

Ensayo de inmunización con thiol-proteinasas de vermes adultos de *Haemonchus contortus* en ganado caprino

Hernández, Y.; Quesada, J.; Ortega, L.; Martín, S.; Ruiz, A.; González, J. F. & Molina, J. M.*
Unidad de Parasitología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de G.C.

RESUMEN: Las cisteína-proteinasas de *Haemonchus contortus*, debido a su función crítica evidente en la fisiología del verme, se consideran candidatos importantes en el control inmunológico de la haemonchosis en oveja. Sin embargo, existe una información limitada o parcial de las propiedades inmunoprotectoras de dichas moléculas en ganado caprino. En el presente estudio evaluamos la protección conferida por cisteína (tiol)-proteinasas aisladas de vermes adultos de este parásito, enriquecidas por cromatografía de afinidad. La inmunoprotección quedó reflejada en una reducción significativa del 73,3% ($p=0.019$) del recuento fecal de huevos en el lote inmunizado con respecto al lote testigo, y en una reducción de vermes que osciló entre el 53,2% y el 65,6 %.

Introducción

Los nematodos gastrointestinales son responsables de importantes pérdidas económicas en el sector ganadero. En el ganado caprino en particular, las parasitosis producidas por estos nematodos se consideran como una de las infecciones más extendidas e importantes mundialmente (24). Entre los distintos nematodos que afectan al tracto gastrointestinal del ganado caprino, *Haemonchus contortus* destaca por su amplia distribución y por su elevada patogenicidad. Entre los efectos patógenos que produce destacan la anemia, hipoproteinemia y retraso en el crecimiento, pudiendo llegar a provocar la muerte en animales jóvenes fuertemente parasitados. Tradicionalmente las parasitosis han sido controladas por medio de tratamientos con antihelmínticos. Sin embargo, la persistencia de residuos farmacológicos en productos animales y el desarrollo de resistencia a los mismos (6) han estimulado la búsqueda de otras estrategias de control (2). Una de las alternativas que se ha planteado ha sido la inducción de res-

puestas inmunes protectoras mediante la inmunización con antígenos parasitarios tanto en ganado ovino como (1, 7, 13, 25, 33, 34, 36) como bovino (10,11).

Uno de los antígenos parasitarios que ha despertado interés como inmunógeno protector son las enzimas tiol-proteinasas, por considerarse decisivas para el ciclo de vida de muchos nematodos y trematodos. La capacidad de estas enzimas para degradar proteínas como la hemoglobina sugiere que desarrollan funciones vitales relacionadas con la nutrición de algunos parásitos hematófagos (8, 16, 18, 27). A estas importantes funciones se añade su abundancia, como revela el análisis de los productos excretados/secretados o del ADNc que codifica estas enzimas –especialmente a nivel intestinal– en nematodos hematófagos como *H. contortus* (15).

En esta línea de investigación, se realizaron ensayos previos en nuestro laboratorio cuyos resultados apuntan la posibilidad de utilizar en ganado caprino estas enzimas proteolíticas como inmunógenos frente a *H. contortus*. En ese primer ensayo, la

inmunización con tiol-proteinasas procedentes de vermes adultos fueron capaces de proteger de forma significativa frente a una infección experimental con este parásito, determinando una reducción en el número de vermes que alcanzan el estado adulto, y la consiguiente disminución en la eliminación de huevos fecales, fuente de contagio para los animales susceptibles (29).

A pesar de estos resultados prometedores, es necesario profundizar en distintos aspectos para tratar de mejorar el grado de protección inducido. Así, por ejemplo, sería necesario determinar cuáles de las más de 50 proteinasas con actividad tiol son responsables de esta protección (15, 31), así como los mecanismos inmunológicos involucrados en dicha protección, o los estadios evolutivos del parásito afectados por estas respuestas.

En esta línea, en el presente trabajo se trata de confirmar el efecto inmunoprotector de estas enzimas proteolíticas obtenido en ensayos previos, a la vez que analizar de forma preliminar algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados

Correspondencia

José M. Molina

Correo-e: jmolina@dpat.ulpgc.es

en estas respuestas, atendiendo al estado evolutivo del parásito frente al cual se desarrollan, así como el efecto de la inmunización sobre algunos parámetros biopatológicos relacionados con la actividad patógena del parásito (valor hematocrito y concentración de proteínas plasmáticas).

Material y métodos

1. Obtención de L3 de *Haemonchus contortus*:

La cepa de *Haemonchus contortus* utilizada en este estudio se obtuvo a partir de animales infectados de forma natural y sacrificados en el Matadero Insular de Gran Canaria. Las hembras adultas de este nematodo, se maceraron y se incubaron con una mezcla de heces y turba estériles durante 10 días a 22 °C. A partir de los huevos intrauterinos, se desarrollaron L3 del parásito que se aislaron tras el coprocultivo mediante el método de Baermann (9, 22). Estas L3 sirvieron para la inoculación experimental vía intraruminal de animales donantes, que una vez reproducido el ciclo del parásito sirvieron, bien para la obtención de un mayor número de L3, o para la obtención de vermes adultos tras el sacrificio de dichos animales donantes.

2. Obtención de tiol-proteinasas de vermes adultos de *Haemonchus contortus*

El aislamiento de estas enzimas se llevó a cabo mediante un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución (FPLC), utilizando como absorbente columnas de Thiol-Sepharosa y siguiendo el protocolo propuesto por Knox et al. (1999) (19,20), con ligeras modificaciones (28). La actividad proteolítica de la mezcla eluida fue determinada posteriormente mediante espectrofotometría, utilizando una solución de azocaseína (83,3 mg/ml) como sustrato a distintos pH (17). La incubación con el inhibidor enzimático E64 0,2 mM, permitió finalmente constatar su

naturaleza cisteína-proteinasas. La concentración proteica de la mezcla se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (4), procediéndose a su conservación a -20° C.

