4.000 L3) podría explicar la falta de efectos significativos de la infestación sobre PCV.

La eliminación fecal de huevos es un importante marcador fenotípico *in vivo* de la resistencia a la infestación por *H. contortus* (Bakker et al., 2004). Por su parte, la carga parasitaria de adultos en abomaso, además de su valor como marcador de protección (Gaully et al., 2002; Amarante et al., 2005), es el verdadero responsable de la patogenia de la hemoncosis. A pesar de las variaciones individuales esperadas dentro de cada grupo, los corderos vacunados (G1, G2, G4) mostraron valores de hpg de *Haemonchus* significativamente ($P < 0,05$) menores desde la semana 4pi hasta el final del experimento. La protección inducida por la vacunación fue dependiente del antígeno rHc23 administrado, ya que no se encontraron diferencias entre los animales del grupo testigo infestado + no tratado y los corderos que recibieron solo los adyuvantes en

ninguno de los análisis realizados. La estimación de los valores de hpg está sujeta a una serie de posibles sesgos (ej. grado de hidratación de la materia fecal, variaciones de la dieta). Por ello se considera más adecuado emplear el recuento fecal acumulado (AUC). Los resultados confirmaron el efecto significativo de la vacunación, con ambos adyuvantes y dosis de antígeno, en la reducción de huevos eliminados al medio por los animales infestados. La reducción observada en el grupo inmunizado con la dosis elevada de rHc23 + aluminio (82,3%) fue similar a la obtenida previamente con las proteínas nativa (Fawzi et al., 2014) y recombinante (Fawzi et al., 2015) usando el mismo adyuvante en corderos de raza Assaf y ligeramente menor a la hallada recientemente en ovejas Baladi con este antígeno recombinante (Kandil et al., 2017). La dosis de antígeno (G1 vs. G2) no afectó al recuento de hpg ($P > 0,05$). La reducción de la AUC observada en los corderos que recibieron solo adyuvante podría estar relacionada con la inducción de una protección inespecífica, como se ha observado previamente con QuilA (Spickler y Roth, 2003).

La carga parasitaria de helmintos adultos en abomaso es probablemente, junto con su tamaño y su fertilidad, uno de los parámetros más relevantes para evaluar la eficacia de la vacunación frente a *H. contortus*. La tasa de establecimiento observada fue similar a la obtenida con este aislado de *Haemonchus* en infestaciones experimentales y ensayos de vacunación previos (Gómez-Muñoz et al., 1999; Fawzi et al., 2015). Los resultados mostraron que todos los grupos vacunados con rHc23 presentaron un número significativamente menor de adultos en abomaso, lo que apoya el efecto protector del antígeno recombinante. Se observó una mayor protección con la dosis alta de antígeno y el hidróxido de aluminio como adyuvante respecto a la vacunación con rHc23 + QuilA. A pesar del número limitado de animales, nuestros resultados confirmaron el valor de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante en la inmunización con rHc23 frente a la hemoncosis ovina. La falta de diferencias significativas entre los corderos vacunados con la saponina + rHc23 y el grupo que recibió solo el adyuvante sugiere que, en nuestras condiciones, QuilA se comportó como un inmunomodulador y casi el 50% de la protección inducida en los animales vacunados con este adyuvante (G4) se debió aparentemente a la protección inespecífica provocada por la saponina. Por el contrario, el aluminio no mostró ningún efecto relevante cuando fue administrado sin antígeno.

Se observó una tendencia hacia una mayor protección (hpg, carga parasitaria) con la dosis elevada de antígeno, pero las diferencias no fueron significativas y ello

podría estar relacionado con la presencia de corderos “respondedores” (*responders*) y “no respondedores” (*non responders*) dentro de un mismo grupo de animales. Se considera que la resistencia inmunitaria natural y adquirida frente a los NGI de ganado ovino está asociada a una respuesta predominante Th2 (Lacroux et al., 2006; Miller y Horohov, 2006; McRae et al., 2015). Probablemente tanto la respuesta celular como la humoral están involucradas en la protección con rHc23 ya que los niveles más elevados y prolongados de anticuerpos inducidos por QuilA no se correlacionaron con una mayor protección de los corderos. Esta falta de correlación también se ha observado en ensayos de vacunación con un antígeno de superficie larvario de este nematodo (Jacobs et al., 1999; Piedrafita et al., 2013).

Las infestaciones por *Haemonchus* son frecuentes y las resistencias a antihelmínticos en pequeños rumiantes están en aumento (Rose et al., 2015; Kotze y Prichard, 2016). La vacunación frente a la hemoncosis podría tener un importante efecto sobre la producción animal en el marco de la agricultura sostenible, en la disminución de los residuos con actividad farmacológica en el medio y los productos animales. En este escenario, la vacunación con rHc23 ha mostrado niveles significativos de protección frente a la hemoncosis ovina en los principales parámetros (carga de helmintos en abomaso, hpg) (70% - más del 80%). Obviamente, existe un amplio margen de mejora (ej. calendario de vacunación, mejora de la producción del antígeno recombinante), pero los resultados combinados de este experimento y los obtenidos previamente (Fawzi et al., 2015; Kandil et al., 2017) confirman el papel de este antígeno recombinante como candidato a una vacuna de subunidades frente a *H. contortus* (Matthews et al., 2016) y apoya firmemente los ensayos en condiciones de campo.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la ayuda con el manejo y muestreo de animales a los estudiantes de grado de la Facultad de Veterinaria S. Domínguez, E. Gómez, P. Gómez, L. González, Á. Betancor, A. Salvador, L. Prado, M. Pérez, M. García y M. García. Laura Barrios (Departamento de Investigación Operativa y Estadística Aplicada, CSIC, Madrid) ayudó con el análisis estadístico de los datos.

5.6. Referencias

- Amarante AFT, Bricarello PA, Huntley JF, Mazzolin LP, Gomes JC (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.
- Atmar RL, Keitel WA, Cate TR, Munoz FM, Ruben F, Couch RB (2007). A dose response evaluation of inactivated influenza vaccine given intranasally and intramuscularly to healthy young adults. *Vaccine* 25, 5367–5373.
- Bakker N, Vervelde L, Kanobana K, Knox DP, Cornelissen AWCA, de Vries E, Yatsuda AP (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/ secretory products (ES). *Vaccine* 22, 618-628.
- Barnes EH, Dobson RJ, Barger IA (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11, 56-63.
- Cachat E, Newlands GFJ, Ekoja SE, Mcallister H, Smith WD (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunol.* 32, 414-441.
- Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM (1991). Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. *Vet. Parasitol.* 38, 131–143.
- Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* 46, 755-769.
- Estcourt MJ, Létourneau S, McMichael AJ, Hanke T (2005). Vaccine route, dose and type of delivery vector determine patterns of primary CD8⁺ T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 35, 2532–2540.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *Int. J. Parasitol.* 44, 429-426.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015). Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211, 54-59.
- Gamble HR, Zajac AM (1992). Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet. Parasitol.* 41, 211-225.

- Gauly M, Kraus M, Vervelde L, van Leeuwen MA, Erhardt G (2002). Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 30, 55-67.
- Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Gómez-Iglesias LA, Méndez S, Fernández-Pérez FJ, de la Fuente C, Alunda JM (1999). Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81, 281-293.
- Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashman K, Meeusen ENT (1999). Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-368.
- Kandil OM, Abdelrahman KA, Shalaby HA, Hendawy SHM, Abu El Ezz NMT, Nassar SA, Miller JE (2017). Evaluation of crude larval protein and recombinant somatic protein 26/23 (rHcp26/23) immunization against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. World* 10, 758-763.
- Kaplan RM, Vidyashankar AN (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70-78.
- Kotze AC, Prichard RK (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Adv. Parasitol.* 93, 397-428.
- Lacroux C, Nguyen TH, Androletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud J-P (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits and unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-622.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1971. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. HMSO, London.
- Magalhães de Matos AFI, Rosa Nobre CO, Monteiro JP, Leal Bevilaqua CM, Smith WD, Teixeira M (2017). Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. *Small Rum. Res.* 151, 1-4.
- Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebot E (2016). Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol.* 38, 744-753.
- McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* 37, 605-613.
- Meeusen EN, Balic A (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16, 95-101.

- Meier L, Torgerson PR, Hertzberg H (2016). Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet. Parasitol.* 229, 15-21.
- Miller JE, Horohov DW (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84 (E-Suppl.), 124-132.
- Newton SE, Munn EA (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15, 116-122.
- Nicholls EF, Madera L, Hancock REW (2010). Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1213, 46-61.
- Piedrafita D, Preston S, Kemp J, de Veer M, Sherrard J, Kraska T (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, e78357.
- Quan FS, Yoo DG, Song JM, Clements JD, Compans RW, Kang SM (2009). Kinetics of immune responses to influenza virus-like particles and dose-dependence of protection with a single vaccination. *J. Virol.* 83, 4489-4497.
- Redmond DL, Knox DP (2004). Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252-4261.
- Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Antonio Rodríguez- Bertos A, Prenafeta A, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM (2011). Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Vet. Parasitol.* 175, 220-229.
- Rose H, Rinaldi L, Bosco A, Mavrot F, de Waal T, Skuce P, Charlier J (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet. Rec.* 176, 546-547.
- Schallig HD, van Leeuwen MA (1997). Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology* 114, 293-299.
- Spickler AR, Roth JA (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 273-281.
- Stills Jr HF (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 46, 280-293.

Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, 43-50.

Yanming S, Ruofeng Y, Muleke CI, Guangwei Z, Lixin X, Xiangrui L (2007). Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29, 319-326.

Este capítulo ha sido publicado en PLoS ONE 13 (3): e0193118.

DOI: 10.1371/journal.pone.0193118. [González-Sánchez et al., 2018.](#)

Capítulo 6

Protección parcial de corderos vacunados con la proteína recombinante rHc23 frente a infestaciones seriadas por *Haemonchus contortus*

6.1. Resumen

La hemoncosis es una de las enfermedades parasitarias de pequeños rumiantes de mayor importancia económica a nivel mundial. El control terapéutico es deficiente (ej. arsenal antihelmíntico limitado, resistencia frecuente) e inaccesible para muchos productores. El antígeno recombinante rHc23 ha demostrado inducir una protección significativa en ensayos de inmunización en corderos sometidos a un reto administrado en dosis única, y con diferentes adyuvantes. Sin embargo, no existe información acerca de su comportamiento frente a infestaciones seriadas por *Haemonchus contortus*.

Se vacunaron corderos con 100µg/dosis de rHc23 + inmunomodulador bacteriano (LPS de *Escherichia coli* + extracto de *Propionibacterium acnes*) (días -2, 0, 7 y 14) y se sometieron a infestaciones seriadas con dos dosificaciones diferentes (6x, 1.000 L3 y 6x, 2.000 L3). Los corderos inmunizados mostraron una respuesta de anticuerpos significativa específica frente a rHc23 y al extracto soluble de *Haemonchus contortus*, valorada mediante ELISA y Western blotting. La eliminación fecal de huevos acumulada (AUC) en los animales vacunados e infestados con la dosis baja se redujo en un 43%. La carga de helmintos adultos en abomaso en los corderos vacunados fue un 45-60% menor que la hallada en los animales no vacunados.

