



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL AUMENTO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS INDUCIDO CON Ag DE METACESTODO DE *Taenia hydatigena* SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LARVAS DE *Haemonchus contortus* EN OVINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CÉSAR CUENCA VERDE

TUTOR:

Dr. FERNANDO ALBA HURTADO

COMITÉ TUTORAL:

Dr. ANDRÉS ROMERO ROJAS

Dr. FROYLÁN IBARRA VELARDE

CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó con el equipo e instalación de la
Unidad Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FES-Cuautitlán UNAM

Con financiamiento del proyecto
Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT) UNAM No. IN-219005.

César Cuenca Verde fue alumno becario

CONACYT 200750 (2005-2007)

COMECYT 07BTM517 (2007)

AGRADECIMIENTOS

Dr. Fernando Alba Hurtado por todo su apoyo y la oportunidad de trabajar en esta línea de investigación.

Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por el apoyo y enseñanzas, ya que sin su ayuda este trabajo habría sido más difícil “muchas gracias”.

M en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez por su apoyo y amistad.

M en C. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz por ser más que un amigo y por el respeto y admiración que le tengo.

Dr. Abdelghany Hefnawy Abdelghany por su amistad y las enseñanzas brindadas.

A los profesores que me dieron clase: Dr. Sergio Estrada Parra (ENCB- IPN), Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dr. Guillermo Valdivia Anda, Dra. Virginia Lara Sahagún, Dr. Andrés Romero Rojas, Dr. Jorge Luis Tortora Pérez.

A los miembros del jurado por el tiempo que se tomaron para la revisión de este trabajo: Dr. Héctor Quiroz Romero, Dr. Froylán Ibarra Velarde, Dr. Jorge Luis Tortora Pérez, Dr. Andrés Romero Rojas, Dr. Fernando Alba Hurtado.

A todos los amigos de la UIMSA: Gerardo, Miguel Ángel, Lorena, Jessica, Víctor, Claudia, Ángeles, Paty y Quique.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme este logro.

A mis padres, Sr. Elías Cuenca Molano y María del Pilar Verde Montiel por su cariño este logro también es de ustedes.

A Elma, mi "Flaquita" por toda tu comprensión y apoyo, por hacer más placentero este camino, mi vida. Te amo.

A mis princesitas, Metztli y Leslie, son mi inspiración, todo lo hago pensando en ustedes, son mi vida. Las amo.

Al mejor hermano del mundo, Néstor porque contigo a mi lado todo es más fácil, una vez más lo logramos.

A mi hermanita Pili, rata este logro también es tuyo, te quiero muchísimo.

A Tomy por ser la compañera de mi hermano.

A Ovín por ser mi sobrino favorito y dar fuerza a mi hermano.

A sobrinitas, Samis y Machi las quiero mucho.

A las familias Cuenca y Verde sin excepción.

A mi tío RIGO (†) porque luchaste hasta el final, eres un gran ejemplo.

A mis grandes amigos, Luis, Hilario, Rogelio, Guni, Víctor y los demás.

A la FES-Cuautitlán.

César

ÍNDICE

Índice	I
Índice de figuras.....	III
Índice de cuadros.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Introducción	1
Ciclo biológico.....	2
Epidemiología.....	4
Patogenia.....	6
Signos Clínicos.....	7
Lesiones.....	8
Control y prevención.....	9
Resistencia genética.....	10
Respuesta inmunológica contra <i>Haemonchus contortus</i>	12
Respuesta inmune inespecífica.....	13
Respuesta específica humoral.....	14
Respuesta específica celular.....	16
Los eosinófilos.....	19
Raza Columbia.....	22
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
Ubicación.....	26
Animales.....	26
Modelo para provocar eosinofilia.....	27
Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>	31
Evaluación del efecto del aumento de los eosinófilos sanguíneos.....	31
Conteo de eosinófilos sanguíneos.....	34

Inoculación de L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	34
Conteo de huevos.....	35
Sacrificio.....	36
Recolección y conteo de nematodos adultos.....	36
Medición de fases adultas.....	37
Determinación de la prolificidad.....	37
Conteo de eosinófilos tisulares.....	37
Análisis de resultados.....	38
Resultados	39
Modelo para provocar eosinofilia en corderos.....	39
Eosinófilos sanguíneos.....	43
Eliminación de huevos.....	43
Número de fases adultas de <i>Haemonchus contortus</i>	48
Longitud de fases adultas.....	48
Prolificidad de hembras.....	48
Eosinófilos tisulares.....	48
Correlaciones entre grupos.....	49
Discusión	56
Conclusiones	62
Bibliografía	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	4
Figura 2.	Diagrama del primer ensayo para provocar eosinofilia.....	27
Figura 3.	Diagrama del segundo ensayo para provocar eosinofilia.....	28
Figura 4.	Diagrama del tercer ensayo para provocar eosinofilia	29
Figura 5.	Diagrama del cuarto ensayo para provocar eosinofilia.....	29
Figura 6.	Diagrama del quinto ensayo para provocar eosinofilia.....	30
Figura 7.	Diagrama del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de la eosinofilia sobre el establecimiento de <i>Haemonchus contortus</i>	33
Figura 8.	Número de ES de ovino al cual se le administro vía intravenosa 50 pmol/kg de IL-5	40
Figura 9.	Promedio (\pm EE) del número de ES de ovinos a lo cuales se les administró vía intravenosa 5000 pmol/kg de IL-5 (grupo IL-5) y 600 mg de antígenos somáticos de <i>Toxocara canis</i>	40
Figura 10.	Número de ES en ovino al cual se le administró intraperitonealmente 600 mg de Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> (ExmTh) los días 0 y 8.....	41
Figura 11.	Promedio (\pm EE) del número de ES de ovinos a los cuales se les administraron ip 600 mg de Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> (ExmTh) y 600 mg de antígeno somático de <i>T. canis</i> (Ag <i>T. canis</i>) los días 0, 5 y 12.....	41
Figura 12.	Promedio (\pm EE) del número de ES en ovinos a los cuales se les administraron intraperitonealmente 600 mg de ExmTh los días 0, 4 y 8.....	42
Figura 13.	Media (\pm EE) de ES en ovinos Columbia a los cuales se les administró un extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> , antes de ser inoculados con 5000 L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i>	45
Figura 14.	Media semanal (\pm EE) de la eliminación de huevos por gramo de heces en corderos con valores de ES normales (L3) y elevados (ExmTh+L3). La flecha indica la inoculación con 5000 L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i>	47

Figura 15.	Muestra el promedio (\pm EE) de la prolificidad, interpretada como número de huevos por hembra al día (h/h/d) de las hembras de <i>H. contortus</i> en ovinos Columbia con valores de ES normales (L3) y elevados (ExmTh+L3) al momento de la inoculación con 5000 L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i>	52
Figura 16.	Media (\pm EE) del número de eosinófilos por cm ² en las regiones fúndica (RFA), Pilórica (RPA) y del linfonodo abomasal (LNA) de ovinos Columbia a los cuales se les administro un extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> (grupos ExmTh y ExmTh+L3) antes de ser inoculados con 5000 L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> (grupos L3 y ExmTh+L3). Los corderos del grupo ExmTh se dividieron en ExmTh día 10 y ExmTh día 57.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Método de adaptación a la dieta utilizada.....	26
Cuadro 2.	Promedio \pm EE del número de ES, en corderos Columbia a los cuales se les administró un extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> (grupos ExmTh y ExmTh+L3) e inoculados con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> (grupos L3 y ExmTh+L3).....	44
Cuadro 3.	Promedio (\pm EE) de la eliminación de hgh de <i>Haemonchus contortus</i> , en ovinos Columbia con valores de eosinófilos circulantes normales (L3) y elevados (ExmTh) al momento de la inoculación con 5000 L ₃ del parásito.....	46
Cuadro 4.	Promedio del número de fases adultas de <i>Haemonchus contortus</i> recuperadas, porcentaje de hembras y machos, así como el porcentaje de establecimiento de larvas, en ovinos Columbia con valores de ES normales (L3) y elevados (ExmTh+L3) al momento de la inoculación con 5000 L ₃ del parásito.....	50
Cuadro 5.	Promedio (\pm EE) de la longitud de las FA de <i>Haemonchus contortus</i> recuperadas, de ovinos Columbia con valores de ES normales (L3) y elevados (ExmTh) al momento de la inoculación con 5000 L ₃ del parásito.....	51
Cuadro 6.	Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos tisulares por cm ² en las RFA RPA LNA. En ovinos Columbia con valores de ES normales (L3) y elevados (ExmTh) al momento de la inoculación con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i>	53
Cuadro 7.	Correlación de parámetros parasitológicos y eosinófilos en corderos infestados experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> . Fases adultas en abomaso; FA, porcentaje de establecimiento; % EST, huevos por gramo de heces; hgh promedio, eosinófilos sanguíneos; ES, eosinófilos en región fúndica abomasal; ET RFA, eosinófilos en región pilórica abomasal; ET RPA; eosinófilos en linfonodo abomasal ET LNA.....	55

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
EE	Error estándar
ES	Eosinófilos sanguíneos
ET	Eosinófilos tisulares
ExmTh	Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>
FA	Fases adultas
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
hgh	Huevos por gramo de heces
IL-5	Interleucina 5
i.m	Intramuscular
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenosa
LNA	Linfonodo abomasal
L₃	Larvas de tercer estadio
mg	Miligramos
p.a	Post-administración
p.i	Post-inoculación
pmol	Picomoles
RFA	Región fúndica abomasal
RPA	Región pilórica abomasal
<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la eosinofilia sobre el establecimiento de *Haemonchus contortus* en corderos. Primero, se estableció un modelo para inducir el aumento de eosinófilos sanguíneos (ES) para lo cual, se administraron diferentes sustancias, interleucina 5 (IL-5), antígenos somáticos de *Toxocara canis* y un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* (ExmTh). La administración de este último provocó mayor aumento y por más tiempo en el número de ES.

En la segunda parte se utilizaron 25 corderos Columbia, divididos en 4 grupos. Los corderos del Grupo L3 (n=6) recibieron el día cero 5000 larvas de tercer estadio (L₃) de *H. contortus*, los del Grupo ExmTh+L3 (n=6) recibieron ExmTh los días -10, -6 y -2 y 5000 L₃ de *H. contortus* el día cero, los del Grupo ExmTh (n=8) solo recibieron ExmTh los días -10, -6 y -2 del experimento y los corderos del Grupo testigo (n=5) únicamente recibieron placebo. Semanalmente se calcularon el número de huevos por gramo de heces (hgh) y a diferentes días el número de ES.

Cuatro corderos del Grupo ExmTh fueron sacrificados el día cero, los restantes fueron sacrificados con los corderos de los demás grupos el día 57 post-inoculación (p.i). Se colectó un linfonodo abomasal (LNA) y segmentos de aproximadamente 1 cm² de tejido abomasal de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA). Los tejidos fueron procesados para cortes histológicos y se tiñeron con Cromotrope 2R para el conteo de eosinófilos tisulares (ET). También se contaron y midieron las fases adultas (FA) presentes en el abomaso.

Los corderos de los grupos L3, ExmTh+L3 y ExmTh presentaron más ES que los corderos del Grupo testigo. Los corderos del Grupo L3 presentaron más hgh (p<0.05) que los corderos del Grupo ExmTh+L3. Los corderos del Grupo L3 presentaron más FA (p<0.05) que los del Grupo ExmTh+L3. No se observaron diferencias (p>0.05) en el tamaño y la prolificidad de las FA recuperadas de los corderos de los grupos L3 y ExmTh+L3. Se observó un mayor (p<0.05) número de ET en RPA y LNA en los corderos del Grupo ExmTh sacrificados el día cero en comparación con los demás grupos, en la RFA no se observaron diferencias (p>0.05).

Se encontraron correlaciones positivas (p<0.05) entre las FA con el porcentaje de establecimiento, entre las FA con hgh y entre las FA con los ET de RFA y RPA. También se observaron correlaciones negativas entre los ES con las FA, ES con el porcentaje de establecimiento y entre ES con hgh (p>0.05). Por lo anterior, se puede concluir que la administración de ExmTh produce eosinofilia periférica y tisular en los corderos la cual reduce en un 81% el establecimiento de *H. contortus*.

ABSTRACT

The effect of eosinophilia was evaluated on the establishment of *Haemonchus contortus* in lambs. First, a model settled down to induce the increase of blood eosinophils (BE). For which, different substances were administered, interleukin-5 (IL-5), somatic antigens of *Toxocara canis* and an extract of *Taenia hydatigena* (ExmTh). The administration of this last one caused greater increase and by more time in the number of BE.

For the second part, 25 Columbia lambs were used, divided in 4 groups. The lambs of L3 group (n=6) received the day zero 5000 larvae of third stage (L3) of *H. contortus*, those of the ExmTh+L3 group (n=6) received ExmTh days -10, -6 and -2 and 5000 L3 of *H. contortus* day zero, those of the ExmTh group (n=8) single received ExmTh days -10, -6 and -2 of the experiment and the lambs of the group witness (n=5) received placebo only. Weekly fecal egg counts (FEC) were calculated and to different days the number of BE.

Four lambs of ExmTh group were euthanized day zero, the rest were euthanized with the lambs of the other group's day 57 pos-inoculations (p.i). Segments of approximately 1 cm² of fundic (FRA) and pyloric (PRA) of abomasal regions and the abomasal lymph node (ALN) were taken at the time of the sacrifice. The samples were process for histological sections and they dyed with Cromotropro 2R for the count of tissue eosinophils (TE) also the adult phases (AP) present in abomasum were counted and measured.

Lambs of the groups L3, ExmTh+L3 and ExmTh presented/displayed a greater amount of BE than those of the witness group. The lambs of the L3 group presented a greater number ($p < 0.05$) of FEC than those the ExmTh+L3 group, The lambs of the L3 Group presented/displayed greater number of AP than those the ExmTh+L3 group, ($p > 0.05$) Differences in the size and the prolificidad of the recovered AP between the lambs of the L3 y ExmTh+L3 groups were not observed. ($p < 0.05$) greater number of TE in PRA and ALN was observed in the lambs of the ExmTh Group sacrificed day zero in comparison with the other groups, In FRA region differences ($p > 0.05$) were not found.

Positive correlations between the AP with the percentage of establishment were found, between the AP with FEC and between the AP with TE in the FRA and AP were found also. Negative correlations were observed between BE with the AP, between BE with the percentage of establishment and between BE with FEC. By the previous thing, is possible to be concluded that the administration of ExmTh produces peripheral and tissue eosinophilia in the lambs which reduces 81% the establishment of *H. contortus*.

1. INTRODUCCION

La verminosis gastroentérica es uno de los principales problemas sanitarios de los pequeños rumiantes que repercute en la salud de los animales, afecta la producción y ocasiona pérdidas económicas en todo el mundo (Waller & Chandrawathani., 2005). El mayor impacto económico se observa en los países tropicales (George & Quiroz, 1993) y de climas cálidos (Gaxiola *et al.*, 1996), especialmente en los que existen abundantes lluvias durante el verano (Radostits, *et al.*, 2002). Esta enfermedad es producida por nematodos de varios géneros que interaccionan en el tracto digestivo de los rumiantes y traen como consecuencia importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Los nematodos gastroentéricos (NGE) más frecuentes en los ovinos de México, son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.* y *Trichuris ovis*. (Quiroz, 2003). Debido a su patogenicidad y distribución geográfica se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante en los ovinos de México (Cuéllar, 1986).

Haemonchus también es conocido como gran gusano del estómago, gusano del cuajar (Soulsby, 1987), gusano en poste de barbero (Lapage, 1976). *H. contortus* se encuentra en el abomaso de diversos rumiantes, mide de 10 a 30 mm de longitud. El extremo cefálico es muy delgado, poseen una pequeña cápsula bucal, con un fino diente o lanceta que se origina en el lado dorsal. Tiene papilas cervicales prominentes, en forma de espinas. La bolsa copuladora del macho es grande, tiene dos grandes rayos laterales y uno dorsal pequeño y asimétrico en forma de Y invertida. Las papilas son relativamente cortas, hay papilas prebursales y posee un gubernáculo. La vulva está en la parte posterior del cuerpo y está cubierta por una protuberancia, solapa o proceso lingüiforme. El macho tiene un color rojizo uniforme, mientras que en la hembra, los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo, le dan un aspecto rallado. Las espículas miden de 0.46 a 0.56 mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo (Soulsby, 1987). Los machos miden de 10 a

20 mm y las hembras de 18 a 30 mm (Lapage, 1976; Soulsby, 1987 y Quiroz, 2003). Los huevos tienen una forma ovoide son incoloros miden de 70-85 por 41-48 μm (Soulsby, 1987).