3. Diseño experimental

A fin de determinar el efecto de la inmunización sobre los estadios inmaduros (periodo prepatente) y adultos del parásito (periodo patente), el estudio se ha estructurado en dos experimentos:

- Experimento 1: En el que los animales de experimentación fueron sacrificados a las 4 semanas del desafío con L3 del parásito, después de que fueran inmunizados con las enzimas cisteína-proteinasas.
- Experimento 2: En el que se siguió un procedimiento similar, pero en esta ocasión los animales de experimentación fueron sacrificados a las 8 semanas del desafío.

En ambos experimentos se consideraron dos grupos de animales: Lote inmunizado (Lote I; n=6) y Lote testigo de la inmunización (Lote T; n=6).

Los animales del lote I se sometieron a un protocolo de inmunización de 5 semanas con dosis crecientes de enzimas tiol-proteinasas de *H. contortus*, mientras que los incluidos

en el lote T, recibieron solamente adyuvante. Una vez finalizados dichos protocolos (inmunización o adyuvante), todos los animales de los lotes I y T, se sometieron a un desafío con L3 del parásito, siendo finalmente sacrificados todos a las 4 semanas (Experimento 1) o las 8 semanas (Experimento 2) del estudio (Fig. 1).

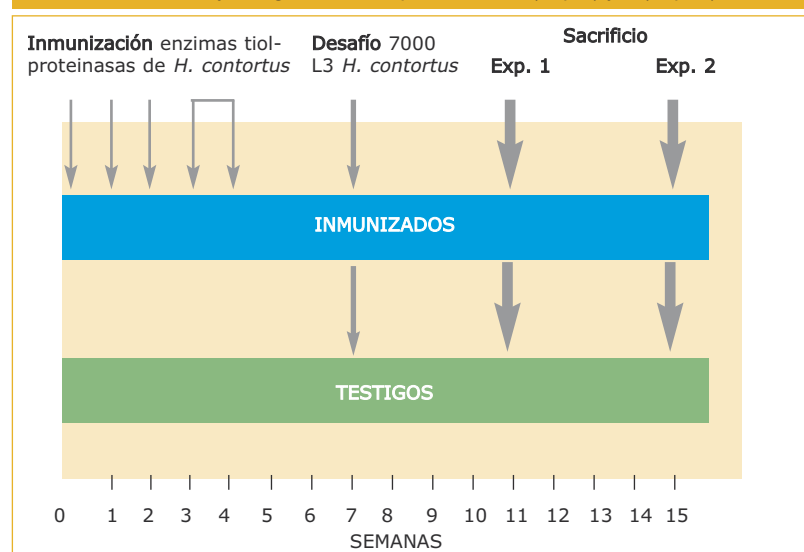
3.1 Animales

En cada uno de estos experimentos se utilizaron cabras de raza Majorera que fueron adquiridas en una explotación del Sur de Gran Canaria, y mantenidas en condiciones libres de nematodos hasta que contaron con 9 meses de edad, momento en el que se inició cada experimento.

3.2 Protocolo de inmunización

Los animales de los lotes inmunizados se inmunizaron semanalmente durante cinco semanas consecutivas. Estas inmunizaciones se hicieron por vía intramuscular. La primera inoculación (semana 1) se llevó a cabo con 50 µg del antígeno en adyuvante completo de Freund, mientras que las cuatro restantes (semanas 2, 3, 4 y 5) se realizaron con dosis crecientes de dicho antígeno

Figura 1. Esquema del protocolo de inmunización y sacrificio de los lotes de animales inmunizados y testigos en los experimentos 1 (Exp.1) y 2 (Exp. 2).



(75, 100, 100 y 400 µg respectivamente), utilizándose en este caso como vehículo del antígeno, adyuvante incompleto de Freund (3, 28) (Fig. 1).

3.3 Desafío

Dos semanas después de finalizar el protocolo de inmunización, los animales de los lotes I y T de ambos experimentos se inocularon por vía intrarruminal con 7.000 L3 infectantes de *H. contortus* de una cepa del parásito aislada según quedó recogido en el punto 1 de este apartado de Material y Métodos (Fig. 1).

3.4 Recogida de muestras

3.4.1 Muestras sanguíneas

Durante todo el periodo experimental se extrajeron, con una frecuencia semanal, muestras de sangre de todos los animales investigados. Dichas muestras fueron utilizadas para analizar los dos parámetros hematológicos considerados (valor hematocrito y concentración de proteínas plasmáticas) siguiendo procedimientos estándar.

3.4.2 Muestras fecales

A partir de la tercera semana después del desafío, se recogieron dos muestras fecales semanales de todos los animales infectados experimentalmente. Dichas muestras se tomaron directamente del recto y fueron utilizadas tanto para la realización de estudios coprológicos cualitativos como cuantitativos (5, 22, 36).

3.5 Sacrificio

Como se indicó previamente, se llevó a cabo a las 4 (Experimento 1) o 8 (Experimento 2) semanas después del desafío. En este momento se recogió el abomaso de los animales investigados, procesándose siguiendo distintos protocolos en función de los análisis realizados posteriormente. El

órgano fue abierto y se lavó para determinar el número de vermes adultos. Así mismo, se llevaron a cabo raspados de la mucosa para determinar el número de formas inmaduras.