Los resultados obtenidos mostraron que la vacunación con 100µg/dosis de rHc23 + inmunomodulador bacteriano protegió parcialmente a corderos frente a las infestaciones seriadas por *H. contortus*. La protección observada fue debida a la inmunización con rHc23, no estando relacionada con la protección inespecífica inducida por el inmunomodulador bacteriano. El inmunorreconocimiento de Hc23 en el ESA de *H. contortus* no se correlacionó con la protección provocada por la inmunización en los corderos individuales, lo que sugiere que la protección obtenida con rHc23 probablemente involucra tanto componentes celulares como humorales. Estos resultados confirman y amplían el valor protector de esta proteína recombinante y sugieren que rHc23 es un buen candidato potencial para el desarrollo de una vacuna recombinante frente a la hemoncosis en corderos.

6.2. Introducción

El helminto hematófago *Haemonchus contortus* es probablemente el nematodo más importante económicamente de pequeños rumiantes (Waller y Chandrawathani, 2005) y se considera responsable del 15% de todas las enfermedades gastrointestinales del ganado ovino (<http://www.fao.org>). Las infestaciones en los animales adultos provocan pérdida de peso, disminución de la fertilidad y menor crecimiento de lana y producción de leche. Las infestaciones en corderos son más graves y frecuentemente provocan la muerte de los más afectados. Su control se basa principalmente en el uso de antihelmínticos. Sin embargo, el arsenal terapéutico es reducido y se han observado resistencias frente a todos los grupos de antiparasitarios disponibles (Kotze y Prichard, 2016). Las dificultades económicas de los productores, la preocupación social reciente sobre la presencia de residuos en el medio, así como la necesaria seguridad de los productos animales para el consumo humano, requieren una producción ganadera sostenible. Además, debido a los escasos retornos esperados, las inversiones de las compañías farmacéuticas en el desarrollo de nuevos antihelmínticos se han reducido. En condiciones naturales los corderos pueden desarrollar una resistencia parcial frente a *H. contortus* tras exposiciones repetidas al parásito y se han logrado niveles significativos de protección en diversos ensayos realizados con diferentes antígenos aislados tanto ocultos como expuestos (Knox et al., 2003; Redmond y Knox, 2004; Cachat et al., 2010). No obstante, los resultados obtenidos con sus homólogos recombinantes no han logrado niveles comparables de protección (Redmond y Knox, 2004; Yanming et al., 2007). La inmunización de corderos de 5-6 meses de edad con el antígeno recombinante rHc23 provocó una protección significativa (>70% en la carga parasitaria adulta en abomaso y >80% en la eliminación fecal de huevos) frente a la infestación con *H. contortus* (Fawzi et al., 2015), especialmente con hidróxido de aluminio (González-Sánchez et al., 2018). La mayoría de los experimentos que han explorado la inmunoprofilaxis de la hemoncosis se han llevado a cabo utilizando, en el reto, una dosis única. En condiciones naturales, sin embargo, los corderos destetados están expuestos a infestaciones repetidas durante el pastoreo. Con el objetivo de refinar la vacunación de corderos con rHc23 frente a la hemoncosis se realizó un ensayo preliminar del potencial valor inmunoprofiláctico de la proteína recombinante (rHc23+ inmunomodulador bacteriano, IB) frente a infestaciones seriadas con *H. contortus* (1.000 o 2.000 larvas 3 (L3) administradas 3 veces/semana, durante 2 semanas consecutivas).

6.3. Material y métodos

El aislado de *H. contortus* fue obtenido originalmente de Merck, Sharp & Dohme (Madrid, España) y se ha mantenido en nuestras instalaciones (> 25 años) mediante pases seriados en corderos. Las larvas infestantes (L3) se obtuvieron por coprocultivo, se recuperaron utilizando la técnica de Baermann, se limpiaron mediante purificación parcial en papel de filtro y se almacenaron a 4°C en agua hasta su uso (MAFF, 1971). La proteína recombinante rHc23 se produjo como se ha descrito previamente (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018). Para el ensayo de inmunización, la proteína se resuspendió en PBS y la concentración de proteínas se determinó con el método RC/DC (Bio Rad, Alemania). Las corderas, Entrefinas, de 5-6 meses edad, se adquirieron en productores locales (“Antón Codesal, Sociedad Cooperativa”, Cerezal de Aliste, Zamora, y “El Navajo”, Mondéjar, Guadalajara, España). Tras su llegada a las instalaciones, los corderos fueron sometidos a cuarentena y alojados en condiciones libres de helmintos en las instalaciones de la granja de experimentación animal de la Facultad de Veterinaria, UCM (ES280790000137), alimentados con pienso comercial (Rubio Sanidad y Alimentación Animal, España), paja y agua *ad libitum*. Los animales (32) se dividieron de forma estratificada (peso vivo) en seis grupos. El Grupo 1 y el Grupo 4 se inmunizaron con 100µg/dosis de rHc23 + inmunomodulador bacteriano (LPS de *Escherichia coli* + extracto de *Propionibacterium acnes*) (IB) (3ml) los días -2, 0, 7 y 14 del experimento vía intramuscular. El Grupo 2 fue el grupo testigo de inmunomodulador y solo recibió el IB en los mismos días. En los días 0, 2, 4, 7, 9 y 11 del experimento, los corderos fueron infestados con 6 dosis de 1.000 L3 de *H. contortus* (G1, G2 y G3) o 6 dosis de 2.000 L3 (G4, G5). Los corderos del G6 fueron el grupo testigo no inmunizado y no infestado (Tabla 1). Los animales fueron observados diariamente para la detección de reacciones adversas a las inmunizaciones o signos clínicos de la infestación.

Se tomaron muestras fecales individuales del recto una vez por semana a lo largo del experimento. Los recuentos fecales de huevos (huevos por gramo, hpg) se determinaron utilizando una técnica de McMaster modificada (MAFF, 1971). Los recuentos acumulados de hpg se calcularon utilizando el método trapezoidal para determinar el área bajo la curva (AUC) de animales y grupos. Al final del experimento, los corderos se sacrificaron en un matadero local (Villarejo de Salvanés, Madrid) y se

extrajeron sus abomasos para la determinación de la carga parasitaria de adultos (Slotved et al., 1996).

Se obtuvieron muestras de sangre semanalmente mediante venopunción yugular utilizando tubos de vacío con anticoagulante para determinar el valor hematocrito (PCV) y sin anticoagulante para la obtención de sueros. El extracto soluble de adulto de *H. contortus* (ESA) se obtuvo por ciclos de congelación/descongelación y la concentración de proteína se determinó con el método RC/DC (Bio Rad, Alemania). La respuesta periférica de anticuerpos se determinó mediante ELISA usando microplacas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) tapizadas con 5µg/mL de ESA o 1µg/mL de rHc23 (Cuquerella et al., 1991). Los sueros se usaron a una dilución 1/200 (1h, 37°C) y el conjugado (anti-sheep IgG-AP, Sigma, EE.UU.) se utilizó a una dilución 1/8000 (ESA) y 1/32000 (rHc23) (1h, 37°C). Como sustrato se empleó 1mg/mL de 4-nitrofenil fosfato sal disódica hexahidratada (Sigma-Aldrich, EE.UU.) durante 30 min a 37°C y se midió la densidad óptica (OD) con lector Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) a 405 nm. El ESA de *H. contortus* se fraccionó en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5% y el Western blot se realizó como se ha descrito previamente (Cuquerella et al., 1991). El conjugado anti-sheep IgG-HRP (Sigma-Aldrich, EE.UU.) fue diluido 1/1000 (1h, 37°C). El color se reveló con 4-cloro-1-naftol (0,5mg/mL) y la reacción se detuvo con agua destilada. Los marcadores de peso molecular (PM) fueron de GE Healthcare (Reino Unido).

Los recuentos de hpg, PCV y los niveles de anticuerpos específicos se compararon mediante ANOVA de 2 vías y la reducción de hpg acumulada y la carga de helmintos en abomaso mediante ANOVA de 1 vía. Para todas las pruebas, $P < 0,05$ se estableció como nivel de significación. Las figuras y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism version 6.0.

6.4. Resultados

La Figura 1 muestra los resultados correspondientes a la infestación seriada con 1.000 L3/dosis. El protocolo de inmunización con rHc23 indujo una rápida respuesta de IgG específica anti-rHc23 ($P < 0,05$) en los corderos vacunados (G1), mientras que no se observó respuesta en los animales que recibieron el IB (G2), en los corderos no tratados (G3) ni en los animales del grupo control no infestado (G6). Los resultados de ELISA obtenidos con ESA siguieron un patrón similar (no mostrado), consistente con la presencia de Hc23 en ESA como se muestra en el WB (Figura 1 inserto). Se obtuvieron resultados similares con la dosis más alta (2.000 L3/dosis) (G4, G5). En todos los casos, los corderos inmunizados mostraron una respuesta IgG anti-ESA significativa, mientras que las infestaciones, con o sin inmunoestimulante bacteriano, no provocaron ninguna elevación del título de anticuerpos. El hematocrito se mantuvo en todos los grupos dentro de los valores fisiológicos a lo largo del experimento (datos no mostrados).

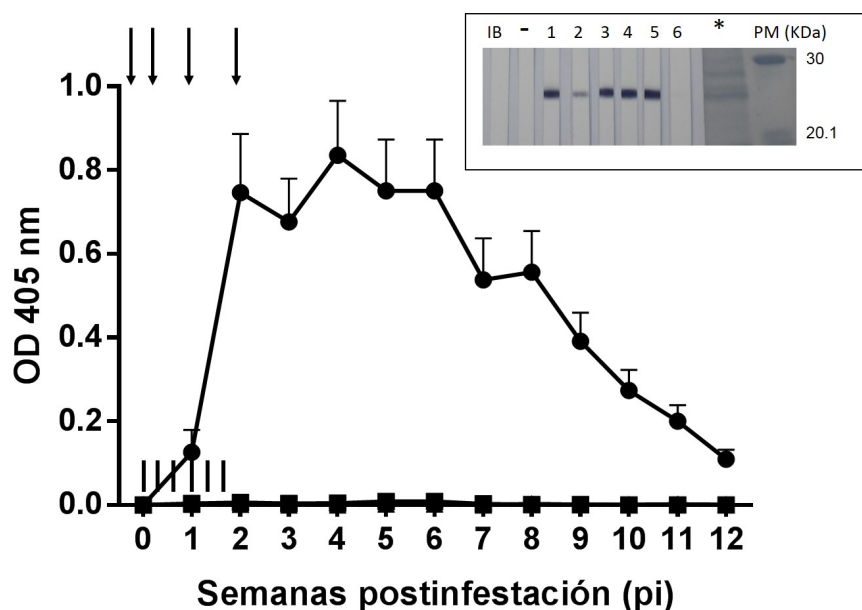


Figura 1.

Respuesta sérica IgG anti-rHc23 de corderos experimentales sometidos a infestaciones seriadas con 1.000 L3/dosis de *Haemonchus*. G1 (●), G2 (■) y G3 (○). Los datos son las medias \pm error estándar de la media (SEM). Inserto: inmunorreconocimiento de ESA de *H. contortus*. Carriles 1-6: sueros individuales de corderos vacunados (G1); IB: “pool” de sueros de los animales del grupo control de adyuvante (G2); (-): “pool” de sueros de corderos del grupo infestado + no tratado (G3). Flechas: días de tratamiento. Barras verticales: días de infestación. PM: marcador de peso molecular. *: Membrana teñida con negro Amido.

