

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS - CÁTEDRA CONCYTEC

TESIS

Inmunidad celular en ganado vacuno lechero Infectado naturalmente con *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú

Para optar el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por
M.Cs. Heber Silva Díaz

Asesor:
PhD. Pedro Ortiz Oblitas, PhD

Cajamarca - Perú

Noviembre del 2014

COPYRIGHT © 2014 by
HEBER SILVA DÍAZ
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS - CÁTEDRA CONCYTEC

TESIS a

Inmunidad celular en ganado vacuno lechero infectado naturalmente con *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por

M.Cs. Heber Silva Díaz

Comité Científico:

Ph.D. Pedro Ortiz Oblitas
Asesor

Dr. Carlos Rosales Loredo
Miembro Titular

Dr. Corpus Cerna Cabrera
Miembro Titular

Dr. Teófilo Torrel Pajares
Miembro Titular

Fecha: Noviembre del 2014

A mí querida esposa, padres, hermanos y amigos, quienes con su confianza y apoyo han permitido cumplir mi sueño profesional.

Heber

No sé lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí...

-Isaac Newton

CONTENIDO

Ítem	Página
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	3
Antecedentes teóricos de la investigación	3
Bases Teóricas	4
-Generalidades de la respuesta inmunitaria antihelmíntica ⁴	
-Respuesta inmunitaria a infección por <i>F. hepática</i>	5
Definición de términos	12
CAPÍTULO III: DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	14
Hipótesis	14
Diseño metodológico	14
-Diseño metodológico	14
-Localización	14
-Unidad de análisis, universo y muestra	14
-Diseño experimental	15
-Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	15
-Análisis estadístico	24
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Estudio de la capacidad proliferativa de las PBMC	25
Estudio de la expresión de citoquinas de las PBMC	30
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
LISTA DE REFERENCIAS	39
APÉNDICES	47

LISTA DE ILUSTRACIONES

Tablas	Página
01. Análisis de varianza de los IE proliferativa de PBMC en relación al grupo bovino, antígeno e intersección.	27
02. IE proliferativa de PBMC según grupo bovino.	27
03. IE proliferativa de PBMC según antígeno.	28
04. IE proliferativa de PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.....	28
05. Análisis de varianza de la expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC en relación al grupo bovino, antígeno e intersección.	31
06. Expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC según grupo bovino.	31
07. Expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC según antígeno.	32
08. Expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.	32
09. Análisis de varianza (SC tipo III) de la expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC en relación al grupo bovino, antígeno e intersección.....	34
10. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según grupo bovino.	34
11. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según antígeno.	35
12. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.	35

Gráficos

Página

01. Promedio de los índices de estimulación proliferativa de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.26

02. Promedio de la expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.....30

03. Promedio de la expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.33

AGRADECIMIENTOS

Al jefe del Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por prestar las instalaciones e equipamiento especializado para la ejecución de los ensayos del presente trabajo de investigación.

Mi gratitud sincera a la MV. Rosmery Cruz y MV. Cristian Hobán por su apoyo incondicional en varias actividades de campo y laboratorio que requirió el trabajo. Asimismo, agradezco al Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA (Estación experimental Baños del Inca) por facilitar los animales de experimentación de los cuales se obtuvieron los especímenes inmaduros de la *Fasciola hepatica*.

Del mismo modo mi reconocimiento por su valiosa colaboración a los administradores del camal local, Fundo El Triunfo, Fundo Cristo Rey y Fundo Santa Luzmila, Fundo Los Alpes y Fundo Tartar de la UNC, por prestar las facilidades para obtener diversas muestras biológicas.

Finalmente mi gratitud a todas y cada una de las personas que colaboraron y brindaron el entorno adecuado para culminar de manera satisfactoria la presente tesis.

LISTA DE ABREVIACIONES

- FhESP inmaduro: productos de secreción-excreción del estadio inmaduro (28 días PI) de *Fasciola hepatica*.
- FhESP maduro: productos de secreción-excreción del estadio maduro (conducto biliar) de *F. hepatica*.
- TI: ternera infectada naturalmente con *F. hepatica*.
- VI: vaca infectada naturalmente con *F. hepatica*.
- CNI: control no infectado.
- AAM : macrófagos activados por la vía alternativa.
- Th1: respuesta inmunitaria caracterizada por un perfil de citoquinas con alta expresión INF- y baja de IL-4.
- Th2: respuesta inmunitaria caracterizada por un perfil de citoquinas con alta expresión IL-4 y baja de INF- .
- IL-4: Interleuquina 4.
- INF- : Interferón gamma.
- PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

RESUMEN

ANTECEDENTES: La fasciolosis producida por *Fasciola hepatica* es una enfermedad parasitaria importante de la ganadería en muchos países. En Cajamarca, Perú se reportan tasas de prevalencia superiores al 80% en el ganado lechero. La respuesta inmune celular es pobremente conocida en infección natural, razón por la cual el presente trabajo estudió la capacidad de proliferación y la expresión de citoquinas (IFN- γ e IL-4) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de terneras y vacas contra los antígenos no específico fitohemaglutinina (PHA) y específico de excreción/secreción del estadio inmaduro (FhESP-I) y maduro (FhESP-M) de *F. hepatica*.

MÉTODOS: La capacidad proliferativa fue determinada por linfoproliferación in vitro y la expresión de citoquinas se evaluó en sobrenadantes de cultivo celular por la técnica ELISA.

RESULTADOS: Las vacas infectadas con *F. hepatica* mostraron una disminución de la capacidad de respuesta frente a los estímulos proliferativos inespecífico y específico. Cuando se estudió el perfil de citoquinas, la expresión de IFN- γ fue baja y la IL-4 alta contra el estímulo específico, lo que indica que la respuesta permanece polarizada hacia una respuesta tipo Th2. Las terneras infectadas naturalmente expresan niveles de IFN- γ más altas en comparación con las vacas, pero con una expresión similar de IL-4 entre los dos grupos de animales. Estos resultados demuestran una respuesta inmunomoduladora en los animales adultos a medida que la enfermedad progresa. No se observaron diferencias en la respuesta inmune a los antígenos del estadio inmaduro y maduro del parásito.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados sugieren que las vacas infectadas con *F. hepatica* responden con una respuesta inmune polarizada TH2, con niveles bajos de IFN- γ y altos de IL-4. Por otro lado, las terneras infectadas expresaron niveles significativamente más altos de IFN- γ en comparación con las vacas, no obstante, ambos grupos expresaron cantidades similares de IL-4.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, respuesta inmunitaria celular, infección natural, citoquinas, ganado vacuno lechero, Cajamarca.

ABSTRACT

BACKGROUND: Fasciolosis produced by *Fasciola hepatica* is an important parasitic disease of livestock in many countries. In Cajamarca, Peru, prevalence rates above 80% are reported in dairy cattle. The cellular immune responses is poorly understood in natural infection, hence the present work studied the proliferative capacity and expression of cytokines (IFN- and IL-4) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cows and calves against nonspecific Phytohemagglutinin (PHA) and specific Excretory/Secretory antigens from immature (FhE/S-I) and mature stages (FhE/S-M) of *F. hepatica*.

METHODS: The proliferative capacity was determined by in vitro lymphocyte proliferation and cytokine expression was evaluated in cell culture supernatants by ELISA.

RESULTS: Cows infected with *F. hepatica* showed a decreased capacity to respond against nonspecific and specific proliferative stimulus. When the cytokine profile was studied, IFN- expression was low with high IL-4 against specific stimulus indicating that the response remains polarized towards a TH2 type response. Naturally infected calves expressed higher IFN- levels compared to cows, with a similar expression of IL-4 between both groups of animals. These results demonstrate an immunomodulatory response in adult animals as the disease progresses. No differences were observed regards the immune response to antigens of immature and mature stages of the parasite.

CONCLUSIONS: Our results suggest that cows infected with *F. hepatica* respond with a polarized TH2 immune response with low levels of IFN- and a high IL-4 response. On the other hand, infected calves expressed significantly higher levels of IFN- compared with cows, but both groups expressed similar quantities of IL-4.

Key words: *Fasciola hepatica*, celular immune response, natural infection, cytokines, diary cattle, Cajamarca.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La infección por *Fasciola hepatica* es considerada en Perú como una enfermedad infecciosa parasitaria emergente en la salud pública (Marcos et al. 2007). Así mismo, es la zoonosis helmíntica más importante en varias regiones del mundo (Robinson and Dalton 2009) afectando principalmente a humanos, animales bovinos, ovinos y caprinos. La enfermedad humana y animal está distribuida en el 71% del territorio peruano y es endémica de la sierra, con mayor importancia en los valles andinos (Claxton et al. 1997; Marcos et al. 2004; Marcos et al. 2005; Valencia et al. 2005; Marcos et al. 2007; Espinoza et al. 2010; Lopez et al. 2012).

La prevalencia en ganado bovino es variable. En una zona de Pakistán se reportó 3.06 % (Khan et al. 2009), en Zulia (Venezuela) 23 % (Angulo Cubillín et al. 2007); y en Huancavelica (Perú) 23.1 % (Valencia et al. 2005). Mientras que, en la Provincia de Cajamarca, donde la industria lechera es una actividad económica importante, la prevalencia es superior al 75 % (SENASA 2007).

En zonas endémicas del Perú, la enfermedad en ganado constituye un significativo impacto económico, con pérdidas no menores de US\$ 50 millones al año (Espinoza et al. 2010). Estas pérdidas son principalmente por disminución de la producción lechera, disminución de la fertilidad, menor ganancia de peso, productos decomisados y costos en tratamiento antiparasitario, siendo este último el que representa el 46 % de la pérdida total (Espinoza et al. 2010; Craig 1988; Blanco-Penedo et al. 2012).

En efecto, actualmente la fasciolosis en ganado vacuno lechero en la provincia de Cajamarca es controlada principalmente por quimioterapia, y apoyada en actividades de manejo agropecuario. Sin embargo, el problema persiste y empeora, debido a la resistencia que ha mostrado el parásito a dosis estándares de Triclabendazol, el antihelmíntico más usado en tratamiento de esta parasitosis (Ortiz et al. 2013).

Aunque el uso de una vacuna, es una estrategia que podría controlar eficazmente el problema de la fasciolosis en Cajamarca, todavía no es posible desarrollarla, debido a vacíos de conocimiento sobre las características de la respuesta inmunitaria del hospedero a la infección. Al respecto, la respuesta humoral en ganado lechero infectado con *F. hepatica* ha sido estudiado (Ortiz et al. 2000); sin embargo se carece de estudios que permitan entender la respuesta inmune celular en ganado con infección natural. Esta realidad conduce al siguiente problema: ¿Cuál es el mecanismo de respuesta inmune celular en ganado vacuno lechero naturalmente infectado con *F. hepática* en Cajamarca, Perú?

Por tal motivo, el presente estudio se propuso determinar el mecanismo de respuesta inmune celular en ganado vacuno lechero naturalmente infectado con *F. hepatica*. Así mismo se persiguieron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar la capacidad proliferativa de los linfocitos circulantes durante la respuesta inmune celular en ganado vacuno lechero infectado naturalmente con *F. hepatica*.

- ✓ Medir la expresión de IFN- (citoquina tipo 1) e IL-4 (citoquina tipo 2) durante la respuesta inmune celular en ganado vacuno lechero infectado naturalmente con *F. hepatica*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

I. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

La fasciolosis humana y animal está distribuida en el 71% del territorio peruano y es endémica de la sierra y costa, con mayor importancia en los valles andinos (Claxton et al. 1997; Marcos et al. 2004; Marcos et al. 2007; Espinoza et al. 2010; Valencia et al. 2005). En la provincia de Cajamarca la prevalencia de esta enfermedad en ganado vacuno asciende a 75% (SENASA 2007).

La respuesta inmunitaria celular en ganado durante infección primaria por *F. hepatica* no es protectora (McCole et al. 1999). Un estudio realizado en bovinos crónicamente infectados con *F. hepatica*, verificó que varios clones de células Th específicos correspondían a células Th2 por presentar una fuerte expresión de IL-4 pero baja o nula para IL-2 o IFN- γ . No obstante, la mayoría de clones de células Th investigados fueron clasificados como Th0 por expresar solo una de las tres citoquinas. No se obtuvieron clones de células Th1 (Brown et al. 1994).

Así también, en el modelo experimental de coinfección entre *F. hepatica* y *Mycobacterium bovis* resulta alterada la capacidad del test para diagnóstico de la tuberculosis bovina, debido a que la infección por *F. hepatica* polariza la respuesta inmunitaria a células Th2, la cual inhibe la respuesta Th1 propia de *M. bovis* (Flynn et al. 2007). Similares resultados se muestran en un estudio de coinfección entre *Toxoplasma gondii* inductor de respuesta Th1 y *F. hepatica* inductor de respuesta Th2 (Miller et al. 2009).

Por otro lado estudios experimentales en modelos de ratas muestran que en infección aguda, durante las dos primeras semanas, *F. hepatica* induce un perfil de citoquinas Th0 transitorio seguido por una regulación negativa de la respuesta celular e inducción de un perfil de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-10). El perfil de citoquinas Th1 (INF- γ) se observó en niveles basales (Tliba et al. 2002a; Tliba et al. 2002b). Mientras que en ratas con infección crónica temprana por *F. hepatica*, se encontró que hay predominio de una respuesta Th2, la cual disminuyó en infección crónica avanzada, y se caracterizó por inmunosupresión (Gironenes et al. 2007).

Así mismo, un estudio experimental en ratas, concluye que *F. hepatica* regula negativamente la respuesta Th1 al observar que tras la infección se exhibe una respuesta Th2, con producción de niveles altos de citoquinas IL-4 e IL-5, y niveles bajos de IFN- γ e IL-2 (O'Neill et al. 2000).

De forma similar, un estudio realizado en terneros infectados con *F. gigantica* mostró niveles no detectables de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), igual al control; sin embargo, la IL-10 se encontró en niveles detectables en PBMCs de animales infectados más no en los controles (Ingale et al. 2010).

Por otro lado, la participación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en la activación del sistema inmune recién ha empezado a explorarse en la infección por *F. hepatica*. En efecto, el parásito genera un gran número de moléculas de

secreción las que inducen una variedad de efectos en el hospedero (Torres y Espino 2006; Donnelly et al. 2005; Dalton et al. 2003; O'Neill et al. 2001).

II. BASES TEÓRICAS

2.1 Generalidades de la respuesta inmunitaria antihelmíntica

La respuesta inmunitaria del hospedero a infección por helmintos se caracteriza por la intervención de eosinófilos, mastocitos, macrófagos activados por la vía alternativa (AAM) y linfocitos tipo Th2. Estos dos últimos caracterizan una respuesta polarizada Th2 (Jenkins y Allen 2010).