3.5.1. Recuentos de vermes adultos

Tras abrir los abomasos a lo largo de su curvatura mayor, se realizó el lavado con agua destilada de la cara interna del mismo, tratando de recoger todo el material adherido. Tras medir el volumen total recogido en cada caso, se tomaron alícuotas de 200 ml a las que se adicionó formaldehído hasta conseguir una concentración final del 10 % (v/v). Sobre dichas alícuotas se determinó el número total de vermes (machos y hembras).

3.5.2. Recuentos de vermes inmaduros

Se llevó a cabo sobre raspados de mucosa gástrica de la región del fondo de los animales inoculados. Estas muestras se sometieron a una digestión péptica (a base de pepsina, HCL y NaCL) a 37°C en agitación durante 15-30 minutos). Finalmente, se frenó la reacción mediante la adición de formaldehído hasta alcanzar una concentración final del 5% (v/v), conservándose

la mezcla a 4 °C hasta su posterior examen microscópico (modificado de MAFF, 1989) (22).

3.6. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete informático PAWS versión 18.0. Se utilizó el test U de Mann-Whitney para contrastar los valores medios de vermes observados en cada lote. Por su parte, los muestreos seriados (recuentos fecales, valor hematocrito y concentración de proteínas plasmáticas), se analizaron mediante el modelo general lineal para muestras repetidas. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor *p* fue menor o igual a 0,05.

Resultados

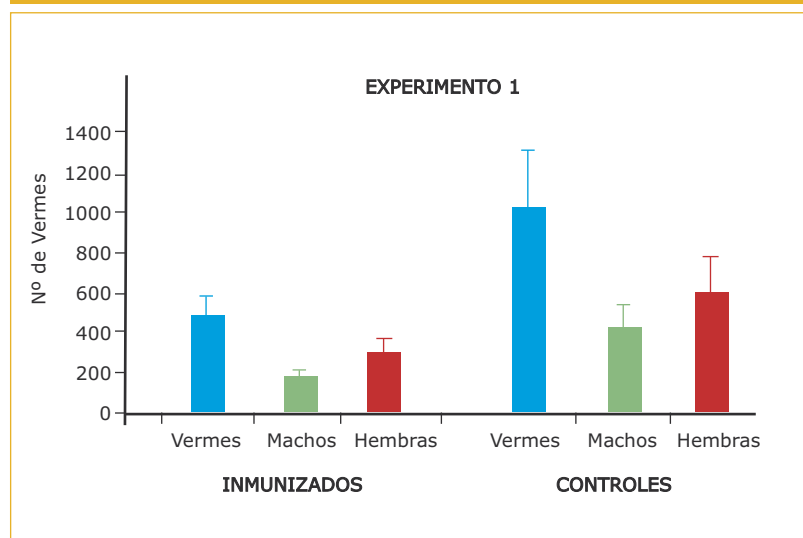
1. Resultados parasitológicos

1.1. Recuento de vermes adultos

1.1.1 Experimento 1

Los recuentos de vermes tanto de los animales sacrificados al final del periodo prepatente, tanto los inmunizados como los utilizados como testigos, se encuentran recogidos en la figura 2.

Figura 2. Número medio de vermes totales (\pm ES) y diferenciados por sexo en los lotes de animales inmunizados y controles sacrificados a las 4 semanas del desafío (Experimento 1).



En dicha figura se puede apreciar que, mientras que valor medio total de vermes recogidos en los animales que se sometieron al protocolo de inmunización antes del desafío fue de $476,0 \pm 96$ (IC 95% 280-744), este mismo parámetro en el grupo testigo presentó un valor medio de 1018 ± 287 vermes (IC 95 % 220-1816). La reducción total de vermes que podríamos atribuir por tanto a la inmunización en este caso sería del 53,2 %.

A la hora de valorar la reducción en función del sexo, ésta afectó de forma más importante a los machos (% reducción=59,2 %), al observarse unos recuentos medios de 172 ± 35 (IC 95 % 68-277) y 423 ± 114 (IC 95 % 105-740). Por su parte la reducción del número de hembras fue del 49,0 %, con valores medios que oscilaron entre 304 ± 60 (IC 95 % 136-471) y 595 ± 174 (IC 95 % 113-1078) en animales inmunizados y testigo respectivamente. Ambas reducciones no fueron estadísticamente significativas.

1.1.2 Experimento 2

Se observó un porcentaje de reducción en los animales inmunizados con respecto a los testigos, superiores a los obtenidos en el experi-

mento anterior. De este modo, la reducción en el número total de vermes fue del 65,6 %, mientras que en el número de machos y hembras fue del 65,1 % y el 65,9 % respectivamente, no observándose significación en ninguna de las reducciones. Los datos pormenorizados de este apartado se encuentran recogidos en la figura 3. En esta ocasión, los valores medios de vermes totales en los animales inmunizados fue de 392 ± 156 (IC 95 % 0,0-794). Por su parte, estos recuentos totales alcanzaron un valor medio en los animales testigos de 1.140 ± 370 (IC 95 % 189-2090) vermes.

En relación con los datos observados en los recuentos de vermes diferenciados por sexo, los datos referidos a machos presentaron unos valores medios de 157 ± 77 (IC 95 % 0-354) y 450 ± 164 (IC 95 % 29-872) vermes en inmunizados y testigos respectivamente, mientras que dichos datos para las hembras fueron de 235 ± 82 (IC 95 % 23-447) y 689 ± 210 (IC 95 % 150-1228).

1.2 Recuento de larvas en mucosa

No se encontraron larvas (formas inmaduras) en ninguno de los animales de los experimentos realizados.