La eliminación fecal de huevos, considerando tanto el patrón de hpg como la eliminación total de huevos, es una buena estimación de la protección. Se encontraron amplias variaciones entre los animales de cada grupo. Sin embargo, la eliminación fecal de huevos acumulada (AUC) de animales inmunizados expuestos a 1.000 L3/dosis (G1) se redujo en más del 43% respecto al grupo que recibió el IB (G2) ($P < 0,05$); este grupo no fue significativamente diferente de los animales del grupo testigo no tratado (G3). La AUC en los corderos vacunados y sometidos a la infestación seriada con 2.000 L3/dosis (G4) no fue diferente a la observada en animales no inmunizados e infestados (G5) ($P > 0,05$) (Figura 2A). Sin embargo, el patrón de eliminación de huevos a lo largo del experimento en animales inmunizados fue comparable en las dos dosis infestantes. El patrón de eliminación (hpg) de los corderos vacunados fue diferente al observado en los animales del grupo control de IB, sin reducción de hpg hasta la semana 7 del experimento (Figura 2B).

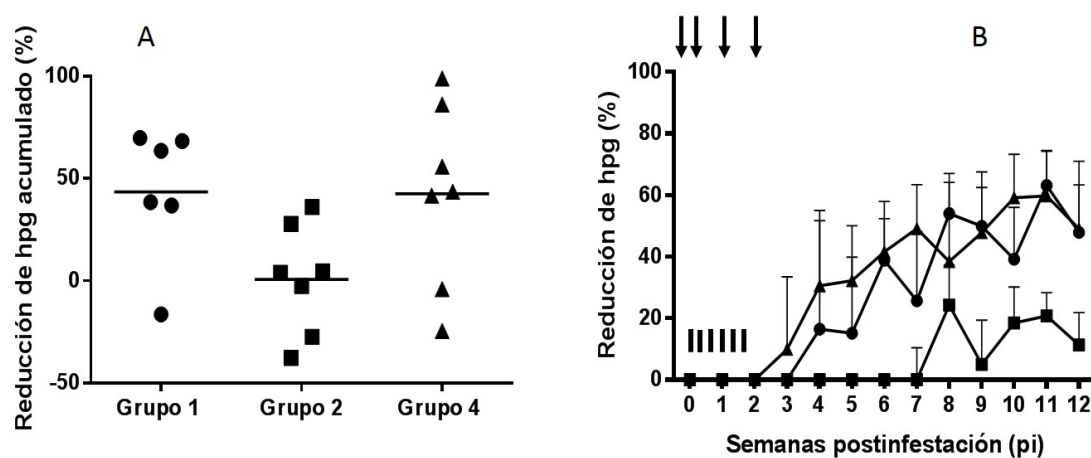


Figura 2.

Eliminación fecal de huevos de corderos vacunados con rHc23 + inmunomodulador bacteriano (IB) tras infestaciones seriadas a altas y bajas dosis. Figura 2A: Reducción de los valores individuales de hpg acumulados en corderos experimentales (G1, G2, G4). Las barras horizontales representan el valor medio de cada grupo. Figura 2B: Media \pm error estándar de la reducción (%) de los recuentos fecales de huevos de corderos a lo largo del período experimental. G1 (●), G2 (■) y G4 (▲).

La carga parasitaria de adultos en abomaso es una de las mejores estimaciones de la protección frente a la hemoncosis. La inmunización con IB + rHc23 provocó una reducción significativa ($P < 0,05$) de la carga de *H. contortus* en corderos sometidos a infestaciones seriadas con 1.000 L3/dosis ($44,16 \pm 11,6\%$) o 2.000 L3/dosis ($59,6 \pm 24,3\%$) respecto a los corderos no tratados. No se observó ningún efecto protector en la administración del IB solo (Grupo 2) (Tabla 1).

Tabla 1.

Diseño experimental del ensayo de inmunización con rHc23 + inmunomodulador bacteriano (IB) y carga parasitaria de *Haemonchus contortus* (media \pm error estándar de la media) en abomaso de los corderos experimentales.

	IB	rHc23	Infestación (L ₃)	Adultos machos	Adultos hembras	Helminthos totales
Grupo 1 [6]	+	+	1.000 x 6	288,5 \pm 68,2	239,5 \pm 43,9	528 \pm 110,2 ^[2,3]
Grupo 2 [7]	+	o	1.000 x 6	524,3 \pm 98,4	481,4 \pm 57,3	1005,7 \pm 150,4 ^[1]
Grupo 3 [4]	o	o	1.000 x 6	466,3 \pm 118,3	486,3 \pm 136	952,5 \pm 253,9 ^[1]
Grupo 4 [7]	+	+	2.000 x 6	578,3 \pm 305,2	638,3 \pm 348,2	1216,7 \pm 650,8 ^[5]
Grupo 5 [4]	o	o	2.000 x 6	1423,3 \pm 723,4	1590 \pm 792,5	3013,3 \pm 1503 ^[4]
Grupo 6 [4]	o	o	o			

Infestación seriada con 6 dosis de 1.000 L3/dosis, 3 dosis por semana, 2 semanas: Grupos 1, 2 y 3.

Infestación seriada con 6 dosis de 2.000 L3/dosis, 3 dosis por semana, 2 semanas: Grupos 4 y 5.

Grupo 6: grupo control. En corchetes el número de corderos de cada grupo experimental.

+: Tratamiento recibido; o: Sin tratamiento.

* Los valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos

6.5. Discusión

En nuestras condiciones experimentales, las inmunizaciones llevadas a cabo con IB + rHc23 provocaron una fuerte respuesta de anticuerpos frente a la proteína recombinante. La reactividad de los sueros de corderos inmunizados en ELISA y WB con ESA confirma la presencia de Hc23 en el adulto de *H. contortus*. La ausencia de signos clínicos a lo largo del experimento y la falta de una reducción significativa de los valores de hematocrito en los corderos infestados + no tratados, además de la variabilidad individual entre corderos, posiblemente pudo estar relacionada con las dosis infestantes empleadas.

Se ha descrito una disminución en la tasa de establecimiento de larvas en infestaciones seriadas (Barger et al., 1985). En nuestro caso no se observó una reducción evidente en función de la dosis infestante administrada (1.000 L3 vs. 2.000 L3); el valor obtenido fue incluso más alto (>15%) que el observado con este aislado en infestaciones en dosis única (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018). Ello podría estar relacionado con la duración de la infestación (2 vs. 15 semanas) y las variaciones del protocolo de infestación.

Los ensayos de infestación e inmunización en este sistema (corderos-*H. contortus*) se ven obstaculizados por las respuestas individuales (LeJambre et al., 2008; Piedrafita et al., 2012), posiblemente relacionadas con la variabilidad genética de los corderos (Hooda et al., 1999). De hecho, esta variabilidad de la respuesta individual puede reducir la significación de los hallazgos. En nuestro caso se observaron variaciones dentro de cada grupo, particularmente con la dosis infestante baja, donde se encontraron algunos valores atípicos (“outliers”). A pesar de ello, los resultados mostraron el papel protector de rHc23 considerando dos de los parámetros más relevantes para determinar el estado de resistencia de los corderos frente a la hemoncosis. La inmunización con rHc23 provocó una protección parcial frente a infestaciones seriadas (3 dosis/semana, 2 semanas), con 1.000 L3 o 2.000 L3, con una reducción media de los recuentos acumulados de huevos de ca. 43% y una reducción significativa ($P < 0,05$) (45-60%) en la carga de helmintos en abomaso; con mayor protección en los animales que recibieron la dosis infestante elevada. Este nivel de protección fue menor que el obtenido con el mismo aislado parasitario en corderos vacunados con la proteína recombinante (rHc23) (González-Sánchez et al., 2018) o

nativa (Hc23) (Fawzi et al., 2014) sometidos al reto en dosis única. Entendemos que debería analizarse si las diferencias están relacionadas con el calendario de infestación o con el método de inmunización (adyuvante vs. inmunoestimulante, pauta de administración). En nuestro caso la protección observada fue debida a la inmunización con rHc23 y no se observó ninguna evidencia de protección inespecífica provocada por el IB en animales de mayor edad (Abel et al., 2009). Esta falta de eficacia del IB fue manifiesta en los recuentos de hpg acumulados (AUC) y, particularmente, en la carga de helmintos en abomaso. Se observó una escasa reducción (<5%) de los recuentos de hpg en corderos tratados con IB después de 7 semanas pi, aunque su significado no está claro dada la complejidad del sistema y los posibles efectos sobre la respuesta inmunitaria adaptativa (Piedrafita et al., 2012). Los inmunomoduladores, incluida la combinación de ambos componentes de la preparación empleada por nosotros, son utilizados de forma creciente en medicina veterinaria. LPS es un adyuvante que induce, a través del receptor Toll-like 4 (TLR4), una respuesta Th1 en el tejido linfóide y Th17 en el intestino (McAleer y Vella, 2010). Por su parte, *P.acnes* tiene la capacidad de modular las células de la médula ósea (Squaiella et al., 2006). El reconocimiento de Hc23 en el ESA de *H.contortus* mediante ELISA y WB no mostró relación con la protección provocada por la inmunización (hpg, carga de helmintos) en los corderos individuales. Esto sugiere que la protección obtenida con rHc23 probablemente involucra tanto componentes celulares como humorales.

Se ha logrado una protección parcial frente a la hemoncosis con varios antígenos nativos (Bakker et al., 2004; Cachat et al., 2010; Fawzi et al., 2014), iniciándose la vacunación con las glicoproteínas de membrana intestinal de helmintos adultos H11 y H-gal-GP (www.agric.wa.gov.au/print/node/1878). Esta vacunación ha mostrado un bajo rendimiento en ovejas en periodo periparto (Bassetto et al., 2014) y requiere 5-6 revacunaciones con un intervalo de 6 semanas para obtener niveles significativos de protección. Además, a pesar de la cantidad reducida de proteína necesaria en cada inmunización, este sistema utiliza corderos infestados y sacrificados para la obtención del antígeno.

En ausencia de un sistema de cultivo para adultos de *Haemonchus*, un antígeno recombinante sería una ventaja tanto desde un punto de vista ético como tecnológico. Los resultados de protección obtenidos con los homólogos recombinantes han tenido un valor limitado, mientras que rHc23 ha sido capaz de proteger parcialmente a corderos

sometidos al reto en dosis única y en infestaciones seriadas. Es necesario refinar los protocolos de inmunización y estudios con números más elevados de animales. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados alcanzados previamente con el hidróxido de aluminio (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018) y los obtenidos en el presente ensayo de inmunización con IB, apuntan a rHc23 como un candidato potencial para el desarrollo de una vacuna recombinante frente a la hemoncosis ovina (Matthews et al., 2016).