Los linfocitos son las únicas células del organismo capaces de reconocer y diferenciar específicamente distintos determinantes antigénicos, y son por lo tanto responsables de las características más importantes que definen el sistema inmunitario adaptativo: la especificidad y la memoria (Abbas et al. 2002). Existen diferentes subgrupos de linfocitos que se diferencian por sus funciones y sus productos proteicos, pero que son indistinguibles desde el punto de vista microscópico: los linfocitos B, linfocitos T y células citocidas naturales (NK).

Los linfocitos T son las células efectoras de la inmunidad celular, debe su nombre al hecho de que sus precursores se forman en la médula ósea, pero a continuación migran al timo donde maduran. Los linfocitos T se subdividen en subpoblaciones, los linfocitos T citolíticos o citotóxicos (CD8+) y los linfocitos T colaboradores (CD4+); asimismo, estos últimos según su perfil de citoquinas expresados se diferencian en células Th1 o Th2 (Abbas et al. 2002).

Los antígenos helmínticos a los que responde el hospedero son de distintos tipos: excreción-secreción, de tegumento y somáticos. Durante la compleja interacción entre el parásito y el hospedero intervienen principalmente varias proteínas secretadas por el helminto que modulan la respuesta del hospedero (Hewitson et al. 2009).

En efecto, estudios recientes muestran una nueva familia de moléculas helmínticas, denominadas Moléculas Defensivas de Helmintos (HDMs) que exhiben similares características bioquímicas y funcionales que los péptidos defensivos humanos, particularmente CAP18, la cual modula la activación de los macrófagos por lipopolisacáridos (LPS) por ligamiento con los TLR clásicos y con ello reducen la liberación de mediadores inflamatorios. Se piensa que las HDMs, por imitación de funciones de los péptidos defensivos del hospedero, representan una nueva familia de moduladores de células innatas (Robinson et al. 2011).

Por otra parte, los hospederos presentan diferencias en la regulación de la respuesta inmune contra *F. hepatica* dependiendo de la especie, raza e individuos de la misma especie. Esta diferencia también se observa en la habilidad para desarrollar resistencia a la reinfección (Jedlina-Panasiuk 2002).

La ocurrencia de infecciones múltiples por helmintos es común en la naturaleza. Los parásitos que co-infectan pueden interactuar en una variedad de formas, incluyendo a través del sistema inmunitario del hospedero vía mecanismos tales como la inmunomodulación e inmunosupresión (Ezenwa y Jolles 2011). La respuesta inmunitaria en las coinfecciones por helmintos y otros parásitos, no se ha estudiado

aún en profundidad, por lo que se tiene poco entendimiento de la forma en que afectan éstas interacciones.

2.2 Respuesta inmunitaria a infección por *F. hepatica*

La respuesta inmunitaria a infección por *F. hepatica* sigue los patrones generales de la inmunidad frente a helmintos, sin embargo presenta varias diferencias que tienen que ver con la expresión específica de antígenos y la interacción con el hospedero (Jenkins y Allen 2010). La respuesta innata y adaptativa son rigurosamente coordinadas durante la fase aguda y crónica de la enfermedad (Flynn et al. 2010).

Estudios clínicos y experimentales sugieren que tanto la respuesta inmunitaria humoral y celular son importantes para control de la infección (Jedlina-Panasiuk 2002). Sin embargo, estudios en ovinos y caprinos muestran que estas respuestas no tienen efecto protector frente al establecimiento y desarrollo de la enfermedad primaria y secundaria (Pérez et al. 2002; Martínez-Moreno et al. 1997).

El sistema inmune innato juega un importante papel en la defensa contra la infección por *F. hepatica*, además estimula la respuesta inmunitaria adaptativa. Los mecanismos efectores innatos incluyen una rápida eosinofilia y la activación de macrófagos. Al respecto, en ganado infectado con *F. hepatica* se observó recuento elevado de eosinófilos 4 semanas post-infección y persistió por un periodo de 16 semanas (Bossaert et al. 2000). Similar eosinofilia se observó en ovinos (Chauvin et al. 1995) y en modelos animales experimentales de ratas (Cervi et al. 2001).

La capacidad de *F. hepatica* para colonizar el hígado del hospedero puede ser atribuido a la producción de productos parasitarios específicos. Los helmintos parásitos son bien conocidos por su habilidad de secretar complejos proteicos mixtos, que incluyen potentes enzimas, los cuales ayudan no solo con sus requerimientos nutricionales, sino con el tránsito a través del hospedero y la evasión del sistema inmunitario (Flynn et al. 2010). Actualmente se conocen muchos de estos productos específicos, varios de ellos de importancia antigénica (Tabla 01).

Tabla 01. Productos y moléculas biológicas derivados de *F. hepatica*

PRODUCTO / MOLÉCULA	FUNCIÓN / EFECTOS	REFERENCIA
Productos de Secreción-Excreción (FhESP)	Contiene una mezcla de moléculas antigénicas.	Ortiz et al. (2000)
Peroxirredoxin (FhPrx)	Protege al parásito de los Intermediarios Reactivos del Oxígeno. Activa los macrófagos por la vía alternativa. Candidato vacunal	Donnelly et al. (2005); Mendes et al. (2010a)
Catepsina L1 (FhCL1)	Proteasa componente de FhESP. Potencial candidato vacunal y antígeno diagnóstico.	Dalton et al. (2003) O'Neill et al. (2001)
Glutación S Transferasa (GST)	Componente de FhESP. Potencial candidato vacunal	Sexton et al. (1990) Sexton et al. (1994) Dowling et al. (2010)
Leucina Aminopeptidasa (FhLAP)	Potencial candidato vacunal	Acosta et al. (2008) Marcilla et al. (2008)

Proteínas derivados de huevos (FhEP)	Potencial candidato vacunal	Moxon et al. (2010)
Antígenos de Tegumento (FhTeg)	Suprimen la maduración, función de células dendríticas y antígeno diagnóstico	Hamilton et al. (2009) Gaudier et al. (2012) Morales y Espino (2012)
Proteínas tipo Saposin (FhSAP)	Potencial Candidato vacunal	Torres y Espino (2006) Espino y Rivera (2010)
Sm14	Potencial Candidato vacunal	Mendes et al. (2010b) Zafra et al. (2009)
Extracto Total	Potencial candidato vacunal asociado a LPS	Falcón et al. (2012)

Se ha demostrado, en un estudio en ratas, que FhESP puede inducir apoptosis en los eosinófilos por mecanismos dependientes de Caspasa, siendo los componentes carbohidratos presentes en estos antígenos los involucrados en este efecto. La apoptosis de los eosinófilos fue observada en el hígado de ratas 21 días después de la infección. La disminución de los eosinófilos en la infección temprana puede ser una estrategia parasitaria con el fin de prevenir la respuesta inmunitaria por parte del hospedero, sin embargo, si éste resultado es acción del parásito o del hospedero, permanece aún desconocido (Serradell et al. 2007).

La activación de los macrófagos por la vía alternativa (AAM) durante la infección por helmintos ha cobrado importancia últimamente, considerándose como la piedra angular de la inmunología helmíntica (Jenkins y Allen 2010). Los AAMs, a diferencia de los macrófagos activados por la vía clásica (CAMs), se reconocen por la secreción de varias proteínas como la Arginasa 1 (Arg-1), YM1 y FIZZ; adicionalmente se observan niveles bajos de IL-2 (Donnelly et al. 2005). Asimismo se ha demostrado que la producción de actividad elevada de Arg-1, bajos niveles de óxido nítrico (NO) y elevados de IL-10 son distintivos de esta vía (Flynn y Mulcahy 2008b).

Aunque se desconocen los mecanismos exactos por la cual se lleva a cabo la AAM, se sabe que antígenos helmínticos podrían inducirlos. La peroxirredoxin o thioredoxin peroxidase (FhPrx) secretada por *F. hepatica*, además de proteger al parásito contra los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), induce la AAM. Las funciones de estas células no están aún totalmente claras. Sin embargo, estudios sugieren que el desarrollo de la respuesta Th2 durante la infección por *F. hepatica* es mediada por moléculas de secreción, como la Prx, que inducen la activación alternativa de los macrófagos (Robinson et al. 2010; Donnelly et al. 2005). En este contexto juega un rol importante la IL-10 producida por AAMs, conocida por su acción supresora de las células Th1.

Otros modelos animales han demostrado que los AAMs tienen un rol en la fibrosis y la patología del hígado afectado. Asimismo, existe evidencia de la activación de éstas células por citoquinas tipo 2, siendo ésta una respuesta innata frente al daño, la misma que puede ocurrir en ausencia de respuesta adaptativa. Las células Th2 son requeridas para mantener la vía activada durante la respuesta (Loke et al. 2007).

Estudios recientes muestran que lectinas tipo C (Receptor Manosa y Dectin-1) están involucradas en la interacción entre los FhESP y los macrófagos (Guasconi et al. 2011). Tras la estimulación de los macrófagos con FhESP, estos mostraron

actividad alta de Arg-1, TGF- β e IL-10, sugiriendo que FhESP están involucrados en la activación de macrófagos por la vía alternativa, y por lo tanto, tienen funciones inmunomodulatorias. Las HDM regulan negativamente la activación de los macrófagos por la vía clásica, reduciendo la liberación de mediadores inflamatorios (Robinson et al. 2011).

Cisteína proteasas como la Cathepsina L1 (FhCL1) secretada por *F. hepatica* altera la función de los macrófagos, ocurriendo degradación del Toll- Like Receptor 3 (TLR3) dentro de endosomas, como consecuencia inhiben la activación de los macrófagos por la vía clásica y suprime el desarrollo de una respuesta Th1 (Donnelly et al. 2010). Por otro lado, en modelos murinos se ha demostrado que los antígenos de tegumento de *F. hepatica* (FhTeg) suprimen la maduración y la función de las células dendríticas (Hamilton et al. 2009). Sin embargo, los mecanismos bioquímicos implicados en esta acción, son aún desconocidos.

La infección por *F. hepatica* estimula una fuerte respuesta inmunitaria humoral en el hospedero. Dos a cuatro semanas de infección da lugar a una respuesta adaptativa por células B e infiltrado local de células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos, principalmente IgG (Mendes et al. 2010a; Pérez et al. 2002). Estudios han mostrado que la dominancia de anticuerpos de la subclase IgG1 y la baja producción de IgG2 e IgM caracteriza a la respuesta humoral contra *F. hepatica* y en general contra los helmintos (Clery et al. 1996; Gironenes et al. 2007).

FhESP y glutatión S-transferasa (GST) fueron utilizadas para estudiar la respuesta humoral y celular en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. La respuesta humoral anti-FhESP fue precoz y se incrementó durante la infección, resultado contrario se observó para el GST, donde anticuerpos anti-GST no fueron detectados por ELISA ni por western blotting. De forma similar, la respuesta celular anti-FhESP se incrementó precozmente y cayó después de la segunda semana post infección, mientras que la respuesta anti-GST no se observó (Chauvin et al. 1995; Moreau et al. 1998). Asimismo, se sabe que FhESP contiene 29 proteínas y 2 GST (26.7 y 27.2 kDa) (Morphew et al. 2007). Si la anergia del sistema inmunitario frente a GST es causa antigénica o inmunoinducida es desconocida aún.

Similares resultados fueron reportados en ganado vacuno lechero de diferentes edades: terneras, vaquillonas y vacas. Donde los tres grupos muestran respuesta humoral específica a FhESP (60-66 kDa) y a una proteína de preparación somática (SO) de 28 kDa. Los anticuerpos anti FhESP medidos por ELISA permanecieron altos por un periodo de 2 años en los tres grupos de ganado (Ortiz et al. 2000).

Si bien, los FhESP tienen varias proteínas inmunoreactivas, se conoce que no tiene efecto protector en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad primaria o secundaria (Martinez-Moreno et al. 1997); donde la respuesta humoral y celular no presenta cambios significativos en la infección secundaria (Martinez-Moreno et al. 1999; Pérez et al. 2002). Contrariamente, la infección, no sólo no induce protección, sino que la respuesta inmune inducida por antígenos del parásito puede dar lugar a severas lesiones hepáticas (Mendes et al. 2010a).

Otros antígenos de *F. hepatica*, como la FhCL1, FhPrx y Sm14 utilizados en inmunización de caprinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* (Buffoni et al. 2012; Buffoni et al. 2010; Mendes et al. 2010a; Mendes et al. 2010b), generó niveles significativos de anticuerpos específicos, de los cuales, los anticuerpos

antiFhCL1 mostraron los títulos más elevados. Sin embargo la respuesta humoral específica expresada no significó protección inmunobiológica.

Existe evidencia de que títulos elevados de IgG2a confieren protección contra la infección, esto ha sido observado en un número de casos y situaciones (Pleasance et al. 2011). Asimismo, la disminución de la carga parasitaria, usando vacunación con antígenos derivados del parásito, fue correlacionada con el incremento de títulos de anticuerpos específicos IgG2a (Mulcahy et al. 1998; Raadsma et al. 2008).

La activación precisa de células T y la generación de una respuesta adaptativa de células T son de suma importancia para contener una infección, pero en el contexto de los helmintos es inexplorado aún. En la infección por *F. hepatica* la respuesta inmunitaria celular local está representada principalmente por infiltrado de linfocitos T, con una mayor proporción de linfocitos T CD4+ que CD8+, especialmente en hospederos reinfectados (Gironenes et al. 2007; Pérez et al. 2002). Asimismo, la diferenciación de las células T a Th2 caracterizan la respuesta a éste parásito.

Tradicionalmente se sabe que las células presentadoras de antígenos (APC) como las células dentríticas (DC) y macrófagos (M) contribuyen al proceso de presentación de antígenos a las células T vía CMH clase II. Trabajos respecto a la participación de DC en la infección por helmintos han fallado hasta la fecha en mostrar el rol definitivo de estas células en la diferenciación de las células Th2. Recientemente modelos murinos infectados con nemátodes han revelado un role, anteriormente no descrito, de los basófilos en la activación de las células Th2. El estudio mostró que los basófilos pueden presentar antígenos y secretar IL-4 necesaria para activar las células Th2 (Wynn 2009).

El factor mielóide de diferenciación 88 (MyD88) es una molécula adaptadora crítica (similar a los receptores Toll-like), y ha sido encontrada crucial en el control de inmunidad Th1. Sin embargo, no se ha confirmado si la respuesta Th2 contra la infección helmíntica requiere de ésta señalización. Al respecto se observó que ratones carentes de MyD88 e infectados con metacercarias de *F. hepatica* exhibieron un rol no indispensable de MyD88 en la respuesta inmune, dado por un incremento de IgG1, IgE, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y disminución de IgG2 e IFN- , que caracterizan a la respuesta Th2 (Luo et al. 2012).

Sin embargo, en el mismo estudio, se observó que el número de eosinófilos y neutrófilos disminuyeron significativamente en la cavidad peritoneal de ratones carentes de MyD88, aunque no se observaron diferencias en los macrófagos y linfocitos. Estos experimentos sugieren que MyD88 es requerido para el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos pero es dispensable para la respuesta Th1 y Th2 del hospedero infectado con *F. hepatica*.