1.3 Recuentos coprológicos

1.3.1 Experimento 1

Dado que los animales incluidos en este experimento fueron sacrificados coincidiendo con el periodo prepatente, no se disponen de datos correspondientes a este parámetro.

1.3.2 Experimento 2

Los resultados observados en este apartado se encuentran recogidos en la figura 4. En dicha figura se han representado los recuentos fecales acumulados tanto del lote inmunizado como del lote testigo a lo largo del estudio. En dicha figura, se puede apreciar que el periodo prepatente fue de 4 semanas en ambos lotes, constándose una reducción general del número de huevos fecales al final del estudio del 73,3 % en el grupo de animales inmunizados en relación con los observados en el lote testigo. Si prestamos atención a los recuentos fecales de los diferentes grupos de animales por semana, podemos apreciar diferencias significativas entre ambos a partir de la semana 11, hasta la última semana del experimento, a excepción de una de las muestras recogidas de la semana 15.

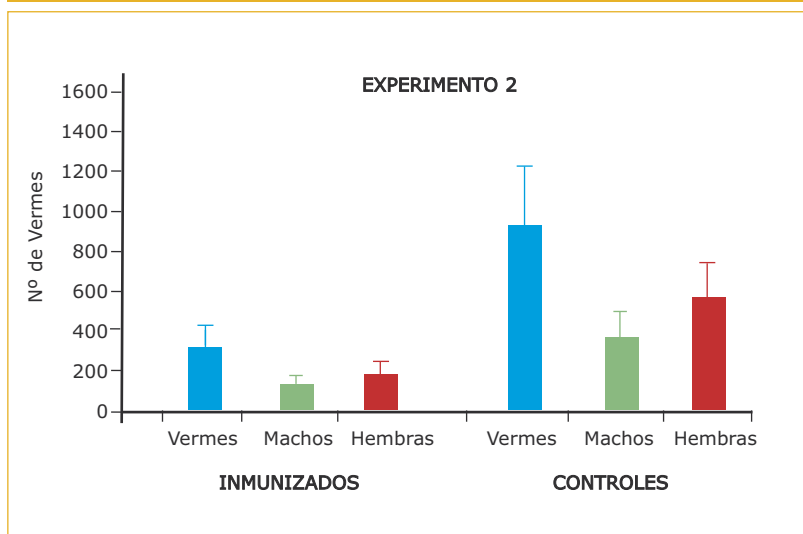
2. Resultados hematológicos

2.1. Evolución del valor hematocrito

2.1.1 Experimento 1

Los datos respecto a la evolución del hematocrito (valor medio \pm ES) se encuentran recogidos en la figura 5. En dicha figura podemos apreciar los valores medios de los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 4 semanas del desafío. Como muestra dicha figura, el valor medio del lote vacunado fue de $29,6\% \pm 0,0081$ (IC 95% 0,273-0,313) y del grupo testigo $30\% \pm 0,0089$ (IC 95% 0,281-0,32). Si bien dicho valor medio fue algo más elevado en el grupo inmunizado, no se

Figura 3. Número medio de vermes totales (\pm ES) y diferenciados por sexo en los lotes de animales inmunizados y controles sacrificados a las 8 semanas del desafío (Experimento 2).



observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

2.2.2 Experimento 2

De igual forma, el hematocrito fue ligeramente más elevado en el grupo inmunizado, sin que llegaran a detectarse diferencias significativas entre ambos grupos. Así el valor medio para los animales vacunados fue del $33\% \pm 0.0058$ (IC 95% 0.315-0.339) y la de los testigos de un $30\% \pm 0.0065$ (IC 95% 0.287-0.314). Los datos de dicho parámetro quedan representados en la figura 6.

2.2. Evolución de los niveles de proteínas séricas

2.2.1 Experimento 1

Los datos referidos a este parámetro se encuentran representados en la figura 7, observándose el recuento de proteínas plasmáticas séricas semanales (valor medio \pm ES) en los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 4 semanas del desafío. La media del grupo vacunado fue de $7,308 \text{ g/dl} \pm 0.0718$ (IC 95% 7.14-7.47) y la de los testigos de $6,814 \text{ g/dl} \pm 0.0991$ (IC 95% 6.59-7.04), no observándose diferencias significativas entre ambos grupos, comparando los datos generales de todo el estudio con respecto a este parámetro.

Si atendemos a los datos por semana, nos encontramos con diferencias significativas entre ambos grupos en la semana 8ª en los animales vacunados de $7.72 \pm 0.205 \text{ g/dl}$ (IC 95% 7.247-8.193) y en los animales testigos de $7.04 \pm 0.205 \text{ g/dl}$ (IC 95% 6.567-7.513), y en la semana 10ª en los animales vacunados de $6.960 \pm 0.170 \text{ g/dl}$ (IC 95% 6.569 - 7.351), mientras que en los testigos fue de $6,000 \pm 0.170 \text{ g/dl}$ (IC 95% 5.609- 6.391).

2.2.2 Experimento 2

Tras el estudio de los valores medios de la proteínas plasmáticas en sangre, se observó una gran diferencia

inicial entre ambos lotes, inmunizados y testigos por lo que llevamos a cabo un ajuste teniendo en cuenta esas diferencias iniciales mediante del valor medio de los datos antes de iniciar la experiencia. La representación de la evolución de este parámetro una vez ajustado en el curso del experimento se encuentra recogida en la figura 8. En dicha gráfica podemos apreciar que, si bien el valor medio

general fue más elevado en el grupo inmunizado, no se encontraron diferencias significativas, con valores medios de $7.082 \text{ g/dl} \pm 0.071$ (IC 95% 6.929-7.235) el lote inmunizado y 6.258 ± 0.062 (IC 95% 6.124-6.390) para el lotes testigo.