1.1 CICLO BIOLÓGICO

En la Figura 1 se ilustra el ciclo biológico, este es directo. Los adultos de *H. contortus* se localizan en el abomaso del hospedador. Las hembras pueden producir de 5,000 a 10,000 huevos al día, los cuales son eliminados en la materia fecal, si las condiciones ambientales son adecuadas, se desarrolla la larva 1 (L_1) que eclosiona en la materia fecal en 1 ó 2 días (Quiroz, 2003). Esta se alimenta de bacterias del medio donde se encuentra. Al completar su crecimiento muda de epidermis y se transforma en larva 2 (L_2), que también se alimenta de bacterias y crece hasta que madura, muda su epidermis pero esta no se desecha, permanece como una envoltura suelta alrededor de la L_3 que se ve separada por ella del ambiente, por lo tanto no puede alimentarse. La L_3 se mantiene de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1976).

La L_3 es muy activa y capaz de desplazarse verticalmente sobre las superficies húmedas de los vegetales, presenta varios tropismos: hidrotropismo positivo, busca las zonas húmedas, fototropismo negativo, evita la luz intensa, termotropismo positivo, la temperatura óptima es de 15 a 37° C y un geotropismo negativo, se aleja del suelo buscando la parte alta de los pastos (Quiroz, 2003). La migración vertical les permite subir a las gotas de rocío que se encuentran en las puntas de los pastos en las mañanas o en los días nublados (Soulsby, 1987).

La infección de los animales se da por la ingestión de las L_3 con las pasturas. Aproximadamente 30 minutos después de la ingestión, la L_3 pierde la cutícula que conservaba de la anterior muda, esto se da por diversos estímulos del hospedador (bicarbonato, CO_2 gaseoso). Estos estímulos activan a la L_3 que libera

un fluido de muda que actúa sobre la cutícula provocando su ruptura, con esto la larva puede salir mediante movimientos propios (Lapage, 1976).

Las larvas ya liberadas en abomaso, penetran la mucosa por las fosas de las glándulas gástricas (Lapage, 1976; Soulsby, 1987). *H. contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Meana & Rojo, 1999).

En la mucosa, la L₃ se alimenta de sangre, crece y muda a larva 4 (L₄), ésta también crece e ingiere sangre, sale de la mucosa y muda a larva 5 (L₅) o preadulto. Las L₅ se desarrollan directamente, ya sin mudar, hasta transformarse en adulto, macho o hembra, después de la cópula las hembras comienzan a producir huevos cerrando el ciclo (Meana & Rojo, 1999).

En algunas circunstancias, el desarrollo larvario se detiene dentro del hospedador en L₄ durante algunos meses en condición de hipobiosis. La naturaleza del estímulo que induce hipobiosis se desconoce, aunque algunos trabajos mencionan que se debe a factores genéticos, inmunológicos o ambientales, el fenómeno coincide con condiciones ambientales adversas, meses fríos o épocas secas y parece ser que la capacidad de inhibición es una característica heredable y se considera una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador, a factores ambientales adversos o ambos a la vez (Quiroz, 2003).

La reanudación del desarrollo de las larvas hipobióticas se produce cuando las condiciones ambientales son adecuadas para la supervivencia de las fases libres y está asociada probablemente con estímulos estacionales (Lapage, 1976). Desde el punto de vista patológico es muy importante, pues la desinhibición sincrónica de las larvas hipobióticas puede dar lugar a cuadros agudos graves. También es importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que al coincidir en el tiempo la madurez sexual de los adultos procedentes de larvas hipobióticas, se eliminan cantidades elevadas de huevos que contribuyen en forma significativa a la contaminación ambiental, en una época del año favorable para el desarrollo de las L₃, siendo muy alto el riesgo de infección para los animales jóvenes. En ausencia de hipobiosis el periodo de prepatencia es de 15 a 20 días (Soulsby, 1987 y Meana & Rojo, 1999).

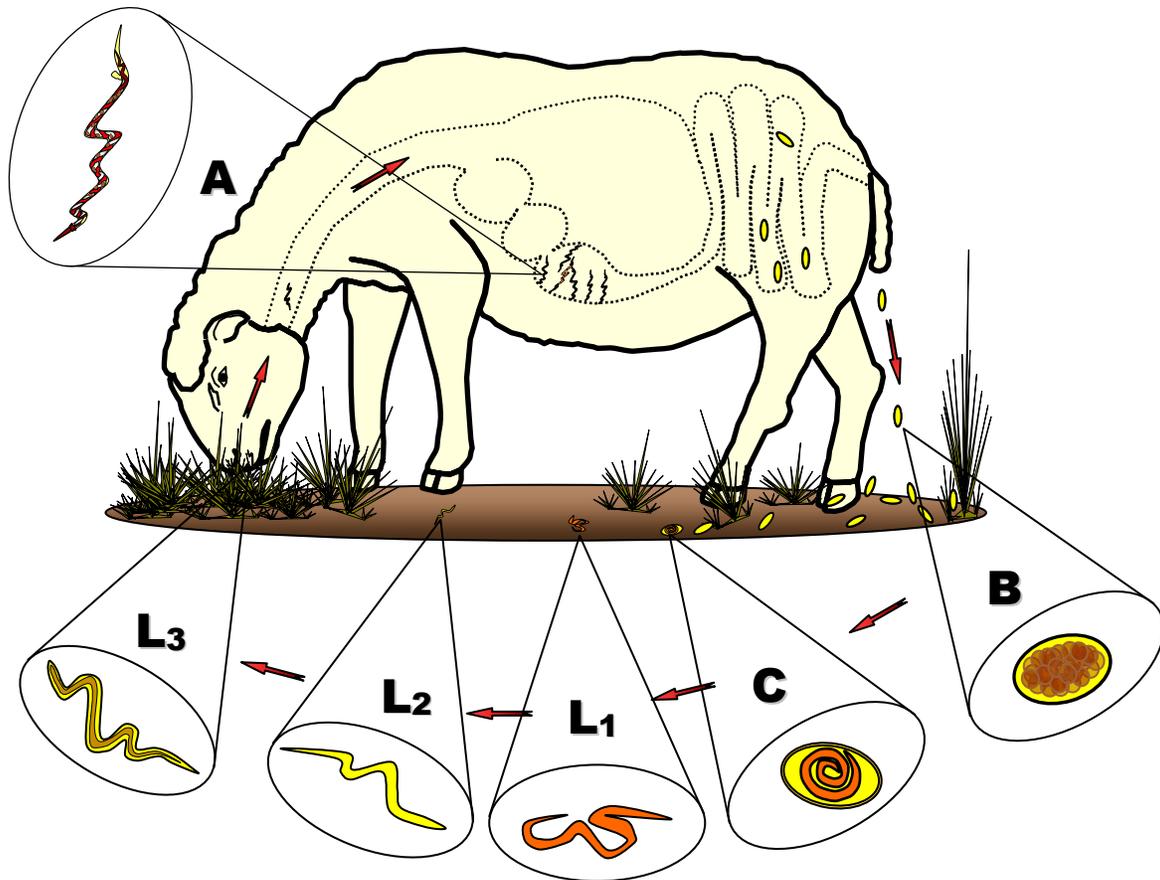


Figura 1. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*. A) Adultos en la mucosa abomasal. B) Huevo eliminado en heces. C) Huevo larvado. L₁) Larva 1 libre en suelo. L₂) Larva 2. L₃) Larva 3 (fase infectante).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

En México esta parasitosis muy común, puede verse agravada por el hecho de que la mayoría de los rumiantes se encuentran en pastizales comunales, donde pastorean juntos bovinos, ovinos y caprinos, en terrenos sobrepastoreados altamente contaminados (Cuéllar, 1992).

Las larvas preinfectantes son susceptibles a la desecación, mientras que las infectantes soportan más. Las L₃ migran mejor en clima húmedo y cálido.

Algunas larvas pueden encontrarse a 90 cm de las heces de origen en 24 horas, pero más del 90% se encuentran a 10 cm y este número disminuye logarítmicamente a medida que aumenta la distancia (Blood *et al.*, 1986).

La humedad es el factor climático mas importante que determina el desarrollo y supervivencia de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos de los rumiantes, por lo tanto la época de lluvias representa una situación de alto riesgo para la adquisición de la parasitosis. Otro aspecto importante entre los factores ambientales es la hora del día en que pastorean los animales. Esto hace que en ocasiones se ingieran cantidades masivas de larvas que desarrollarán cuadros clínicos de nematodiasis gastroentérica (Cuéllar, 1992).

La presencia de nematodos gastroentéricos ocurre tanto en animales jóvenes como en adultos, sin embargo, la presentación clínica de la enfermedad casi es exclusiva de corderos. Además, existen otros factores propios del hospedador que condicionan la severidad de la parasitosis, entre los que están: la especie, raza, estado nutricional y estado fisiológico (Cuéllar, 1992).

Es una opinión generalizada que los animales nativos o genéricamente llamados “criollos”, resisten más las infecciones parasitarias en relación a los animales de razas puras o exóticas, esta situación se explica por una selección natural en los animales nativos, con una progenie con las mismas características. Además debe considerarse que los ovinos de razas puras son por lo regular criados y mantenidos bajo condiciones estabuladas en las que difícilmente tienen contacto con los parásitos y al entrar en contacto con ellos muestran una gran susceptibilidad (Cuéllar, 1992).

El estado nutricional del animal juega un papel fundamental en la susceptibilidad a la nematodiasis gastrointestinal. Los animales subnutridos por lo regular presentan cargas parasitarias mayores en relación a aquellos que mantienen óptimas condiciones nutricionales, esto podría explicarse por los mecanismos inmunológicos que permiten o no la infección parasitaria, cuya base está en la cantidad y calidad de alimento consumido, especialmente en lo referente a proteínas (Cuéllar, 1992).

El estado fisiológico, puede favorecer una mayor población de nematodos adultos en el abomaso. Ocurre un “alza posparto” o “alza lactacional”, que se refiere a un aumento en la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos en ovejas después del parto, cuando se encuentran lactando. El pico máximo en la eliminación de huevos, ocurre entre las cuatro y ocho semanas después del parto. Se considera que el desarrollo masivo de nemátodos adultos se favorece por la prolactina, la cual está presente hacia el final de la gestación y durante la lactación (Cuéllar, 1992). En realidad existen dos aumentos, que en general coinciden en el tiempo, uno el lactacional en las hembras en cualquier tiempo y el de primavera, que se presenta en hembras vírgenes y en los machos es de menor intensidad (Quiroz, 2003).

La expulsión de parásitos adultos ocurre por su vejez o por respuesta inmune. En el caso de *H. contortus* se ha observado que los animales que han tenido infecciones previas expulsan parásitos adultos tres días después de una nueva infección. Se considera que se desarrolla una hipersensibilidad tipo I contra el líquido de muda de la L₃ y la L₄, cuando la infección es intensa aún las nuevas larvas son expulsadas (Quiroz, 2003).

1.3 PATOGENIA

La patogenia está relacionada con la actividad expoliadora hematófaga de las L₄ así como la de los adultos (Dunn, 1983). Al ingerir grandes cantidades de sangre del hospedador se producen pérdidas de los componentes sanguíneos, incluyendo eritrocitos y proteínas plasmáticas, lo que ocasiona anemia e hipoproteinemia. La pérdida diaria es de alrededor de 0.05 ml de sangre completa por gusano (Soulsby, 1987).

Las larvas ejercen acción mecánica y traumática cuando penetran a las glándulas gástricas en la pared del abomaso (Quiroz, 2003) y la lesión causada a la mucosa por fijación de los adultos produce abomasitis catarral (Lapage, 1976; Blood *et al*, 1986). Las larvas que penetran en la mucosa producen lesiones,

consecutivas a la penetración y crecimiento de las larvas en el interior de las glándulas gástricas, lo que origina hiperplasia, dilatación y una marcada protusión sobre la superficie de la mucosa. Durante este periodo las larvas ejercen también una acción antigénica, debida a la muda y a los productos de secreción y excreción, que en algunos casos necrosa el tejido circunvecino y en otros provoca una respuesta inmune local y humoral (Quiroz, 2003).

Los adultos generan también una acción tóxica por medio de sustancias anticoagulantes que infiltran en los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasionan para succionar sangre; al cambiar de sitio de alimentación, la úlcera continúa sangrando, lo que favorece la pérdida de sangre (Quiroz, 2003).

La parasitosis en abomaso da lugar a la disminución de la secreción de HCl que facilita el aumento del pH gástrico, que repercute negativamente en la digestión proteica ya que el pepsinógeno no se convierte en pepsina, además se pierde el efecto bacteriostático del pH bajo. También aumenta la síntesis de gastrina, que va aunado a un aumento de la contractilidad del abomaso y del peristaltismo intestinal (Meana & Rojo, 1999).

1.4 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos pueden agruparse en tres cuadros: Hiperagudo, agudo y crónico.

Hemoncosis hiperaguda: Es poco común, pero puede darse en animales susceptibles expuestos a una repentina infección masiva. El enorme número de parásitos provoca el rápido desarrollo de anemia, heces de color oscuro y muerte súbita, debida a la pérdida de sangre. Ocurre gastritis hemorrágica intensa. Se puede producir la muerte en el periodo prepatente de tales infecciones (Dunn, 1983; Soulsby, 1987).

Hemoncosis aguda: Se observa principalmente en animales jóvenes susceptibles con infecciones intensas (Soulsby, 1987). Afecta a pocos animales, pero en brotes graves puede afectar un gran porcentaje del rebaño si no recibe

tratamiento. El cuadro clínico incluye baja considerable de peso y/o retardo en el crecimiento. Hay diarrea intermitente de color café oscuro, emaciación, mucosas pálidas y presencia de edema submandibular. Los animales están débiles, dejan de comer y se retrasan al momento de pastorear, puede haber caída de lana o esta es arrancada a mordidas por otros animales afectados. En muchos casos el animal muere como consecuencia de los severos trastornos digestivos y metabólicos que provocan los parásitos. Los animales recuperados suelen quedar subdesarrollados (Dunn, 1983; Blood *et al.*, 1986).

Hemoncosis crónica o subclínica: Se presenta en la mayoría de los casos con ausencia de signos observables. Esta presentación es importante ya que pasa inadvertida por el productor o el responsable de la sanidad del rebaño, trae como consecuencia grandes pérdidas económicas a largo plazo, dada la ineficiencia económica y biológica de los animales afectados (Cuellar, 1986).

1.5 LESIONES

En los animales muertos como consecuencia de la hemoncosis, además de las lesiones inespecíficas debidas a trastornos generales, como emaciación, deshidratación, anemia y diarrea. Existen otras lesiones más específicas limitadas al tracto digestivo relacionadas con *H. contortus* (Meana & Rojo, 1999).

A la necropsia la canal se observa pálida, edematosa y con un pobre estado de carnes, así como ausencia de grasa y presencia de líquidos en cavidad peritoneal, torácica y en pericardio (Dunn, 1983; Cuellar, 1986).

En el abomaso se observa la presencia de adultos de *H. contortus*, la pared está hiperémica, pueden observarse coágulos y pequeñas ulceraciones en los puntos donde se fijaron los gusanos adultos. El contenido del abomaso suele tener un color pardusco por la presencia de sangre (Dunn, 1983; Blood *et al.*, 1986).

1.6 CONTROL Y PREVENCIÓN

Debido a la cantidad de factores que intervienen es imposible indicar una receta especial para una situación dada. Sin embargo, se deberá buscar siempre el costo beneficio óptimo, para lo cual es necesario además de las consideraciones epidemiológicas, inmunológicas, zootécnicas, llevar registro de ganancia de peso, producción de lana, leche, crías y relacionarlos con el programa o calendario de desparasitación ensayado (Quiroz, 2003).

Desparasitación selectiva. Se ha empleado recientemente el Sistema FAMACHA© (de Fafa Malan Chart) para tratar de disminuir la presentación de cepas de nematodos resistentes a los antihelmínticos, este se basa en la identificación individual de animales que manifiestan signos de anemia en la mucosa ocular, para aplicar un producto antihelmíntico. De esta forma solo se desparasita la población del rebaño más afectada. Para realizar esto se compara la coloración de la mucosa ocular de los corderos con los colores presentes en los cinco niveles de la tarjeta de FAMACHA©. Se considera que un cordero con la mucosa ocular de color rosa intenso (nivel 1) no es afectado de forma importante por los parásitos, de tal forma que no se desparasita y solo los animales que tienen la mucosa ocular pálida (niveles 4 y 5) se desparasitan (Wyk & Bath, 2002).

El uso de sistemas de rotación de potreros puede ser utilizado en el control de nematodos (Cuéllar, 1986), por ejemplo los animales que entren a pastos nuevos deben tener la menor carga de parásitos posible. La separación por edades permite utilizar los potreros con mayor carga de larvas por kg de pasto para los animales adultos, por el grado de inmunidad que tienen y a los animales jóvenes introducirlos o permitir el acceso a pastos nuevos con menor carga de larvas (Quiroz, 2003).

La henificación o el ensilaje de la pradera permiten cortar el ciclo por medio de la muerte de las larvas. Esta condición ocurre durante la estación de sequía en

zonas tropicales en donde los rayos solares materialmente esterilizan desde el punto de vista parasitológico a la pradera (Quiroz, 2003).