El hospedero infectado con *F. hepatica* experimenta inmunosupresión durante la fase aguda y crónica de la enfermedad. Estudios experimentales en ratas han mostrado que durante la infección crónica temprana hay predominancia de una respuesta Th2, la cual disminuye en la infección crónica avanzada, caracterizado por una persistente inmunosupresión. Esto se pudo demostrar, debido a que la cuantificación de citoquinas en suero de ratas con 20 semanas de infección revelaron niveles basales (Gironenes et al. 2007). La supresión de la respuesta inmune celular inducida por FhESP de *F. hepatica*, ha sido también reportada en ratas (Cervi et al. 1996; Cervi et al. 1998); así como, la inhibición de la respuesta proliferativa de las células esplénicas al estímulo mitógeno, a causa de las FhESP (Cervi y Masih 1997).

Adicionalmente, otro estudio experimental en ratas mostró que la supresión transitoria de la respuesta proliferativa de células esplénicas está mediada por citoquinas IL-4 e IL-10, además se observó disminución de la producción de NO en el peritoneo (Cervi et al. 2001; Cervi et al. 1998). Estos acontecimientos pueden ser mecanismos de *F. hepatica* para evadir la respuesta inmune protectora en las primeras etapas de la penetración del hígado.

Así mismo, la regulación negativa de la respuesta Th1 por infección con *F. hepatica* se estudió en ratones, donde se exhibió una respuesta Th2 con producción de niveles altos de citoquinas IL-4 e IL-5 y bajos niveles de INF- γ e IL-2 (O'Neill et al. 2000). La supresión de la respuesta protectora Th1, inducida por *F. hepatica*, fue demostrada a través de un experimento en ratones coinfectados con *Bordetella pertusis*, bacteria patógena del cual la vacuna protectora depende de una potente respuesta Th1. Los ratones coinfectados mostraron un perfil de citoquinas Th2 en respuesta a los antígenos de *F. hepatica*, similar a los infectados solo con *F. hepatica*. Por el contrario, la respuesta Th1 a los antígenos de *B. pertusis* fueron marcadamente suprimidos y la infección bacteriana exacerbada (Brady et al. 1999).

Al examinar las citoquinas regulatorias, IL-10 y TGF- β 1, en ganado vacuno infectado se observó que el nivel de IL-10 aumentó con el tiempo y el TGF- β 1 alcanzó tempranamente niveles altos y después se mantuvo. Esta cinética diferente de las citoquinas en mención podrían indicar funciones independientes para ellas, de hecho, el uso de anticuerpos neutralizantes confirmó que la IL-10 es responsable predominantemente del control de la producción IFN- γ , y el TGF- β 1 de la IL-4 (Flynn y Mulcahy 2008a).

La regulación de la respuesta contra *F. hepatica* solo ha sido investigada relativamente en pocos trabajos hasta la fecha. Sin embargo la existencia de células T reguladoras parásito-específicas, productoras de IL-10 y TGF- β , capaces de suprimir respuestas Th1 y Th2 parásito-específicas ha sido recientemente demostradas experimentalmente en ratones (Walsh et al. 2009).

FhESP también han sido descritos como inductores de propiedades tolerogénicas en células dendríticas mieloides de ratones, debido a que, al estimularlas exhibieron una capacidad para polarizar a las células T CD4+ a Th2 y T reguladoras (Falcón et al. 2010). Asimismo, recientemente han sido identificados los efectos inmunosupresores de dos moléculas (CL1 y GST sigma) componentes de FhESP que involucra a las células dendríticas (DC). Estas moléculas, TLR4 dependientes, activan el fenotipo supresor de las DC, las cuales atenúan la respuesta Th17 y fallan en la activación de la respuesta Th2 (Dowling et al. 2010). La modulación de la respuesta inmune por CL1 y GST sigma con inmunosupresión asociada a inflamación crónica es un mecanismo que puede beneficiar la sobrevivencia del parásito dentro del hospedero.

Por otro lado, un reciente estudio realizado en ovejas de raza ITT resistentes a infección por *F. gigantica* pero no a *F. hepatica*, sugiere que la inducción temprana de una respuesta inmunitaria tipo 1 (Th1), evidenciada en perfil de citoquinas (IL-4 e IFN- γ) y anticuerpos (IgG1 e IgG2), puede ser responsable de la habilidad para resistir la infección (Pleasant et al. 2011). Este modelo es ideal para investigar los mecanismos de resistencia del parásito en un hospedero natural.

Resultados similares fueron observados durante la vacunación en conejos con antígeno FhSAP recombinante, con 83% de reducción de carga parasitaria y niveles

de IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-10 significativamente altos. Estos resultados sugieren que la protección conferida por la proteína FhSAP puede estar asociada con una respuesta mixta Th1/Th2, en la cual las citoquinas Th1 son las dominantes (Espino y Rivera 2010). Sin embargo, la inmunización con Sm14 recombinante (rSm14) en caprinos ha dado resultados con número de células IL-4(+) más altas que las de IFN γ , sugiriendo una respuesta polarizada Th2 en los animales inmunizados y control infectados (Mendes et al. 2010b; Zafra et al. 2009)

Las DC pueden funcionar como adyuvantes capaces de mediar en la protección frente a diferentes patógenos. Teniendo en cuenta que la vacunación exitosa contra la *F. hepatica* se relaciona principalmente con la inducción de respuestas Th1, en un estudio reciente se estudió el potencial de las DC cargados con antígenos (extracto total – TE) de *F. hepatica* y LPS como una vacuna contra la fasciolosis en ratones (Falcón et al. 2012). Ellos evidenciaron que una sola vacuna estimuló una respuesta Th1 sistémica y confirió protección contra el daño hepático inducido por *F. hepatica*. Se concluye que las respuestas Th1 y Th2 son importantes en la protección contra *F. hepatica*, sin embargo, existe evidencia de que la dominancia deberá ser de células Th1.

III. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Respuesta Inmunitaria. Reacción coordinada y colectiva del hospedero a la introducción de sustancias extrañas (caso del parásito *F. hepatica*), mediada por células y moléculas del sistema inmunitario.

Respuesta inmunitaria innata. Es aquella que depende de mecanismos que existen antes de la infección, son capaces de una respuesta rápida a los microorganismos y reaccionan básicamente de la misma forma a las infecciones de repetición. La respuesta inmunitaria innata se compone de las barreras epiteliales, células fagocíticas, célula citocidas naturales (NK), sistema del complemento y las citoquinas.

Respuesta inmunitaria adaptativa. Es aquella que está mediada por los linfocitos y es estimulada por la exposición a agentes infecciosos. A diferencia de la respuesta innata, la respuesta adaptativa se caracteriza por poseer especificidad y memoria. Presenta dos tipos: la respuesta celular y humoral.

Inmunidad Celular. Tipo de respuesta adaptativa que está mediada por linfocitos T CD4+ y T CD8+.

Inmunidad humoral. Tipo de respuesta adaptativa que está mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B.

Inmunosupresión. Inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo a consecuencia de una enfermedad o inducida intencionalmente por fármacos.

Citoquinas. Son proteínas producidas por varios tipos celulares y son los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmunitario. Cada citoquina es producida por un grupo de células particulares, lo cual hace posible saber indirectamente, a través de ellas, los tipos celulares que se han activado en esa respuesta inmunitaria.

Células Th1. Subpoblación funcional de células T colaboradoras que secretan un conjunto específico de citoquinas, como IFN γ , y cuya función principal consiste en estimular la defensa mediada por los fagocitos contra las infecciones, especialmente las debidas a infecciones intracelulares.

Células Th2. Subpoblación funcional de células T colaboradoras que secretan otro grupo de citoquinas específicas, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y cuyas funciones principales consisten en estimular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y por eosinófilos/mastocitos y regular negativamente las respuestas Th1.

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

I. HIPÓTESIS

La respuesta inmunitaria celular en ganado vacuno lechero infectado naturalmente con *F. hepatica* se caracteriza por la activación de linfocitos T CD4+ específicos y diferenciación en células efectoras predominantemente Th2 evidenciadas por alta expresión de citoquinas IL-4 y una disminución de IFN- .

II. DISEÑO METODOLÓGICO

1. Diseño metodológico

La presente investigación es básica, explicativa y con procesos experimentales y no experimentales.

2. Localización

La investigación se realizó en la provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca, Perú. Esta provincia, ubicada en valle andino, tiene una superficie aproximada de 2,979.78 Km², una población estimada de 316 152 habitantes y 2 720 msnm de altitud. Sus coordenadas geográficas son 07° 09' 12" latitud sur y 78° 30' 57" longitud oeste (INEI 2007). El trabajo de laboratorio fue conducido en el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca.

3. Unidad de análisis, universo y muestra

Para el estudio, se utilizó ganado vacuno lechero de establos del valle de Cajamarca (Anexo 01), los mismos que guardaron las condiciones de infección natural a *F. hepatica*. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 18 animales hembras de raza Holstein, de los cuales se utilizaron sus linfocitos de sangre periférica para el ensayo de la respuesta inmunitaria celular.

4. Diseño experimental

Los animales se dividieron en tres grupos. Se consideró 3 repeticiones experimentales.

- Grupo terneras infectadas (TI, n=6) correspondieron a animales de 4 - 8 meses de edad naturalmente infectados, de los cuales sus linfocitos recibieron estímulo.
- Grupo vacas infectadas (VI, n=6) correspondieron a animales, de un parto a más, naturalmente infectados, de los cuales sus linfocitos recibieron estímulo. Los animales de este grupo fueron de entre 3 y 8 años de edad, vacías y sin tratamiento antiparasitario en el periodo de muestreo.
- Grupo control no infectado (CNI, n=6) correspondieron a animales de cualquier edad, no infectados por *F. hepatica*.

Tabla 02. Diseño experimental

Grupo bovino	n	Antígenos	Evaluaciones
Terneras infectadas (TI)	6	Cultivo celular de PBMC estimuladas con FhESP-M, FhESP-I y PHA	1. Capacidad proliferativa 2. Expresión de Citoquinas
Vacas infectadas (VI)	6		
Control no infectado (CNI)	6		

PHA: fitohemaglutinina (mitógeno)

FhESP-M: antígeno de secreción-excreción del estadio maduro de *F. hepatica*. FhESP-I: antígeno de secreción-excreción del estadio maduro de *F. hepatica*.

5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La determinación de las respuestas de los linfocitos circulantes frente al antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhESP), estadio maduro e inmaduro (28 días), y mitógeno fitohemaglutinina-PHA (Sigma Aldrich) se realizó cuantificando dos parámetros: Capacidad proliferativa y capacidad de producción de citoquinas específicas (IFN- γ e IL-4).

5.1. Selección de los animales.

La infección por *F. hepatica* en los animales se determinó utilizando procedimientos coproparasitológicos para identificar y cuantificar huevos, e inmunológicos para identificar anticuerpos séricos.

Los animales en los cuales se demostró conteos mayores a 5 hpg de *F. hepatica*, fueron preseleccionados para la identificación de anticuerpos y posterior inclusión aleatoria en los grupos de animales infectados (TI y VI). De forma similar la preselección de los animales no infectados (CNI) fue constituido por aquellos que no presentaron huevos en heces, y su inclusión fue determinada por la ausencia de anticuerpos séricos ensayados por Western Blot.

5.1.1. Examen coproparasitológico

El examen coproparasitológico tuvo como fin detectar y contar huevos de *F. hepatica* en heces de los animales candidatos. Se utilizó la técnica de Sedimentación Rápida (TSR) anteriormente descrita (Beltrán et al. 2003). El protocolo fue el siguiente:

- Se homogenizó 2 g de heces con unos 10 a 20 mL de agua filtrada.
- Se colocó el colador y dos capas de gasa en la abertura de la copa y a través de ella se filtró la muestra.
- Se retiró la coladera y llenó la copa con agua filtrada hasta 1 cm debajo del borde, esto es 15 a 20 veces el volumen de la muestra.
- Se dejó sedimentar la muestra durante 10 minutos.

- Se decantó las 2/3 partes del contenido del vaso y agregó nuevamente agua.
- Se repitió los pasos anteriores cada 5 a 10 minutos por 3 a 4 veces, hasta que el sobrenadante quedó limpio.
- Se transfirió el sedimento a una placa Petri y se le añadió una gota de azul de metileno.
- Se observó y contó los huevos de *F. hepatica* en el estereoscopio. Se reportó el número de huevos contados en un gramo de heces (hpg).

5.1.2. Búsqueda de anticuerpos séricos por Western Blot

Para realizar el ensayo se utilizó el kit comercial Fascioblot para la detección de anticuerpos contra *Fasciola hepatica* (Escalabs SAC), que contenía tiras de nitrocelulosa al cual se le habían transferido proteínas de secreción/excreción de *F. hepatica* separadas por electroforesis (Escalante et al. 2011).

Como muestra se utilizó suero sanguíneo, para lo cual se sangró a los animales de la vena yugular por extracción al vacío en tubos sin anticoagulante. El ensayo siguió el instructivo de uso del kit comercial.

- Las tiras de nitrocelulosa se humedecieron 15 minutos por inmersión en 0.5 mL de solución de trabajo. Posteriormente se retiró la solución de los canales por aspiración.
- Se agregó 0.5 mL de muestra y controles previamente diluidos (20 uL de muestra o control en 500 uL de buffer de dilución), e incubó a temperatura ambiente por una hora en agitación constante. Al finalizar, se retiró las muestras y controles.
- Se lavó las tiras tres veces con 0.5 mL de solución de trabajo, durante 3 minutos por vez en agitación constante. Al finalizar los tiempos se retiró la solución de trabajo.
- Se agregó 0.5 mL de conjugado enzimático (0.5 mL de solución de trabajo con 5 uL de conjugado) e incubó a temperatura ambiente por una hora en agitación constante. Al finalizar, se retiró el conjugado.
- Se lavó las tiras tres veces con 0.5 mL de solución de trabajo, durante 5 minutos por vez en agitación constante. Adicionalmente se lavó 2 veces con 0.5 mL de solución de lavado, durante 5 minutos por vez. Al finalizar se retiró la solución de lavado.

- Se agregó a cada canal 0.5 mL de solución sustrato e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación constante.
- Se detuvo la reacción agregando agua destilada. Las tiras se lavaron tres veces y se dejaron secar en la oscuridad.
- Se consideró positivo a la presencia de anticuerpos anti Fasciola si se observó coloración en una o en las dos de las siguientes bandas: 17 y 23 Kda.

5.2. Preparación de los antígenos de *F. hepatica* (FhESP).

Los ensayos con PBMC requirieron estímulos inespecíficos (PHA) y específicos, estos últimos constituidos por los antígenos FhESP maduro y FhESP inmaduro.

