

Título: RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS COMO FACTORES DETERMINANTES DE PROTECCIÓN EN LA INFESTACIÓN POR HYPODERMA SP

Nombre: Dacal Rivas, Vicente

Universidad: Universidad de Santiago de Compostela

Departamento: Patología animal

Fecha de lectura: 01/12/2009

Programa de doctorado: INTRODUCCIÓN A INVESTIGACIÓN EN MEDICINA E SANIDADE VETERINARIA

Dirección:

> **Director:** Rosario Panadero Fontán

> **Codirector:** Ceferino López Sáñez

> **Codirector:** Pablo Díez Baños

Tribunal:

> **presidente:** CARIDAD SÁNCHEZ ACEDO

> **secretario:** Patrocinio Morrondo Pelayo

> **vocal:** FRANCISCO ALONSO DE VEGA

> **vocal:** VALENTIN PÉREZ PEREZ

> **vocal:** JESUS MARIA PÉREZ JIMENEZ

Descriptores:

> PARASITOLOGIA ANIMAL

> INMUNOLOGIA VETERINARIA

> PATOLOGIA VETERINARIA

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

> 7_136.pdf

Localización: BIBLIOTECA XERAL USC

Resumen: Las larvas de *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) son parásitos obligados que atraviesan de forma activa la piel del hospedador y migran y se alimentan de sus tejidos, dejando tras de sí importantes lesiones. La piel está considerada como una barrera importante frente a las larvas 1 de *Hypoderma*, especialmente en animales previamente infestados.

En el primer ensayo se emplearon 12 vacas de raza Holstein, que se distribuyeron en 3 grupos. El primer grupo estaba formado por 4 novillas que se mantuvieron como testigos sin infestar. Los otros dos grupos se infestaron experimentalmente, actuando como grupo primoinfestado y reinfestado por primera vez. La infestación se realizó con larvas 1 de *Hypoderma lineatum*, colocadas en 5 puntos de la piel del dorso. De cada uno de estos

puntos se tomaron biopsias de piel a las 0, 6, 12, 48 y 96 h.p.i. Estas muestras se incluyeron en parafina para realizar un estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

En el estudio histopatológico de los animales testigo no se observó ninguna alteración aparente en la piel, ni tampoco se evidenció un incremento significativo en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas. En los animales primoinfestados se observó una ligera reacción inflamatoria entre las 6 y 96 h.p.i., y se apreciaron además, pequeñas escaras a nivel epidérmico. A las 48 h.p.i. la reacción cutánea se caracterizó por un infiltrado inflamatorio moderado en la dermis superficial. Este infiltrado estaba compuesto por células mononucleares y, ocasionalmente por polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. En los animales reinfestados la respuesta celular en el área de penetración de las larvas fue mucho más intensa y extensa desde el comienzo de la reinfestación. Así a las 6 h.p.i., ya pudo observarse a nivel de la dermis superficial un infiltrado perivascular moderado que fue intensificándose hasta las 48-96 h.p.i. en las que la reacción inflamatoria cutánea fue mucho más intensa, afectando tanto a la dermis superficial como a la profunda e incluso a la hipodermis. Los eosinófilos fueron abundantes en el infiltrado a las 12 h.p.i. Mediante inmunohistoquímica se observó que en los animales primoinfestados el número inicial de células T fue moderado, si bien fue aumentando progresivamente a lo largo del estudio mientras que en los reinfestados aumentó considerablemente a lo largo del estudio, con valores máximos a las 96 h.p.i. distribuyéndose uniformemente en la dermis superficial y profunda. Los linfocitos B en los testigos y primoinfestados se mantuvieron en niveles bajos y constantes a lo largo del estudio, mientras que en los reinfestados se incrementaron a partir de las 6 h.p.i., alcanzándose un máximo a las 48 h.p.i. Por último, las células plasmáticas siguieron una evolución similar a la de las células B.

Para poder estudiar las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y ver lo que sucedía tras sucesivas reinfestaciones de los animales, planteamos un segundo ensayo en el que las muestras se conservaron mediante congelación, se incluyó un grupo reinfestado y se amplió el muestreo hasta las 144 h.p.i. para evaluar el comportamiento de las diferentes poblaciones celulares una vez que las larvas ya han abandonado la piel y emprendido su migración hacia el esófago. En este ensayo se incluyó, por lo tanto, un grupo primoinfestado, reinfestado por primera vez y un grupo reinfestado por segunda vez.

El estudio histopatológico mostró resultados muy similares a los del ensayo 1 para los animales primo y reinfestados por 1ª vez. Los animales reinfestados por 2ª vez presentaron una reacción más intensa en todas las capas dérmicas en comparación con los reinfestados por 1ª vez. La respuesta eosinofílica también fue mayor en las vacas reinfestadas por segunda vez con un máximo a las 96 h.p.i.

El análisis mediante inmunohistoquímica de las distintas poblaciones linfocitarias mostró que los linfocitos T seguían un comportamiento muy similar en los tres grupos, con un máximo a las 96 h.p.i. La mayor parte de estos linfocitos expresaban el receptor CD4, los cuales fueron más abundantes en los animales reinfestados por 2ª vez; sin embargo, los CD8 mostraron un comportamiento muy similar en los tres grupos.

Al igual que en el ensayo 1, la respuesta de los linfocitos B fue muy escasa en los animales primoinfestados, mientras que en los reinfestados por 1ª y 2ª el número de células marcadas se incrementó para alcanzar valor máximo a las 48 h.p.i.

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de la producción local (inmunohistoquímica) y los niveles séricos

(ELISA sándwich) de las citoquinas TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, IL-4 e IL-12. En general, el número de células marcadas fue reducido. En relación con el TNF-alpha en los animales primoinfestados y reinfestados por primera vez el número de células marcadas se incrementó desde el comienzo de la infestación hasta llegar a un máximo a las 48 h.p.i para posteriormente descender bruscamente hasta el final del estudio, sin embargo en los reinfestados por segunda vez se incrementó de forma más precoz.

Las células IFN-gamma+ mostraron un aumento significativo a las 6 h.p.i en los tres grupos de animales, seguido por un rápido descenso a las 12 y 48 h.p.i., en los reinfestados por 1ª y 2ª vez, respectivamente.

El número de células IL-10+ se incrementó significativamente en los animales primoinfestados a las 6 y 48 h.p.i., mientras que en ambos grupos reinfestados este incremento se retrasó hasta las 12 h.p.i., alcanzando un pico a las 48 h.p.i.

El número de células IL-4+ presentó un aumento significativo el grupo primoinfestado a las 6 h.p.i., mientras que en el grupo reinfestado por primera vez su número disminuyó de forma significativa a las 48 h.p.i.

Finalmente, con respecto a la IL-12 destacó el comportamiento de los animales reinfestados por 2ª vez mostrando un aumento progresivo a lo largo del estudio con valores máximos a las 96 h.p.i., momento en el que alcanza los valores del grupo G-1, que habían sido más elevados.

Por último, señalar que la penetración de las larvas 1 de *H. lineatum* a través de la piel no presentó ningún efecto significativo en las concentraciones séricas de IFN-gamma y, excepto para la IL-10, no existe correlación entre la producción local y las concentraciones séricas de las distintas citoquinas. El incremento de conjunto de citoquinas de tipo Th1 (IFN-gamma, TNF- alpha) y Th 2 (IL-4, IL-10) podría indicar que la respuesta durante las primeras fases de la infestación por Hypoderma es aparentemente de tipo Th0.