Agradecimientos

Los autores agradecen profundamente la colaboración en el manejo de los animales a los estudiantes de grado en Veterinaria M. Pezella, E. Gómez-León, M. García-Caneda, M. Frías-Mateo, S. Álvarez-García y P. Feijoo-Vico. La investigación realizada recibió apoyo financiero de la CICYT (AGL2014-54049-R). Esta investigación es una contribución del grupo de investigación 910993 ICPVet, de la Universidad Complutense de Madrid, España (UCM),.

Aprobación del comité ético

El diseño y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y autorizados por la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 75/14).

6.6. Referencias

- Abel LC, Chen S, Ricca LG, Martins MF, Garcia M, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Shaw RJ, Longo-Maugéri IM (2009). Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunol.* 31:604-612.
- Bakker N, Vervelde L, Kanobana K, Knox DP, Cornelissen AWCA, de Vries E, Yatsuda AP (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22:618-628.
- Barger IA, Le Jambre LF, Georgi JR, Davies HI (1985). Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *Int. J. Parasitol.* 15:1049-1054.
- Bassetto CC, Picharillo MÉ, Newlands GFJ, Smith WD, Fernandes S, Siqueira ER, Amarante AFT (2014). Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *Int. J. Parasitol.* 44:1049-1054.
- Cachat E, Newlands GFJ, Ekoja SE, McAllister H, Smith WD (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunol.* 32:414-419.
- Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM (1991). Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. *Vet. Parasitol.* 38:131-143.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *Int. J. Parasitol.* 44:429-436.
- Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015). Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211:54-59.
- González-Sánchez ME, Cuquerella M, Alunda JM (2018). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS ONE* 13(3):e0193118.
- Hooda V, Yadav CL, Chaudhri SS, Rajpurohit BS (1999). Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J. Helminthol.* 73:137-142.

- Knox DP, Redmond DL, Newlands GF, Skuce PJ, Pettit D, Smith WD (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.
- Kotze AC, Prichard RK (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv. Parasitol.* 93:397-428.
- LeJambre LF, Windon RG, Smith WD (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoprotein in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet. Parasitol.* 153:302-312.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1971). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. HMSO, London.
- Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E (2016). Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol.* 38:744-753.
- McAlear JP, Vella AT (2010). Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *Trends Immunol.* 31:429-435.
- Piedrafita DP, de Veer MJ, Sherrard J, Kraska T, Elhay M, Meeusen EN (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* 30:7199-7204.
- Redmond DL, Knox DP (2004). Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22:4252-4261.
- Slotved HC, Barnes EH, Bjørn H, Christensen CM, Riksen L, Roepstorff A, Nansen P (1996). Recovery of *Oesophagostomum dentatum* from pigs by isolation of parasites migrating from large intestinal contents embedded in agar-gel. *Vet. Parasitol.* 63:237-245.
- Squaiella CC, Ananias RZ, Mussalem JS, Braga EG, Rodrigues EG, Travassos LR, Lopes JD, Longo-Maugéri IM (2006). *In vivo* and *in vitro* effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. *Immunobiol.* 211:105-116.
- Waller PJ, 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.

Yanming S, Ruofeng Y, Muleke CI, Guangwei Z, Lixin X, Xiangrui L (2007). Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29:319-326.

Una versión de este capítulo se ha sometido para su publicación en BMC Veterinary Research. [González-Sánchez et al., 2018.](#)

Capítulo 7

Discusión global y Conclusiones

1. Producción ovina y hemoncosis

La producción mundial de ganado ovino se ha visto incrementada de manera sustancial en los últimos 20 años. Este incremento no ha sido generalizado y se aprecian diferencias regionales importantes. Así, en el periodo entre 1992 y 2012, mientras la producción ovina en Europa y Oceanía (Australia, Nueva Zelanda) ha sufrido un retroceso en el número de animales sacrificados (>47 millones (M) y 22 M, respectivamente), la producción se ha incrementado en más de 90 M de cabezas en Asia y más de 50 M en África debido principalmente a un aumento en el consumo de carne y leche (<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>). Este desplazamiento de los núcleos de mayor producción ovina supone que *ca.* 75% de todo el ganado ovino mundial se explota en Asia (*ca.* 45%) y África (>28%). El incremento relativo de la producción ovina en dichas áreas y su reducción en regiones más desarrolladas responde a distintos factores de desigual importancia entre los que podrían señalarse el incremento de la demanda de carne y leche en áreas en desarrollo, cambios socioeconómicos en Europa, Australia y América –con mayor demanda de proteínas de origen animal de otras especies–, tabúes culturales y religiosos en regiones asiáticas y africanas (ej. prohibición del consumo de cerdo y bovinos por algunas religiones), y urbanización progresiva de países occidentales, entre otros.

El cambio de los focos de producción tiene un impacto en las enfermedades parasitarias, y entre ellas las ligadas a la explotación de espacios abiertos tales como la hemoncosis, aún no suficientemente valorado. No obstante, se puede anticipar que el desarrollo de nuevos antihelmínticos para este ganado por parte de la industria farmacéutica (ubicada en Europa y EE.UU.) probablemente pierda relevancia dados los menores consumos esperados en los mercados tradicionales. Ello, unido a los fenómenos de resistencia antihelmíntica descritos y generalizados en el caso de *Haemonchus contortus* (Waller, 1997) incluso a los antihelmínticos más recientes (ej. monepantel) (Kotze y Prichard, 2016; Lamb et al., 2017) crea condiciones desfavorables para el control quimioterápico de esta parasitosis. Incidentalmente, la pérdida de relevancia productiva del sector en países occidentales podría explicar la ausencia de inversiones para la I+D de sistemas de control de parasitosis del ganado ovino (y caprino). No obstante, este escenario favorece la exploración y eventual producción de sistemas alternativos de control, entre ellos la inmunoprofilaxis. Por otra parte, la

polarización de la producción ovina hacia Asia y África y las regiones en la que la hemoncosis es más prevalente (Meradi et al., 2011; Fitzpatrick, 2013) permiten anticipar que no existirá una reducción de la parasitosis considerada más relevante para este ganado por su importancia patológica y económica (Nisbet et al., 2016).

Como estrategia alternativa de control de la extensión y gravedad de la hemoncosis ovina nos hemos centrado en la inmunoprofilaxis teniendo en cuenta el desarrollo de protección parcial del ganado tras sucesivas infestaciones y reinfestaciones (Adams y Beh, 1981; McRae et al., 2015) así como los resultados obtenidos en distintos ensayos (Bassetto y Amarante, 2015). La eficacia de las vacunaciones depende, además de la capacidad del/de los antígeno/s para inducir una respuesta protectora en los hospedadores, del adyuvante adecuado y las pautas de vacunación. Por otra parte, los estudios de inmunoprofilaxis de la hemoncosis tienen una limitación adicional dada la especificidad de *H. contortus*. Por ello, en nuestro trabajo hemos explorado 1) la posibilidad de emplear modelos parásito-hospedador subrogados para determinar su posible traslación al modelo natural (ganado ovino-*H. contortus*); 2) valor relativo de adyuvantes e inmunomoduladores en la inmunoprotección; y 3) optimización de la inmunización de ganado ovino frente a la hemoncosis con un antígeno recombinante (rHc23) incluyendo la dosis de antígeno y el régimen de infestación en el reto.

2. Valor del modelo *Heligmosomoides polygyrus*-ratón en el estudio de las relaciones helminto gastrointestinal-ganado ovino. Papel protector del inmunomodulador (Lipopolisacárido de *Escherichia coli* + *Propionibacterium acnes*)

Hasta este momento no se ha logrado completar el ciclo biológico de *H. contortus* en ningún hospedador convencional de laboratorio y solo se ha llegado a desarrollar la L4 en jerbos (*Meriones unguiculatus*) tratados con inmunosupresores (Conder et al., 1992; Yang et al., 2017). Aunque dicho modelo puede ser útil en algunos casos (ej. quimioterapia), su valor para el estudio de la respuesta inmunitaria estaría comprometido. Por dicho motivo hemos optado por utilizar un modelo subrogado, *Heligmosomoides polygyrus*-ratón, por la similitud de los ciclos, proximidad taxonómica con *H. contortus*, desarrollo de infestaciones crónicas tras la

primoinfestación y capacidad de inducción de una respuesta protectora tras las reinfestaciones, además de por tratarse de un parásito natural del hospedador y la abundante información existente (Gause et al., 2003; McSorley et al., 2013).

La respuesta inmunitaria en ratones frente a las infestaciones por *H.polygyrus* es compleja e involucra una respuesta predominante Th2 acompañada de una activación de células Treg y una inhibición de citoquinas Th1 (Setiawan et al., 2007; Maizels et al., 2012). En el primer experimento realizado en nuestro trabajo pretendimos determinar el papel de un inmunomodulador, lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) + *Propionibacterium acnes* inactivado, sobre el curso de la infestación por *H.polygyrus*, así como la relación entre los parámetros parasitológicos determinados [eliminación fecal de huevos (hpg), población de helmintos], la respuesta inmunitaria de los animales infestados [anticuerpos (Ac), linfoproliferación] y las lesiones observadas en la mucosa intestinal.

La eliminación fecal de huevos (hpg) es considerada una de las determinaciones más adecuadas para la estimación *in vivo* del grado de infestación de los animales y de su resistencia a las tricostrongilidosis. Hemos observado que el patrón de hpg fue dependiente del inmunomodulador, que fue capaz de reducir la eliminación de huevos. Aunque, aparentemente, los niveles de IgG₁ específicos desempeñan un papel esencial en la protección (Pritchard et al., 1984; Williams y Behnke, 1993) no pudimos demostrar dicha relación, lo que sugiere que en las infestaciones por este nematodo el papel de los Ac detectables en la protección es probablemente escaso (Wahid y Behnke, 1993; Harris y Gause, 2011). Los resultados obtenidos en el ELISA fueron confirmados en las inmunodetecciones (WB) con un reducido número de antígenos del helminto, reconocidos tras la primera exposición al parásito (Ben-Smith et al., 1999).

Las infestaciones por *H.polygyrus* inducen inmunosupresión de los animales (Reynolds et al., 2012), evidenciada por la menor capacidad linfoproliferativa de los hospedadores en presencia de un agente mitogénico general (ConA). De forma similar a lo observado en la respuesta de Ac, el inmunomodulador evitó de manera parcial la inmunosupresión, con un menor número de helmintos adultos en el momento del sacrificio inicial (7 días pi). Ello podría ser debido al retraso en el desarrollo larvario en la mucosa, aunque las alteraciones de la mucosa intestinal (hiperplasia de criptas,

acortamiento de vellosidades, respuesta inflamatoria) (Doligalska et al., 2006) no fueron completamente consistentes.

El impacto del inmunomodulador empleado sobre el sistema inmunitario no es completamente conocido e implica una variedad de propiedades *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Ananias et al., 2007; Tchaptchet et al., 2012). En nuestro caso no hemos estudiado los posibles mecanismos pero nuestros resultados han mostrado que el inmunomodulador (LPS *E.coli* + *P.acnes*) reduce la eliminación de hpg y, aparentemente, provoca un retraso del desarrollo del helminto en el hospedador. Los resultados son preliminares y existen diferencias sustanciales entre el modelo parásito-hospedador subrogado empleado y las infestaciones por *H.contortus* en ganado ovino. Sin embargo, si los sistemas de regulación de las infestaciones por *H.polygyrus* son similares a los presentes en la hemoncosis, y los mecanismos efectores inducidos por el inmunomodulador son comparables en ambos hospedadores (ratón, oveja), el posible papel protector del inmunomodulador debería ser investigado en el ganado ovino.