5.2.1. Preparación de los FhESP maduro.

Las fasciolas adultas fueron obtenidas de hígados infectados de ganado vacuno en el camal local. Previo a los procedimientos de obtención de los antígenos, los especímenes fueron lavados con PBS 0.01 M (Sigma Aldrich) y RPMI 1640 (Sigma Aldrich) atemperados a 37 °C con la finalidad de eliminar restos biliares y contenido intestinal. Posteriormente los especímenes pudieron utilizarse en la preparación de los antígenos, siempre antes confirmando su viabilidad (Ortiz et al. 2000).

La preparación de los FhESP maduro fue realizado como lo descrito anteriormente (Ortiz et al. 2000).

- Las fasciolas recuperadas de los hígados fueron lavadas seis veces con PBS 0.01 M, pH 7.2 y una vez con medio RPMI 1640.
- Los especímenes fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico, 100 UI/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomycinina (Sigma Aldrich). Se acondicionó 1 espécimen por cada mililitro de medio a condiciones de incubación de 37 °C, 5% de CO₂ y humedad constante por 12 horas (Flow Laboratories, Automatic CO₂ Incubator IR 1500).
- Finalizada la incubación, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 14000 g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5430 R).
- El sobrenadante recuperado de la centrifugación constituye el antígeno FhESP maduro.

5.2.2. Preparación de los FhESP inmaduro.

Las fasciolas inmaduras de 28 días fueron colectadas de hígados de cuyes (*Cavia porcellus*) infectados con 20 metacercarias de fasciolas de origen bovino. Las metacercarias fueron obtenidas por infección experimental de caracoles *Lymnaea* sp. con miracidios del parásito, y fueron facilitados por el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (Ortiz et al. 2013). Los animales de experimentación fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Baños del Inca-Cajamarca.

Se utilizó el siguiente protocolo de trabajo:

- Posterior al sacrificio del animal, se recuperó el hígado, el cual fue almacenado inmediatamente en PBS 0.01 M, pH 7.2 a 37 °C.
- Las fasciolas inmaduras fueron recuperadas del parénquima hepático y posteriormente lavadas cuatro veces con PBS 0.01 M, pH 7.2 y una vez con medio RPMI 1640.
- Los especímenes fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico (100 UI/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina), a razón de 10 especímenes por cada mililitro de medio, a condiciones de incubación de 37 °C, 5% de CO₂ y humedad constante por 24 horas (Flow Laboratories, Automatic CO₂ Incubator IR 1500).
- Finalizada la incubación, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 14000 g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5430 R).
- El sobrenadante recuperado de la centrifugación constituyó el antígeno FhESP inmaduro.

Una vez obtenidos los antígenos (FhESP maduro e FhESP inmaduro), se determinó la concentración proteica utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) por espectrofotometría molecular (Mindray BA-88A), a través de la confección de una curva de calibración. La concentración proteica de los FhESP varió desde 500 a 1000 ug/mL. Finalmente se agregó a los FhESP fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM (Sigma Aldrich), y luego fueron filtrados en membrana de 0.22 um (Corning Costar), alícuotados y almacenados a -70 °C (Thermo Fisher Electronic Corporation).

5.3. Ensayo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para efectos de este ensayo, se tomaron muestras de sangre periférica de cada animal, para lo cual se procedió a la punción de la vena yugular utilizando

tubos heparinizados al vacío (Vacutainer). El aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Histopaque-1077 (Sigma Aldrich). El protocolo de procedimientos siguió las recomendaciones del proveedor con ligeras variaciones. Se requirió de la preparación previa de los siguientes medios:

- Medio de cultivo celular: Medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico: penicilina y estreptomina (Sigma Aldrich) a razón de 100 UI/mL y 100 µg/mL respectivamente, 10% de suero fetal bovino (Sigma Aldrich) y L-Glutamina a una concentración 2 mM.
- Medio de lavado: Medio RPMI 1640 suplementado con 50 UI/mL de heparina sódica (Sigma Aldrich).

Se siguió el siguiente protocolo:

- Se mezcló 3 ml de medio de lavado con 3 mL de sangre en un tubo estéril de 15 ml.
- La mezcla previa se vertió en un nuevo tubo de 15 mL que contenía 3 mL de Histopaque-1077 (Sigma Aldrich). La mezcla se dejó caer por la pared evitando la aparición de turbulencias, hasta que se forme una monocapa en la zona superior.
- Se centrifugó durante 30 y 45 minutos a 500 x g sin usar el freno de la centrifugadora, en los grupos VI y TI respectivamente.
- Se recuperó el anillo blanco formado en la interfase plasma- Histopaque (que contiene el componente PBMC) con una pipeta Pasteur estéril y se depositó en tubos de 15 mL.
- Se añadió medio de lavado hasta 12 mL, se mezcló y centrifugó por 10 minutos a 250 x g. Este proceso se repitió dos veces más. Al finalizar se eliminó completamente el sobrenadante.
- Luego se resuspendió el sedimento (que contenía PBMC) con 1 mL de medio de cultivo celular.
- La determinación de la concentración celular y la viabilidad se realizó usando una cámara de Neubauer (Boeco) y Trypan Blue 0.4% (Sigma Aldrich).
- Se ajustó la concentración celular por pocillo de cultivo celular según el experimento y se incubaron las placas de cultivo celular en una estufa

a 37°C, 5% de CO₂ y humedad constante durante 72 horas (Flow Laboratories, Automatic CO₂ Incubator IR 1500).

Para el ensayo de linfoproliferación se ajustó la concentración a 2 x10⁵ células por pocillo, mientras que, para el ensayo de producción de citoquinas se ajustó a 4x10⁵ células por pocillo. Para tal fin se usaron placas de cultivo celular (Corning Costar) de fondo plano con 96 pocillos con tapa especial para disminuir la evaporación. El porcentaje de viabilidad celular varió entre 97 – 99%.

5.4. Ensayo de la capacidad proliferativa de las PBMC.

Este ensayo permitió estudiar la capacidad proliferativa linfoide a la estimulación con PHA, FhESP maduro y FhESP inmaduro. Se sembró por duplicado un volumen total de 100 uL/pocillo de medio de cultivo celular, los cuales contenían 2x10⁵ células (PBMC) de cada animal y estímulo a concentración de 5 ug/mL. Como control de estímulo (CE) se sembraron pocillos sólo con células, sin estímulo.

La linfoproliferación se midió mediante reacción colorimétrica usando el reactivo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) de Sigma Aldrich. Para ello, tras el tiempo requerido de incubación, se añadió a cada pocillo 10 uL de MTT a concentración de 5 mg/mL, luego se incubó durante 2 horas hasta formación de los cristales de formazán. Los cristales se disolvieron agregando 100 uL de isopropanol acidificado (0.04N HCl), previa centrifugación de las placas a 1800 RPM por 10 minutos y eliminación de sobrenadante.

La reacción colorimétrica producida es directamente proporcional al número total de células viables en el pocillo y por tanto de la linfoproliferación. Usando un lector de placas de ELISA (Awarenes Technology Inc), se determinó la absorbancia a 570 nm. La variación de la proliferación fue medida por un Índice de Estimulación (IE).

IE = (DOE – DOC)/DOE Donde:

IE: Índice de proliferación

DOE: Absorbancia de los cultivos estimulados con FhESP o mitógeno.

DOC: Absorbancia de los cultivos no estimulados con FhESP o mitógeno.

5.5. Ensayo de la producción de citoquinas de las PBMC.

Para la producción de citoquinas por parte de las PBMC, se sembró por duplicado un volumen de 200 uL/pocillo de cultivo celular, los cuales contenían 4x10⁵ células (PBMC) de cada animal y estímulo a concentraciones variables. PHA a concentración de 10 µg/mL, FhESP maduro e inmaduro a 10 µg/mL (en el caso del IFN-) o bien a 10 y 20 µg/mL (en el caso de la IL-4).

Trascurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las placas a 1800 RPM durante 10 minutos, se recolectó el sobrenadante por tratamientos y posteriormente se almacenó en congelación a -70 °C (Thermo Fisher Electronic Corporation). Sobre estos sobrenadantes de cultivo celular se determinó la concentración de las citoquinas IFN- e IL-4 por la técnica de ELISA.

5.5.1. Determinación de la producción de IFN- γ

Para la detección de la producción de IFN- γ se utilizó el kit comercial Bovine IFN Gamma ELISA Reagent Set (Genway Biotech Inc-USA), específico para IFN- γ bovino en sobrenadante de cultivo celular. El kit se basa en la técnica inmunoenzimática de ELISA y el empleo de anticuerpos monoclonales.

En el mencionado kit se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos cubiertos con anticuerpos específicos contra IFN- γ bovino. El ensayo se realizó siguiendo los procedimientos y recomendaciones del kit.

A continuación se detalla el procedimiento:

- A cada pocillo se le agregó 100 μ L del suero estándar o muestra (sobrenadante de cultivo celular) sin diluir y por duplicado.
- Se cubrió con la lámina selladora y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado.
- Se agregó a cada pocillo 100 μ L del reactivo que contenía los anticuerpos de detección.
- Se cubrió con la lámina selladora y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado.
- Se agregó a cada pocillo 100 μ L de Streptavidina-HRP.
- Se cubrió con la lámina selladora y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado.
- Se agregó 100 μ L del sustrato constituido por el Tetrametilbenzidine (TMB) (Genway Biotech Inc-USA) a cada pocillo. Se dejó desarrollar la reacción por 30 minutos a temperatura ambiente en un ambiente oscuro.
- Se paró la reacción agregando 100 μ L de solución de parada (H_2SO_4 0.18 M) a cada pocillo.
- Finalmente las placas fueron leídas en un lector de ELISA (Awarenes Technology Inc) a 450 nm.

Los resultados se expresaron en ng/mL de IFN- γ , calculado a través de una curva de calibración confeccionada con diluciones de un estándar que contenía 8 ng/mL de IFN- γ bovino recombinante.

5.5.2. Determinación de la producción de IL-4.

Para la detección de la producción de IL-4 se utilizó el kit comercial Bovine Interleukin-4 ELISA Kit (Bio-Rad), específico para IL-4 bovino en

sobrenadante de cultivo celular. Este kit, al igual que para el IFN- γ , se basa en la técnica de ELISA y el empleo de un anticuerpo monoclonal. El ensayo siguió los procedimientos y recomendaciones del kit.

A continuación se detalla el procedimiento:

- Se cubrieron los pocillos de la placa con 100 uL de anticuerpos primarios. Se incubó toda la noche a 4 °C, luego se lavó 3 veces con solución de lavado.
- Se agregó 200 uL de buffer de bloqueo. Se incubó a temperatura ambiente por 1 hora., luego se lavó 3 veces con solución de lavado.
- Se agregó 50 uL del estándar o muestra (sobrenadante de cultivo celular) por duplicado e incubó a temperatura ambiente por 1 hora, luego se lavó 3 veces con.
- Se agregó 100 uL del reactivo que contenía los anticuerpos de detección a cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente por 1 hora., luego se lavó 3 veces con solución de lavado.
- Se reveló con 100 uL de TMB y se dejó desarrollar por 30 minutos. La reacción se paró con 100 uL de solución de parada (H₂SO₄ 0.2M).
- Finalmente las placas fueron leídas en un lector de ELISA (Awarenes Technology Inc) a 450 nm.

Los resultados se expresaron en ng/mL de IL-4, calculado a través de una curva de calibración confeccionada con diluciones de un estándar que contenía 2 ng/mL de IL-4 bovino recombinante.

6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 22.0 e Infostat/E. Se calculó los parámetros descriptivos habituales (media y desviación estándar de cada variable). La prueba de análisis de varianza de dos vías y comparaciones múltiples de Tukey a 0.05 de significación fueron utilizadas para definir diferencias entre las variables grupo bovino y antígeno en relación a la respuesta proliferativa y expresión de citoquinas. En ambos casos se consideró significativo un nivel de $P < 0.05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado anteriormente, *Fasciola hepatica* es capaz de polarizar la respuesta inmunitaria del animal hacia una de tipo Th2 no protector, caracterizado por la producción de IL-4; facilitando así su desarrollo y establecimiento de infecciones crónicas y re-infecciones. Para caracterizar la respuesta celular en el ganado vacuno lechero de Cajamarca naturalmente infectado con *F. hepatica*, se han ensayado dos parámetros ampliamente utilizados en los estudios inmunológicos en infecciones parasitarias: capacidad proliferativa y la expresión de citoquinas de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La capacidad proliferativa de las PBMC se evaluó, tanto de manera inespecífica usando el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estímulo, como de manera específica frente a antígenos del parásito: Productos de secreción-excreción de los estadios inmaduro y maduro de *F. hepatica* (FhESP inmaduro y FhESP maduro).

Del mismo modo, el estudio de la expresión de citoquinas (IFN- γ e IL-4 típicas de respuestas Th1 y Th2 respectivamente), por parte de las PBMC fue determinada en respuesta a los estímulos específico e inespecífico, lo cual constituyó el elemento más importante para tipificar la respuesta inmune. En ambos estudios se utilizó dos grupos etéreo de animales, terneras y vacas infectadas naturalmente con *F. hepatica*, en las cuales el tiempo de infección influyó en las características de la respuesta inmune.

Estudios similares han sido realizados en infecciones por *F. hepatica* en distintos hospederos (Martinez-Moreno et al. 1999; Cervi et al. 2001; Cervi et al. 1998; Mendes et al. 2010a; Bossaert et al. 2000; Gironenes et al. 2007), incluyendo al bovino (McCole et al. 1999; Brown et al. 1994; Clery et al. 1996, Mendes et al. 2013). Sin embargo, en Perú es el primer trabajo en ganado vacuno lechero infectado naturalmente.

I. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS PBMC.

El estudio de la respuesta proliferativa de las PBMC se muestra en el Gráfico 01 y Tablas 01, 02, 03 y 04. Los datos están expresados en índice de estimulación (IE) linfocitaria, obtenidos en los diferentes grupos bovinos, terneras infectadas (TI), vacas infectadas (VI) y control no infectado (CNI), al usar los antígenos específico e inespecífico.

Las TI y VI desarrollaron una respuesta proliferativa a los antígenos específicos de *F. hepatica*, siendo las primeras las que presentaron mayor respuesta. Mientras que, los animales del CNI, tal como se esperaba, no mostraron respuesta específica, pero si una normal y potente respuesta al antígeno inespecífico (PHA). Asimismo, Los animales infectados, de ambos grupos, mostraron respuesta al antígeno inespecífico pero en menor intensidad en comparación al CNI (Gráfico 01).