La buena nutrición aumenta la resistencia de los ovinos contra las infecciones por *H. contortus*. La suplementación con proteína ha demostrado los mejores efectos, hasta ahora se han utilizado suplementos convencionales como la soya, árboles forrajeros y bloques de melaza-urea (Torres, 2000).

Se ha señalado, por otra parte, que depredadores tales como hongos y escarabajos, contribuyen en la dispersión fecal y eliminan gran cantidad de larvas (Quiroz, 2003). La función de los hongos nematófagos como *Arthrobotrys oligospora* y *Duddingtonia flagrans* en el control de las larvas infectantes, consiste en tratar de establecer en las praderas, una población de estos hongos capaz de reducir el grado contaminación por L₃ de *H. contortus* en el pasto (Faedo *et al.*, 1998; Torres, 2000).

Una vacuna comercial contra NGE esta lejos todavía de ser realidad. La única vacuna comercial es contra nematodos pulmonares (Torres, 2000).

Se han efectuado investigaciones respecto a la eficacia de la vacunación contra *H. contortus* con larvas irradiadas mediante rayos X, pero este método no ha tenido utilización práctica (Blood *et al.*, 1986, Seaton *et al.*, 1989).

Se han realizado trabajos para evaluar vacunas elaboradas con antígenos intestinales de *H. contortus*, con la cual se ha observado una reducción en la eliminación de huevos, lo que permite disminuir la contaminación de las praderas (Kabagambe *et al.*, 2000; Radostits *et al.*, 2002).

1.7 RESISTENCIA GENÉTICA

El término “resistencia a nematodos” ha sido definido como la habilidad de un hospedador para iniciar y mantener una respuesta que evite o reduzca el establecimiento de los parásitos o elimine la carga parasitaria. Los animales resistentes no son completamente refractarios a la enfermedad, solo albergan

menos parásitos que los animales susceptibles y por lo tanto eliminan menos huevos en heces (Albers *et al.*, 1987).

Existen diferentes formas de evaluar la resistencia genética a nematodos gastroentéricos, la más común es medir la reducción en la eliminación de huevos en las heces, con todas las limitaciones que eso implica (Stear & Murray, 1994), pues la cantidad de huevos eliminados no necesariamente está relacionada con la carga parasitaria en el animal. No obstante lo anterior, esta prueba se ha empleado para la selección de animales en Australia (Woolaston, 1993; Eady *et al.*, 1996) y Nueva Zelanda (Pernthaner *et al.*, 1995). La más confiable, es conocer la cantidad de parásitos (larvas y adultos) presentes en el tracto gastrointestinal de los animales evaluados (Gray *et al.*, 1992; Hooda *et al.*, 1999; Balic *et al.*, 2000).

La resistencia a los nematodos adultos se puede manifestar de tres formas: La primera es la eliminación de la población de nematodos adultos, la segunda son cambios en la morfología de los nematodos adultos y la tercera se observa como una disminución en la fecundidad de las hembras parásitas (Balic *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que algunas razas de ovinos son más resistentes que otras a los nematodos gastroentéricos. Algunas de las razas en que se ha demostrado esta resistencia son: Blackbelly (Yaswinski *et al.*, 1980; Muñoz *et al.*, 2007), Romanov (Luffau *et al.*, 1990), Merino (Gill *et al.*, 1993), Saint Croix, Katahdin (Parker *et al.*, 1993), Florida (Torres *et al.*, 1994), Romney (Hohenhaus & Outteridge, 1995), Red maasai (Mugambi *et al.*, 1996), Nali (Singh *et al.*, 1997), Polaca de lana larga (Bouix *et al.*, 1998), Nativa de Louisiana (Miller *et al.*, 1998), Castellana, Florida y sus cruzas (Gómez *et al.*, 1999).

Por otro lado, se han realizado evaluaciones dentro de raza encontrando que existe una gran variabilidad genética individual, lo que ha obligado a la selección de aquellos animales con una reducida eliminación de huevos en heces (Hooda *et al.*, 1999). Dicha variabilidad probablemente está basada en la capacidad individual de responder inmunológicamente contra los parásitos (Pernthaner *et al.*, 1995, 1996) y es una característica altamente heredable (Sréry *et al.*, 1994).

Los mecanismos de resistencia dependen de respuestas inmunitarias adquiridas tras el contacto con los parásitos y de la capacidad fisiológica innata de los animales para adaptarse a la infección. La inmunidad frente a los nematodos gastrointestinales es dependiente directamente de la respuesta celular de linfocitos T, incluye importantes alteraciones inflamatorias en la mucosa, y también se ve facilitada por la presencia de anticuerpos específicos frente a los parásitos (Meana & Rojo, 1999).

1.8 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA *Haemonchus*

No son claros los mecanismos inmunológicos a través de los cuales los animales tienen o adquieren resistencia a esta parasitosis, a pesar de haberse realizado bastantes estudios, aun existen dudas al respecto, no obstante, se ha observado que la respuesta es diferente dependiendo de la edad, raza, estado nutricional así como del estadio de desarrollo parasitario y las exposiciones previas (Muñoz, 2007). Incluso, animales de la misma raza pueden comportarse de forma distinta dependiendo la zona donde sean explotadas. De tal forma, que si una raza identificada como resistente es introducida a una zona de baja prevalencia y en este lugar se explota por varias generaciones, cuando estas nuevas generaciones se comparan con individuos de la misma raza, producidos en una zona endémica, se observarán probablemente diferencias entre ambos grupos. La migración de las poblaciones a diferentes áreas de contacto con los parásitos, puede dar como resultado diferentes niveles de inmunidad adquirida (Mugambi *et al.*, 1997).

Una característica de la respuesta inmune es la especificidad inmunológica. El tipo de respuesta está condicionada por las variaciones antigénicas que presentan los nematodos. Debido a que *H. contortus* tiene varios estadios durante su desarrollo en el hospedador, es difícil que este sea capaz de montar una respuesta eficiente, pues se ha demostrado que cada fase larvaria que se encuentra dentro del hospedador tiene antígenos de superficie diferentes. Una L₃

de *H. contortus* que penetra la mucosa abomasal pasa de uno a dos días en este estadio, antes de seguir con su desarrollo a L₄, en caso de que esta larva no entre en hipobiosis continua su desarrollo a L₅ en dos o tres días, cabe mencionar que también existen moléculas que se desprenden del parásito (secreción y excreción). Esto indica que el sistema inmune es estimulado por distintas moléculas antigénicas en poco tiempo, que además son distintas a los antígenos que se encuentran en la superficie de las fases adultas (Meeusen *et al.*, 2005).

1.9 RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA

La inmunidad innata de un individuo no requiere de contacto previo con el agente infectante, esta funciona de manera no específica, incluye aspectos genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales así como factores relacionados con la edad y las barreras de protección mecánica (Rojas, 2001).

Se han observado algunos factores relacionados con una respuesta más eficiente contra los nematodos, entre las cuales podemos mencionar, cambios en las propiedades fisicoquímicas del moco en el estómago, incremento en la producción del mismo, el aumento de la motilidad, así como una hiperplasia de mastocitos intraepiteliales, denominados leucocitos globulosos (globule leucocyte GL). En trabajos con cuyes infectados con *T. colubiformis* se observó un aumento significativo en los GL, así como en la cantidad de sulfomucinas contenidas en estas células (Manjili *et al.* 1998). Por otro lado, los ovinos infectados con *H. contortus* mostraron una reducción significativa de mucina neutra en la superficie abomasal y un incremento en la cantidad de mucina ácida (Claerebout, 2000).

En muchos estudios se ha comprobado que los parásitos tienen la capacidad de activar el complemento por la vía alterna, esta es la primera señal de activación de la respuesta inmune inespecífica en las infecciones con *H. contortus*. Por medio de las fracciones C3a y C5a del complemento, arriban los eosinófilos a la zona de infección en forma independiente a los mecanismos específicos de respuesta, esta activación del complemento puede mediar la citotoxicidad de los

eosinófilos a las larvas, en etapas tempranas de la infección, en ausencia de anticuerpos específicos. Por esta razón se denomina a este proceso eosinofilia tisular timo-independiente, la cual se considera como parte de la respuesta innata (Muñoz, 2007).

También se conoce el fenómeno de autocura, el cual ocurre cuando la población de nematodos adultos ya establecidos, son expulsados espontáneamente cuando se da una nueva invasión masiva, después de un periodo corto de exposición. Este fenómeno se observa comúnmente después de una fuerte lluvia que activa un gran número de larvas que se encuentran en las heces. Esta invasión larvaria resulta en un aumento del pH abomasal y una reacción de hipersensibilidad mediado por la IgE que finaliza con la expulsión de la población parasitaria presente (Miller & Horohov, 2006).

1.10 RESPUESTA ESPECÍFICA HUMORAL

Los mecanismos por los cuales las inmunoglobulinas IgG e IgA contribuyen en la inmunidad contra los nematodos gastrointestinales no son totalmente claros. Pero se sugiere que los anticuerpos pueden tener un efecto directo sobre los parásitos. Son varios los estudios donde se relacionan las inmunoglobulinas de tipo IgA e IgG con la resistencia a *Haemonchus contortus*. En general se ha observado un incremento en los anticuerpos séricos contra antígenos larvarios y de adultos después de una infección primaria y secundaria, sin embargo, se ha cuestionado la relación directa entre los niveles de anticuerpos séricos y el estado inmune del ovino. Aunque se ha demostrado en varios estudios, que las IgA juegan un papel importante en la respuesta local en ovinos inmunes, esto es cuestionable debido a que *Haemonchus contortus* se localiza en la mucosa abomasal, por tal motivo la respuesta por anticuerpos a nivel periférico es probablemente un pobre reflejo de lo que sucede a nivel local (Gasbarre, 1997). Para estudiar la respuesta inmune a nivel local, del abomaso *in vivo*, Smith, 1988 (citado por Schallig, 2000) realizó canulaciones del conducto linfático gástrico,

para monitorear la respuesta contra *Teladorsagia circumcincta* y observo una correlación negativa entre la respuesta de tipo IgA y la longitud de los gusanos, sugiriendo que las IgA pueden interferir en la habilidad del parásito para alimentarse.

Gill, *et al* (1992) Utilizaron la misma técnica y realizaron biopsias para monitorear la cinética de la respuesta inmune local contra *Haemonchus contortus* y encontraron que el número de células conteniendo IgA-, IgG₁-, IgG₂-, o IgM- fue menor antes de la infección. Después de la infección se observó un incremento en el número de células contenedoras de inmunoglobulinas, con un pico los días 21 y 28 post-infección. Las células conteniendo IgA fueron las más frecuentemente observadas, seguidas de las IgG₁, lo cual sugiere que las IgA juegan un papel de mayor importancia que el de las IgG en la respuesta inmune contra *Haemonchus*.

Resultados similares se observaron cuando se determinó mediante inmunofluorescencia el número de células IgM, IgG e IgA positivas en las regiones fúndica y pilórica de la mucosa abomasal en ovinos de dos razas distintas, infectadas experimentalmente con 6000 L3 de *H. contortus* de forma gradual. Los resultados de este trabajo mostraron un aumento en el número de células IgM, IgG e IgA positivas en los animales infectados en comparación con los animales testigos. No obstante se observó una relación negativa entre los niveles de anticuerpos y la eliminación de huevos en heces, lo mismo sucedió con el número de fases adultas recuperadas y la cantidad de inmunoglobulinas séricas (Muñoz, 2007).

Varios trabajos con *T. colubriformis* y *O. circumcincta* enfocados a la relación existente entre los niveles de IgA con el tamaño de los adultos, demuestran una fuerte asociación entre el incremento de la respuesta de IgA con la reducción en el tamaño de estos, particularmente las IgA específicas contra las L₄ (Stear, 1999). Se midió *in vitro* la producción de IgG e IgE en cultivos de células esplénicas y de linfonodo abomasal de ovinos sacrificados 28 días p.i, las células fueron estimuladas con antígenos parasitarios, se observó en los resultados que las células de los animales resistentes produjeron significativamente mas IgG e IgE que las células de los animales susceptibles (Gill, 2000).

Los incrementos en los niveles de IgE total y específicas, se consideran generalmente como un factor importante en la respuesta del hospedador en la infección por helmintos. La mayoría de estos trabajos se han realizado en humanos y roedores, en rumiantes el papel de esta inmunoglobulina se ha estudiado poco, aunque en la actualidad ya se encuentran anticuerpos contra IgE ovina disponibles (Shaw *et al.*, 1996).

En 1997 Kooyman *et al.*, desarrollaron un ELISA para monitorear los niveles de IgE sérica total y antígeno específica, en una infección experimental controlada con *H. contortus*, la cual resultó en un incremento en los niveles de IgE sérica totales de las dos a las cuatro semanas p.i, también se encontró una relación negativa entre el número de adultos recuperados con los niveles séricos de IgE total.

1.11 RESPUESTA ESPECÍFICA CELULAR

En 1986, Mosmann *et al.*, iniciaron un concepto revolucionario en Inmunología al dividir las células T cooperadoras (Th) en dos poblaciones según los perfiles de citocinas implicadas. A tal grado que el papel de las células Th1 y Th2 ha llegado a constituir un dogma, con afirmaciones categóricas que actualmente aparecen en los libros de inmunología, en las cuales se dice que las respuestas de tipo Th1 acaban con parásitos intracelulares y las respuestas Th2 eliminan los extracelulares (Caballero, 1998). En rumiantes aún no se ha establecido la polarización de una respuesta de tipo Th1 o Th2, como en roedores y humanos (Gill, 2000). En la mayoría de los trabajos realizados al respecto se han obtenido resultados que sugieren una clara respuesta de tipo Th2. Incluso en investigaciones realizadas sobre producción de vacunas, se observó que se puede obtener una respuesta de tipo Th1, o bien una respuesta de tipo Th2 dependiendo del tipo de adyuvante utilizado (QuilA u hidroxido de aluminio respectivamente) obteniendo mejores resultados con la respuesta tipo Th2 (Newton y Munn 1999),

tal vez, el tipo de repuesta que montan los animales de razas resistentes, sea primordialmente de tipo Th2.

Se aplicó un anticuerpo contra células CD4+ (Mouse anti-ovine mAb 44.38) a ovinos resistentes y presentaron una mayor cantidad de huevos en heces 28 días p.i con 20,000 L₃ de *H. contortus*, en comparación con animales de la misma raza que fueron tratados con un anticuerpo contra células CD8+ ((Mouse anti-ovine mAb 38.65) y un grupo que no recibió ningún tratamiento. El grupo tratado con el anti-CD4 se comportó como el grupo de una raza susceptible. Resultados semejantes se obtuvieron cuando se evaluó la carga parasitaria al sacrificio de los animales, pues los animales tratados con anti-CD4 y los de la raza susceptible presentaron una mayor carga parasitaria, que el grupo tratado con anti-CD8 y los de raza resistente no tratados. La reducción de la expresión de linfocitos CD4+, también repercutió en el número de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares, a nivel de la mucosa abomasal (Gill, 1993). Estos resultados sugieren que los linfocitos CD4+ juegan un papel preponderante en la respuesta inmunológica contra *H. contortus*, aunque el mecanismo por el cual esto sucede no es claro. Por otro lado los animales de una raza resistente y una susceptible, presentaron un mayor número de linfocitos CD4+ que CD8+ en las regiones fúndica y pilórica abomasal, después de ser infectados con *H. contortus*, en comparación con los animales testigo (Muñoz, 2007). Lo cual confirma la polarización hacia una respuesta mediada por linfocitos CD4+ principalmente.

El incremento en el número de mastocitos y eosinófilos se ha relacionado desde hace tiempo con la infecciones por helmintos en los mamíferos, incluidos los ovinos, esta respuesta se caracteriza por una eosinofilia sistémica y local. En trabajos *in vitro*, se observó que los eosinófilos purificados tenían la capacidad de eliminar o matar las fases larvianas de los parásitos, lo cual dio pie para dirigir las investigaciones hacia la importancia de los eosinófilos como las principales células efectoras en las infecciones parasitarias. Se demostró la capacidad de estas células para matar *in vitro* varios parásitos de interés humano y veterinario. En muchos casos se observó que la muerte parasitaria mediada por los eosinófilos era más efectiva contra los estados larvarios y requería de la cooperación, ya sea

de anticuerpos o de las proteínas del complemento, para obtener un máximo efecto. En ensayos *in Vitro*, se demostró que los eosinófilos necesitan estar activados para adquirir una óptima capacidad de matar parásitos. Ha sido más difícil establecer la función directamente efectora de los eosinófilos, en infecciones parasitarias *in vivo* (Meusen & Balic, 2000).