3. Las coinfecciones (Protista - helminto) agravan el curso de las infestaciones por *H.polygyrus*

No suelen existir en los hospedadores infecciones/infestaciones mono-específicas. Por el contrario, en condiciones naturales, las parasitosis suelen ser pluriespecíficas y la presencia simultánea de más de un agente parasitario determina el curso de la enfermedad, el diagnóstico, así como las posibles medidas de control (Vaumorin et al., 2015). Se han llevado a cabo experimentos con infecciones/infestaciones intercurrentes, aunque la comparación directa de los resultados es difícil y el resultado final depende de las especies implicadas y los diseños experimentales. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la inmunomodulación de las infestaciones por *H.polygyrus* en ratón y la receptividad de la misma estirpe murina (BALB/c) a *L.infantum*, se investigó el impacto de la infección por el protista sobre la infestación por el helminto.

Nuestros resultados mostraron que la coinfección con *L.infantum* y *H.polygyrus* redujo la capacidad de respuesta protectora de los hospedadores frente al helminto con cargas parasitarias (nematodo) más elevadas en los animales coinfectados.

Este hallazgo es consistente con la supresión parcial de la respuesta Th2 en infestaciones por *H.polygyrus* (Maizels et al., 2012) y también ha sido descrito en otras coinfecciones con esta especie de helminto (Coomes et al., 2015; Ahmed et al., 2017), independientemente del diseño experimental. Por su parte, se halló un notable aumento en la eliminación fecal de huevos en ratones coinfectados desde el día 15 al 21 postinfestación (pi), sin diferencias en el número de helmintos, respecto a los animales sometidos a una única infestación por *H.polygyrus* (14 días pi). Ello sugiere que la coinfección indujo un incremento aparente en la fertilidad de las hembras del helminto, incremento no observado en coinfecciones *H.polygyrus/Trypanosoma congolense* donde no se encontraron diferencias en la fertilidad de las hembras (Fakae et al., 1994, 1997).

La situación dista de ser clara ya que recientemente, la infección previa con *Toxoplasma gondii* tiene como consecuencia una mayor fecundidad de las hembras de *H.polygyrus* (Ahmed et al., 2017), de forma similar a nuestros resultados. Parece por ello que el calendario de infecciones/infestaciones, orden de administración y las especies de protistas son aparentemente menos relevantes y, en ambos casos, la respuesta inmunitaria se polariza hacia Th1, lo que resulta en una mayor fecundidad y longevidad de los helmintos. El mecanismo real de esta interferencia es poco conocido y merece atención ya que es de relevancia en el marco de los hospedadores infectados de forma natural, donde el poliparasitismo es la regla (Griffiths et al., 2014).

La ausencia de efecto de las infecciones monoespecíficas por *L.infantum* sobre el bazo está probablemente relacionada con el ciclo biológico del parásito en este hospedador y el escaso tiempo transcurrido desde la infección (<4 semanas) (Bankoti y Stäger, 2012). Por ello, el incremento en el peso del bazo en los ratones coinfectados parece ser debido a la infestación por el nematodo. Así, y al igual que en el experimento anterior (ver Capítulo 2), en las primeras etapas de la infestación por *H.polygyruys* se observó una disminución de la capacidad linfoproliferativa (bazo, linfonódulos) tanto específica (frente a extracto soluble del helminto) como inespecífica (frente a ConA), mientras que la inmunosupresión en las infecciones por *L.infantum* fue posterior. Por ello, la reducción de la capacidad linfoproliferativa inicial (2 semanas pi) observada en los animales coinfectados debe relacionarse con la interferencia de la respuesta murina por la infección con *L.infantum* (Finney et al., 2007; Reynolds et al., 2012).

Las leishmaniosis viscerales inducen una respuesta mixta Th1/Th2 (Honoré et al., 1998; Rolão et al., 2007; Loeuillet et al., 2016) aunque solo la respuesta Th1 parece desempeñar un papel relevante en la protección. *H.polygyrus*, por su parte, bloquea la inmunidad protectora Th2 frente al helminto (Maizels et al., 2012). Sin embargo, no se halló ninguna correlación entre los niveles de IgG₁ y la protección (ej. reducida carga parasitaria o hpg), lo que sugiere un escaso valor de los Ac detectables en la protección (Hewitson et al., 2011).

Considerando de forma conjunta nuestros resultados, además de confirmar la inmunosupresión inducida por *H.polygyrus*, ambos experimentos mostraron que en presencia de una coinfección (*L.infantum*) existió una cierta polarización no completa hacia una respuesta anti-nematodo de tipo Th1. Por otra parte, los elevados niveles de IgG₁ anti-*Heligmosomoides*, sin ningún impacto en los parámetros parasitológicos estimados (hpg, carga parasitaria, fertilidad aparente), apoya el escaso papel de los Ac en la protección frente al helminto.

No existen modelos subrogados ideales, por lo que no es posible trasladar directamente los resultados obtenidos en el modelo murino empleado a las infestaciones por otros tricostrongídeos, en particular *H.contortus*, en ganado ovino. A pesar de las diferencias fisiológicas, incluyendo el sistema inmunitario, de los hospedadores y las diferencias del ciclo biológico de los agentes (*H.contortus*-abomaso; *H.polygyrus*-intestino delgado), es plausible que las coinfecciones/coinfestaciones en el ganado ovino tengan una notable repercusión sobre la respuesta inmunitaria frente a los nematodos gastrointestinales. Este es un aspecto de notable importancia dado el poliparasitismo natural de este ganado. Además, la recuperación parcial de la inmunidad protectora observada en los animales tratados con el inmunoestimulador bacteriano (Capítulo 2) sugiere su posible utilidad frente a las nematodosis gastrointestinales.

4. La proteína recombinante rHc23. Caracterización

Las ventajas de los sistemas inmunoprolácticos para el control de una parasitosis y, en nuestro caso, la hemoncosis ovina son claras. Estas incluyen la ausencia de residuos con actividad farmacológica en el medio, la potencial “sostenibilidad” de los sistemas de producción ganadera, la reducción/desaparición de

los cuadros más graves y, en el caso de las vacunas recombinantes, la homogeneidad de los preparados inmunoproliféricos. Sin embargo, a pesar de las evidencias obtenidas en infestaciones y reinfestaciones naturales y experimentales por *H. contortus*, solo se han logrado niveles de protección aceptables cuando se han utilizado en los ensayos formas nativas de algunos de los antígenos del helminto. Por el contrario, las vacunaciones con los homólogos recombinantes han producido resultados inconsistentes o insatisfactorios (Munn et al., 1993; Smith et al., 1994; Cachat et al., 2010; Roberts et al., 2013).

Por dicha razón, y basándonos en los resultados obtenidos en infestaciones/reinfestaciones (Cuquerella et al., 1994), se intentó el aislamiento y purificación de una proteína de masa molecular *ca.* 23-26 KDa (p26/23), así como la producción de una forma recombinante de ella para su utilización en ensayos vacunales. La variante recombinante obtenida, rHcp26/23, no fue capaz de inducir ninguna respuesta protectora frente al reto con 16.000 L3 de *H. contortus* administrada a corderos (300µg) con adyuvante completo de Freund (García-Coiradas et al., 2010).

Teniendo en cuenta que la proteína Hc23 ha sido capaz, en su forma nativa, de proteger a los corderos de menos de seis meses de edad (67-86%) (Fawzi et al., 2014), la falta de protección observada debía relacionarse con el producto recombinante. Un análisis más minucioso de la secuencia determinada originalmente mostró que la proteína recombinante era defectiva. Trabajos posteriores permitieron obtener una forma recombinante, rHc23, que ha demostrado su eficacia, siendo la primera vacuna recombinante eficaz frente a la hemoncosis (Fawzi et al., 2015; Matthews et al., 2016). A pesar de dicho éxito, la información disponible sobre la proteína es escasa por lo que se exploró su caracterización mediante secuenciación (espectrometría de masas) tras separación electroforética.

Se observó una diferencia sustancial en la masa aproximada estimada mediante SDS-PAGE, ya que la proteína nativa mostró un peso molecular (PM) de *ca.* 21,61 KDa mientras que en la recombinante obtenida el PM fue de *ca.* 24,15 KDa. Las secuencias peptídicas de la proteína fueron coincidentes con la secuencia deducida de la proteína hipotética (ORF) HCC00515 (García-Coiradas et al., 2009). Aparentemente, esta proteína presenta una variedad de isoformas observables en 2D-electroforesis, aunque sus secuencias (tripsina, endo V8) eran homólogas y dichas isoformas fueron

reconocidas por sueros de corderos inmunizados, lo que confirmaba su identidad. Dicha proteína puede existir en forma dimérica o bien formar dímeros espontáneamente, ya que siempre estuvo presente una proteína de *ca.* 46 KDa, con similares secuencias y reconocimiento en las inmunodetecciones con sueros de ovinos inmunizados.

Las secuencias obtenidas a partir de la recombinante, por secuenciación múltiple y determinación de huella peptídica de rHc23 en solución, tras SDS-PAGE y 2D-electroforesis, mostraron la homología de ambas proteínas, además de ser reconocida rHc23 por los sueros de los corderos inmunizados con la proteína nativa. Era claro, por tanto, que el sistema de clonación y expresión había sido adecuado. La secuencia de ambas formas mostraba a su vez homología con la secuencia deducida de HCC00515. Existían, sin embargo, algunos aspectos que deben ser destacados.

De una parte, ni en la secuencia obtenida mediante el método de Edman de los 20 aminoácidos (aa) del extremo N-amino (García-Coiradas et al., 2009) ni en las secuencias múltiples obtenidas, el primer aa correspondía a metionina (M). De otra parte, la proteína nativa purificada mostró una masa aparente de 21,61 KDa mientras que en la recombinante dicha masa fue de 24,15 KDa. Esta diferencia no era debida a la cola de 6 histidinas presentes en la recombinante, solo responsables de *ca.* 0,9 KDa. Las diferentes masas corresponden al fragmento inicial, presente en rHc23, de 16 aa y que sí aparece codificado en la secuencia de HCC00515. El hecho de no observarse este fragmento inicial en la proteína nativa purificada (García-Coiradas et al., 2010) sugiere la existencia en Hc23 de una fracción “transmembrana” que no aparecería en el extracto soluble de adultos al quedar atrapada en la fracción particulada del homogeneizado. Su significación es desconocida, pero la falta de protección inducida por la proteína recombinante defectiva observada por García-Coiradas et al., (2009) y la protección lograda con rHc23 completa (Fawzi et al., 2015) sugieren que tal fragmento podría desempeñar algún papel en la protección.