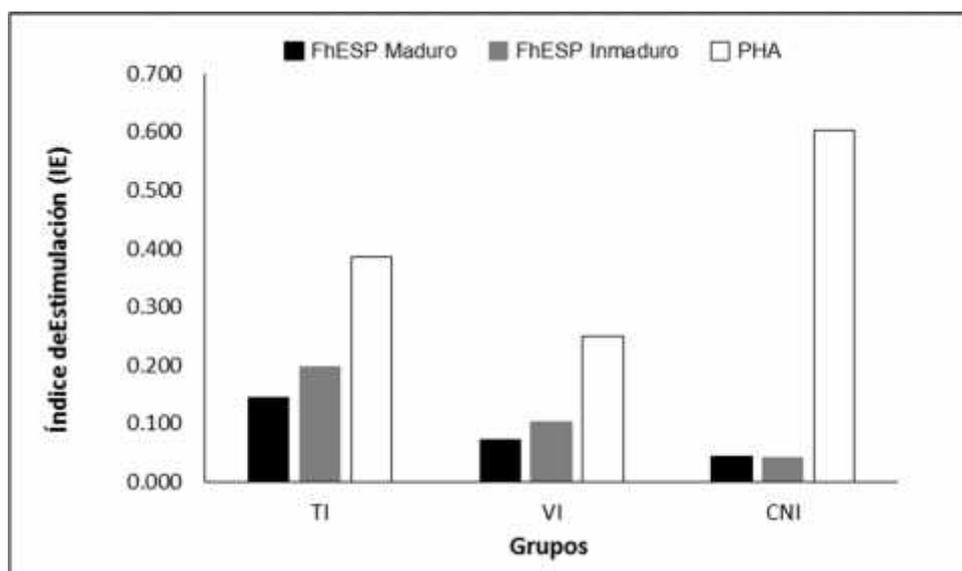


Gráfico 01. Promedio de los índices de estimulación proliferativa de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.

El análisis de varianza realizado a los promedios de los IE en relación a los factores: grupo bovino, antígenos e intersección; muestra que existe al menos alguna diferencia significativa en dichos promedios, tal como lo evidencia los valores de p ($p < 0.05$) (Tabla 01).

Tabla 01. Análisis de varianza de los IE proliferativa de PBMC en relación al grupo bovino, antígeno e intersección.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor*
Modelo	1.662	8	0.208	36.659	<0.0001
Grupo bovino	0.108	2	0.054	9.515	0.0004
Antígeno	1.176	2	0.588	103.708	<0.0001
Grupo bovino*Antígeno	0.379	4	0.095	16.707	<0.0001
Error	0.255	45	0.006		
Total	1.918	53			

*Valores $p < 0.05$ indican diferencia significativa. Alfa = 0.05.

Las comparaciones múltiples de promedios según prueba de Tukey muestra que existe diferencia significativa en la respuesta proliferativa entre las TI y VI, siendo en las primeras mayor. Asimismo, no se observa diferencia entre las TI y CNI, los que presentaron promedios estadísticamente similares (Tabla 02); no obstante esta igualdad estadística de los promedios generales, las TI y CNI presentaron una respuesta diferente cuando fueron enfrentados a los antígenos específico e inespecífico (tabla 04).

Tabla 02. IE proliferativa de PBMC según grupo de bovino.

<u>Grupo bovino</u>	<u>n</u>	<u>Promedio IE ± IC 95% *</u>
TI	18	0.243 ± 0.067 a
VI	18	0.142 ± 0.046 b
<u>CNI</u>	<u>18</u>	<u>0.229 ± 0.127 a</u>

*El promedio IE con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Tabla 03. IE proliferativa de PBMC según antígeno.

<u>Antígeno</u>	<u>n</u>	<u>Promedio IE ± IC 95% *</u>
FhESP inmaduro	18	0.115 ± 0.039 a
FhESP maduro	18	0.087 ± 0.035 a
<u>PHA</u>	<u>18</u>	<u>0.413 ± 0.082 b</u>

*El promedio IE con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

En cuanto a los antígenos, se observó que la respuesta linfocitaria originada por el antígeno FhESP inmaduro fue similar a los producidos por el FhESP maduro. Sin embargo el antígeno inespecífico PHA produjo respuestas significativamente mayores en comparación a los antígenos específicos (Tabla 03).

Tabla 04. IE proliferativa de PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.

<u>Grupo bovino</u>	<u>Antígeno</u>	<u>n</u>	<u>Promedio IE ± IC 95% *</u>
CNI	FhESP Inmaduro	6	0.042 ± 0.050 a
CNI	FhESP Maduro	6	0.043 ± 0.044 a
VI	FhESP Maduro	6	0.072 ± 0.024 ab
VI	FhESP Inmaduro	6	0.105 ± 0.050 ab
TI	FhESP Maduro	6	0.145 ± 0.062 abc
TI	FhESP Inmaduro	6	0.198 ± 0.039 bc
VI	PHA	6	0.250 ± 0.081 cd
TI	PHA	6	0.386 ± 0.083 d
<u>CNI</u>	<u>PHA</u>	<u>6</u>	<u>0.603 ± 0.106 e</u>

*El promedio IE con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

La respuesta proliferativa al antígeno inespecífico PHA en TI y VI fue similar entre ellos, pero significativamente menores en comparación al CNI (Tabla 04).

Estos resultados sugieren un efecto inmunosupresor de la infección por *F. hepatica* sobre PBMC de los animales infectados. De hecho, en las TI, debido a la probable infección reciente o cambio de la fase aguda a crónica, el grado de inmunosupresión es menor. Mientras que, por su mayor edad, mayor tiempo de

enfermedad y resistencia del parásito a ser eliminado con tratamiento farmacológico; las VI se encontrarían en fase crónica, en la cual la inmunosupresión es mayor. El efecto inmunosupresor de *F. hepatica* se explica en base a los múltiples papeles que juegan los antígenos parasitarios en la evasión e inmunomodulación ejercida por el parásito (Flynn et al. 2010).

El efecto de *F. hepatica* sobre la respuesta de las PBMC a mitógenos ha sido estudiada en bovinos (McCole et al. 1999; Brown et al. 1994), además en caprinos (Martinez-Moreno et al. 1999) y ratas (Gironenes et al. 2007; Cervi et al. 2001; Tliba et al. 2002a), poniendo de manifiesto diferencias interespecíficas así como entre infecciones agudas y crónicas. Así por ejemplo, en ganado vacuno infectado se produce una elevada respuesta a mitógenos con producción de IFN- en fases agudas, mientras que, en fases crónicas cae la respuesta a mitógenos y también la producción de IFN- (Clery et al. 1996).

Este efecto inmunosupresor en fases crónicas fue observado previamente en cabras (Martínez-Moreno et al. 1997) y ratas (Gironenes et al. 2007; Cervi et al. 1998). No obstante, el presente trabajo es el primero en estudiar la capacidad proliferativa y la expresión de citoquinas en PBMC de ganado vacuno lechero infectado naturalmente con *F. hepatica*, en respuesta al mitógeno PHA y antígenos de secreción-excreción del estadio inmaduro y maduro del parásito

En cuanto a los antígenos específicos, no se encontró diferencia en la respuesta proliferativa cuando se usó los antígenos de estadio inmaduro (FhESP inmaduro) o maduro (FhESP maduro) del parásito ($p < 0.05$), sin embargo ambos indujeron una débil respuesta en relación al PHA ($p < 0.05$). Estos datos muestran que este efecto inmunomodulador no varía respecto al origen de proteínas de secreción-excreción (estadio inmaduro o maduro de *F. hepatica*), donde se ha descrito previamente que composición molecular y la proporción de éstas, varían según el estadio del parásito (Morphew et al. 2007; Robinson et al. 2009). Y que por lo tanto, las proteínas de secreción-excreción, tanto del estadio inmaduro y maduro de *F. hepatica* tienen el potencial de inmunomodulador sobre el sistema inmune del hospedero.

En el presente estudio, como se esperaba, los animales del CNI no mostraron respuesta proliferativa a los estímulos específicos por carecer de exposición previa, mientras que los animales infectados (TI y VI) mostraron una respuesta muy baja, siendo las TI las que mostraron una respuesta superior. Estos resultados podrían indicar que, las terneras debido a una posible infección reciente aún tienen la capacidad de respuesta proliferativa específica. Sin embargo, el fallo la respuesta proliferativa en las VI frente a antígenos específicos concuerda con estudios previos en ovinos (Chauvin et al. 1995; Moreau et al. 1998), ratas (Gironenes et al. 2007), bovinos (Bossart et al. 2000) y en caprinos (Martinez-Moreno et al. 1997). Lo que confirma el efecto inmunomodulador que ejercen las proteínas de excreción-secreción del parásito sobre el sistema inmunológico del hospedero.

II. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DE LAS PBMC

En cuanto a los resultados del estudio de la expresión de citoquinas, éstos se muestran en los Gráficos 02 y 03 y Tablas de la 05 a la 12.

La expresión de IFN- γ por parte de las PBMC proliferadas con los estímulos específicos e inespecífico medida por la técnica de ELISA se muestra en el Gráfico 02 y Tablas de la 05 a la 08. Mientras que, la IL-4, medida por la misma técnica, se muestra en el Gráfico 03 y Tablas de la 09 a la 12.

Estudio de la expresión de IFN-

En el Gráfico 02 se puede observar que las PBMC de los animales de todos los grupos (TI, VI y CNI) son capaces de producir IFN- γ en respuesta al PHA; sin embargo, fallaron en su producción cuando estos fueron sometidos a los antígenos específicos de *F. hepatica* (FhESP inmaduro y FhESP maduro). No obstante, las TI evidenciaron expresión de IFN- γ en cantidades detectables, 0.479 y 0.159 ng/mL, en respuesta al FhESP inmaduro y maduro respectivamente. Esto es probablemente debido a la que en las TI la infección es reciente y por lo tanto existe aún la capacidad de responder con producción de IFN- γ , la que se iría extinguiendo a medida que la infección se hace crónica; tal como ha sido demostrado en estudios previos (Flynn et al. 2010; Clery et al. 1996)

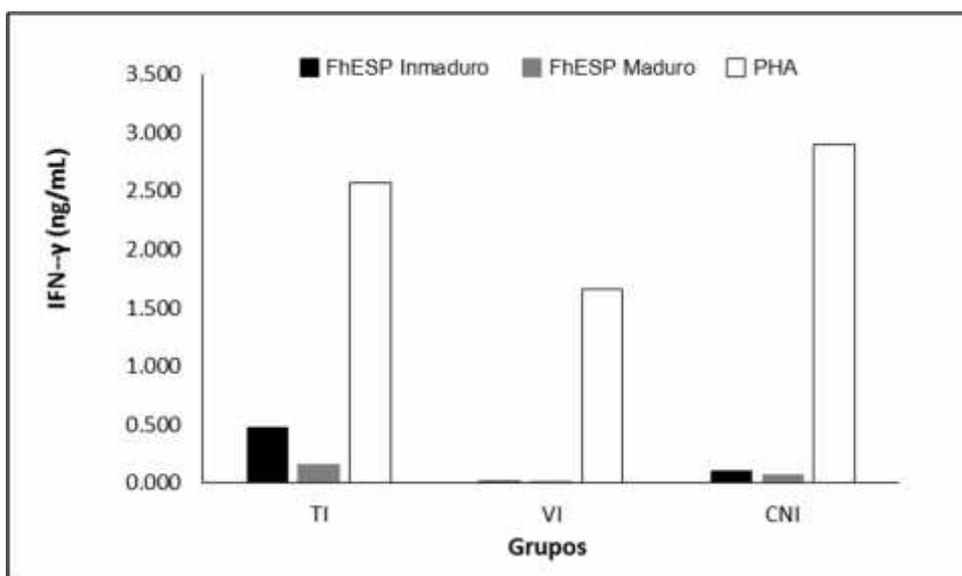


Gráfico 02. Promedio de la expresión de IFN- γ (ng/mL) de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.

Asimismo, el análisis de varianza realizado con los datos de la expresión de IFN- γ en relación al grupo de bovino y estímulo antigénico, muestra que la producción de ésta citoquina varió de forma significativa en uno o más de los tratamientos ensayados (Tabla 05).

Tabla 05. Análisis de varianza de la expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC en relación al grupo bovino, antígeno e intersección.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor*
Modelo	64.751	8	8.094	29.949	<0.0001
Grupo bovino	3.060	2	1.530	5.662	0.0064
Antígeno	59.080	2	29.540	109.305	<0.0001
Grupo bovino*Antígeno	2.611	4	0.653	2.415	0.0626
Error	12.161	45	0.270		
Total	76.912	53			

*Valores p <0.05 indican diferencia significativa. Alfa = 0.05.

De acuerdo a estos resultados, en promedio, las VI produjeron menor cantidad de IFN- respecto a las TI y a los animales del CNI (p<0.05), según prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 06). Asimismo, la producción de IFN- en promedio fue similar en el grupo de las TI y CNI (Tabla 06), lo cual indica que la competencia del sistema inmune celular en las TI se mantiene.

Tabla 06. Expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC según grupo bovino.

<u>Grupo bovino</u>	<u>n</u>	<u>Promedios ± IC 95%*</u>
VI	18	0.559 ± 0.152 a
CNI	18	1.059 ± 0.224 b
TI	18	1.068 ± 0.191 b

*El promedio IFN- con letras diferentes indican diferencias significativas (p<=0.05), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Por otro lado, en promedio, las PBMC de los tres grupos produjeron significativamente mayor cantidad de IFN- (2.372 ng/mL) en respuesta al PHA en comparación a los producidos con estímulos específicos (FhESP maduro y FhESP inmaduro), en los cuales la producción fue menor (Tabla 07).

Tabla 07. Expresión de IFN- (ng/mL) de las PBMC según antígeno.

<u>Antígeno</u>	<u>n</u>	<u>Promedios ± IC 95%*</u>
FhESP Maduro	18	0.078 ± 0.023 a
FhESP Inmaduro	18	0.236 ± 0.056 a
PHA	18	2.372 ± 0.151 b

*El promedio IFN- con letras diferentes indican diferencias significativas (p<=0.05), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

La mayor producción de IFN- γ , con 2.895 ng/mL, se observó en el grupo de animales del CNI en respuesta al PHA, seguido del grupo de las TI y VI, en respuesta al mismo antígeno. Mientras que, la menor producción de esta citoquina (0.010 y 0.011 ng/mL) se evidenció en el grupo de las VI estimuladas específicamente con FhESP maduro e inmaduro respectivamente, donde se observó el fallo total en la producción de IFN- γ (Tabla 08). Estos resultados se justifican por la capacidad del parásito para inmunomodular la respuesta inmune del hospedero a medida que la enfermedad avanza.

Tabla 08. Expresión de IFN- γ (ng/mL) de las PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.