Al analizar semanalmente este parámetro, se pudo constatar unos valores medios significativamente más elevados en el grupo inmunizado

Figura 4. Recuentos fecales acumulados (valor medio \pm ES) en lotes de animales inmunizados y controles sacrificados a las 8 semanas del desafío (Experimento 2). Se realizaron dos muestreos semanales (A-B) una vez que la inoculación fue patente (semana 11, 4 semanas después del desafío).

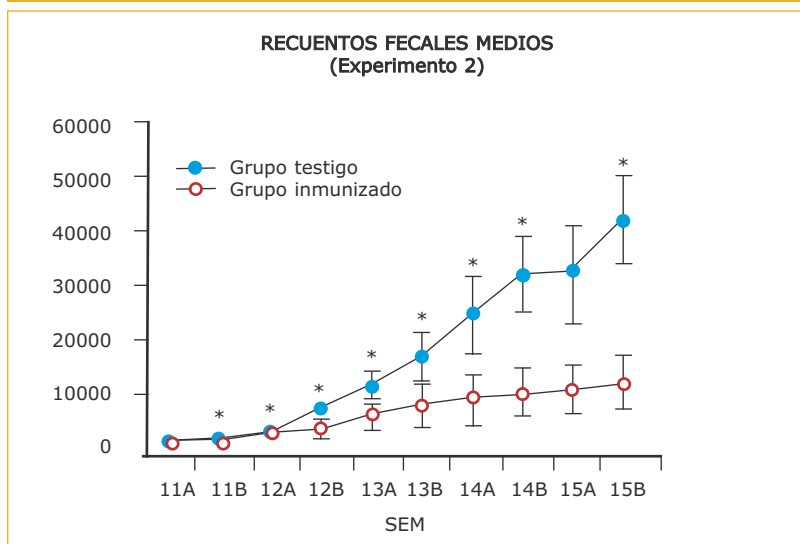
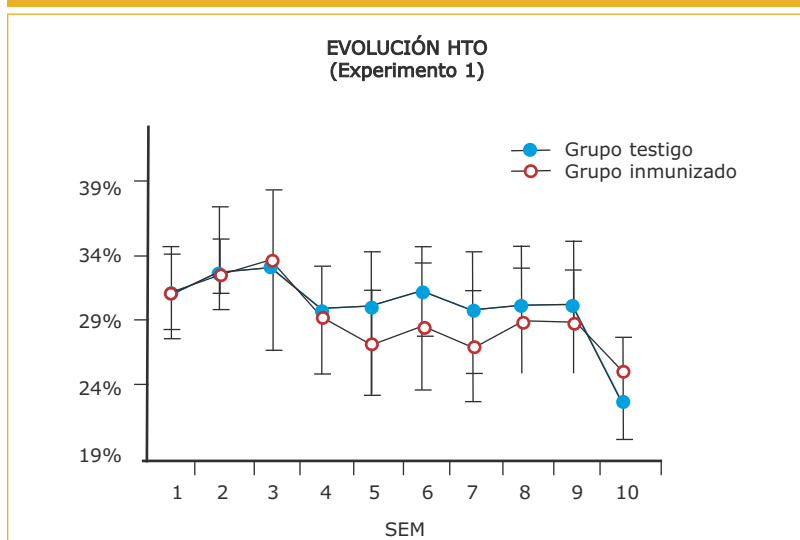


Figura 5. Evolución del hematocrito (valor medio \pm ES) en los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 4 semanas del desafío (Experimento 1).



a partir de la semana trece hasta el final del estudio.

Discusión

El desarrollo de las investigaciones relacionadas con la protección mediante antígenos naturales se ha visto afectado por diversos factores; por un lado destaca la gran variabilidad antigénica que presentan los

nematodos en las diferentes etapas de su ciclo biológico (en su estadio inmaduro y adulto). Estas diferencias también se ponen de manifiesto entre distintas especies parásitas, incluso entre distintas cepas de cada una de ellas, lo que dificulta el desarrollo de vacunas a nivel comercial. A esta circunstancia, se añade la diversidad genética del hospedador, lo que condiciona que los animales inmunizados

experimenten diferentes respuestas inmunológicas a las parasitosis (entre las diferentes razas e incluso entre individuos dentro de la misma raza) (35,38). Ante estas circunstancias, el presente estudio ha tratado de adecuar algunos de estos factores a nuestro entorno. De modo, en el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos sobre cabras majoreras y utilizando como desafío a las inmunizaciones una cepa de *H. contortus* procedente de animales de Gran Canaria infectados de forma natural por este parásito,

A tenor de los resultados obtenidos en el presente estudio, la inmunización con fracciones enriquecidas de cisteína-proteínas aislada a partir de vermes adultos de *Haemonchus contortus* según el protocolo propuesto, confiere una inmunoprotección parcial en cabras, que queda reflejada mediante una reducción significativa de los recuentos fecales de huevos (73.3%) en el lote inmunizado con respecto al lote testigo, y una reducción de 53.2% (Experimento 1-animales sacrificados a las 4 semanas p.i.-) y del 65.6% (Experimento 2-animales sacrificados a las 8 semanas p.i.-) en el número total de vermes recogidos en el abomaso, confirmando con ello los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio utilizando un protocolo similar (29).