No conocemos la función de esta proteína en *H. contortus* y la mayor parte de la información en el helminto está relacionada con secuencias deducidas a partir de ORFs y no de la secuenciación de aminoácidos. Por otra parte, el estudio cristalográfico a fin de deducir su estructura tridimensional no fue posible por el pequeño tamaño de los cristales obtenidos así como su inestabilidad. Por ello, en el momento presente, a

pesar de conocer la estructura primaria de Hc23 (y rHc23) (205 aa), así como su homología con la fracción p23/26 (Domínguez-Toraño et al., 2000) y rHcp26/23 (García-Coiradas et al., 2009), su papel en la fisiología de *H. contortus* es aún desconocida. Por otra parte, la falta de “moldes” (“*templates*”) a partir de proteínas purificadas con elevada homología no permite conocer su estructura. Es posible, sin embargo, que los estudios bioinformáticos sean de utilidad.

5. La protección inducida por rHc23 frente a la hemoncosis es dependiente del adyuvante empleado

El uso de un antígeno recombinante para el control de la hemoncosis tiene importantes ventajas (ej. producción estandarizada, enfoque ético, fácil almacenamiento). Ya que se trata de un antígeno expuesto, se considera que una protección superior al 60% sería adecuada (Barnes et al., 1995). El antígeno recombinante de *H. contortus* rHc23, producido en nuestras instalaciones, es capaz de alcanzar de un 80% de protección (hpg, carga de helmintos) frente a la infestación en corderos usando hidróxido de aluminio como adyuvante y un programa de inmunización estándar con tres dosis de antígeno (100µg/dosis) (Fawzi et al., 2015). Es conocido, además, que la eficacia de las vacunas depende de la elección adecuada del adyuvante para inducir una respuesta inmunitaria eficaz (Stills, 2005) teniendo en cuenta la activación selectiva de los mecanismos efectores (Th1/Th2). Asimismo, la dosis de antígeno administrada es importante por razones económicas, y se han observado variaciones de la respuesta en dependencia de la dosis empleada en otros sistemas parásito-hospedador (Estcourt et al., 2005; Atmar et al., 2007; Quan et al., 2009; Rojo-Montejo et al., 2011). Entendimos, por ello, que era necesario explorar el efecto tanto de la dosis antigénica como del posible valor de otros adyuvantes habituales.

En nuestro trabajo ambos adyuvantes empleados (aluminio, QuilA) indujeron la producción de altos niveles de Ac circulantes (IgG anti-rHc23). Tanto la rápida disminución de IgG con aluminio como la elevación más notable y prolongada cuando se empleó QuilA podrían relacionarse con la doble activación (Th1/Th2) del sistema inmunitario por la saponina (Spickler y Roth, 2003; Nicholls et al., 2010). Por otra

parte, la reactividad tanto en ELISA como en WB con el extracto soluble de adultos (ESA) y el recombinante apoyan la similitud antigénica de la forma nativa y rHc23. En el momento del reto, los corderos sometidos a la primoexposición no mostraron ninguna respuesta específica frente a *Haemonchus*. Esta observación es frecuente en las infestaciones experimentales con el helminto (Cuquerella et al., 1994; Gómez-Muñoz et al., 1999, 2001; Fawzi et al., 2014).

El reto no provocó alteraciones significativas ni en el número de eosinófilos ni en el valor hematocrito (PCV), probablemente por el buen estado fisiológico de los animales y la dosis infestante, relativamente moderada. Sin embargo, existieron importantes diferencias entre los grupos de animales en los parámetros parasitológicos considerados como criterio de protección: hpg (Bakker et al., 2004) y número de helmintos en abomaso (Gauly et al., 2002; Amarante et al., 2005). La reducción observada en la eliminación fecal de huevos a partir de la 4ª semana pi en los corderos vacunados con rHc23 fue debida a la inmunización, ya que los grupos testigo que solo recibieron el adyuvante no fueron significativamente diferentes de los testigos absolutos. Los animales vacunados con rHc23 + aluminio redujeron >80% los valores de hpg. Esta reducción fue comparable a la obtenida con el antígeno nativo (Fawzi et al., 2014) y con el recombinante en Assaf (Fawzi et al., 2015) y ligeramente inferior a la obtenida en ovejas de raza Baladi (Kandil et al., 2017). Estos niveles de protección son relevantes y confirman no solo el potencial valor de rHc23 sino también su posible utilización en diferentes razas ovinas. La reducción hallada en los animales que habían recibido QuilA, sin antígeno, ha sido descrita previamente y puede estar relacionada con la inducción de una protección inespecífica por el adyuvante (Spickler y Roth, 2003).

La población de helmintos en abomaso, junto con su tamaño y fertilidad de las hembras, es probablemente el mejor parámetro estimativo del valor inmunoprotector de rHc23 ya que determina tanto los signos clínicos de la infestación como la contaminación ambiental con huevos de *H. contortus*. Todos los grupos vacunados con el recombinante redujeron de forma significativa la carga parasitaria en el momento del sacrificio ($47,3 \pm 35,4\%$ a $71 \pm 14,3\%$), de forma especial con la dosis antigénica más elevada (200µg/dosis) y con hidróxido de aluminio. De forma comparable a lo observado en la eliminación fecal de huevos, no existieron diferencias significativas entre los corderos vacunados con la saponina + rHc23 y el grupo que recibió solo el

adyuvante. Este hallazgo sugiere que, en nuestras condiciones, QuilA se comportó como un inmunomodulador y casi el 50% de la protección inducida en los animales vacunados con este adyuvante (G4) se debió aparentemente a la protección inespecífica provocada por la saponina. Nuestros resultados confirmaron el valor de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante en la inmunización con rHc23 frente a la hemoncosis ovina ya que el aluminio no mostró ningún efecto cuando fue administrado en ausencia de antígeno.

Tanto en el caso de los valores de hpg como de la carga parasitaria gástrica se observó una tendencia hacia una mayor protección con la dosis elevada de antígeno, pero las diferencias no fueron significativas. Ello podría estar relacionado con la presencia de corderos “respondedores” (“*responders*”) y “no respondedores” (“*non responders*”) dentro de un mismo grupo de animales, así como el tamaño reducido de estos. Solo el empleo de grupos con un mayor número de animales puede determinar si en el intervalo considerado (50 a 200 μg rHc23/dosis) existen diferencias.

Se considera que la resistencia inmunitaria de ganado ovino está asociada a una respuesta predominante Th2 (Lacroux et al., 2006; Miller y Horohov, 2006; McRae et al., 2015). En nuestras condiciones, tanto la respuesta celular como la humoral están involucradas en la protección con rHc23 ya que los niveles de Ac inducidos por QuilA no se correlacionaron con una mayor protección de los corderos, al igual que se ha señalado en ensayos vacunales con un antígeno de superficie del helminto (Jacobs et al., 1999; Piedrafita et al., 2013).

Los niveles de protección alcanzados con otros antígenos recombinantes frente a la hemoncosis han sido muy discretos o incluso ausentes y, actualmente –siguiendo un modelo conceptual similar al utilizado en el desarrollo de Bm86 frente a ixódidos bovinos (Willadsen et al., 1995)– el único antígeno comercializado (Barbervax[®]) es un antígeno nativo. Esta vacunación tiene algunas limitaciones [número de inmunizaciones necesarias (5-6/animal), reducida protección, potencial riesgo de heterogeneidad de lotes] (Emery et al., 2016; Meier et al., 2016; Magalhães et al., 2017) además de las consideraciones éticas al requerir la infestación de corderos para la obtención de antígenos.

En este escenario la vacunación con rHc23 ha logrado inducir con un protocolo de inmunización convencional niveles significativos de protección frente a la

hemoncosis ovina en los principales parámetros (carga de helmintos en abomaso, hpg) (70% - más del 80%). Obviamente, existe un amplio margen de mejora (ej. calendario de vacunación, mejora de la producción del antígeno recombinante), pero los resultados combinados de nuestro experimento y los obtenidos previamente (Fawzi et al., 2015; Kandil et al., 2017) confirman el papel relevante de rHc23 como candidato a una vacuna de subunidades frente a *H. contortus* (Matthews et al., 2016). Incidentalmente, el empleo de distintas razas ovinas (Manchega, Assaf) en los ensayos constituye una evidencia del valor interracial de la vacunación.

6. La inmunización con rHc23 induce una protección parcial en corderos sometidos a infestaciones seriadas con *H. contortus*

Los ensayos de inmunización llevados a cabo con rHc23 mostraron su capacidad para inducir una protección parcial significativa frente al reto con *H. contortus* en administración única (Fawzi et al., 2015; resultados del presente trabajo). Este diseño experimental, habitual en todos los ensayos de vacunación, sin embargo no reproduce las infestaciones por el helminto en condiciones de pastoreo. En este caso, el acceso de L3 del helminto al hospedador se produce mediante sucesivas infestaciones. Por ello, y con objeto de evaluar el potencial inmunoproliférico de rHc23 en condiciones más próximas a las naturales, se efectuaron inmunizaciones de corderos que fueron posteriormente expuestos a infestaciones seriadas (“*trickle infections*”) consistentes en la administración de 6 dosis de larvas infestantes (3/semana) y con dos niveles de infestación (1.000 y 2.000 L3/dosis).

Por otra parte, en infestaciones únicas se había observado que rHc23 inducía protección en corderos tanto con hidróxido de aluminio como con QuilA como adyuvante (*vide supra*). Además, el inmunomodulador LPS de *E. coli* + *Propionibacterium acnes* (inmunomodulador bacteriano, IB) provocaba en el modelo *H. polygyrus*–ratón una protección reflejada en la disminución de alteraciones en la mucosa intestinal de los animales tratados, alargamiento del desarrollo larvario en la mucosa y menor contaminación ambiental con huevos del nematodo. Probablemente esta protección podría estar relacionada con la modificación de la inmunosupresión inicial inducida por la infestación por el helminto. Con estas consideraciones se utilizó

como inmunógeno rHc23 + IB en corderos y su exposición posterior a infestaciones seriadas con *H. contortus*.

En nuestras condiciones no se observaron signos clínicos notables ni reducción de PCV, probablemente como consecuencia de las dosis moderadas de L3 de *H. contortus* administradas (6.000 y 12.000 L3). Además, no se apreció la disminución de la tasa de implantación descrita, al menos considerando la carga parasitaria de adultos al final del experimento. De hecho la tasa de implantación fue más elevada (>15%) que la obtenida con este mismo aislado del parásito en otros ensayos de vacunación (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018) lo que podría estar relacionado con la dosis, el calendario de administraciones de L3, la raza ovina (tronco Entrefino) y el momento del sacrificio.

Se observaron variaciones dentro de cada grupo, particularmente con la dosis infestante baja, con algunos valores atípicos (“*outliers*”), posiblemente relacionados con la variabilidad genética de los corderos (Hooda et al., 1999), circunstancia habitual en ensayos con *H. contortus* y que obstaculiza la obtención de resultados significativos (LeJambre et al., 2008; Piedrafita et al., 2012). No obstante, la inmunización con rHc23 provocó una protección parcial frente a infestaciones seriadas (3 dosis/semana, 2 semanas), con 1.000 L3 o 2.000 L3, con una reducción media de los recuentos acumulados de huevos de *ca.* 43% y una reducción significativa ($P < 0,05$) (45-60%) en la carga de helmintos en abomaso, con mayor protección en los animales que recibieron la dosis infestante elevada. Este nivel de protección fue inferior al logrado con retos en dosis única con este mismo recombinante y diferentes adyuvantes (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018) o con la proteína nativa (Hc23) (Fawzi et al., 2014). La protección fue específica ya que no se observó ninguna protección inespecífica (hpg, carga parasitaria en abomaso) provocada por el IB, tal como ha sido descrito en animales de mayor edad (Abel et al., 2009).