<u>Grupo bovino</u>	<u>Antígeno</u>	<u>n</u>	<u>Promedios \pm IC 95%*</u>
VI	FhESP Inmaduro	6	0.010 \pm 0.004 a
VI	FhESP Maduro	6	0.011 \pm 0.007 a
CNI	FhESP Maduro	6	0.065 \pm 0.020 a
TI	FhESP Maduro	6	0.159 \pm 0.063 a
CNI	FhESP Inmaduro	6	0.219 \pm 0.078 a
TI	FhESP Inmaduro	6	0.479 \pm 0.127 a
VI	PHA	6	1.656 \pm 0.264 b
TI	PHA	6	2.565 \pm 0.208 bc
<u>CNI</u>	<u>PHA</u>	<u>6</u>	<u>2.895 \pm 0.212 c</u>

*El promedio IFN- γ con letras diferentes indican diferencias significativas ($p <= 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Estudio de la expresión de IL-4

En cuanto a la expresión de IL-4 por parte de las PBMC proliferadas, se observó que los animales de los dos grupos infectados (TI y VI) expresaron esta citoquina en respuesta a todos los estímulos, específico y no específico. No obstante, el CNI solo expresó esta citoquina en respuesta al PHA, más no cuando las PBMC de los animales de este grupo fueron sometidas a los estímulos específicos (Gráfico 03).

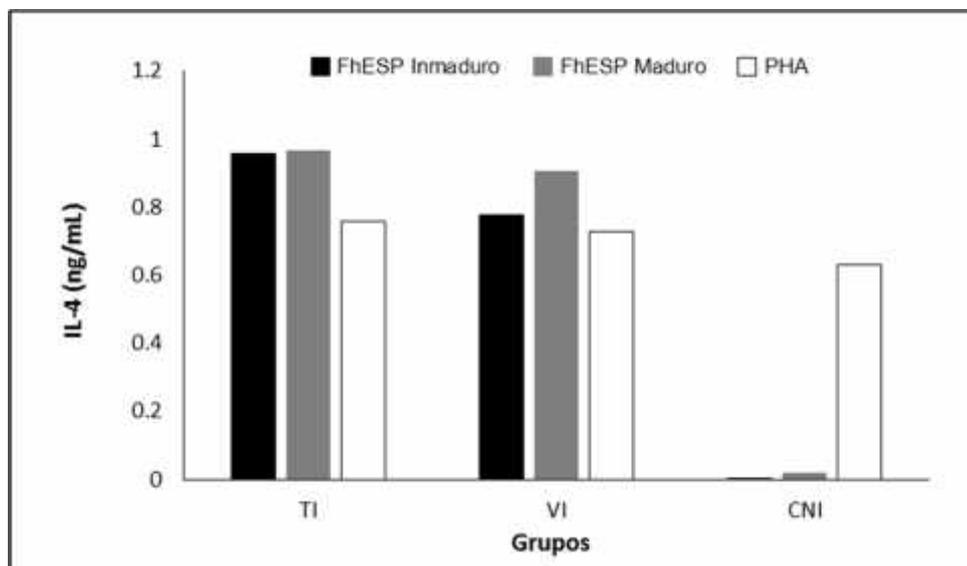


Gráfico 03. Promedio de la expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC de los animales infectados (TI y VI) y no infectado (CNI) con *F. hepatica*, frente a los antígenos FhESP Maduro, FhESP Inmaduro y PHA.

El análisis de varianza realizado a los datos de la expresión de IL-4 en relación al grupo bovino y de antígeno muestra que la producción de ésta citoquina varió de forma significativa en respuesta a uno o más de los tratamientos ensayados (Tabla 09). De acuerdo a estos resultados, se observó que las PBMC de los animales infectados, en promedio, produjeron significativamente mayor cantidad de esta citoquina en comparación a los animales del CNI, tal como lo muestra la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 10).

Tabla 09. Análisis de varianza de la expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC en relación al tipo de bovino, antígeno e intersección.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor*
Modelo	6.681	8	0.835	35.845	<0.0001
Grupo bovino	4.869	2	2.434	104.487	<0.0001
Antígeno	0.145	2	0.073	3.122	0.0538
Grupo bovino*Antígeno	1.667	4	0.417	17.886	<0.0001
Error	1.048	45	0.023		
Total	7.730	53			

*Valores $p \leq 0.05$ indican diferencia significativa. Alfa = 0.05.

Tabla 10. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según tipo bovino.

Grupo bovino	n	Promedios \pm IC 95%*
CNI	18	0.216 \pm 0.050 a
VI	18	0.802 \pm 0.026 b
TI	18	0.894 \pm 0.034 b

*El promedio IL-4 con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Asimismo, se observó que tanto los estímulos específicos e inespecífico generan una producción similar de IL-4, siendo el FhESP maduro con el que se obtuvo mayor cantidad de esta citoquina (Tabla 11). Por otro lado, tal como se esperaba, se evidenció que las PBMC del grupo CNI fallaron en la producción de IL-4 en respuesta a los estímulos específicos, toda vez que carecían de memoria inmunológica para estos (Tabla 12).

Tabla 11. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según antígeno.

Ag	n	Promedios \pm IC 95%*
FhESP Inmaduro	18	0.579 \pm 0.072 a
FhESP Maduro	18	0.629 \pm 0.072 ab
PHA	18	0.705 \pm 0.029 b

*El promedio IL-4 con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Tabla 12. Expresión de IL-4 (ng/mL) de las PBMC según la interacción grupo bovino y antígeno.

Grupo bovino	Antígeno		Promedios \pm IC 95%*
CNI	FhESP Inmaduro	6	0.002 \pm 0.002 a
CNI	FhESP Maduro	6	0.016 \pm 0.003 a
CNI	PHA	6	0.631 \pm 0.040 b
VI	PHA	6	0.726 \pm 0.052 bc
TI	PHA	6	0.759 \pm 0.057 bc
VI	FhESP Inmaduro	6	0.777 \pm 0.040 bc
VI	FhESP Maduro	6	0.904 \pm 0.032 bc
TI	FhESP Inmaduro	6	0.958 \pm 0.068 c
TI	FhESP Maduro	6	0.966 \pm 0.034 c

*El promedio IL-4 con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), según prueba de Tukey Alfa=0.05.

Este perfil de citoquinas con baja expresión de IFN- γ y alta de IL-4 demuestra que, la respuesta inmune celular en ganado vacuno lechero de Cajamarca infectado naturalmente con *F. hepatica*, está polarizada hacia una respuesta tipo Th2.

No obstante la baja expresión de IFN- γ de ambos grupos TI y VI frente al estímulo específico (FHESP), las PBMC del grupo de las TI expresaron una cantidad significativamente mayor en comparación a las VI ($p < 0.05$). Este resultado se puede explicar debido a que las TI debido a su probable reciente infección, responden todavía, aunque débilmente, con expresión de IFN- γ antes de polarizarse a una respuesta Th2, donde la IL-4 es la dominante.

Asimismo, estos resultados concuerdan con estudios experimentales realizados anteriormente, donde se ha puesto de manifiesto la producción de IFN- γ típica de la respuesta Th1 durante las primeras semanas de infección (Clery et al. 1996; Tliba et al. 2002a; Tliba et al. 2002b). Sin embargo, en etapas crónicas dicha producción decae hasta extinguirse, evidenciándose el cambio a una respuesta Th2 con elevada expresión de IL-4 (Brown et al. 1994; Gironenes et al. 2007; O'Neill et al. 2000).

No obstante lo descrito anteriormente, otros dos estudios experimentales, uno realizado en ovejas de raza ITT resistentes a infección por *F. gigantica* (Pleasant et al. 2011) y el otro en conejos con alta protección conferidos con una vacuna contra *F. hepatica* (Espino y Rivera 2010); muestran que una respuesta temprana tipo Th1 o la dominancia de esta, está asociado a protección y resistencia a la infección.

Sin embargo, el presente estudio, reitera que en animales naturalmente infectados la respuesta está polarizada hacia una respuesta de tipo Th2, lo que evidencia el efecto inmunosupresor e inmunomodulador que ejerce la infección por *F. hepatica* en el

hospedero. Estos resultados concuerdan con un trabajo realizado también en ganado lechero infectado natural y crónicamente con *F. hepatica* en Brasil, donde se demostró que las células de tejido hepático de los animales expresan altas cantidades de IL-4 e IL-10 en relación al IFN- γ , típica de una respuesta Th2 (Mendes et al. 2013).

Estos resultados también ponen en evidencia que el efecto inmunosupresor e inmunomodulador hacia respuesta tipo Th2 que induce la infección por *F. hepatica* en ganado naturalmente infectado, afecta su capacidad para responder normalmente a otras infecciones, principalmente aquellas que requieren de una potente respuesta tipo Th1, como las producidas por agentes biológicos intracelulares. Esta consecuencia negativa y agravante de la infección por *F. hepatica* ha sido reportada en estudios con animales infectados experimentalmente con *F. hepatica* y otro agente infeccioso; *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn et al. 2007), *Bordetella pertusis* (Brady et al. 1999) y *Toxoplasma gondii* (Miller et al. 2009).

La capacidad inmunomoduladora de los FhESP sobre el hospedero, se explica por la amplia variedad y funciones de las proteínas que lo componen (Dowling et al. 2010; Morphew et al. 2007; Robinson et al. 2009; Dalton et al. 2003; O'Neill et al. 2001; Sexton et al. 1990). Entre estas proteínas, la peroxirredoxina (FhPrx) demostró inducir la activación de los macrófagos por la vía alternativa (AAM \emptyset), y ésta su vez, promueve la respuesta Th2 (Robinson et al. 2010, Donnelly et al. 2005). También, la catepsina L1 (FhCL1), en otro estudio, se demostró que inhibe la activación de los macrófagos por la vía clásica (CAM \emptyset) y suprime el desarrollo de una respuesta Th1 (Hamilton et al. 2009). Asimismo, también se ha demostrado que los FhESP indujeron propiedades tolerogénicas en células dendríticas mieloides e inhibieron la respuesta proliferativa de células esplénicas a mitógenos (Falcon et al. 2010; Cervi y Masih 1997).

Por otro lado, la expresión de citoquinas no se diferenció al usarse los antígenos provenientes de estadios inmaduros y maduros del parásito ($p < 0.05$), en los que se han descrito diferencias de proporción y composición molecular (Morphew et al. 2007; Robinson et al. 2009). Lo que sugiere, que tanto el estadio inmaduro que migra a través del parénquima hepático, como el maduro que ocupa los conductos biliares, tienen la capacidad para inmunomodular la respuesta inmune del hospedero a través de la acción de sus proteínas de secreción-excreción.

Se concluye que, vacas y terneras naturalmente infectadas con *F. hepatica* mostraron una disminuida capacidad para responder frente al estímulo inespecífico (PHA) y específico (FhESP), poniendo de manifiesto el efecto inmunosupresor de la infección. Asimismo, las vacas infectadas responden con una respuesta inmune polarizada Th2, con niveles bajos de IFN- γ y altos de IL-4. En tanto que, las terneras infectadas expresaron niveles significativamente más altos de IFN- γ en comparación con las vacas, no obstante, ambos grupos expresaron cantidades similares de IL-4. Esto demuestra la inmunomodulación de la respuesta a medida que avanza la enfermedad. El uso de antígenos del estadio inmaduro (FhESP inmaduro) y maduro (FhESP maduro) del parásito no mostraron tener una respuesta inmune diferente.

Asimismo nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune tipo Th2 en ganado naturalmente infectado con *F. hepatica*, observada previamente en infección experimental, puede también ser responsable del establecimiento de la fase crónica, reinfección y el mantenimiento de la infección natural en ganado de áreas endémicas donde los animales se encuentran en continuo contacto con el parásito.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

1. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de terneras y vacas infectadas naturalmente con *F. hepatica* mostraron una disminuida capacidad de respuesta proliferativa inespecífica frente al mitógeno fitohemaglutinina (PHA).
2. Las PBMC de los animales infectados con *Fasciola hepatica* mostraron una débil respuesta proliferativa a los antígenos específicos, siendo en las terneras superior. No se encontró diferencia en la respuesta cuando se usó los antígenos de estadio inmaduro (FhESP inmaduro) o maduro (FhESP maduro) del parásito.
3. El perfil de citoquinas con baja expresión de IFN- γ y alta de IL-4 por las PBMC estimulados con antígenos específicos, observada en los animales infectados y en particular en las vacas, indica que la respuesta inmunitaria celular en infección natural por *F. hepatica* se mantiene polarizada hacia un tipo Th2.
4. Las PBMC de las terneras infectadas expresaron mayor IFN- γ en comparación a las vacas en respuesta a los estímulos específicos, lo que demuestra la inmunomodulación de la respuesta a medida que avanza la enfermedad. Sin embargo no se observó diferencias en cuanto a los antígenos de estadio inmaduro (FhESP inmaduro) o maduro (FhESP maduro) del parásito.

Recomendaciones:

1. Estudiar la respuesta inmunitaria celular en animales infectados usando antígenos de metacercarias y estadios juveniles de *F. hepatica*.
2. Estudiar la respuesta inmunitaria celular en ganado co-infectado naturalmente con fasciolosis y eimeriosis u otras parasitosis; con el fin de determinar cómo se afecta la respuesta frente a *F. hepatica*, en presencia de co-infecciones.
3. Investigar la respuesta inmunitaria celular en ganado infectado naturalmente con *F. hepatica* frente a antígenos de diferentes estadios de *F. hepatica*, en conjunto con otros estímulos inductores de respuesta Th1 como el lipopolisacárido bacteriano.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pober, J. 2002, "Células y Tejidos del Sistema Inmunitario". Edit. McGraw-Hill Interamericana.
- Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., & Tort, J.F. 2008. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158, (1) 52-64.
- Angulo-Cubillín, F., Molero, M., Escalona, F., Muñoz, J., & Ramírez Barrios, R. 2007. Prevalencia y dinámica de hpg mensual de *Fasciola hepatica* y otros helmintos en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. *Revista Científica*, 17, 111-116
- Beltrán, M., Tello, R., & Náquira, C. 2003. Manual de Procedimientos para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Instituto Nacional de Salud, Perú.
- Blanco-Penedo, I., Haglund, J., Fall, N., & Emanuelson, U. 2012. Exposure to pasture borne nematodes affects individual milk yield in Swedish dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 188, (1-2) 93-98.
- Bossaert, K., Jacquinet, E., Saunders, J., Farnir, F., & Losson, B. 2000. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 88, (1-2) 17-34.
- Brady, M.T., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., & Mills, K.H.G. 1999. *Fasciola hepatica* Suppresses a Protective Th1 Response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 67, (10) 5372-5378.
- Brown, W.C., Davis, W.C., Dobbelaere, D.A., & Rice-Ficht, A.C. 1994. CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infection and Immunity*, 62, (3) 818-827.
- Buffoni, L., Martínez-Moreno, F.J., Zafra, R., Mendes, R.E., Pérez-Écija, A., Sekiya, M., Mulcahy, G., Pérez, J., & Martínez-Moreno, A. 2012. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 185, (2-4) 315-321.
- Buffoni, L., Zafra, R., Pérez-Écija, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez-Galisteo, E., Moreno, T., Pérez, J., & Martínez-Moreno, A. 2010. Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitology International*, 59, (2) 147-153.
- Cervi, L., Cejas, H., & Masih, D.T. 2001. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *International Journal for Parasitology*, 31, (13) 1467-1473.