Muchas de las primeras evidencias, que soportaron el papel de los eosinófilos en la resistencia a los parásitos *in vivo*, se produjeron por la observación de cortes histológicos de tejidos de hospedadores infestados, en los cuales se asociaban los parásitos muertos con la presencia de infiltraciones de eosinófilos. No obstante, no estaba claro si esta asociación se daba al momento de la muerte de los parásitos o era consecuencia de la muerte del parásito y el daño a los tejidos. Sin embargo, algunos estudios en los que se examinaron con más detalle las células y sus productos durante el rechazo en la respuesta inmune, demostraron intensos infiltrados de eosinófilos desgranulados alrededor de los parásitos muertos o dañados, en infecciones con diversos parásitos en diferentes especies. Por otro lado, algunos autores consideran la posibilidad de que el daño tisular mediado por los eosinófilos, puede ser una ventaja en la invasión por helmintos, y que los nematodos pueden provocar activamente el reclutamiento de eosinófilos para fomentar ese proceso. Se evaluó *in Vitro*, la actividad quimioatrayente para eosinófilos de extractos de nematodos parásitos de ovinos (*T. circumcincta* y *H. contortus*) cuando se incubaron con cultivos de médula ósea ovina, y se compararon con extractos de un nematodo de vida libre no patógeno (*Caenorhabditis elegans*). Los resultados de este trabajo mostraron que solo los nematodos patógenos tienen una actividad quimioatrayente para eosinófilos (Wildblood *et al*, 2005).

El soporte indirecto de que los eosinófilos juegan un rol importante en la resistencia contra los parásitos se debe en gran medida a la significativa correlación que existe entre la variación de la susceptibilidad genética con la magnitud de la respuesta eosinofílica (Meusen & Balic, 2000, Woolaston *et al.*, 1996). Al comparar dos razas ovinas, la raza identificada como resistente, presentó un mayor número de eosinófilos circulantes y tisulares que la raza

susceptible (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006). Se observó que animales de la misma raza, pueden montar una respuesta eosinófilica mayor, cuando se exponen a una infección mixta con larvas del díptero *Oestrus ovis* (*O.ovis*) y *Trichostrongylus colubriformis* (*T. colubriformis*). Tres grupos se desafiaron en un inicio con *O.ovis*, dos de estos grupos se desparasitaron y posteriormente se inocularon los tres con *T. colubriformis*. Se encontró una relación negativa entre la infección con ambos parásitos, lo cual indica que los eosinófilos actúan de forma inespecífica contra los parásitos (Yacob *et al.*, 2006).

1.12 LOS EOSINÓFILOS

Se atribuye a Paul Erlich el haber descubierto los eosinófilos en 1879, al notificar que cierta población de leucocitos cargados negativamente, tenían afinidad por los colorantes ácidos, incluida la eosina (de ahí el término eosinófilo), pero probablemente fue el anatomista Inglés T. Warton Jones quien los descubrió en 1846, al observar que en la sangre de algunos animales, incluyendo el elefante, se encontraban leucocitos con gránulos, que se hacían evidentes cuando eran expuestos en soluciones hipotónicas (Giembycz, 1999).

Los eosinófilos son producidos en la médula ósea, donde se desarrollan a partir de células primitivas también conocidas como “células madre”. Los eosinófilos maduros entran a la circulación sanguínea, donde permanecen alrededor de 25 horas antes de migrar a los tejidos. En la circulación, constituyen solo del 1-3% de los leucocitos, pues son principalmente células histicas, en los tejidos hay de 300 a 500 veces más eosinófilos, que en la circulación sanguínea (Lampinen, 2000; Brito *et al.*, 2003).

Los eosinófilos son granulocitos que miden de 10 a 12 μm de diámetro, tienen un núcleo bilobulado, la característica más relevante de su citoplasma es que contiene abundantes gránulos, que miden 1 μm o más de diámetro. El centro de los gránulos contiene un cuerpo cristalino característico, visible al microscopio

electrónico, los eosinófilos contienen pocos organelos (Ross *et al.*, 1997; Kühnel, 2005).

Como se mencionó anteriormente los eosinófilos se forman en la médula ósea a partir de las “células madre”, estas se diferencian en híbridos precursores de basófilos o eosinófilos y después se separa el linaje de los eosinófilos. Tres citocinas son particularmente importantes en la regulación del desarrollo de los eosinófilos, estas son la Interleucina 3 (IL-3), la interleucina 5 (IL-5) y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos (GM-CSF). De estas, la IL-5, también conocida como factor de diferenciación de eosinófilos, es la más específica para estimular el linaje de los eosinófilos y es la responsable de la diferenciación selectiva hacia eosinófilos, la IL-5 también regula la relación de los eosinófilos en médula ósea, con los de la circulación periférica (Rothenberg, 1998).

Los eosinófilos producen mediadores, derivados de proteínas que se almacenan en los gránulos específicos y son también las principales productoras de leucotrienos durante los procesos alérgicos, además contienen cantidades importantes del factor activador de las plaquetas. Producen citocinas como TNF α y particularmente IL-5. Para que los eosinófilos monten una respuesta inflamatoria efectiva, deben primero ser activados, para lograr el rodamiento, adhesión, diapédesis y finalmente su desgranulación. Ya activados tienen la capacidad de fagocitar partículas pequeñas como bacterias, pero su principal mecanismo de agresión está relacionado con la toxicidad de las proteínas de sus gránulos y la producción de radicales libres (Lampinen, 2000).

Los eosinófilos tienen receptores de superficie para IgG de baja afinidad (Fc gamma RII, o CD32), para IgE de baja afinidad (Fc γ RII o CD23), para IgA (CD 89), para las fracciones C3a, C3b y C5a del complemento, para el factor activador de plaquetas (PAF), el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y el marcador de linfocitos CD4 (Gleich *et al.*, 1993). La migración de los eosinófilos a los tejidos se da en respuesta a estímulos ambientales, a través de la quimiotaxis con interacción entre sus receptores de membrana y sus ligandos. Entre las sustancias que son quimiotácticas para los eosinófilos se encuentran, la eotaxina

(que es el único factor quimiotáctico específico para los eosinófilos), el PAF, los leucotrienos B4 y D4, la histamina, el factor quimiotáctico de eosinófilos de anafilaxia (ECF-A), IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF y los productos procedentes de la activación del complemento C3, C5, C6 y C7 (Rothenberg & Hogan, 2006).

La migración de los eosinófilos de la circulación hacia los tejidos, involucra su interacción con las células endoteliales. Esto se da por moléculas de adhesión presentes en las células endoteliales, con los ligandos presentes en los eosinófilos, el paso ocurre entre las células endoteliales. Inicialmente los eosinófilos se adhieren al endotelio por medio de tres selectinas, posteriormente se da el rodamiento sobre el endotelio, mediado principalmente por la P-selectina, se adhieren entonces fuertemente por medio de integrinas, que incluyen la CD18, (β_2 integrinas) y el VLA-4 (*Very late Antigen-4*), de la familia β_1 integrinas. Las moléculas β_2 integrinas interactúan con las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) presentes en las células endoteliales, las β_1 integrinas interactúan con las células del endotelio por medio de las moléculas de adhesión vascular-celular-1 (VCAM-1). La vía de VLA-4- VCAM-1 es también utilizada por los eosinófilos (Rothenberg, 1998). Una vez que los eosinófilos pasan entre de las células endoteliales, se mueven en la zona de inflamación por medio de pseudópodos (Stankiewicz *et al*, 1996) y lamelipodios (Lampinen, 2000).

Una vez en los tejidos, los eosinófilos pueden generar sus propias citocinas IL-3, IL-5 y el GM-CSF a través de la interacción con VLA-4 y VLA-6. Estas son autoproducidas para inhibir la apoptosis de los eosinófilos, por 12 a 14 días *in vitro* (Rothenberg, 1998).

Los eosinófilos contienen tres tipos de gránulos. **Gránulos primarios**, son de tamaño variable, redondos, localizadas en la membrana del eosinófilo, contienen lisofosfolipasa A, la cual forma los cristales de Charcot Leyden y constituyen del 5 al 10 % de la proteína eosinófila.

Gránulos específicos están formados por un núcleo cristaloides, se encuentran adheridos a la membrana, contienen 4 proteínas catiónicas eosinófilas básicas. La proteína básica principal (MBP), posee toxicidad contra parásitos, estimula la liberación de histamina de los basófilos y es depositada en la superficie

de los parásitos. Proteína catiónica eosinófilica (ECP), se une a heparina y neutraliza su actividad anticoagulante, por lo que altera la fibrinólisis, es una helmintotoxina 10 veces más potente que la MBP. Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), esta es muy poderosa y puede dañar severamente las neuronas mielinizadas de animales en experimentación.

Gránulos pequeños, estos contienen arilsulfatasa B y fosfatasa ácida, su liberación ocurre en el proceso de desgranulación en respuesta a estímulos específicos, como la unión de los receptores de superficie del eosinófilo con IgA (Rothenberg & Hogan, 2006).

1.13 RAZA COLUMBIA

Esta raza es el resultado de la cruce de carneros Lincoln con ovejas Rambouillet, desarrollada por el Departamento de Agricultura de EUA. El primer trabajo fue hecho en 1912 en Laramie, Wyoming, se le considera como la primera raza creada en Estados Unidos y la Asociación de Criadores de Columbia se conoce en EUA desde 1941. Aunque su distribución se había restringido a EUA, en México cada vez tiene más aceptación. Los animales de esta raza son de doble propósito y se caracterizan por su gran tamaño y peso. Los machos alcanzan los 160 kg y las hembras hasta 110 kg. Presentan cara blanca, recubierta de pelo, son acornes y carecen de arrugas en la piel y el cuello. Los corderos a los dos meses pueden alcanzar pesos promedio de 35 kg. Su tasa reproductiva se considera buena, con fertilidades superiores al 90% y prolificidad moderada de 140% o más (De Lucas, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La hemoncosis es una de las principales causas de pérdidas económicas en las explotaciones ovinas de México y el resto del mundo, donde la producción se da bajo sistemas de pastoreo, solo así los animales entran en contacto con el parásito y se conjuntan los factores ambientales para la presentación de la enfermedad. Las pérdidas económicas producidas por esta enfermedad no se han calculado, pero en algunos países los gastos anuales por antihelmínticos son muy altos, por ejemplo en Argentina 93 000 000 de dólares (1991), Brasil 100 000 000 de dólares (1991), Kenia 26 000 000 de dólares (1999) y la India 103 000 000 de dólares (Waller *et al.*, 1996; Waller & Chandrawathani, 2005). Además, hay que agregar las pérdidas por baja en todos los parámetros productivos, en Estados Unidos se han estimado pérdidas globales por más de 2 billones de dólares (Gasbarre, 1997).

Durante mucho tiempo el control de esta enfermedad se realizó por medio de la aplicación de antihelmínticos, pero las malas prácticas en la aplicación de estos fármacos, han contribuido al desarrollo de cepas de *Haemonchus contortus* resistentes a estos medicamentos.

Por este motivo, se buscan otras alternativas para controlar esta enfermedad, una de estas ha sido el uso de razas resistentes a la hemoncosis y se trata de entender los mecanismos fisiológicos de la resistencia. Uno de los factores a los que se ha asociado la resistencia es al aumento de eosinófilos sanguíneos y tisulares, pues son mayores en razas resistentes (Bricarello *et al.*, 2004; Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006). Lo que aún no ha quedado claro, es si este aumento es solo un efecto colateral de la infección o en realidad tiene un efecto sobre el establecimiento de los parásitos.

Por lo anterior, en este trabajo se indujo en corderos el aumento del número de eosinófilos sanguíneos y abomasales por la administración de un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* y se correlacionó este aumento con el establecimiento de *Haemonchus contortus* en una infestación experimental.

3. HIPÓTESIS

Existe diferencia en el número, tamaño y porcentaje de establecimiento de fases adultas de *Haemonchus contortus* entre ovinos con valores de eosinófilos sanguíneos elevados y normales, al momento de ser infectados experimentalmente.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL:

Evaluar el efecto del número de eosinófilos sanguíneos sobre el establecimiento de las larvas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental.

4.2 PARTICULARES:

- Establecer un modelo para provocar un aumento en el número de eosinófilos sanguíneos en corderos.
- Comparar mediante el conteo del número de huevos en heces el efecto del número de eosinófilos sanguíneos sobre la hemoncosis en corderos infectados experimentalmente.
- Determinar mediante el conteo de fases adultas de *Haemonchus contortus* en abomaso, el efecto del número de eosinófilos sanguíneos sobre el establecimiento de este parásito en corderos infectados experimentalmente.
- Correlacionar el efecto del número de eosinófilos sanguíneos y abomasales, con los parámetros parasitológicos, huevos por gramo de heces, número, tamaño, y prolificidad de fases adultas de *Haemonchus contortus* en corderos infectados experimentalmente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 UBICACIÓN

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) L-504 de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Campo 4, UNAM y fue financiando con fondos del proyecto PAPIIT IN2119005.

5.2 ANIMALES

Se utilizaron 50 corderos machos menores de ocho meses, de los cuales 49 fueron de la raza Columbia que procedían de una explotación ovina dedicada a la producción de animales para pie de cría, lo cual garantizó su homogeneidad y pureza racial, que además eran contemporáneos. El cordero restante con características raciales indefinidas sirvió para mantener la cepa de *H. contortus* con la cual se trabajó.

Todos los corderos se mantuvieron en condiciones de confinamiento total, en corraletas con capacidad para seis corderos. La alimentación consistió en alimento balanceado comercial para ovinos con 15.5% de proteína cruda, así como forraje seco molido, en una proporción de 80% alimento y 20% forraje. Se realizó una adaptación a la dieta previa al inicio del experimento (cuadro 1).

Día	Alimento balanceado (%)	Forraje (%)
1-4	20	80
5-8	40	60
9-12	60	40
13-16	80	20

Cuadro 1. Método de adaptación a la dieta

El alimento se ofreció diariamente en cantidad del 4% del peso vivo de cada grupo de corderos. El agua se ofreció *ad libitum* con bebederos automáticos de pivote. Antes de iniciar el trabajo los corderos se encontraban clínicamente sanos, como medida preventiva fueron desparasitados (albendazol 10% 5mg/kg pv). Una vez en las instalaciones los corderos tuvieron un periodo de descanso durante dos semanas, para adaptarse a las nuevas condiciones de manejo.

El cordero donador se mantuvo en una corraleta individual elevada totalmente aislado para evitar el contacto con otros animales. Este cordero recibió alimento balanceado comercial y forraje seco molido en una proporción de 50% alimento y 50% forraje. Tanto el alimento como el agua se ofrecieron *ad libitum*.

5.3 MODELO PARA PROVOCAR EOSINOFILIA

Para lograr un aumento de eosinófilos en sangre periférica (ES), se siguieron varios probables protocolos. Durante el primer ensayo se utilizó IL-5, Human IL005 recombinant (Chemicon internacional), 500 pmol/kg vía intravenosa y se siguió el protocolo esquematizado en la Figura 2.

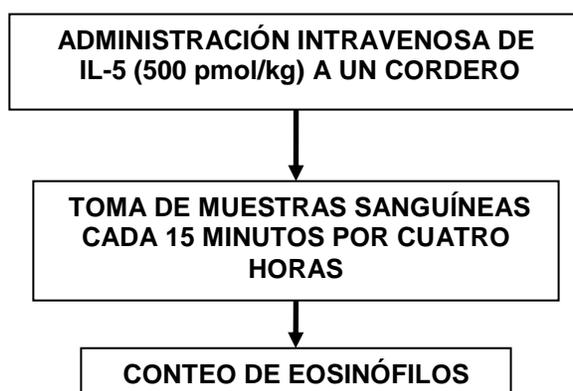


Figura 2. Diagrama del primer ensayo para provocar el aumento de eosinófilos sanguíneos

El resultado de este primer ensayo se muestran en la sección de resultados, pero el aumento de los ES a la dosis usada fue insuficiente para los

siguientes experimentos. Se realizó un segundo ensayo usando antígeno somático de *Toxocara canis* (*T. canis*) y una dosis mayor de IL-5, este ensayo se realizó bajo el protocolo esquematizado en la Figura 3.