Los inmunomoduladores, incluida la combinación de ambos componentes (IB), son utilizados cada vez con mayor frecuencia en medicina veterinaria. LPS es un adyuvante que induce, a través del receptor Toll-like 4 (TLR4), una respuesta Th1 en el tejido linfóide y Th17 en el intestino (McAleer y Vella, 2010). Por su parte, *P. acnes* actúa modulando las células de la médula ósea (Squaiella et al., 2006). La falta de relación entre los niveles de Ac y la protección frente a la hemoncosis apoya los

resultados obtenidos previamente (*vide supra*) y sugiere que en la protección inducida por rHc23 coexisten mecanismos celulares y humorales.

Considerando globalmente nuestros resultados, se ha logrado una protección parcial frente a la hemoncosis con rHc23. Si bien es cierto que varios antígenos nativos (Bakker et al., 2004; Cachat et al., 2010; Fawzi et al., 2014) son capaces de inducir niveles significativos de protección y se ha iniciado la vacunación con las glicoproteínas de intestino de helmintos adultos (www.agric.wa.gov.au/print/node/1878) (H11 y Hgal-GP), esta protección es insuficiente en periparto (Bassetto et al., 2014), requiere 5-6 revacunaciones con un intervalo de 6 semanas para obtener niveles significativos de protección y, además, utiliza corderos infestados y sacrificados para la obtención del antígeno.

En ausencia de un sistema de cultivo para adultos de *Haemonchus*, un antígeno recombinante sería una ventaja tanto desde un punto de vista ético como tecnológico. Los resultados de protección obtenidos con otros recombinantes han tenido un valor modesto, mientras que rHc23 ha sido capaz de proteger parcialmente a corderos sometidos al reto tanto en dosis única como en infestaciones seriadas (Fawzi et al., 2015; González-Sánchez et al., 2018), con distintos adyuvantes y en diferentes razas ovinas. Es necesario desarrollar los protocolos de inmunización, pero los resultados apuntan a rHc23 como un candidato potencial para el desarrollo de una vacuna recombinante frente a la hemoncosis ovina (Matthews et al., 2016).

7. Referencias

- Abel LC, Chen S, Ricca LG, Martins MF, Garcia M, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Shaw RJ, Longo-Maugéri IM (2009). Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunol.* 31:604-612.
- Adams DB, Beh KJ (1981). Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 11 (5), 381–386.
- Ahmed N, French T, Rausch S, Köhl A, Hemminger K, Dunay IR, Steinfeld S, Hartmann S (2017). *Toxoplasma* co-infection prevents Th2 differentiation and leads to a helminth-specific Th2 response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 341.
- Amarante AF, Bricarello PA, Huntley JF, Mazzolin LP, Gomes JC (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.
- Ananias RZ, Rodrigues EG, Braga EG, Squaiella CC, Mussalem JS, Longhini ALF, Travassos LR, Longo-Maugéri IM (2007). Modulatory effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on peritoneal exudate cells from C57Bl/6 mice: major NKT cell recruitment and increased cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.* 65, 538–548.
- Atmar RL, Keitel WA, Cate TR, Munoz FM, Ruben F, Couch RB (2007). A dose response evaluation of inactivated influenza vaccine given intranasally and intramuscularly to healthy young adults. *Vaccine* 25, 5367–5373.
- Bakker N, Vervelde L, Kanobana K, Knox DP, Cornelissen AW, de Vries E, Yatsuda AP (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22, 618–628.
- Bankoti R, Stäger S (2012). Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *Leishmania donovani*. *J. Trop. Med.*; article ID 639304.
- Barnes EH, Dobson RJ, Barger IA (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11, 56-63.
- Bassetto CC, Amarante AF (2015). Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *J. Helminthol.* 89, 517–525.

Bassetto CC, Picharillo MÉ, Newlands GFJ, Smith WD, Fernandes S, Siqueira ER, Amarante AFT (2014). Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *Int. J. Parasitol.* 44:1049-1054.

Ben-Smith A, Wahid FN, Lammas DA, Behnke JM (1999). The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG₁ and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunol.* 21, 383–395.

Cachat E, Newlands GF, Ekoja SE, Mcallister H, Smith WD (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite Immunol.* 32, 414–419.

Conder GA, Johnson SS, Hall AD, Fleming MW, Mills MD, Guimond PM (1992). Growth and development of *Haemonchus contortus* in jirds, *Meriones unguiculatus*. *J. Parasitol.* 78, 492–497.

Coomes SM, Pelly VS, Kannan Y, Okoye IS, Czieso S, Entwistle LJ, Perez-Lloret J, Nikolov N, Potocnik AJ, Biró I, Langhorne J, Wilson MS (2015). INF γ and IL-12 restrict Th2 responses during Helminth/Plasmodium co-infection and promote IFN γ from Th2 cells. *PLoS Pathog.* 11: e0004994.

Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM (1994). Partial protection of Manchego sheep against *Haemonchus contortus* after 6-month postpriming period. Preliminary note. *J. Vet. Med. B.* 41 (1-10), 399–406.

Doligalska M, Rzepecka J, Drela N, Donskow K, Gerwel-Wronka M (2006). The role of TGF- β in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.* 28, 387–395.

Domínguez-Toraño IA, Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Fernández-Pérez FJ, Alunda JM (2000). Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunol.* 22, 131–138.

Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* 46, 755-769.

Estcourt MJ, Létourneau S, McMichael AJ, Hanke T (2005). Vaccine route, dose and type of delivery vector determine patterns of primary CD8⁺ T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 35, 2532–2540.

Fakae BB, Harrison LJ, Ross CA, Sewell MM (1994). *Heligmosomoides polygyrus* and *Trypanosoma congolense* infection in mice: a laboratory model for concurrent gastrointestinal nematode and trypanosome infections. *Parasitology* 108: 61-68.

Fakae BB, Harrison LJ, Ross CA, Sewell MM (1997). Expression of acquired immunity to *Heligmosomoides polygyrus* in mice concurrently infected with *Trypanosoma congolense*. *Int. J. Parasitol.* 27: 1107-1114.

Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Cuquerella M, Alunda JM (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *Int. J. Parasitol.* 44, 429-426.

Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M (2015). Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* 211, 54-59.

Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM (2007). Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 1874-1886.

Fitzpatrick JL (2013). Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. *Vet. Parasitol.* 195, 233-248.

García-Coiradas L, Angulo-Cubillán F, Méndez S, Larraga V, de la Fuente C, Cuquerella M, Alunda JM (2009). Isolation and immunolocalization of a putative protective antigen (p26/23) from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 104, 63-369.

García-Coiradas L, Angulo-Cubillán F, Valladares B, Martínez E, de la Fuente C, Alunda JM, Cuquerella M (2010). Immunization against lamb haemonchosis with a recombinant somatic antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Vet. Med Int.* 852146.

Gauly M, Kraus M, Vervelde L, Van Leeuwen MA, Erhardt G (2002). Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 106 (1), 55-67.

Gause WC, Urban JF Jr, Stadecker MJ (2003). The immune response to parasitic helminths: Insights from murine models. *Trends Immunol.* 24 (5), 269-277.

Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Gómez-Iglesias LA, Méndez S, Fernández-Pérez FJ, de la Fuente C, Alunda JM (1999). Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus*

contortus infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81, 281–293.

Gómez-Muñoz MT, Gómez-Iglesias LA, Fernández-Pérez FJ, Méndez S, Domínguez IA, de la Fuente C, Alunda JM, Cuquerella M (2001). Experimental *Haemonchus contortus* infection and challenge in the Churra sheep breed: immunological and pathophysiological parameters. *Rev. Ibér. Parasitol.* 61 (3-4), 83–89.

González-Sánchez ME, Cuquerella M, Alunda JM (2018). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS ONE* 13(3):e0193118.

Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL (2014). Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. *Proc. Biol. Sci.* 281: 20132286.

Harris N, Gause WC (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminthes. *Trends Immunol.* 32, 80–88.

Hewitson JP, Filbey KJ, Grainger JR, Dowle AA, Pearson M, Murray J, Harcus Y, Maizels RM (2011). *Heligmosomoides polygyrus* elicits a dominant nonprotective antibody response directed against restricted glycan and peptide epitopes. *J. Immunol.* 187: 4764- 4777.

Honoré S, Grain YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F (1998). Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21: 231-239.

Hooda V, Yadav CL, Chaudhri SS, Rajpurohit BS (1999). Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J. Helminthol.* 73:137-142.

Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashman K, Meeusen ENT (1999). Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-368.

Kandil OM, Abdelrahman KA, Shalaby HA, Hendawy SHM, Abu El Ezz NMT, Nassar SA, Miller JE (2017). Evaluation of crude larval protein and recombinant somatic protein 26/23 (rHcp26/23) immunization against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. World* 10, 758-763.

Kotze AC, Prichard RK (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. *Adv. Parasitol.* 93, 397–428.

- Lacroux C, Nguyen TH, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud J-P (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits and unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-622.
- Lamb J, Elliott T, Chambers M, Chick B (2017). Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet. Parasitol.* 241, 48–51.
- LeJambre LF, Windon RG, Smith WD (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoprotein in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet. Parasitol.* 153:302-312.
- Loeuillet C, Bañuls AL, Hide M (2016). Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit. Vectors* 9: 144.
- Magalhães de Matos AFI, Rosa Nobre CO, Monteiro JP, Leal Bevilaqua CM, Smith WD, Teixeira M (2017). Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. *Small Rum. Res.* 151, 1-4.
- Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 459–466.
- Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E (2016). Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol.* 38, 744–753.
- McAleer JP, Vella AT (2010). Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *Trends Immunol.* 31:429-435.
- McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol.* 37, 605–613.
- McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301–310.
- Meier L, Torgerson PR, Hertzberg H (2016). Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet. Parasitol.* 229, 15-21.
- Meradi S, Bentounsi B, Zouyed I, Cabaret J (2011). The steppe species of gastrointestinal nematodes of small ruminants, with a focus on *Marshallagia*: climate as a key determinant. *Parasite* 18, 261–269.
- Miller JE, Horohov DW (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84 (E-Suppl.), 124-132.

- Munn EA, Smith TS, Graham M, Greenwood CA, Tavernor AS, Coetzee G (1993). Vaccination of merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. *Parasitology* 106, 63–66.
- Nicholls EF, Madera L, Hancock REW (2010). Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1213, 46-61.
- Nisbet AJ, Meeusen EN, González JF, Piedrafita DM (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Adv. Parasitol.* 93, 353–396.
- Piedrafita D, Preston S, Kemp J, de Veer M, Sherrard J, Kraska T (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, e78357.
- Piedrafita DP, de Veer MJ, Sherrard J, Kraska T, Elhay M, Meeusen EN (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* 30:7199-7204.
- Pritchard DI, Behnke JM, Williams DJ (1984). Primary infection sera and IgG₁ do not block host-protective immunity to *Nematospiroides dubius*. *Immunology* 5, 73–81.
- Quan FS, Yoo DG, Song JM, Clements JD, Compans RW, Kang SM (2009). Kinetics of immune responses to influenza virus-like particles and dose-dependence of protection with a single vaccination. *J. Virol.* 83, 4489-4497.
- Reynolds LA, Filbey KJ, Maizels RM (2012). Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Semin. Immunopathol.* 34: 829-846.
- Roberts B, Antonopoulos A, Haslam SM, Dicker AJ, McNeilly TN, Johnston SL, Dell A, Knox DP, Britton C (2013). Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet. Res.* 44, 111.
- Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Antonio Rodríguez- Bertos A, Prenafeta A, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM (2011). Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Vet. Parasitol.* 175, 220-229.
- Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L (2007). *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 115: 270-276.