Si comparamos los resultados de nuestro estudio con los obtenidos previamente (29) podemos apreciar que la reducción en cuanto al número de huevos fecales fue algo menor (73,3% frente al 82,35 % obtenido previamente). Esta diferencia puede ser debida a varios factores como la cepa del verme inoculada que, si bien fue obtenida en Gran Canaria en ambos casos, no fue exactamente la misma. Así mismo, el tiempo transcurrido entre la inoculación y sacrificio fueron diferentes, ya que oscilaron entre las 15 semanas post inoculación y las 8 semanas (en este trabajo), hecho que también podría interferir en los resultados parasitológicos observados.

Figura 6. Evolución del hematocrito semanal (valor medio \pm ES) en los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 8 semanas del desafío (Experimento 2).

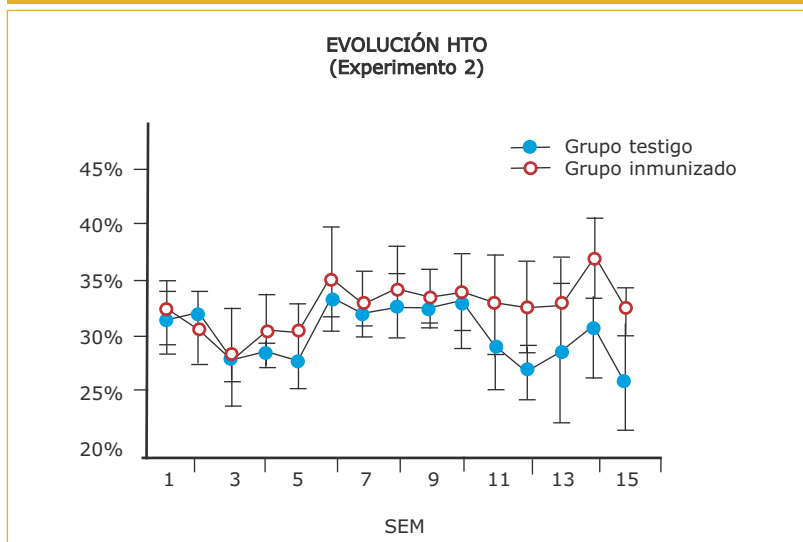
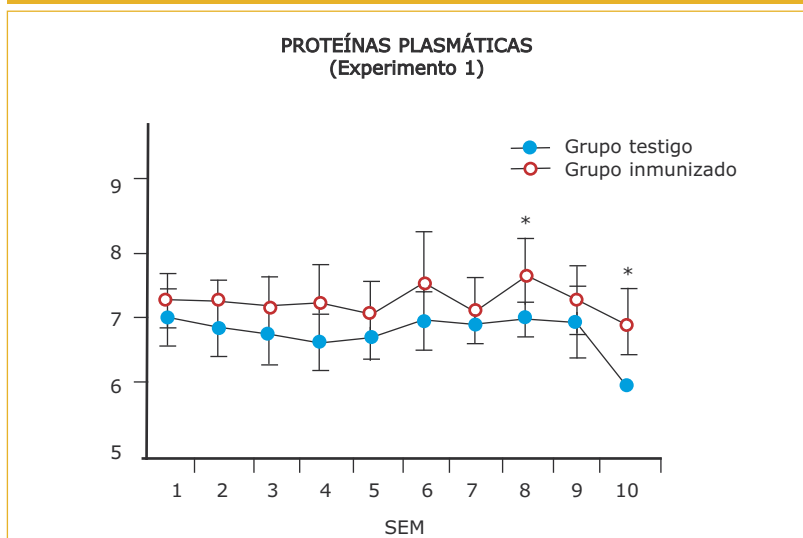


Figura 7. Recuento de proteínas plasmáticas séricas semanales (valor medio \pm ES) en los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 4 semanas del desafío (Experimento 1).



Atendiendo al número de vermes aislados del abomaso, observamos resultados similares a los del ensayo previo, con valores 67,5% (29) y un 65,6% en el Exp.2 de nuestro estudio. Sin embargo en el grupo de animales sacrificados a las 4 semanas p.i., la reducción del número de vermes fue algo menor (53,2%), lo que parece indicar que estas inmunizaciones determinan una dinámica protectora distinta sobre estadios inmaduros y adultos.

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en ensayos similares en ganado ovino (21), en los que no llegó a constatarse ninguna protección, aún utilizando el mismo extracto antigénico. Al comparar ambos estudios, además de las posibles diferencias que pudieran establecerse entre dos hospedadores distintos (ovejas de la raza Greyface/Suffolk frente a cabras Majoreras), destacan otros factores como la utilización de distintos protocolos de inmunización (12, 26), así como el desafío con dos cepas distintas del parásito. Finalmente cabría destacar la diferencia de edad de los lotes experimentales utilizados en ambos estudios. Así, en el estudio antes referido en ovino, los animales fueron inmunizados con 3 meses de edad, mientras que en

nuestro estudio, dichas inmunizaciones tuvieron lugar en animales de 9 meses. Esta diferencia podría explicar un grado menor de respuesta a la inmunización, y por consiguiente un menor grado de protección, que por otro lado también se ha observado en ensayos realizados en ovino en el que se tuvo en cuenta el factor edad (39).

Si atendemos a los resultados obtenidos en otros estudios de inmunoprotección utilizando diferentes protocolos o antígenos, podemos comprobar que los niveles de inmunoprotección observados en nuestro trabajo fueron similares a los obtenidos en ovino utilizando productos de excreción/secreción con actividad proteolítica (30), donde se llegó a determinar una reducción del 82,2% en el número total de vermes, así como de un 72,9% en el número de huevos por gramos de heces. Resultados similares se han obtenido mediante la inmunización con enzimas (de distinta naturaleza) o glicoproteínas (H11) asociadas a membrana procedentes del intestino de vermes adultos (13, 21, 25, 32).