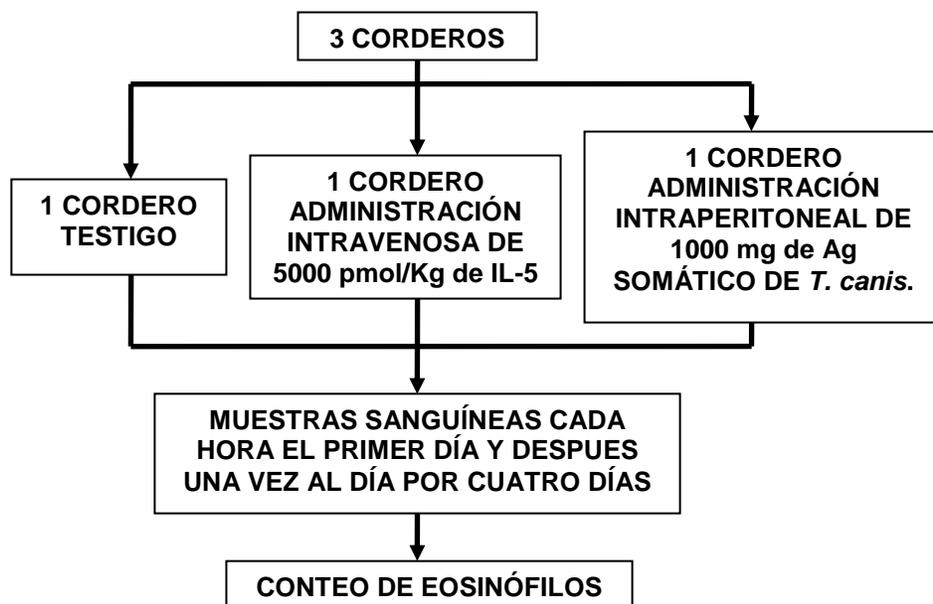


Figura 3. Diagrama de flujo del segundo ensayo para provocar aumento de eosinófilos sanguíneos

Los resultados de este segundo ensayo se presentan en la sección de resultados, no se obtuvo un aumento de ES suficiente y mantenido para ser utilizado en los experimentos posteriores de inoculación. Por lo cual se realizó un tercer ensayo utilizando un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* (ExmTh). Este ensayo se realizó bajo el protocolo esquematizado en la Figura 4.

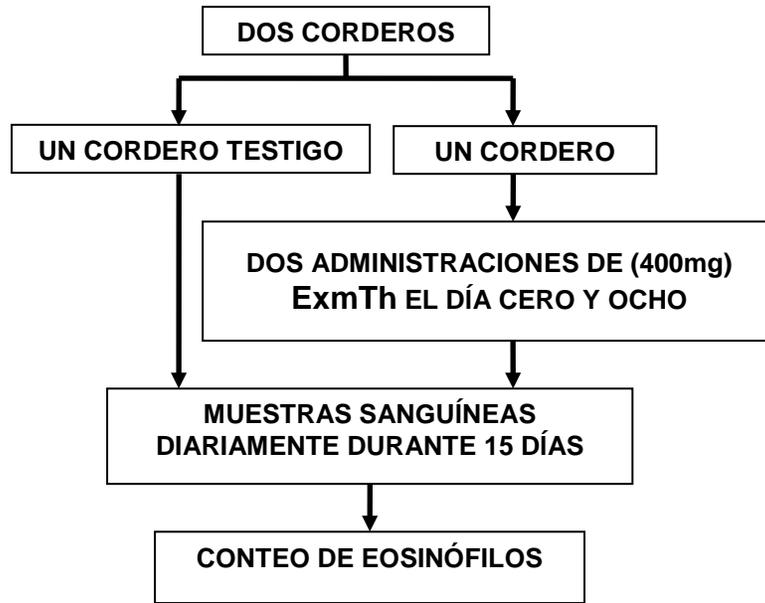


Figura 4. Diagrama de flujo del tercer ensayo para provocar el aumento de eosinófilos sanguíneos

Los resultados de este tercer ensayo se presentan en la sección de resultados. Se observó un aumento de los ES después de la segunda inoculación de ExmTh. Se realizó un cuarto ensayo con el protocolo esquematizado en la Figura 5.

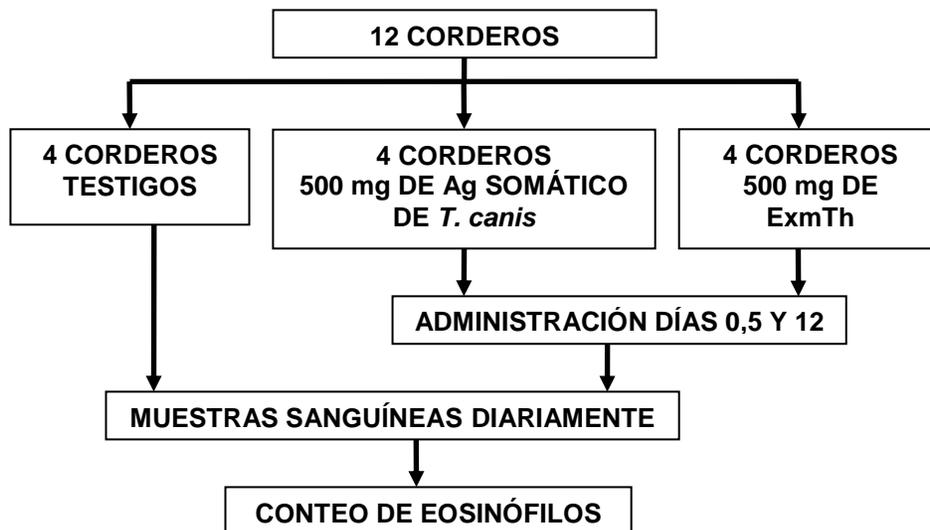


Figura 5. Diagrama de flujo del cuarto ensayo para provocar el aumento de eosinófilos sanguíneos

Los resultados de este cuarto ensayo se presentan en la sección de resultados. Se observó un mayor aumento de los ES en los corderos inoculados con ExmTh, que el mostrado por los corderos que recibieron los antígenos somáticos de *T. canis*. Se realizó un quinto ensayo bajo el protocolo mostrado en la Figura 6.

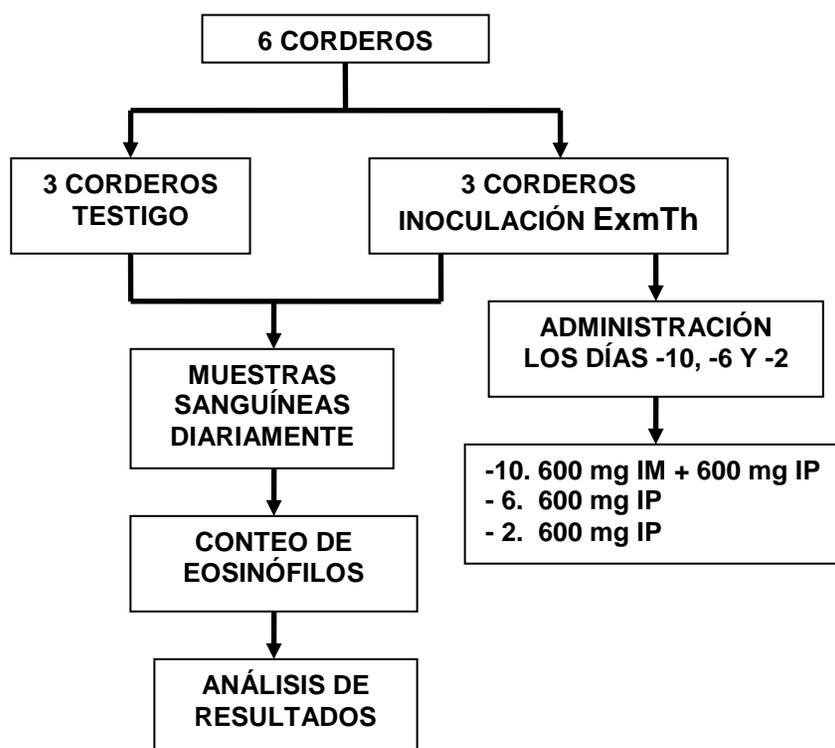


Figura 6. Diagrama de flujo del quinto ensayo para provocar el aumento de eosinófilos sanguíneos

Los resultados obtenidos en este quinto ensayo se presentan en la sección de resultados. Se observó un aumento significativo en el número de ES en los corderos inoculados, por lo que se decidió repetir este protocolo para inducir el aumento de los ES en los corderos de la segunda parte del trabajo.

5.4 EXTRACTO DE METACESTODOS DE *Taenia hydatigena*

Se colectaron metacestodos de *Taenia hydatigena* a partir de ovinos sacrificados en el rastro de Tlalnepantla, Edo. de México. Las larvas colectadas se trasladaron en refrigeración a la UIMSA-FESC, donde se mantuvieron en congelación a -20°C . Para obtener los extractos, se descongelaron los metacestodos y se rompieron las membranas y se colectó el líquido contenido, se agregó un inhibidor de proteasas (aprotinina $10\mu\text{g/ml}$, leupeptina $10\mu\text{g/ml}$, iodoacetamida 1.8 mg/ml y PMSF 1mM SIGMA Labs) y se filtró. Se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de Amonio) y se centrifugó por 1 hora a $20,000\text{ g}$ a 4°C , posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregó PBS. Esta muestra se filtró una vez más mediante un millipore de $0.22\mu\text{m}$, se homogeneizó y alicuotó la muestra, finalmente se determinó la cantidad de proteína contenida en la muestra por el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL AUMENTO DE LOS ES

Se utilizaron 25 corderos Columbia, como se muestra en la Figura 7. Estos fueron divididos en 4. Los corderos de grupo L3 ($n=6$) solo recibieron 5000 L_3 de *H. contortus* mediante sondeo buco-esofágico el día 0 del experimento. Los corderos del grupo ExmTh+L3 ($n=6$) recibieron 600 mg intraperitonealmente (i.p) y 600 mg intramuscularmente (i.m) de ExmTh el día -10, 600 mg i.p de ExmTh el día -6, 600 mg i.p de ExmTh el día -2 y 5000 L_3 de *H. contortus* el día. Los animales del grupo ExmTh recibieron 600 mg i.p y 600 mg i.m de ExmTh el día -10, 600 mg i.p de ExmTh el día -6 y 600 mg i.p de ExmTh el día -2 del experimento, este grupo no recibió larvas. Los corderos del grupo Testigo ($n=5$) solo recibieron agua.

En los corderos de todos los grupos se calculó diariamente el número de ES a partir del día 14 antes de la inoculación de las L_3 de *H. contortus* hasta el día 14 además, de los días 16, 18, 20, 25, 32, 39, 46 y 53 después de la inoculación (p.i). En los corderos de los grupos L3 y ExmTh+L3, se tomaron muestras de

materia fecal los días 14 y 7 antes de la inoculación para calcular número de huevos por gramo de heces (hgh), posteriormente los días 0, 7, 14, 16, 18, 20, 25, 28, 32, 36, 40, 43 47, 50, 54 y 57 p.i.

Cuatro corderos del grupo ExmTh fueron sacrificados el día cero para contar el número de eosinófilos tisulares (ET) en la pared del abomaso en el momento de la inoculación y el resto se sacrificaron el día 57 p.i. En los corderos sacrificados se midió el número de gusanos adultos en abomaso y el tamaño, también se tomaron muestras histológicas para medir el número de eosinófilos por cm^2 (Muñoz-Guzmán *et al*, 2006) en la mucosa abomasal.

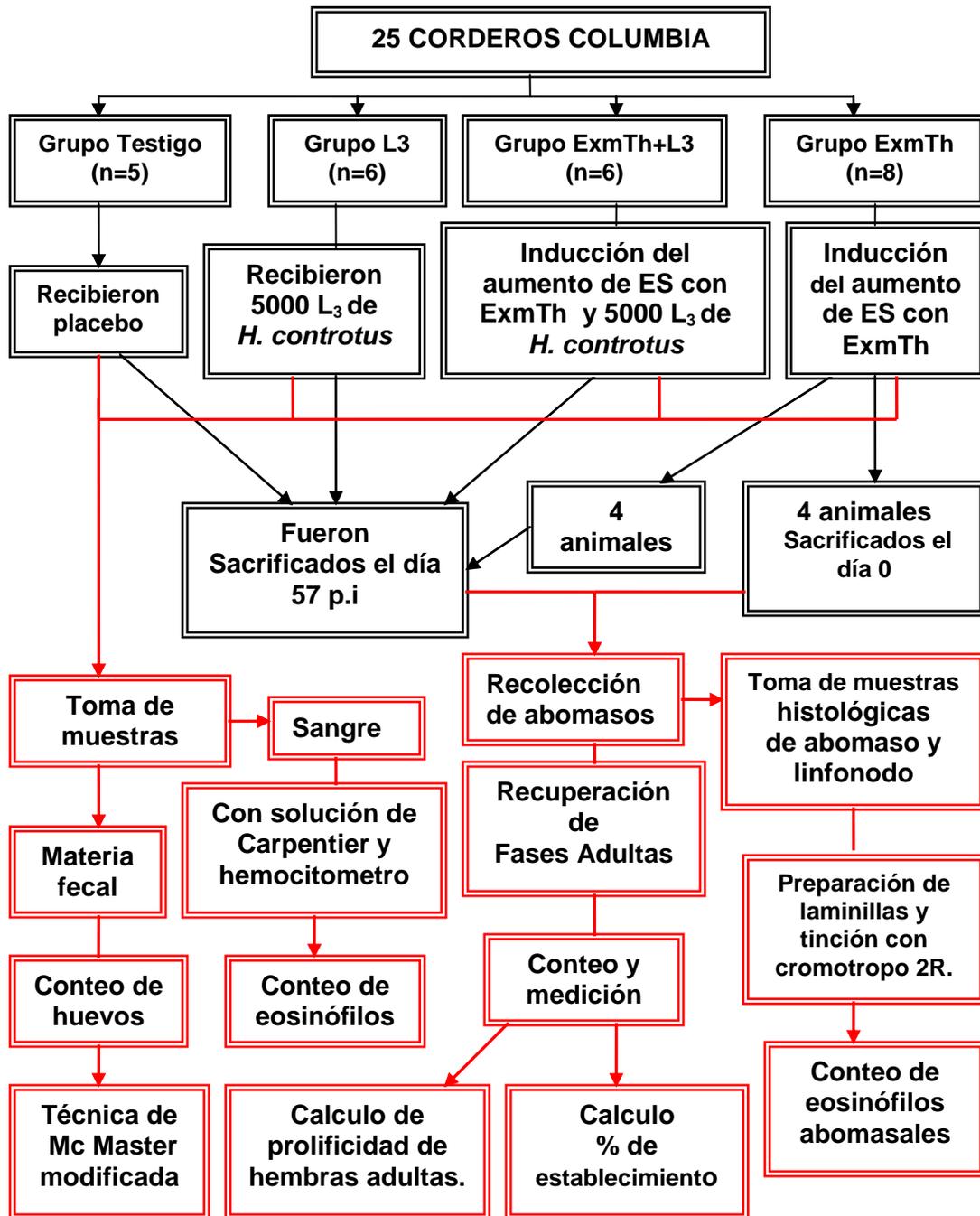


Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del aumento de eosinófilos abomasales y sanguíneos sobre el establecimiento de adultos de *Haemonchus contortus*

5.6 CONTEO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS

Para contar los ES se utilizó sangre fresca obtenida mediante punción en la vena yugular en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante (Rocha *et al.*, 2004) y se realizó una dilución 1:10 con solución de Carpentier (eosina Y al 1% y 40% de formaldehído).

Se utilizó una pipeta de Thoma para leucocitos. Se agregó sangre hasta la marca con el número 1, después se agregó la solución de Carpentier hasta la marca con el número 11, se agitó por tres minutos y se dejó reposar 15 minutos, posteriormente se homogeneizó lentamente, se eliminaron las tres primeras gotas de la dilución y se llenó la cámara del hemocitómetro (Neubauer) nuevamente se dejó en reposo por tres minutos y finalmente se realizó el conteo en la cámara de Neubauer con objetivo de 40x los resultados se expresaron como eosinófilos por mm^3 (Hohenhaus *et al.*, 1998; Muñoz, 2007).

5.7 INOCULACIÓN DE L₃ DE *H. contortus*

Se utilizaron L₃ de una cepa mono-específica de *H. contortus* que fue aislada a partir de un rebaño ovino comercial de Jilotepec, Estado de México, la cual ha sido mantenida por pases sucesivos en corderos (corderos donadores) criados bajo condiciones de estabulación total y con alimentación basada en forraje henificado y alimento balanceado comercial.

Para la obtención de las L₃ fue inoculado un cordero libre de nematodos gastroentéricos mediante sondeo buco esofágico con 3,000 L₃ de *H. contortus*. Una vez que este cordero donador eliminó cantidades elevadas de huevos (4,000 hgh) se le colocó un calzón colector para recuperar la mayor cantidad posible de heces, con la que se realizaron cultivos larvarios mediante una técnica modificada de Corticelli Lai. Esta técnica consiste en colocar una muestra positiva a *H. contortus* (del ovino donador) dentro de una caja Petri de 10 cm, la cual fue colocada a su vez dentro de otra caja Petri más grande (15 cm) que contenía un

poco de agua, esta caja se cerró y se colocó dentro de una estufa de incubación a 28 °C durante siete días, cabe mencionar que estas cajas fueron revisadas diariamente para verificar que no se deshidrataran. Después de estos siete días se revisó con un microscopio estereoscópico el agua contenida en la caja Petri grande para verificar la presencia de larvas. Se recuperó el agua de las cajas para obtener una sola muestra con larvas, esta se homogeneizó lentamente y se recuperó una gota de esta muestra, se revisó al microscopio para contar el número de L₃ contenidas en una gota, este procedimiento se realizó por triplicado para sacar el promedio de larvas por gota. Una vez conocido este dato se contó el número de gotas por ml y se multiplicó por el número de larvas por gota para saber cuántas larvas había en 1 ml de muestra (Cuenca & Cuenca., 2005). De esta forma se calculó la cantidad de muestra necesaria para elaborar inóculos individuales con 5000 L₃.