- Setiawan T, Metwali A, Blum AM, Nedim Ince M, Urban Jr JF, Elliott DE, Weinstock JV (2007). *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory T-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. *Infect. Immun.* 75, 4655–4663.
- Smith WD, Smith SK, Murray JM (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16 (5), 231–241.
- Spickler AR, Roth JA (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 273-281.
- Squaiella CC, Ananias RZ, Mussalem JS, Braga EG, Rodrigues EG, Travassos LR, Lopes JD, Longo-Maugéri IM (2006). *In vivo* and *in vitro* effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. *Immunobiol.* 211:105-116.
- Stills Jr HF (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 46, 280-293.
- Tchaptchet S, Gumenscheimer M, Kalis C, Freudenberg N, Hölscher C, Kirschning CJ, Lamers M, Galanos C, Freudenberg MA (2012). TLR9-dependent and independent pathways drive activation of the immune system by *Propionibacterium acnes*. *PLoS One* 7, e39155.
- Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M (2015). The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasit. Vectors* 8: 545.
- Wahid FN, Behnke JM (1993). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): parasite specific IgG₁ antibody responses and primary response phenotype. *Parasite Immunol.* 15, 401–413.
- Waller PJ (1997). Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 72 (3-4), 391–405.
- Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, 43-50.
- Williams DJ, Behnke JM (1983). Host protective antibodies and serum immunoglobulin isotypes in mice chronically infected or repeatedly immunized with the nematode parasite *Nematospiroides dubius*. *Immunology* 48, 37–47.
- Yang Y, Guo X, Zhang H, Huang Y, Chen X, Du A (2017). Characterization of the development of *Haemonchus contortus* ZJ strain from gerbils. *Parasit. Vectors* 10, 505.

8. Conclusiones

1. La administración de lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) + extracto de *Propionibacterium acnes* a ratones BALB/c infestados con *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda) es capaz de inducir una protección parcial frente al helminto con retraso en el desarrollo larvario en la mucosa, menor eliminación fecal de huevos (hpg) y reducción de la inmunosupresión temprana.
2. La sobreinfección con *Leishmania infantum* de ratones infectados con *H.polygyrus* agravó la helmintosis ya que los animales coinfectados mostraron superiores cargas de helmintos, incremento de su longevidad y de los recuentos de hpg. Ello apunta a la interferencia parcial de la coinfección en la respuesta protectora frente al helminto.
3. La caracterización de la proteína de *H.contortus* Hc23 y su homólogo recombinante, rHc23, mediante electroforesis 2D, espectrometría de masas y huella peptídica, confirmó la identidad de ambas, la presencia de isoformas, así como su posible dimerización.
4. La vacunación de corderos con rHc23 es capaz de inducir una respuesta protectora parcial de corderos frente al reto en dosis única con *H.contortus* con distintos adyuvantes, especialmente hidróxido de aluminio, con reducción de los parámetros parasitológicos más relevantes (hpg, carga parasitaria). La ausencia de protección en los animales tratados solo con el adyuvante confirma el carácter específico de la protección.
5. La vacunación de corderos con rHc23 + inmunomodulador bacteriano (LPS + *P.acnes*) protegió parcialmente, y de forma específica, a corderos enfrentados a infestaciones seriadas (6) tanto con dosis altas (2.000 L3/dosis) como bajas (1.000 L3/dosis).

6. El valor predictivo del modelo subrogado empleado (*H.polygyrus*-ratón) es probablemente escaso para determinar la respuesta inmunitaria en las infestaciones de corderos por *H.contortus*.
7. Nuestros resultados han confirmado el potencial de rHc23 como vacuna recombinante frente a la hemoncosis ovina ya que es capaz de inducir una respuesta protectora en distintas razas ovinas, diferentes regímenes de infestación y con diversos adyuvantes.

Resumen / Summary

Resumen

La hemoncosis ovina es una enfermedad parasitaria de distribución mundial causada por el nematodo gástrico *Haemonchus contortus*. La patogenia de esta parasitosis se relaciona con la hematofagia de adultos y preadultos del helminto. La enfermedad es responsable de importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción y calidad de carne, leche y lana en los animales adultos, así como la muerte de los corderos más afectados. Su control se ha basado esencialmente en el uso de antihelmínticos. No obstante, el aumento de las resistencias frente a estos fármacos, la falta de nuevos antiparasitarios y la creciente preocupación social en la agricultura sostenible, han provocado interés en el desarrollo de sistemas alternativos de control tales como la inmunoprofilaxis. Los estudios en el ganado ovino están limitados por su coste y el desconocimiento de muchos aspectos de su sistema inmunitario, por lo que el empleo de modelos subrogados de laboratorio sería relevante. Se ha logrado la vacunación de corderos frente a la hemoncosis con algunos antígenos purificados del helminto. Sin embargo, las formas recombinantes homólogas no han producido, en general, resultados comparables. La proteína recombinante rHc23, desarrollada a partir de un antígeno de adultos de *H. contortus*, ha sido una excepción ya que ha logrado niveles significativos de protección en corderos.

Teniendo en cuenta esta situación se ha estudiado, en modelo murino (BALB/c), la inmunomodulación inducida por un adyuvante bacteriano [Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) + *Propionibacterium acnes*] en infestaciones por *Heligmosomoides polygyrus* y su posible aplicación al sistema *H. contortus*-cordero. Asimismo, en este mismo modelo, se ha determinado el efecto de una infección intercurrente por *Leishmania infantum*. Se ha profundizado en la caracterización de Hc23 y la forma recombinante (rHc23) mediante purificación, secuenciación múltiple y estudio cristalográfico preliminar. Se ha valorado la capacidad inmunoprotectora de rHc23 con distintos adyuvantes (hidróxido de aluminio - QuilA) y dosis de antígeno (50µg/dosis - 200µg/dosis de rHc23) en infestaciones únicas por *H. contortus*. Finalmente, y con objeto de reproducir las infestaciones naturales, se ha determinado la capacidad protectora de la vacunación con rHc23 + inmunomodulador

bacteriano (IB) en infestaciones seriadas (3 veces/semana, 2 semanas) con dos niveles de infestación (1.000 L3 y 2.000 L3).

Se ha demostrado el papel protector de IB en el modelo *H.polygyrus*-ratón con menor eliminación de huevos, retraso en el desarrollo larvario en la mucosa y una recuperación de la inmunosupresión temprana inducida por el helminto. La infección por *L.infantum* de ratones infestados por *H.polygyrus* provocó un agravamiento de la helmintosis, con mayor eliminación de huevos, superior carga parasitaria y longevidad de los helmintos. La inmunosupresión inducida por el protista, en animales coinfectados, sugiere la modulación de la respuesta protectora frente al helminto (Th2 a Th1). La caracterización de Hc23 y rHc23 ha confirmado su homología, ausencia de contaminación y presencia de isoformas de la proteína, así como su posible dimerización espontánea. Los resultados obtenidos en los ensayos de vacunación en corderos confirman el interés de rHc23 como candidato para la vacunación frente a la hemoncosis, con una elevada reducción de los principales parámetros parasitológicos (eliminación de huevos, carga parasitaria) en las condiciones ensayadas (dosis única, dosis múltiples), así como el superior valor del hidróxido de aluminio como adyuvante. Los mecanismos efectores de esta protección no son conocidos en este momento y en las condiciones ensayadas no se ha observado ningún papel protector aparente de los anticuerpos IgG₁ frente a estas infestaciones (*H.contortus* – *H.polygyrus*). Por otra parte, los resultados obtenidos en el modelo subrogado no permiten una traslación directa a la hemoncosis.

Summary

Sheep haemonchosis is a worldwide distributed parasitic disease caused by the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. Pathogenesis relates to the blood feeding of preadult and adult stages of the helminth. Disease is responsible of important economic losses due to diminished production and quality of meat, milk and wool and also to the death of the most affected lambs. Control of the infection has relied almost completely on the use of anthelmintics. However, resistance phenomena, unavailability of new antiparasitic agents and the growing social concern on sustainable agriculture have fostered the interest on alternative control systems such as immunoprophylaxis. Experimental studies in sheep are hampered by their cost and the lack of information on many aspects of sheep immune system; thus the use of surrogate laboratory models would be relevant. Previous studies have shown the possibility of vaccination against haemonchosis with several purified antigens of the helminth. However no comparable results have been obtained, in general, with their recombinant counterparts. Recombinant protein rHc23, developed from an antigen of adult *H. contortus*, has been an exception since it has been able to elicit significant levels of protection in lambs.

In this scenario, immune modulation by a bacterial extract [*Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) + *Propionibacterium acnes*] (BI) of the infections by *Heligmosomoides polygyrus* in a murine model (BALB/c) has been studied and also its possible translation to *H. contortus* - lamb system. Moreover using a mouse model the impact of an overinfection by *Leishmania infantum* on previously infected mice with the nematode was determined. We have deepened our knowledge on both the purified native (Hc23) and recombinant (rHc23) proteins by multiple sequencing and a preliminary crystallographic study. Immunoprotection elicited by rHc23 has been evaluated using different standard adjuvants (aluminum hydroxide, QuilA) and antigen dosages (50µg/dose - 200µg/dose) in lambs subjected to a single challenge with *H. contortus*. Finally and with the aim of mimicking natural infections the potential immunoprotective value of rHc23 + BI has been evaluated in lambs subjected to trickle infections (3 times/week, 2 weeks) with two different infective doses (1.000 L3 and 2.000 L3).

Our results confirmed the protective role of the BI in the *H.polygyrus* – mouse model, with reduced fecal egg excretion, delay of intrahost larval development and recovery of the early immune suppression elicited by the helminth. By its part overinfection with *L.infantum* of mice previously infected with *H.polygyrus* aggravated the course of the helminth infection, with higher egg excretion and helminth burden and increased longevity of the nematode. Immune suppression elicited by the protist suggests the modulation, in coinfecting animals, of the protective response against the helminth (Th2 to Th1). Further characterization of Hc23 and rHc23 confirmed their homology, absence of contaminating peptides and also the presence of isoforms, and the possible spontaneous dimerization of the protein. Vaccination trials in lambs confirmed the value of rHc23 as a candidate vaccine for lamb haemonchosis, with highly significant reductions of the main parasitological parameters considered (fecal egg excretion, abomasal helminth burden) in the conditions tested (single challenge, trickle infections) and, particularly, with aluminum hydroxide as adjuvant. Effector mechanisms involved in the protection are not known and in our conditions IgG₁ antibodies, apparently, did not show any correlation with protection in both host-parasite systems (*H.contortus* – *H.polygyrus*). Moreover results obtained in the surrogate model did not allow a direct translation to lamb haemonchosis.