Podríamos, por tanto, concluir que los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan pruebas evidentes de la capacidad inmunoprotectora de

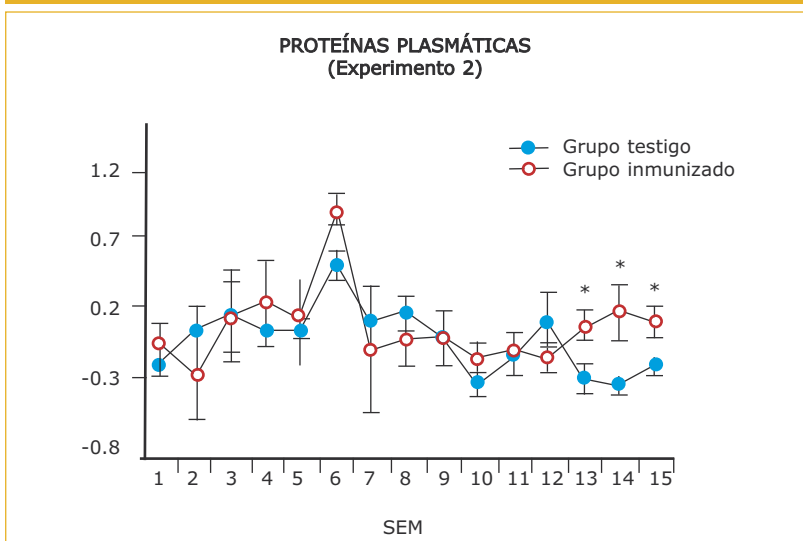
extractos enriquecidos en cisteína-proteinasas de vermes adultos en ganado caprino frente a *H. contortus*, tanto frente a estadios inmaduros (Experimento 1) como a adultos del parásito (Experimento 2), demostrándose además que el nivel de protección conferido por estos extractos, también se refleja en los parámetros biopatológicos estudiados, valor hematocrito y concentración de proteínas plasmáticas, indicadores ambos de la anemia inducida por el parásito. Así, se observó un ligero aumento en el valor del hematocrito en el lote inmunizado respecto al lote testigo, si bien, sin alcanzar significación estadística, en lo que sin duda contribuyó de forma importante la gran variabilidad individual observada en este parámetro. La protección conferida por la inmunización si quedó reflejada de forma más clara al analizar el otro marcador de anemia hemorrágica asociada a la actividad del parásito que estudiamos en este trabajo –proteínas plasmáticas–(23), que si mostró valores significativamente más elevados en el grupo inmunizado en algunas de las semanas posteriores al desafío en ambos experimentos, y por tanto durante el desarrollo de las formas inmaduras y maduras del parásito.

Todos estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar en un futuro este tipo de inmunógenos en ganado caprino frente a *H. contortus*, aunque son aún necesarios más estudios que profundicen en aspectos que permitan identificar los componentes de estos extractos responsables de la protección observada, así como de los mecanismos inmunológicos involucrados, de modo que pudieran incrementarse aún más los beneficios proporcionados por la inmunización, o su posible uso comercial.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos de investigación AGL2002-03528 y AGL2007-62611.

Figura 8. Recuento de proteínas plasmáticas séricas semanales (valor medio- la media de los valores iniciales antes de la inoculación ± ES) en los lotes de animales inmunizados y los testigos sacrificados a las 8 semanas del desafío (Experimento 2).