Los corderos de los grupos L3 y ExmTh+L3 fueron inoculados con 5,000 L₃ de *H. contortus* (Hernández, 2005, Terefe *et al.*, 2005). Esta inoculación se realizó mediante sondeo bucoesofágico para asegurar que las larvas eran depositadas directamente en el rumen. Las larvas empleadas no tenían más de una semana de haber sido cultivadas (Cuenca & Cuenca., 2005).

5.8 CONTEO DE HUEVOS

Se realizó muestreo semanal de materia fecal desde el día -21 del experimento hasta el día 57 p.i con L₃ de *H. contortus*. La materia fecal se colectó directamente del recto de los corderos utilizando bolsas de polietileno y se trabajaron con la técnica de Mc Master modificada (Alba, 2007) para monitorear y cuantificar la eliminación de huevos en las heces. Los resultados se expresaron como número de huevos por gramo de heces (hgh).

5.9 SACRIFICIO

Todos los corderos se sacrificaron para obtener el abomaso. Dicho sacrificio se realizó el día 57 p.i, el abomaso de cada cordero se ligó de ambos extremos y se separó (Coyne *et al.*, 1991; Coyne & Smith, 1992), éstos se identificaron en el lugar de sacrificio y se llevaron rápidamente al Laboratorio de Parasitología de la FES Cuautitlán donde se les realizaron los conteos posteriores.

5.10 RECOLECCIÓN Y CONTEO DE NEMATODOS ADULTOS

En el Laboratorio de Parasitología se recuperó todo el contenido abomasal en recipientes por separado de cada cordero sacrificado, se cortó longitudinalmente toda la pared del abomaso para exponer la mucosa y recuperar de ahí todos los nematodos adultos que se encontraban fijados a la mucosa, esto se realizó mediante arrastre con un chorro de agua (Coyne & Smith, 1992; Cuenca & Cuenca 2005). De esta forma se obtuvieron todos los parásitos contenidos en el abomaso.

Una vez que se recuperó el contenido abomasal con todos los parásitos por separado. Se homogeneizó y pasó hacia una probeta, la cuál se aforó a dos litros, el total de líquido obtenido se homogeneizó nuevamente y de este se tomó sólo el 10% para contar todos de los nematodos adultos presentes (Coadwell & Ward, 1981; Cuenca & Cuenca 2005). El conteo se realizó revisando poco a poco el 10% del contenido abomasal, agregándole un poco de agua para aclarar la muestra y hacer más visibles los parásitos. Con una aguja de disección se fueron separando y colectando los nematodos, en un recipiente se colocaron las hembras y en otro recipiente los machos, una vez revisada en su totalidad la muestra, se contaron todos los parásitos (machos y hembras), se multiplicó por 10 para obtener el número total de adultos en el abomaso.

5.11 MEDICIÓN DE FASES ADULTAS

Una vez que se contaron todos los nematodos de la muestra, se midieron para determinar su tamaño. Se tomaron 50 ejemplares, 25 machos y 25 hembras, se midieron cada uno con un vernier sobre un fondo negro (Coadwell & Ward, 1981; Stear & Murray, 1994). De esa manera se obtuvo el tamaño promedio de las hembras y de los machos adultos de *H. contortus*. El procedimiento se realizó lo más pronto posible después del sacrificio, para poder manipular mejor los parásitos frescos y evitar posibles alteraciones en su tamaño.

5.12 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFICIDAD

Para determinar la prolificidad de las hembras de *H. contortus* se colocó una bolsa colectora para recuperar el total de materia fecal producida en las 24 horas previas al sacrificio, ésta se pesó y se realizó un examen coproparasitoscópico mediante la técnica de Mc Master modificada para obtener el número de huevos eliminado por gramo de heces (Coyne *et al.*, 1991; Coyne & Smith, 1992; Cuenca & Cuenca, 2005). Para determinar el número de huevos producidos por hembra al día se tomó el número de huevos por gramo, se multiplicó por el peso de la muestra de un día y el resultado de esta operación se dividió entre el número total de hembras de *H. contortus*.

5.13 CONTEO DE EOSINÓFILOS TISULARES

Al momento del sacrificio se tomaron muestras de un cm² de tejido abomasal de las regiones fundica (RFA) y pilórica (RPA) así como del linfonodo regional abomasal (LRA). Estas muestras de tejido se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4%, posteriormente fueron deshidratadas y embebidas en parafina para realizar cortes histológicos. Dichos cortes se realizaron a un grosor de 5 µm y se tiñeron con cromótopo 2R al 1% por 30 minutos (Woolley *et al.*,

1994; Muñoz, 2007). Los eosinófilos tisulares se contabilizaron mediante un analizador semiautomático y un software de análisis de imágenes (Image Pro Plus). Para las RPA Y RFA, se contaron 25 campos con un lente objetivo de 40X y lente ocular de 10X, desde la túnica muscular hasta la superficie de la mucosa. Para el conteo de eosinófilos en el LRA se contaron 15 campos pasando por el centro del órgano (Muñoz, 2007). Para el conteo de eosinófilos se registró el número de eosinófilos y el área de tejido analizado en μm^2 y se expresaron como células totales por cm^2 de tejido (Bricarello, 2004).

5.14 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos de hgh y ES se analizaron mediante un modelo general lineal (general lineal model) para muestras repetidas con el programa Statistica for Windows®. Los datos de eosinófilos abomasales se analizaron por medio de una prueba de ANOVA factorial, con el mismo software. Los datos del número de FA, el tamaño y prolificidad de las hembras se analizaron por medio de la prueba T de student. Se realizó una correlación de Pearson para las variables estudiadas (Muñoz, 2007).

6. RESULTADOS

6.1 MODELO PARA PROVOCAR EOSINOFILIA EN CORDEROS

En la Figura 8 se presentan los resultados de la administración de IL-5 vía intravenosa (i.v) sobre la cantidad de ES en un cordero. Se puede observar que la administración de 50 pmol/kg de IL-5 produjo un pico en los ES 30 minutos post-administración (p.a), el cual disminuía paulatinamente hasta desaparecer 3 horas p.a.

En la Figura 9 se presentan los resultados de la administración de 5000 pmol/kg de IL-5 i.v en un cordero y de 1000 mg de antígeno somático de *Toxocara canis* i.p en otro cordero sobre la cantidad de ES. Se puede observar que la aplicación de 5000 pmol/kg de IL-5 produjo únicamente un pico de ES que disminuyó a las 2 horas. La aplicación de Ag de *T. canis* indujo un aumento en el número de ES similar al mostrado por la IL-5 a las 32 horas p.a.

En la Figura 10 se presentan los resultados de la administración i.p los días 0 y 8 de 400 mg de ExmTh en un cordero sobre la cantidad de ES. En esta se observa un aumento en el número de ES después de la segunda administración de ExmTh. Dicho aumento se extendió hasta el día 13 p.a.

En la Figura 11 se presentan los resultados de la administración de 500 mg i.p de ExmTh a 4 corderos y de Ag somático de *T. canis* a otros 4 corderos los días 0, 5 y 12 sobre la cantidad de ES. En esta figura se observa un aumento en el número de ES en los corderos que recibieron el antígeno somático de *T. canis*, pero los corderos que recibieron el ExmTh mostraron valores más elevados después de la segunda inoculación.

En la Figura 12 se presenta el número de ES en tres corderos a los que se administró ExmTh el día 0, 600 mg i.p y 600 mg i.m y los días 4 y 8 600 mg i.p. El promedio del número de ES por mm³ de sangre fue mayor ($p < 0.05$). en los corderos que recibieron el ExmTh (524.89 ± 230) que en los testigo (130.62 ± 31.8). Entre los días 3 y 17 p.a la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

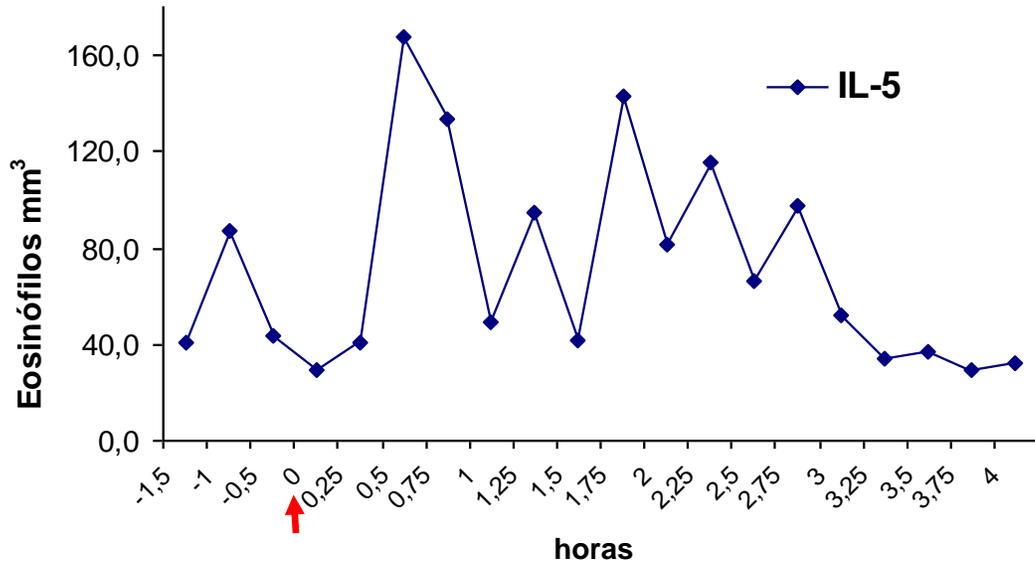


Figura 8. Número de eosinófilos sanguíneos de ovino al cual se le administraron 50 picomoles/kilogramo de interleucina 5 por vía intravenosa a la hora cero ↑.

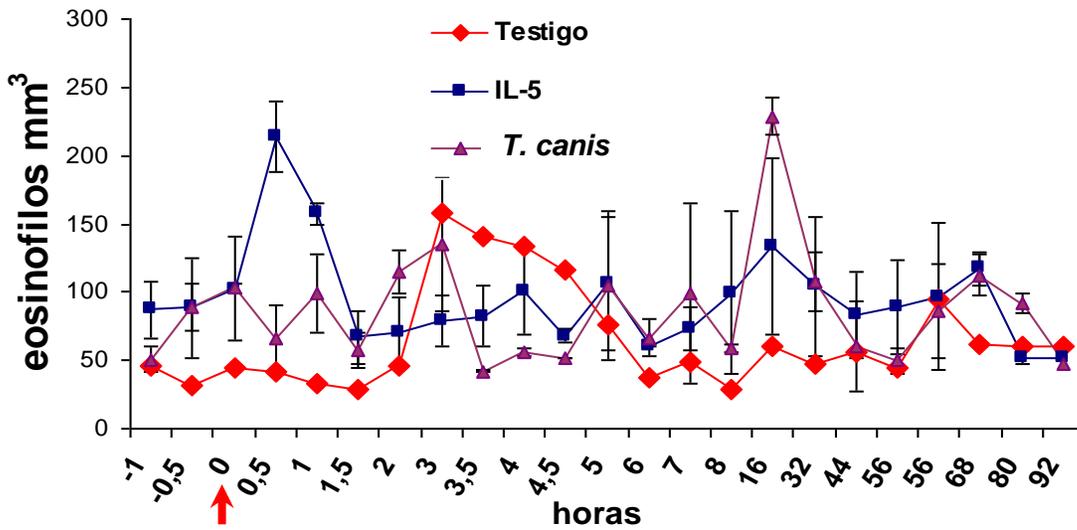


Figura 9. Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos sanguíneos de ovinos a los que se les administraron 5000 picomoles/kilogramo de interleucina 5 por vía intravenosa y 600 miligramos de antígenos somáticos de *Toxocara canis* por vía intraperitoneal a la hora cero ↑.

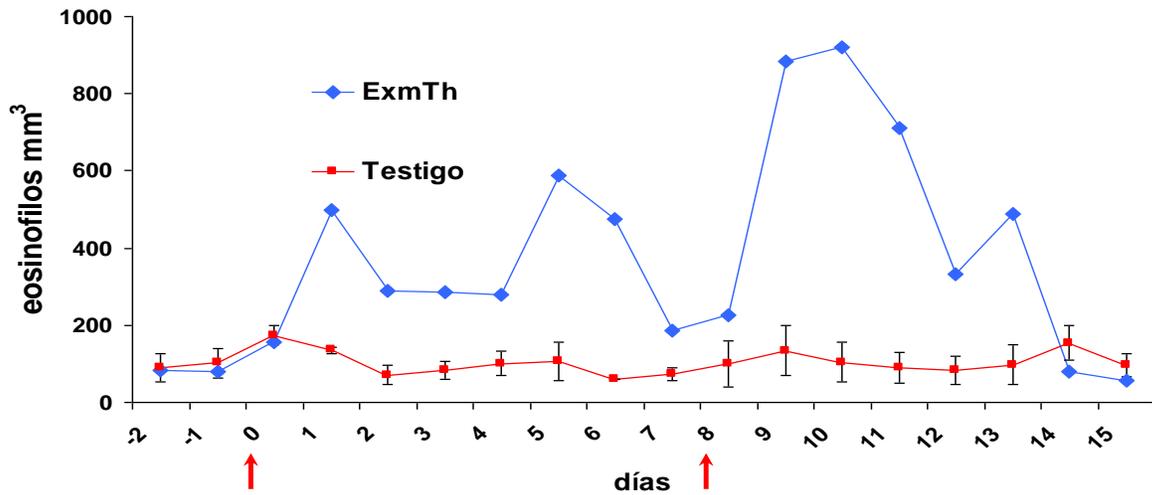


Figura 10. Número de eosinófilos sanguíneos de un ovino al cual se le administraron 600 miligramos de extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* por vía intraperitoneal los días 0 y 8 ↑.

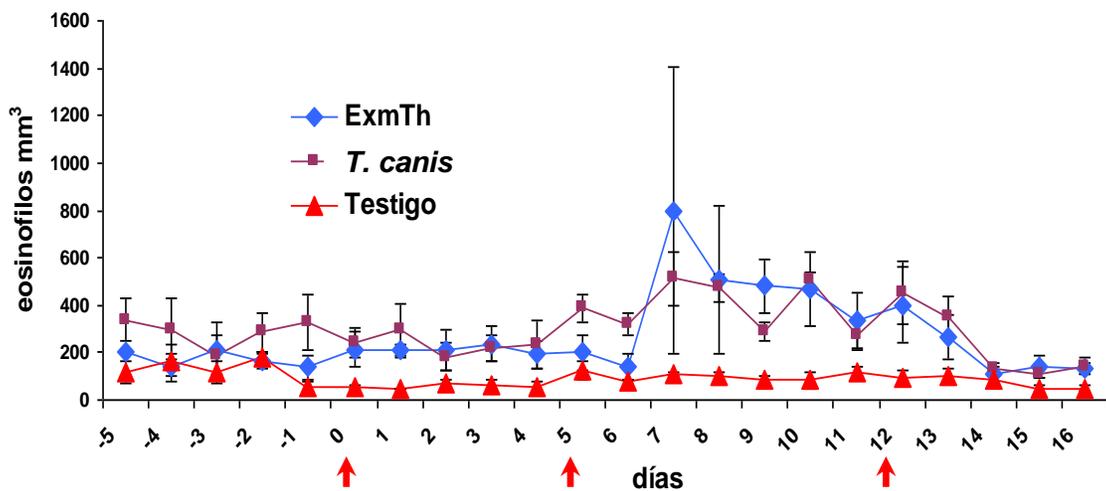
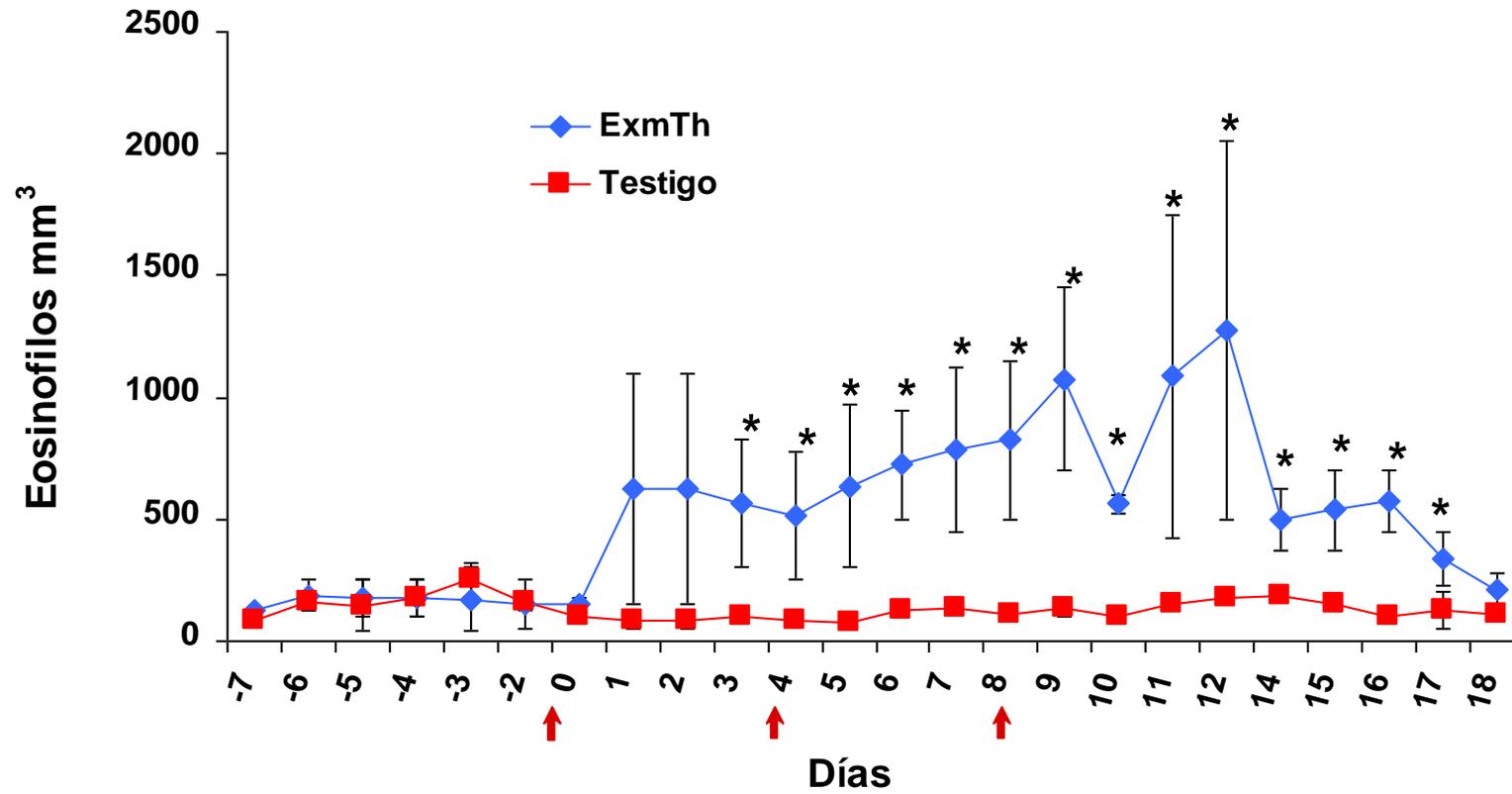


