

Título: DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE CITOQUINAS EN GANADO VACUNO Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA HIPODERMOSIS BOVINA

Nombre: Cabanelas Dopazo, Eva

Universidad: Universidad de Santiago de Compostela

Departamento: Patología animal

Fecha de lectura: 04/04/2017

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Programa Oficial de Doctorado en Investigación en Medicina y Sanidad Veterinarias

Dirección:

- > **Director:** Pablo Díez Baños
- > **Codirector:** Ceferino López Sáñez
- > **Codirector:** Rosario Panadero Fontán

Tribunal:

- > **presidente:** Patrocinio Morrondo Pelayo
- > **secretario:** VALENTIN PÉREZ PEREZ
- > **vocal:** Antonio Scala

Descriptores:

- > PARASITOLOGIA ANIMAL
- > INMUNOLOGIA VETERINARIA
- > BIOLOGIA MOLECULAR

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

- > 314286_906706.pdf

Localización: BIBLIOTECA XERAL USC

Resumen: Actualmente falta información acerca de los mecanismos inmunitarios que inducen inmunidad frente a Hypoderma en ganado vacuno. Conocida la relevancia de las citoquinas como moduladores de la respuesta del hospedador, es importante estudiar el efecto de los antígenos del parásito sobre su producción. Por otro lado, la aplicación de técnicas inmunoenzimáticas y de biología molecular en vacuno es más bien reducida. En el capítulo 1, nos propusimos estudiar la respuesta celular y la producción de IFN- γ en el tejido subcutáneo del dorso; para ello, se analizaron, mediante histología e inmunohistoquímica, muestras de piel de tres vacas infestadas de forma natural.

Durante la etapa dorsal de la hipodermosis, se distinguen tres tipos de lesiones. Las lesiones tipo 1 se caracterizan por una larva con la cutícula intacta y un infiltrado celular compuesto fundamentalmente por células

plasmáticas; predominaron los linfocitos CD79+ y células IgG+ y macrófagos marcados frente a lisozima, CD68 y MAC387+. El epitelio que cubría el orificio del nódulo fue positivo a este último anticuerpo, lo que se relacionó con la expresión de calprotectina por parte de las células epiteliales γ reactivas γ . En las lesiones tipo 2, con larvas con cutícula degradada, el infiltrado estaba compuesto por células epitelioides, gigantes multinucleadas, de cuerpo extraño y de tipo Langhans, formando un granuloma bien definido, asimismo, abundaron los linfocitos CD3+ y los macrófagos marcados con lisozima y CD68. En las lesiones tipo 3, se observaron infiltrados mononucleares perivasculares y tejido de granulación compuesto por fibroblastos y neovasos; se encontraron linfocitos CD3+ dispersos. No se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos lesionales en lo relativo a la producción de IFN- γ .

En el capítulo 2 nos planteamos la puesta a punto y empleo de una técnica de enzimoimmunoanálisis de recuento de puntos (ELISPOT) para la detección de células secretoras de IFN- γ en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de animales sensibilizados y no sensibilizados frente a Hypoderma. Las CMSP se incubaron con distintos antígenos de *H. lineatum* (hipoderminas A, B, C y extracto total larvario) y con el mitógeno fitohemaglutinina A (PHA). Se realizaron cultivos para la determinación de IFN- γ en los sobrenadantes por ELISA sándwich.

En lo que respecta al ELISPOT, la incubación de los linfocitos con mitógeno produjo un incremento en el número de células productoras de IFN- γ . La adición de los distintos antígenos produjo un descenso en el número de células secretoras de IFN- γ . La HyB fue la responsable del mayor efecto inmunosupresor en animales no sensibilizados y el ET, en los animales previamente sensibilizados. Los resultados del ELISA fueron similares, aunque los valores eran muy bajos o por debajo del límite de detección. Así, el ELISPOT es más sensible que el ELISA para detectar la producción de IFN- γ .

En el capítulo 3, con el objetivo de determinar γ in vitro γ el efecto regulador del IFN- γ y la IL-4 en la respuesta proliferativa frente a los antígenos de *H. lineatum* y en la secreción de IL-10, se realizaron cultivos de CMSP de terneros no sensibilizados.

La incubación de las CMSP con los antígenos de *H. lineatum* indujo una reducción de la respuesta linfoproliferativa, aún tras la adición del IFN- γ y la IL-4. La adición del IFN- γ tuvo un efecto inhibitor sobre la respuesta linfoproliferativa en los cultivos incubados con HyB e HyC. La adición de IL-4 no modificó el índice de estimulación del mitógeno ConA. La suplementación exógena con IFN- γ e IL-4 no produjo diferencias en los niveles de IL-10, salvo en los sobrenadantes de los cultivos estimulados con HyB.

En el capítulo 4 se puso a punto un protocolo de RT-qPCR para la detección y cuantificación de la expresión de IFN- γ , IL-10, IL-4 y TNF- γ en cultivos de CMSP de animales sensibilizados y no sensibilizados frente a Hypoderma.

Los niveles de expresión de las distintas citoquinas fueron superiores en los animales sensibilizados, salvo en el caso de la IL-10. El ET produjo una reducción de la expresión del IFN- γ , mientras que la HyB ejerció el mismo efecto inmunosupresor sobre la expresión de la IL-10. Los niveles de expresión de las citoquinas aumentaron desde las 18 hasta las 48 horas, salvo el TNF- γ .

Al comparar los resultados de RT-qPCR, ELISA y ELISPOT, se observó una correspondencia entre técnicas. Los animales previamente sensibilizados presentan mayores niveles de expresión-secreción de citoquinas. El efecto inmunosupresor de los antígenos de Hypoderma se puso de manifiesto con las tres técnicas, presentando la RT-qPCR un límite de detección más bajo.