- Cervi, L. & Masih, D.T. 1997. Inhibition of spleen cell proliferative response to mitogens by excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 27, (5) 573-579.
- Cervi, L., Rossi, G., Cejas, H., & Masih, D.T. 1998. *Fasciola hepatica*-Induced immune suppression of spleen mononuclear cell proliferation: role of nitric oxide. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 87, (2) 145-154.
- Cervi, L., Rubinstein, H., & Masih, D.T. 1996. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinary Parasitology*, 61, (1-2) 97-111.
- Chauvin, A., Bouvet, G., & Boulard, C. 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal for Parasitology*, 25, (10) 1227-1241.
- Claxton, J.R., Zambrano, H., Ortiz, P., Delgado, E., Escurra, E., & Clarkson, M.J. 1997. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitology International*, 46, (4) 281-288.
- Clery, D., Torgerson, P., & Mulcahy, G. 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62, (1-2) 71-82.
- Craig, T.M. 1988. Impact of internal parasites on beef cattle. *Journal of animal science*, 66, (6) 1565-1569.
- Dalton, J.P., Neill, S.O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A.G., & Donnelly, S.M. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: Biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33, (11) 1173-1181.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., & Dalton, J.P. 2005. Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infection and Immunity*, 73, (1) 166-173.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Stack, C.M., Robinson, M.W., Turnbull, L., Whitchurch, C., & Dalton, J.P. 2010. Helminth Cysteine Proteases Inhibit TRIF-dependent Activation of Macrophages via Degradation of TLR3. *Journal of Biological Chemistry*, 285, (5) 3383-3392.
- Dowling, D.J., Hamilton, C.M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P.M., Dalton, J., & O'Neill, S.M. 2010. Major Secretory Antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* Activate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype That Attenuates Th17 Cells but Fails To Activate Th2 Immune Responses. *Infection and Immunity*, 78, (2) 793-801.
- Escalante, H., Davelois, K., Ortiz, P., Rodríguez, H., Díaz, E., & Jara, C. 2011. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Western blot technique standardization of the diagnosis of human fasciolosis using *Fasciola**

- hepatica* excreted-secreted antigens. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 28 (3) 454-461.
- Espino, A.M. & Rivera, F. 2010. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis. Veterinary Parasitology, 169, (1-2) 82-92.
- Espinoza, J.R., Terashima, A., Herrera-Velit, P., & Marcos, L.A. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 27, 604-612
- Ezenwa, V.O. & Jolles, A.E. 2011. From Host Immunity to Pathogen Invasion: The Effects of Helminth Coinfection on the Dynamics of Microparasites. Integrative and Comparative Biology, 51, (4) 540-551.
- Falcón, C.R., Carranza, F.A., Aoki, P., Motran, C.C., & Cervi, L. 2012. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Fasciola hepatica* antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. Journal of Infectious Diseases, 205, (3) 506514.
- Falcón, C., Carranza, F., Martínez, F.F., Knubel, C.P., Masih, D.T., Motrán, C.C., & Cervi, L. 2010. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. Veterinary Immunology and Immunopathology, 137, (2010) 36-46.
- Flynn, R.J. & Mulcahy, G. 2008a. The roles of IL-10 and TGF- β in controlling IL-4 and IFN γ production during experimental *Fasciola hepatica* infection. International Journal for Parasitology, 38, (14) 1673-1680.
- Flynn, R.J., Mulcahy, G., & Elsheikha, H.M. 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. Veterinary Parasitology, 169, (3-4) 235-240.
- Flynn, R.J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O., & Mulcahy, G. 2007. Experimental *Fasciola hepatica* Infection Alters Responses to Tests Used for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. Infection and Immunity, 75, (3) 1373-1381.
- Flynn, R.J. & Mulcahy, G. 2008b. Possible Role for Toll-Like Receptors in Interaction of *Fasciola hepatica* Excretory/Secretory Products with Bovine Macrophages. Infection and Immunity, 76, (2) 678-684.
- Gaudier, J.F., Caban-Hernandez, K., Osuna, A., & Espino, A.M. 2012. Biochemical Characterization and Differential Expression of a 16.5-Kilodalton Tegument-Associated Antigen from the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. Clinical and Vaccine Immunology, 19, (3) 325-333.
- Gironenes, N., Valero, M.A., Garcia-Bodelon, M.A., Chico-Calero, I., Punzon, C., Presno, M., & Mas-Coma, S. 2007. Immune Suppression in Advanced Chronic Fascioliasis: An Experimental Study in a Rat Model. Journal of Infectious Diseases, 195, (10) 15041512.

Guasconi, L., Serradell, M.C., Garro, A.P., Iacobelli, L., & Masih, D.T. 2011. C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology*, 133, (3) 386-396.

Hamilton, C.M., Dowling, D.J., Loscher, C.E., Morphey, R.M., Brophy, P.M., & O'Neill, S.M. 2009. The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. *Infection and Immunity*, 77, (6) 2488-2498.

Hewitson, J.P., Grainger, J.R., & Maizels, R.M. 2009. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167, (1) 1-11.

INEI 2007, Censo de población y vivienda 2007.

Ingale, S.L., Singh, P., Raina, O.K., Verma, A.K., Channappanavar, R., & Mehra, U.R. 2010. Interleukin-2 and interleukin-10 gene expression in calves experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Livestock Science*, 131, (1) 141-143.

Jedlina-Panasiuk, L. 2002. The immune response of various species to *Fasciola hepatica* infection. *Wiadomo ci parazytologiczne*, 48, (1) 11-21.

Jenkins, S.J. & Allen, J.E. 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010,

Khan, M.K., Sajid, M.S., Khan, M.N., Iqbal, Z., & Iqbal, M.U. 2009. Bovine fasciolosis: Prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Research in Veterinary Science*, 87, (1) 70-75.

Loke, P., Gallagher, I., Nair, M.G., Zang, X., Brombacher, F., Mohrs, M., Allison, J.P., & Allen, J.E. 2007. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *Journal of Immunology*, 179, (6) 3926-3936.

Lopez, M., White, A.C., Jr., & Cabada, M.M. 2012. Burden of *Fasciola hepatica* Infection among Children from Paucartambo in Cusco, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, (3) 481-485.

Luo, H. L., Wang, D. Y., Wang, H. J., Nie, K., & Huang, W. Y. MyD88 is required for the recruitment of eosinophils and neutrophils but dispensable for host protective immune responses during *Fasciola hepatica* infection. *Immunobiology*. 2012. Ref Type: In Press.

Marcilla, A., De la Rubia, J.E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay, F.J., Esteban, J.G., & Toledo, R. 2008. Leucine Aminopeptidase Is an Immunodominant Antigen of *Fasciola hepatica* Excretory and Secretory Products in Human Infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15, (1) 95-100.

Marcos, L.A., Maco, V., Terashima, A., Samalvides, F., Miranda, E., Tantalean, M., Espinoza JR, & Gotuzzo, E. 2004. Hiperendemicidad de fasciolosis humana en el Valle del

- Mantaro, Perú: factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. Revista de Gastroenterología del Perú, 24, 158-164
- Marcos, L.A., Terashima, A., Samalvides, F., Miranda, E., Tantalean, M., Espinoza, J.R., & Gotuzzo, E. 2007. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. Revista de Gastroenterología del Perú, 27, 389-396
- Marcos, L., Maco, V., Terashima, A.I., Samalvides, F., Espinoza, J.R., & Gotuzzo, E. 2005. Fascioliasis in relatives of patients with *Fasciola hepatica* infection in Peru. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 47, 219-222
- Martinez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Moreno, T., Redondo, E.S.H., De Las Mulas, J.M., & Pérez, J. 1999. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. Veterinary Parasitology, 82, (1) 19-33.
- Martinez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I., Gutierrez, P.N., Becerra, C., & Hernández, S. 1997. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. Parasitology Research, 83, (7) 680-686.
- McCole, D.F., Doherty, M.L., Baird, A.W., Davies, W.C., McGill, K., & Torgerson, P.R. 1999. T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. Parasite Immunology, 21, (1) 1-8.
- Mendes, R.E., Pérez-Écija, R.A., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Dalton, J.P., Mulcahy, G., & Pérez, J. 2010a. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. Vaccine, 28, (16) 2832-2840
- Mendes, R.E., Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Tendler, M., & Pérez, J. 2010b. Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 105, (5) 698-705.
- Mendes E, De Oliveira T, Lopes S, and Menezes-Souza D. 2013. Expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 195, (1-2) 177-182.
- Miller, C.M.D., Smith, N.C., Ikin, R.J., Boulter, N.R., Dalton, J.P., & Donnelly, S. 2009. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing Protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. PLoS ONE, 4, (5).
- Morales, A. & Espino, A.M. 2012. Evaluation and Characterization of *Fasciola hepatica* Tegument Protein Extract for Serodiagnosis of Human Fascioliasis. Clinical and Vaccine Immunology, 19, (11) 1870-1878.
- Moreau, E., Chauvin, A., & Boulard, C. 1998. Lack of humoral and cellular responses against glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica* experimentally infected sheep. Veterinary Research, 29, (6) 585-591.

- Morphew, R.M., Wright, H.A., LaCourse, E.J., Woods, D.J., & Brophy, P.M. 2007. Comparative Proteomics of Excretory-Secretory Proteins Released by the Liver Fluke *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during in Vitro Culture ex Host. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6, (6) 963-972.
- Moxon, J.V., Flynn, R.J., Golden, O., Hamilton, J.V., Mulcahy, G., & Brophy, P.M. 2010. Immune responses directed at egg proteins during experimental infection with the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunology*, 32, (2) 111-124.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J., & Dalton, J.P. 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, 16, (9-10) 932-939.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H.G., & Dalton, J.P. 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, 22, (3) 147-155.
- O'Neill, S.M., Mills, K.H.G., & Dalton, J.P. 2001. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon gamma production in vivo. *Parasite Immunology*, 23, (10) 541-547.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P., & Solana, H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195, (1-2) 118-121.
- Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J., & Williams, D.J.L. 2000. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93, (2) 121-134.
- Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sández, C., & Martínez-Moreno, A. 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *Journal of Comparative Pathology*, 127, (1) 30-36.
- Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E., & Piedrafita, D. 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunology*, 33, (9) 495-505.
- Raadsma, H.W., Kingsford, N.M., Suharyanta, Spithill, T.W., & Piedrafita, D. 2008. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Merino sheep. II. Development of a predictive index for *Fasciola gigantica* worm burden. *Veterinary Parasitology*, 154, (3-4) 250-261.
- Robinson, M.W., Donnelly, S., Hutchinson, A.T., To, J., Taylor, N.L., Norton, R.S., Perugini, M.A., & Dalton, J.P. 2011. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathogens*, 7, (5).
- Robinson, M.W., Hutchinson, A.T., Dalton, J.P., & Donnelly, S. 2010. Peroxiredoxin: A central player in immune modulation. *Parasite Immunology*, 32, (5) 305-313.

Robinson, M.W. & Dalton, J.P. 2009. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, (1530) 2763-2776.

Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P., & Ranganathan, S. 2009. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8, (8) 1891-1907.

SENASA. Informe Anual, diciembre 2007. Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Cajamarca, Perú.

Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., & Masih, D.T. 2007. Excretory/secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, (3-4) 197-208.

Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T.W., & Mitchell, G.F. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *The Journal of Immunology*, 145, (11) 3905-3910.

Sexton, J.L., Wilce, M.C., Colin, T., Wijffels, G.L., Salvatore, L., Feil, S., Parker, M.W., Spithill, T.W., & Morrison, C.A. 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *The Journal of Immunology*, 152, (4) 1861-1872.

Tliba, O., Moire, N., Vern, Y.L.E., Boulard, C., Chauvin, A., & Sibille, P. 2002a. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Research*, 33, (3) 261-270.

Tliba, O., Sibille, P., Boulard, C., & Chauvin, A. 2002b. Early hepatic cytokine mRNA expression in experimental rat fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 103, (3) 237-249.

Torres, D. & Espino, A.M. 2006. Mapping of B-Cell Epitopes on a Novel 11.5-Kilodalton *Fasciola hepatica*-*Schistosoma mansoni* Cross-Reactive Antigen Belonging to a Member of the *F. hepatica* Saposin-Like Protein Family. *Infection and Immunity*, 74, (8) 4932-4938.

Valencia, N., Pariona, A., Huamán, M., Miranda, F., Quintanilla, S., & Gonzales, A. 2005. Seroprevalencia de fasciolosis en escolares y ganado vacuno en la provincia de Huancavelica, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22, (2) 96-102

Walsh, K.P., Brady, M.T., Finlay, C.M., Boon, L., & Mills, K.H.G. 2009. Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF-beta-Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses. *The Journal of Immunology*, 183, (3) 1577-1586.

Wynn, T.A. 2009. Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses. *Natural Immunology*, 10, 679-681

Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Écija, R.A., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., & Pérez, J. 2009. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Research in Veterinary Science*, 87, (2) 226-232.