Figura 11. Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos sanguíneos de ovinos a los que se les administraron 600 miligramos de extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* por vía intraperitoneal y 600 miligramos de antígenos somáticos de *Toxocara canis* por vía intraperitoneal los días 0, 5 y 12 ↑.



* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Figura 12. Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos sanguíneos en ovinos a los que se les administraron 600 miligramos de extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* por vía intraperitoneal los días 0, 4 y 8 \uparrow .

6.2 EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS

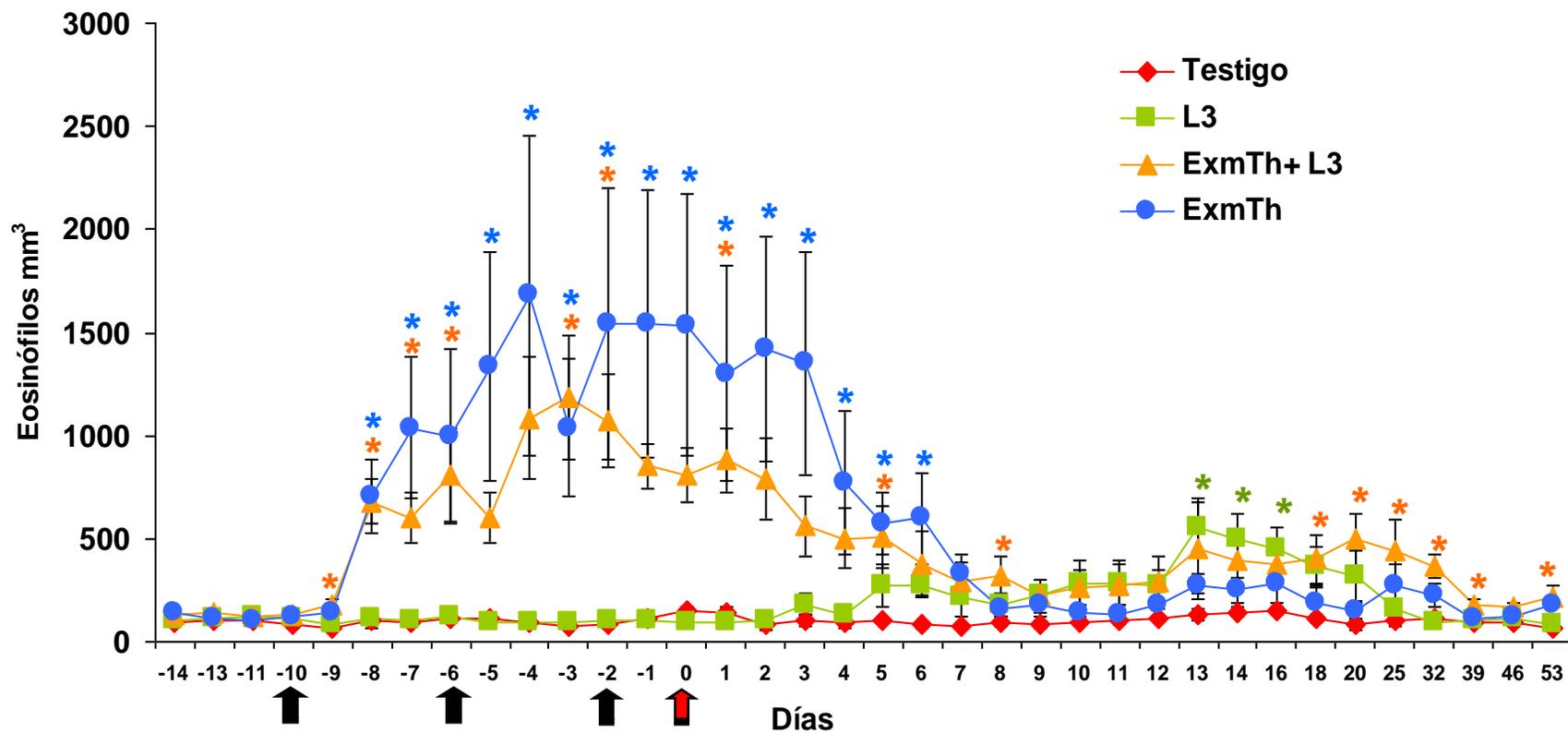
El promedio de ES de los corderos de los cuatro grupos se presenta en el Cuadro 2 y en la Figura 13. El promedio total de ES en el Grupo Testigo fue 101 ± 20 eosinófilos por mm^3 , en el grupo L3 186 ± 49 , en el ExmTh+L3 477.1 ± 118 y en ExmTh 512 ± 143 . Los corderos del Grupo ExmTh+L3 presentaron un mayor número ($p < 0.05$) de ES que el Grupo Testigo los días - 8, - 7, - 6, - 3, - 2, 1, 5, 8, del 18 al 39 y el 53. Entre los corderos del Grupo L3 y ExmTh+L3 se observaron diferencias ($p < 0.05$) los días - 9, - 8, - 7, - 6, - 4, - 3, - 2, - 1, 1 y 2. Entre estos grupos hubo un segundo periodo en el que se observaron diferencias ($p < 0.05$), del día 25 al 39. Entre los grupos ExmTh+L3 y ExmTh solo se observaron diferencias ($p < 0.05$) en los días - 5, 3, 20 y 32. Los corderos del Grupo ExmTh presentaron un mayor número ($p < 0.05$) de ES que el Grupo Testigo los días - 8 al 6. Entre los corderos de los grupos L3 y ExmTh se observaron diferencias ($p < 0.05$) a partir del día -8 hasta el día 4 y los días 32 y 53. Los corderos del Grupo L3 presentaron un mayor número ($p < 0.05$) de ES que el Grupo Testigo los días 23, 24 y 26.

6.3 ELIMINACIÓN DE HUEVOS

Los promedios de hgh se muestran en el Cuadro 3 y en la Figura 14. Los corderos del Grupo L3 tuvieron un promedio total de 6666.02 ± 1582.0 y los corderos del Grupo ExmTh+L3 3031.53 ± 560.8 hgh. En la Figura 18, se observa que los corderos inoculados comenzaron a eliminar huevos entre los días 16 y 18 p.i. El día 20 p.i, en ambos grupos todos los corderos estaban eliminando huevos en heces. Los corderos del Grupo L3 eliminaron más hgh que los del Grupo ExmTh+L3 a partir del día 25 p.i, pero la diferencia fue significativa ($p < 0.05$) solo del día 43 al 57 p.i. Los animales del Grupo Testigo y los del Grupo ExmTh no eliminaron huevos en heces durante el desarrollo del trabajo.

DÍA	GRUPO			
	T	L3	ExmTh	ExmTh+L3
-14	90 ± 16.9	100 ± 18.2	135 ± 12.7	137 ± 26.0
-13	105 ± 16.5	116 ± 12.3	140 ± 10.0	112 ± 26.0
-11	105 ± 14.5	120 ± 28.4	120 ± 14.5	106 ± 15.7
-10	85 ± 18.7	108 ± 25.5	135 ± 23.1	118 ± 38.7
-9	70 ± 16.5	83 ± 12.3	180 ± 31.0	137 ± 29.7
-8	100 ± 29.5	116 ± 22.0	680 ± 108.8	706 ± 178.0
-7	95 ± 24.4	104 ± 15.0	600 ± 123.4	1037 ± 344.6
-6	110 ± 20.3	120 ± 21.8	805 ± 226.7	1000 ± 417.8
-5	110 ± 18.7	95 ± 11.9	605 ± 123.0	1337 ± 556.1
-4	95 ± 30.0	95 ± 11.9	1085 ± 293.1	1681 ± 777.3
-3	80 ± 14.6	91 ± 20.0	1185 ± 300.5	1037 ± 333.7
-2	85 ± 23.1	100 ± 21.4	1075 ± 225.9	1543 ± 657.2
-1	110 ± 31.2	104 ± 23.6	855 ± 108.2	1543 ± 646.3
0	150 ± 20.9	91 ± 13.9	810 ± 133.3	1537 ± 638.4
1	145 ± 24.2	91 ± 12.3	880 ± 158.0	1300 ± 520.3
2	85 ± 31.2	104 ± 18.7	790 ± 200.0	1418 ± 547.4
3	100 ± 27.3	183 ± 55.4	560 ± 148.8	1350 ± 536.5
4	90 ± 23.1	133 ± 41.6	500 ± 147.0	775 ± 347.3
5	105 ± 12.2	270 ± 104.7	505 ± 151.3	575 ± 151.0
6	80 ± 14.5	275 ± 58.4	380 ± 153.9	600 ± 219.1
7	75 ± 7.9	220 ± 95.6	290 ± 95.7	331 ± 87.4
8	95 ± 24.2	179 ± 53.7	320 ± 91.9	162 ± 42.7
9	85 ± 18.7	225 ± 80.3	225 ± 47.4	175 ± 51.0
10	95 ± 14.5	283 ± 107.9	260 ± 85.3	137 ± 16.1
11	100 ± 13.6	283 ± 109.2	275 ± 100.3	131 ± 25.7
12	115 ± 10.0	270 ± 73.4	295 ± 115.2	175 ± 17.6
13	130 ± 28.9	554 ± 142.5	455 ± 222.0	268 ± 57.1
14	145 ± 21.5	500 ± 121.7	395 ± 153.3	250 ± 64.5
16	150 ± 17.6	450 ± 102.2	375 ± 97.1	278 ± 90.7
18	115 ± 18.7	362 ± 99.1	400 ± 119.3	187 ± 80.6
20	80 ± 20.0	316 ± 122.0	495 ± 129.7	150 ± 36.8
25	105 ± 31.0	158 ± 22.9	440 ± 155.6	268 ± 109.1
32	115 ± 21.7	95.8 ± 26.9	365 ± 53.9	225 ± 56.8
39	95 ± 18.3	100 ± 11.1	175 ± 28.5	112 ± 29.7
46	95 ± 9.3	112 ± 33.3	165 ± 18.7	118 ± 44.9
53	70 ± 14.5	87 ± 14.0	220 ± 50.8	175 ± 10.2

Cuadro 2. Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos sanguíneos, en corderos a los cuales se les administró un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (grupos ExmTh y ExmTh+L3) e inoculados con 5000 L₃ de *Haemonchua contortus* (grupos L3 y ExmTh+L3).

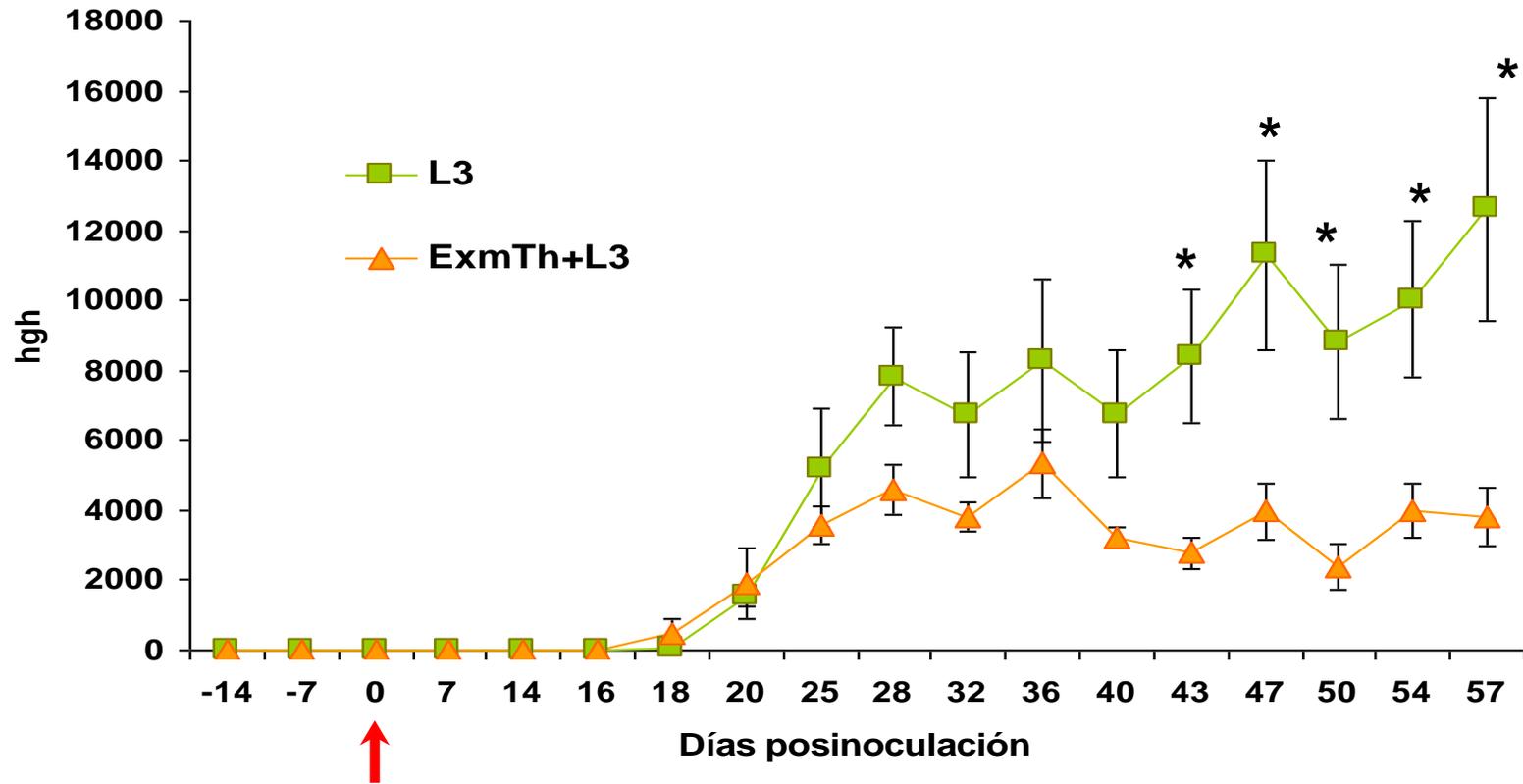


* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Figura 13. Media (\pm EE) de eosinófilos sanguíneos en corderos a los cuales se les administró un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* como lo indican las flechas negras , antes de ser inoculados con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*, indicado por la flecha roja .