Bibliografía

- Bakker, N.; Vervelde, L.; Kanobana, K.; Knox, D. P.; Cornelissen, A. W.; de Vries, E.; Yatsuda, A. P. (2004): Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine*. 22:618-28.
- Balic, A.; Bowles, V. M.; Meeusen, E. N. T (2000): Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 75: 109-120.
- Boisvenue, R. J.; Seiff, M. I.; Tonkinson, L. V.; Cox, G. N.; Hageman, R. (1992): Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 1263-1265.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Colville, J. (1991): Common Laboratory Procedures for Diagnosing Parasitism. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. Ed. Paul W. Pratt. American Veterinary Publications, Inc. California. USA; pp: 7-50.
- Cordero del Campillo, M.; Rojo, F. A.; Martínez, A. R.; Sánchez, M. C.; Hernández, S.; Navarrete, I.; Diez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M. (2000): Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongiloidosis y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.
- Domínguez-Torano, I. A.; Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M. T.; Méndez, S.; Fernández-Pérez, F. J.; Alunda, J. M. (2000): Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites, *Parasite Immunol.* 22; 131-138.
- Fetterer, R. H. y Rhoads, M.L. (1997): The *in vitro* uptake and incorporation of hemoglobin by adult *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 69: 77-87.
- Fleck, S. L. y Moody, A. H. (1988): Faecal parasites. En: *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*. Ed. Wright. Cambridge. Reino Unido; pp: 8-52.
- Geldhof, P.; Claerebout, E.; Knox, D.; Vercauteren, I.; Looszova A. & Vercruyse J. (2002): Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Parasite Immunology*, 24: 263-270.
- Geldhof, P.; Vercauteren, I.; Vercruyse J.; Knox, D.; Van Den Broeck, W.; Claerebout, E. (2004): Validation of the protective *Ostertagia ostertagi* ES-Thiol antigens with different adjuvants. *Parasite Immunol.* 26, 37-43.
- Hoste, H.; Chartier, C. (1998): Goat resistance to trichostrongyle infections of the gastrointestinal tract, *Point Vét.* 29; 161-166 (en Francés).
- Jasmer, D. P.; McGuire, T. C. (1991): Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens, *Infect. Immun.* 59; 4412-4417.
- Jasmer, D. P.; Perryman, L. E.; Conder, G. A.; Crow, S.; McGuire, T. (1993): Protective immunity to *Haemonchus contortus* induced by immunoaffinity isolated antigens that share a phylogenetically conserved carbohydrate gut surface epitope. *J. Immunol.* 151: 5450-5460.
- Jasmer, D. P.; Roth, J.; Myler, P. J. (2001): Capthepsin B-like cysteine proteases and Caenorhabditis elegans homologues dominate gene products expressed in adult *Haemonchus contortus* intestine. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 116(2): 159-169.
- Karanu, F. N.; Rurangirwa, F. R.; McGuire, T. C.; Jasmer, D. P. (1993): *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Exp. Parasitol.* 77: 362-371.
- Knox, D.P. y Kenndy (1988): Proteinases released by the parasitic stages of *Ascaris suum*, and their inhibition by antibody. En: *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 207-216.
- Knox, D. P.; Redmond, D. L.; Jane, D. G. (1993): Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology*; 106 (Pt 4): 395-404.
- Knox, D. P.; Smith, S. K.; Smith, W. D.; Redmond, D. L.; Murray, J. M. (1995): Thiol binding proteins. *International Patent Application PCT/GB95/00665*.
- Knox D. P.; Smith S. K.; Smith W. D. (1999): Immunization with affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*, *Parasite Immunol.* 21; 201-210.
- Knox, D. P.; Smith, S. K.; Redmond, D. L.; Smith, W. D. (2005): Protection induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. *Parasite Immunology*, 27: 121-126.
- MAFF (1989): *Helminthology*. London: Her Majesty's Stationery Office. Reino Unido; pp: 1-68.
- Meana, A.; Rojo, F. A. (1999): Parasitosis de los ruminantes. En "Parasitología veterinaria". Cordero del Campillo, M.; Rojo, F.A. Eds. Mc Graw Hill. Madrid. Pp: 237-251.
- Molina, J. M.; Hernández, Y.; Ruiz, A.; González, J. F.; Ortega, L.; Quesada, J. (2010): Control

- de las nematodosis gastrointestinales en ganado caprino lechero, Albéitar. Endoparásitos 133; 8-10.
25. Munn, E. A.; Smith, T. S.; Smith, H.; James, F. M.; Smith, F. C. (1997): Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11, Parasite Immunol. 19; 243-248.
 26. Pomroy, W. E.; Lambert, M. G.; Betteridge, L. (1985): Comparison of faecal strongylate egg counts of goats and sheep on the same pasture, N. Z. Vet. J. 34; 36-37.
 27. Rhoads, M. L. y Fetterer, R. H. (1995): Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. J. Parasitol. 81: 505-512.
 28. Ruiz A.; Molina J. M.; González J. F.; Rodríguez-Ponce E.; Conde M. M. (2001): Ensayo de inmunoprotección en cabras frente a *Haemonchus contortus* mediante el empleo de proteinasas aisladas de homogenizados de vermes adultos. Acta Parasitologica Portuguesa, 8 (2), p. 364.
 29. Ruiz A.; Molina J. M.; González J. F.; Conde M. M.; Martín, S.; Hernández, Y. I. (2004): Inmunoprotección en cabras frente a *Haemonchus contortus* after immunization with cysteine protease enriched protein fraction. Vet. Res. 35, 565-572.
 30. Schallig, H. D.; Van Leeuwen M. A.; Cornelissen, A. W. (1997): Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory-secretory proteins in sheep, Parasite Immunol. 19; 447-453.
 31. Shompole, S.; Jasmer, D. P. (2001): Cathepsin B-like cysteine proteases confer intestinal cysteine protease activity in *Haemonchus contortus*, J. Biol. Chem. 276; 2928-2934.
 32. Smith, S. K.; Pettit, D.; Newlands, G. F.; Redmond, D. L.; Skuce, P. J.; Knox, D. P.; Smith, W.D. (1999): Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*, Parasite Immunol. 21: 187-199.
 33. Smith, T. S.; Munn, E. A.; Graham, M.; Tavernor, A. (1993); Greenwood, C. A. Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as protective antigen against *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 1993; 23 (2): 271-80.
 34. Smith, W. D. (1993): Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. Res Vet Sci. 54(1): 94-10.
 35. Smith, W. D.; Zarlenga, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. (2006): Veterinary Parasitology 139, 347-359.
 36. Sloss, M. W.; Kemp, R. L.; Zajac, A.M. (1994): Veterinary Clinical Parasitology. Ed. Por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L. American Association of Veterinary Parasitologists. Iowa. USA.
 37. Sloss, M. W.; Kemp, R. L.; Zajac, A.M. (1994): Veterinary Clinical Parasitology. Ed. Por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L. American Association of Veterinary Parasitologists. Iowa. USA.
 38. Vercruyse, J.; Schetlers, T. P. M.; Knox, D. P.; Willadsen, P.; Claerebant, E. (2007): Control of parasite disease using vaccine: an answer to drug resistance?. Rev. Science tech. off. Int. Epiz. 26 (1); 105-115.
 39. Vervelde, L.; Kooyman, F. N.; Van Leeuwen, M. A.; Schallig, H.D.; Mackellar, A.; Huntley, J. F.; Cornelissen, A.W. (2001): Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. Parasite immunol. 23; 419-426.