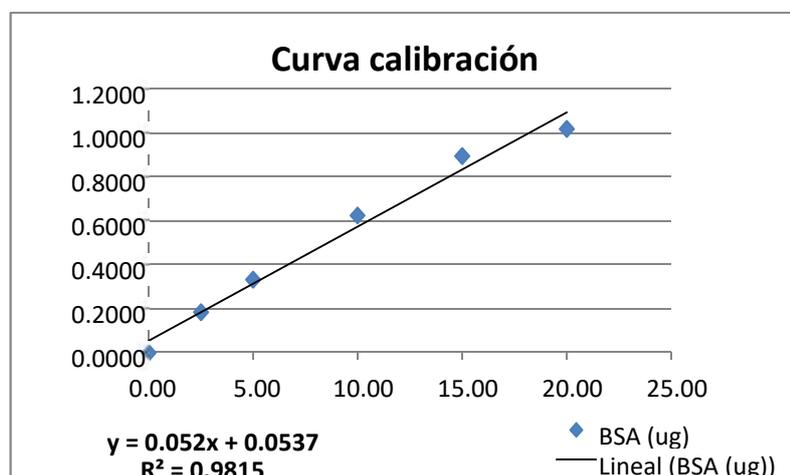
APÉNDICES

Anexo 01. Grupos Experimentales

Código	Animales	TSR (hpg)	Western Blot	Procedencia
VI-1	Elsi	14	Positivo	UNC Tartar
VI-2	Olga	10	Positivo	UNC Tartar
VI-3	Dina	12	Positivo	UNC Tartar
VI-4	Redonda	24	Positivo	Villa Sta. Luzmila
VI-5	Tatiana	16	Positivo	Villa Sta. Luzmila
VI-6	Ada	11	Positivo	UNC Tartar
TI-1	Fedora	6	Positivo	UNC Tartar
TI-2	Sandy	6	Positivo	UNC Tartar
TI-3	Cecilia	12	Positivo	Villa Sta. Luzmila
TI-4	Nube	4	Positivo	UNC Tartar
TI-5	Valentina	12	Positivo	Los Alpes
TI-6	Anelis	6	Positivo	Los Alpes
CNI-1	Oti	0	Negativo	UNC Tartar
CNI-2	Jade	0	Negativo	UNC Tartar
CNI-3	Novy	0	Negativo	UNC Tartar
CNI-4	Evelyn	0	Negativo	UNC Tartar
CNI-5	Mayte	0	Negativo	UNC Tartar
CNI-6	Julieta	0	Negativo	Los Alpes

Anexo 02. Cuantificación de Proteínas FhES - Protein Assay Bradford BioRad

Item	BSA (ug)	Mx (uL)	Rx (mL)	Abs-1	Abs-2	Abs-X	Abs Blanco	Prot. (ug/20uL)	Prot. (ug/mL)
Blanco	0.00	20.00	1.00	0.5364	0.5460	0.5412	0.0000
S1 (125 ug/mL)	2.50	20.00	1.00	0.7235	0.7250	0.7243	0.1831
S2 (250 ug/mL)	5.00	20.00	1.00	0.8734	0.8727	0.8731	0.3319
S3 (500 ug/mL)	10.00	20.00	1.00	1.1644	1.1673	1.1659	0.6247
S4 (750 ug/mL)	15.00	20.00	1.00	1.4334	1.4383	1.4359	0.8947
S5 (1000 ug/mL)	20.00	20.00	1.00	1.5596	1.5598	1.5597	1.0185
L1 - 16.07 (10h)	20.00	1.00	0.8845	0.8860	0.8853	0.3441	5.60	279.86
L2 - 16.17 (22h)	20.00	1.00	1.4483	1.4460	1.4472	0.9060	16.40	820.14
L3 - 16.07 (P22h)	20.00	1.00	0.7700	0.7702	0.7701	0.2289	3.38	169.13
19.04	20.00	1.00	0.8727	0.8724	0.8726	0.3314	5.35	267.64
1.05	20.00	1.00	1.2485	1.2501	1.2493	0.7081	12.60	629.90
1.05 (PBS)	20.00	1.00	0.8557	0.8634	0.8596	0.3184	5.10	255.14
5.05	20.00	1.00	1.3415	1.3488	1.3452	0.8040	14.44	722.07
L3 - 02.07	20.00	1.00	0.8833	0.8831	0.8832	0.3420	5.56	277.88



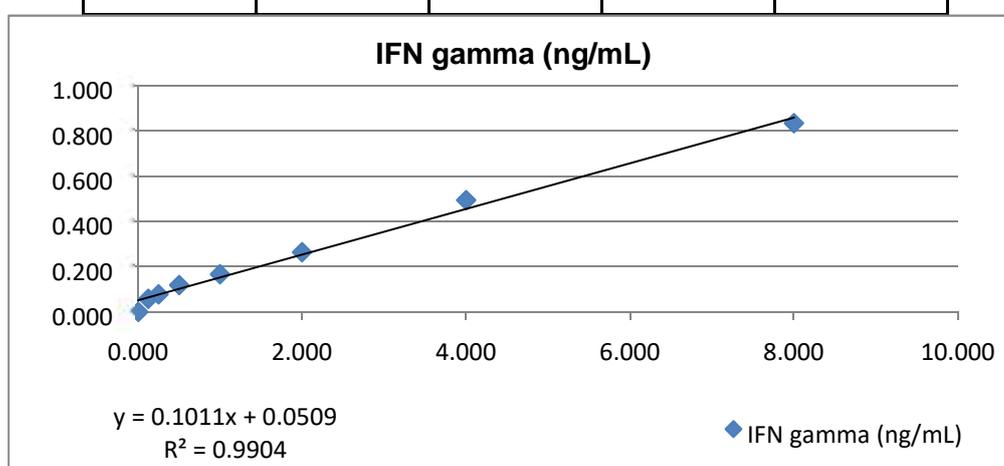
Anexo 03. Ficha de Registro - Estudio linfoproliferación y producción de citoquinas

Grupo 1 - Repetición experimento N° (1) (2) (3)

Ttto.		Linfoproliferación (100 uL/pozo - 250,000 cel/pozo - 5'000,000 cel/mL) 2cc						Citoquinas (200 uL/pozo - 500,000 cel/pozo - 5'000,000 cel/mL) 2cc					
		FhESP-M (5ug/mL)	FhESP-I (5ug/mL)	PHA (5ug/mL)	CE (Medio+linf.)			FhESP-M (10ug/mL)	FhESP-M (20ug/mL)	FhESP-I (10ug/mL)	FhESP-I (20ug/mL)	PHA (10ug/mL)	
Grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CNI	A												
CNI	B												
	C												
VI	D												
VI	E												
	F												
TI	G												
TI	H												

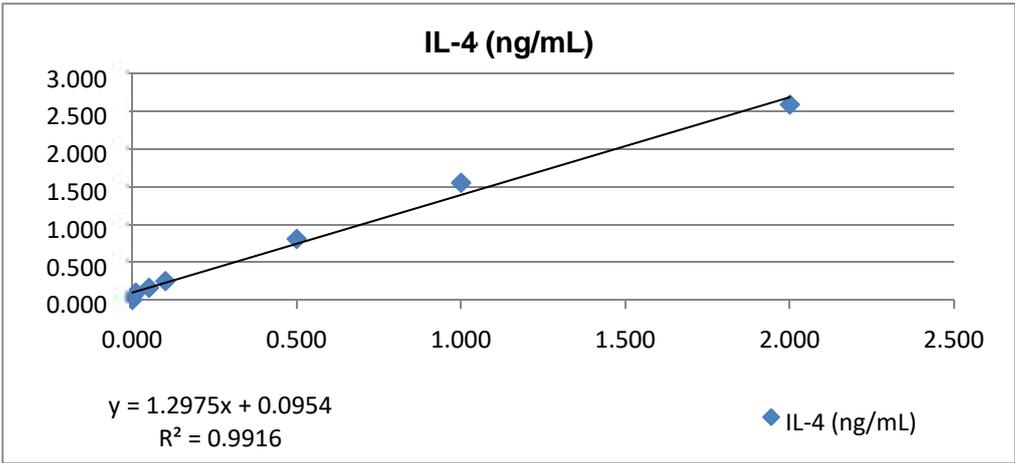
A. Curva de calibración para cuantificación de IFN gamma (ng/mL)

Std (ng/mL)	OD Std 1	OD Std 2	OD prom	OD-Blanco
0.000	0.240	0.248	0.244	0.000
0.125	0.302	0.300	0.301	0.057
0.250	0.326	0.317	0.321	0.077
0.500	0.368	0.358	0.363	0.119
1.000	0.414	0.408	0.411	0.167
2.000	0.506	0.509	0.508	0.264
4.000	0.734	0.742	0.738	0.494
8.000	1.079	1.079	1.079	0.835



B. Curva de calibración para cuantificación de IL-4 (ng/mL)

Std (ng/mL)	OD Std 1	OD Std 2	OD prom	OD-Blanco
0.000	0.152	0.166	0.159	0.000
0.002	0.224	0.201	0.213	0.054
0.010	0.261	0.255	0.258	0.099
0.050	0.308	0.328	0.318	0.159
0.100	0.398	0.415	0.407	0.248
0.500	0.946	0.992	0.969	0.810
1.000	1.752	1.672	1.712	1.553
2.000	2.799	2.705	2.752	2.593



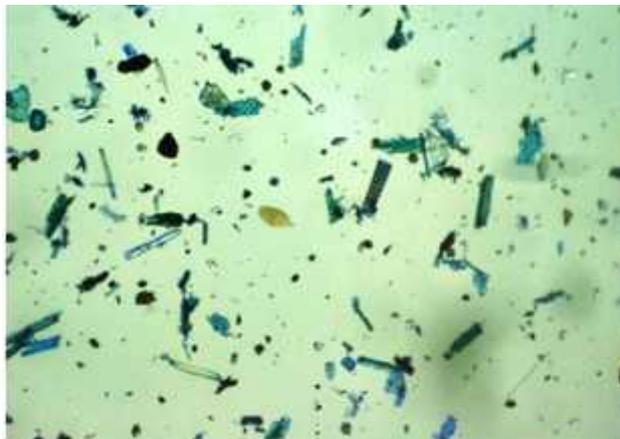
Anexo 05. Imágenes



Colección de las muestras de heces



Procesamiento de 2g de heces por la técnica de sedimentación



Huevos de *F. hepatica* observados al estereoscopio



Toma de muestra sanguínea por punción yugular con sistema de extracción al vacío

EXO	23	17	Nº
			1
			2
			3
			4
			5
			6
			7
			8
			9

Tiras de nitrocelulosa en las que se han revelado bandas diagnósticas positivas a anticuerpos contra *F. hepatica*.



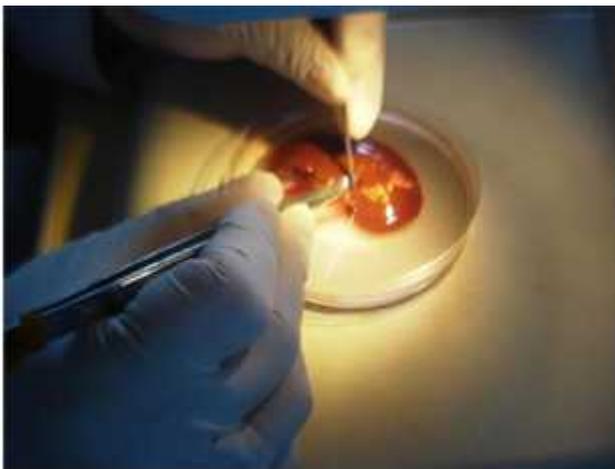
Se cultivó las fasciolas en RPMI 1640 suplementado con antibiótico a 37°C / 12 h / 5% CO₂ / humedad. A razón de 2 fasciolas / mL



Se infectaron 10 cuyes (proporcionados por INIA) con 20 metacercarias de *F. hepatica* bovina



Posterior a la infección se sacrificaron los animales 28 días PI.



El parénquima hepático se examinó en busca de los estadios inmaduros de *F. hepatica*.



Los especímenes recuperados fueron lavados 4 veces con PBS 0.01M y una con RPMI 1640 atemperados a 37°C



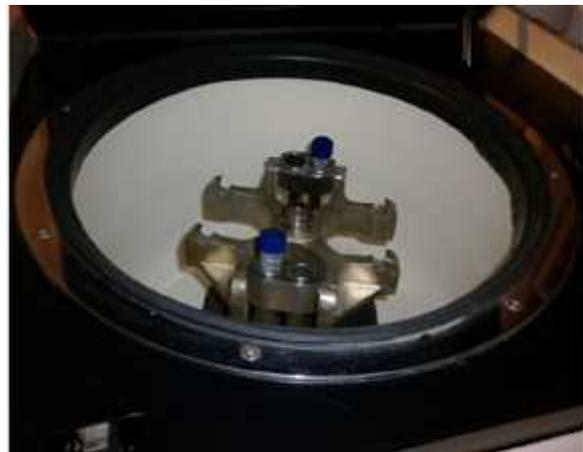
Se cultivó las fasciolas en RPMI 1640 suplementado con antibiótico a 37°C / 24 h / 5% CO₂ / humedad. A razón de 10 fasciolas / mL



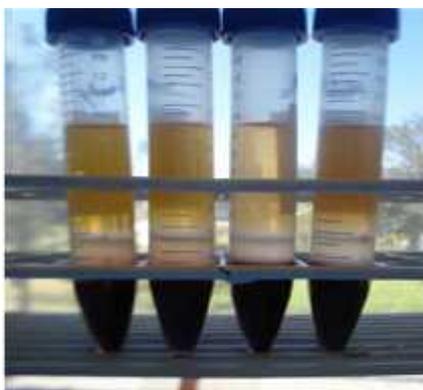
Los FhESP fueron cuantificadas por espectrofotometría usando el kit Protein Assay, Bio Rad.



La preparación se centrifugó a 1000g o 1600RPM/ 30 minutos en las vacas y 40 minutos en las terneras



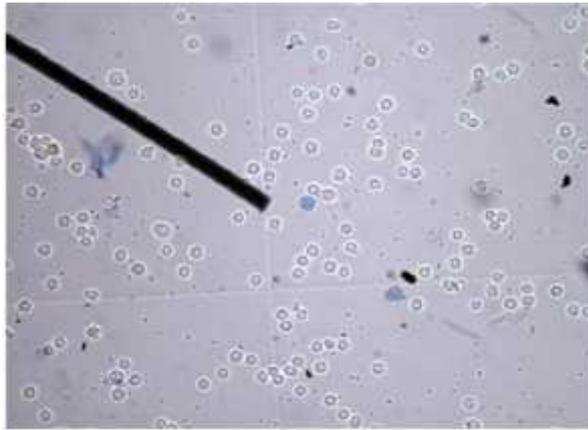
Se utilizó una centrifuga con rotor de ángulo horizontal.



Posterior a la centrifugación el anillo de PBMC se formó en la interfase plasma - Histopaque



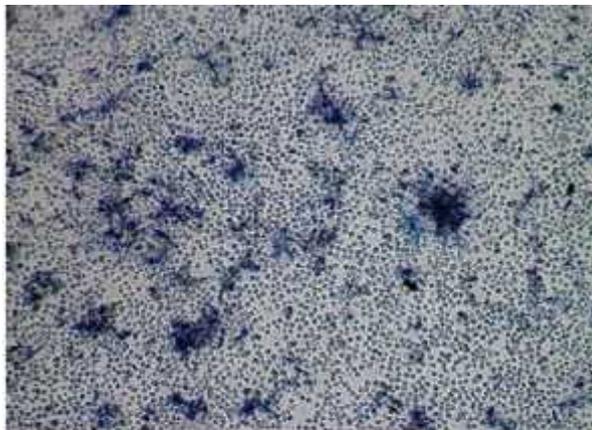
Se resuspendió el sedimento celular en un mililitro de medio de cultivo celular (RPMI 1640 + antibiótico + 10% SFB).



Se determinó la concentración y viabilidad celular usando trypan blue 0.4% y cámara de Neubauer.



PBMC a razón de 2.5×10^6 células/pozo se enfrentaron a los FhESP-M, FhESP-I y PHA. Se incubó a 37°C / 72 h / 5% CO_2 / humedad.



Una hora antes de culminar la incubación se agregó 10 uL de MTT 5mg/mL e incubó por una hora.



Los cristales de formazán se disolvieron agregando 100uL de isopropanol ácido y leídos a 570 nm.



Las placas se centrifugaron a 1800 RPM/10 min.



Las citoquinas IFN- γ e IL-4 fueron cuantificados en sobrenadantes de cultivos celulares a través de la técnica de ELISA.



Las placas se leyeron en un lector de placas a 450 nm.