	DÍAS										
GRUPO	20	25	28	32	36	40	43	47	50	54	57
L3	1558.3 ± 317	5208.3 ± 1715	7833.3 ±1398	6741.7 ±1778	8291.6 ±2342	6750.0 ±1808	8383.3 ±1912	11300.0 ±2699	8450.0 ±2205	9791.7 ±2238	12616.6 ±3177
ExmTh +L3	1920.0 ±1019	3580.0 ±539	4610.0 ±724	3820.0 ±430	5340.0 ±960	3230.0 ±265	2780.0 ±451	3970.0 ±795	2370.0 ±640	3990.0 ±781	3800.0 ±835

Cuadro 3. Promedio (\pm EE) de la eliminación de huevos por gramo de heces, en corderos con valores de eosinófilos sanguíneos normales (Grupo L3) y elevados (Grupo ExmTh) al momento de ser inoculados con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*.



* Diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Figura 14. Promedio (\pm EE) de la eliminación de huevos por gramo de heces en corderos con valores de eosinófilos sanguíneos normales (Grupo L3) y elevados (Grupo ExmTh+L3). La flecha roja  indica el momento de la inoculación con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*.

6.4 NÚMERO DE FASES ADULTAS DE *H. contortus*

En el Cuadro 4 se presenta el total de FA de *H. contortus* en los corderos de los grupos L3 y ExmTh+L3. Los corderos del Grupo L3 (1063) presentaron más ($P < 0.05$) FA que los corderos del Grupo ExmTh+L3 (194). En ambos grupos se presentaron más ($P < 0.05$) hembras que machos. No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre la relación macho y hembra entre ambos grupos. El porcentaje de establecimiento fue mayor ($P < 0.05$) en los corderos del Grupo L3 (21.3%) que en los corderos del Grupo ExmTh+L3 (3.9%).

6.5 LONGITUD DE FASES ADULTAS

El promedio del tamaño de las FA de *H. contortus* se muestra en el Cuadro 5, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre el tamaño de machos y hembras de las FA recuperadas de los corderos de ambos grupos.

6.6 PROLIFICIDAD DE HEMBRAS

El número de huevos por hembra al día (h/h/d) se ilustra en la Figura 15, se calculó un promedio de 21639.8 (± 5963) y 38799.1 (± 10325) h/h/d para los corderos de los grupos L3 y ExmTh+L3 respectivamente, no existiendo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos grupos.

6.7 EOSINÓFILOS TISULARES

En el Cuadro 6 y la Figura 16 se presenta el número de ET por cm^2 en las RFA, RPA y LNA de todos los corderos usados en este experimento. En la RFA no se observaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los corderos de todos los grupos. Los corderos del Grupo ExmTh sacrificados el día 0 presentaron mayor

número ($p < 0.05$) de ET que los corderos de los grupos Testigo y ExmTh+L3. Los corderos del Grupo ExmTh sacrificados el día 0 presentaron mayor número ($p < 0.05$) de eosinófilos en LNA que todos los corderos de los demás grupos.

6.8 CORRELACIONES ENTRE GRUPOS

Las correlaciones entre el Grupo de L3 y el Grupo ExmTh+L3 se presentan en el Cuadro 7. Las correlaciones positivas con diferencias estadísticas ($p < 0.05$) fueron entre FA y % de establecimiento, FA y hgh, FA y ET en RFA, FA y ET en RPA, % de establecimiento y hgh, % de establecimiento y ET en RFA, % de establecimiento y ET en RPA, ET en RFA y ET en RPA, ET en RPA y eosinófilos de LNA.

Grupo	Total de adultos		Hembras		Machos		Establecimiento
	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	%	
L3	1063 ^a	775.0	72,88	288.3	27.11	21.3 ^a	
ExmTh+L3	194 ^b	152	78.35	42	21.64	3.9 ^b	

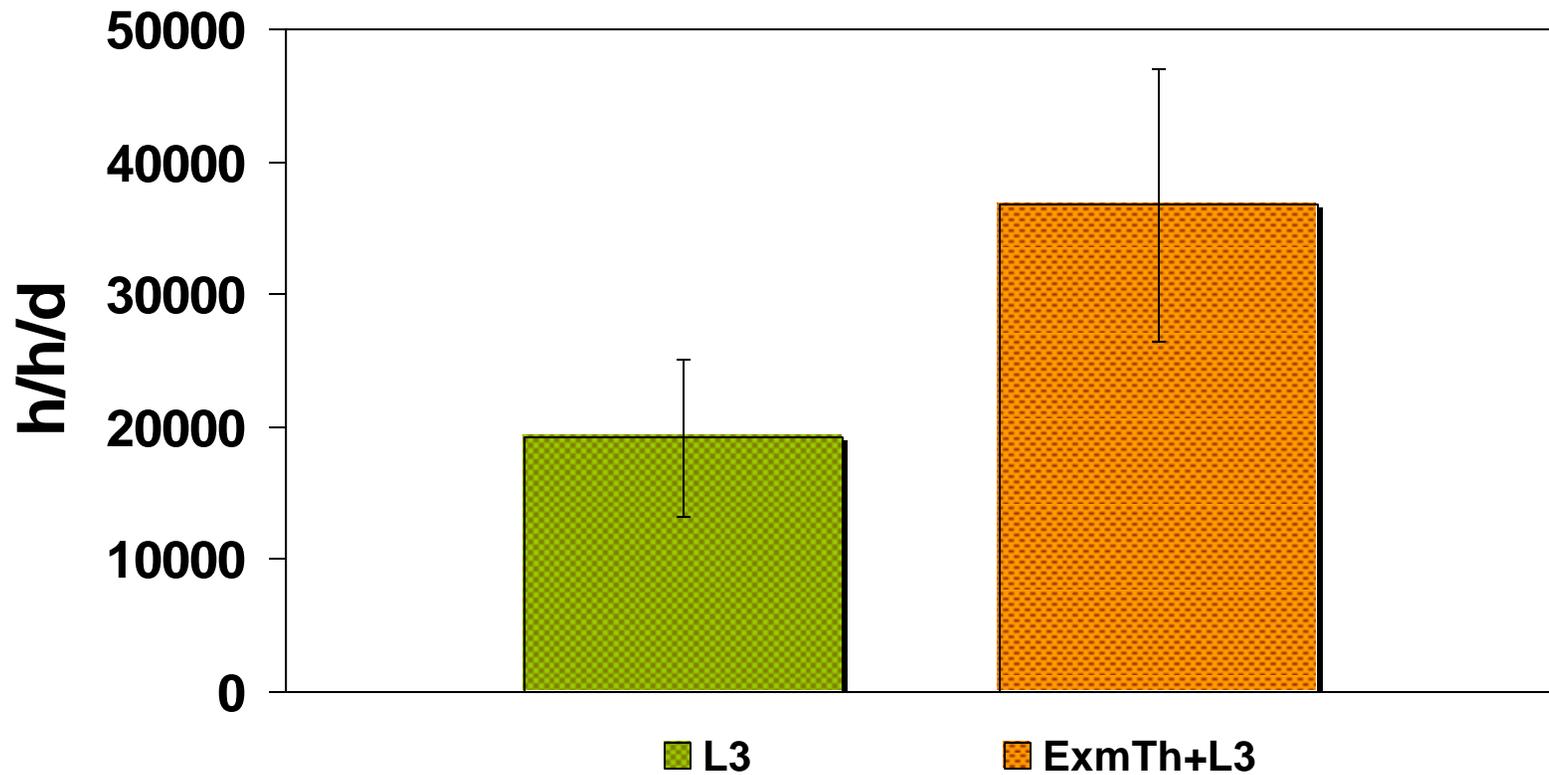
Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Cuadro 4. Promedio del número de fases adultas recuperadas, porcentaje de hembras y machos así como el porcentaje de establecimiento de *Haemonchus contortus*, en corderos con valores de eosinófilos sanguíneos normales (grupo L3) y elevados (grupo ExmTh+L3) al momento de la inoculación con 5000 L₃ del parásito.

Grupo	Longitud de hembras (mm)	Longitud de machos (mm)
L3	26,83 ± 0.65	17,69 ± 0.36
ExmTh+L3	27 ± 0.83	17,84 ± 0.34

No hubo diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Cuadro 5. Promedio (\pm EE) de la longitud de las fases adultas de *Haemonchus contortus* recuperadas, de corderos con valores de eosinófilos sanguíneos normales (grupo L3) y elevados (grupo ExmTh) al momento de la inoculación con 5000 L₃ del parásito.

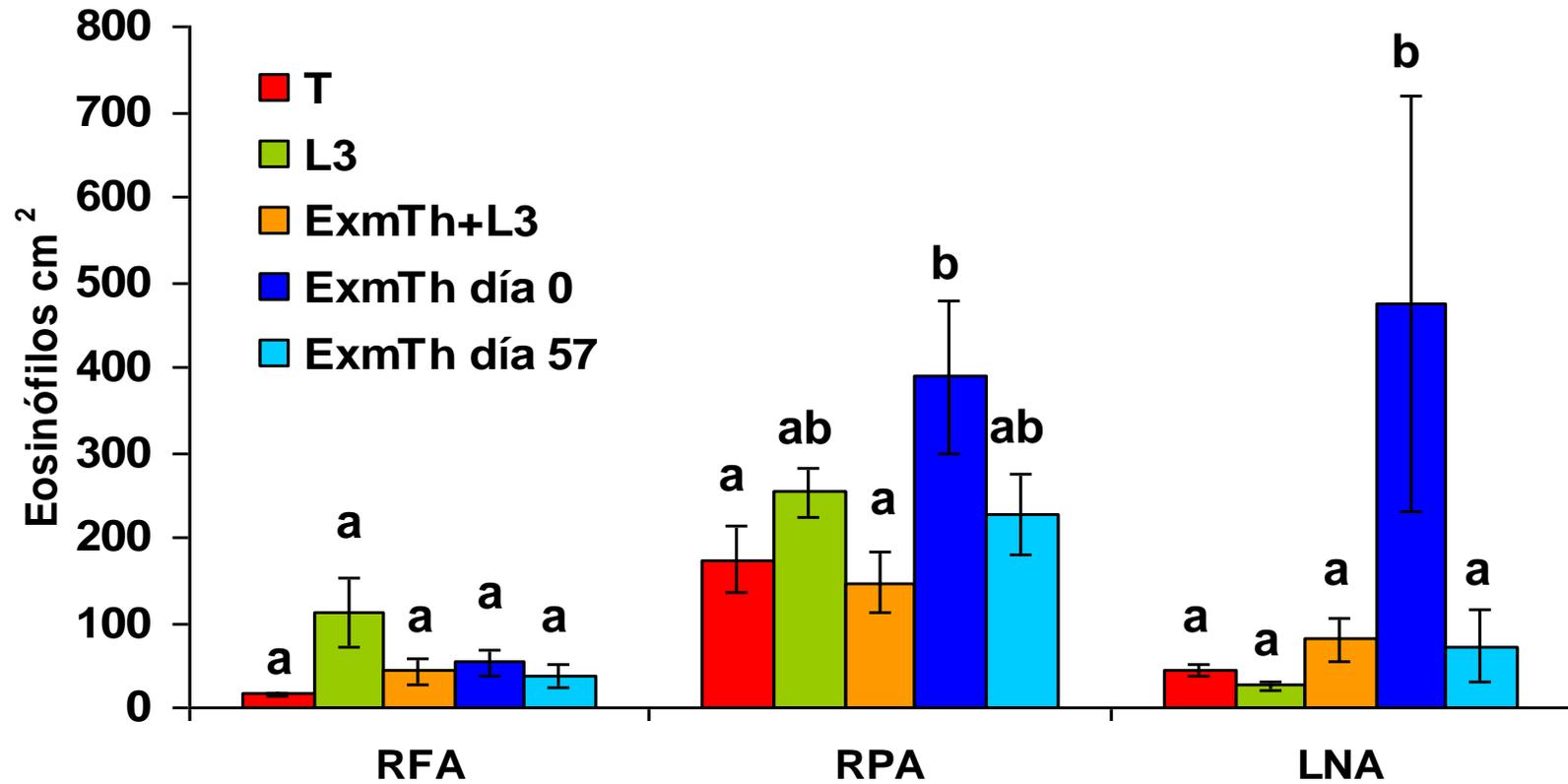


No hubo diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Figra 15. Promedio (\pm EE) de la prolificidad, interpretada como número de huevos por hembra al día de las hembras de *Haemonchus contortus* recuperadas de corderos con valores de eosinófilos sanguíneos normales (grupo L3) y elevados (grupo ExmTh+L3) al momento de la inoculación con 5000 L₃ del parásito.

REGIÓN	GRUPO				
	Testigo	L3	ExmTh+L3	ExmTh día 0	ExmTh día 57
RFA	15.56 ± 2.5	112.36 ± 39.7	42.47 ± 15.8	53.95 ± 15.3	37.20 ± 14.6
RPA	173.51 ± 39.2	253.7 ± 28.2	147.41 ± 34.8	388.16 ± 8.9	225.75 ± 47.7
LNA	45.04 ± 7.3	25.69 ± 6.3	80.41 ± 24.9	473.92 ± 244.0	72.62 ± 42.9

Cuadro 6. Promedio (\pm EE) del número de eosinófilos tisulares por cm^2 en las regiones fúndica, pilórica y del linfonodo abomasales en corderos a los cuales se les administró un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (grupos ExmTh+L3, ExmTh día 0 y ExmTh día 57) y en corderos inoculados con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus* (grupos L3 y ExmTh+L3). Los corderos del Grupo Testigo solo recibieron placebo.



Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Figura 16. Media (\pm EE) del número de eosinófilos por cm^2 en las regiones fúndica, pilórica y del linfonodo abomasal en corderos a los cuales se les administró un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (grupos ExmTh+L3, ExmTh día 0 y ExmTh día 57) y en corderos inoculados con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus* (grupos L3 y ExmTh+L3).

	FA	% EST	hgh PROM	ES	ET RFA	ET RPA	ET LNA
FA	1						
% EST	*1	1					
hgh PROM	*0,6858	*0,6858	1				
ES	-0,5544	-0,5544	-0,5502	1			
ET RFA	*0,8987	*0,8987	0,5020	-0,4098	1		
ET RPA	*0,6942	*0,6942	0,4978	-0,5428	*0,6617	1	
ET LNA	-0,4442	-0,4442	-0,4467	0,6346	-0,3712	*-0,7943	1

* indican diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

Cuadro 7. Correlación de parámetros parasitológicos y eosinófilos en corderos infectados experimentalmente con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*. Fases adultas en abomaso; FA, porcentaje de establecimiento; % EST, huevos por gramo de heces; hgh PROM, eosinófilos sanguíneos; ES, eosinófilos tisulares en región fúndica abomasal; ET RFA, en región pilórica abomasal; ET RPA; y en linfonodo abomasal ET LNA.

7. DISCUSIÓN

La eosinofilia es uno de los signos mas frecuentemente encontrados en las helmintiasis en general, esta se ha asociado con la resistencia a los nematodos gastrointestinales de ovinos (Doligalska *et al.*, 1999), a *Trichostrongylus columbiformis* (Dawkins *et al.*, 1989, Yacob *et al.*, 2006), a *Teladorsagia circumcincta* (Stear *et al.*, 2002) y en particular a la infección por *Haemonchus contortus* (Buddle *et al.*, 1992., Terefe *et al.*, 2005., Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006). Todos estos autores coinciden, en que la eosinofilia es una respuesta a las infestaciones por helmintos en los ovinos con mayor grado de resistencia, aunque los animales susceptibles, también presentan un aumento en el número de eosinófilos pero es menor. Se discute si este aumento de eosinófilos es solo un efecto colateral de la infección o en realidad tiene un efecto sobre el establecimiento de los parásitos. Este cuestionamiento induce la hipótesis de sí un aumento en el número de eosinófilos sanguíneos al momento de la inoculación con L3 de *H. contortus* influye en el establecimiento de las larvas.

En el presente trabajo, se utilizaron corderos de la raza Columbia, que se ha identificado como altamente susceptible a la hemoncosis, en trabajos anteriores realizados por el grupo de trabajo (Cuenca & Cuenca, 2005; Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006). Esta característica era necesaria en el trabajo, ya que se requería que todos los corderos fueran susceptibles y que la diferencia de susceptibilidad fuera producto del estímulo aplicado y no de resistencia natural asociada a la raza.

En la primera parte del trabajo se estableció un modelo para provocar el aumento en el número de los eosinófilos sanguíneos en ovinos. Se ha demostrado que la aplicación de IL-5 en roedores provoca el aumento de los eosinófilos sanguíneos y tisulares, también se ha demostrado que la IL-5 es una citosina que estimula la eosinofilopoyesis (Mould *et al.*, 1997) y que la aplicación de anticuerpos anti IL-5 provoca una disminución de la eosinofilia en infecciones por helmintos (Kusama *et al.*, 1995) y el asma en roedores (Tomaki *et al.*, 2000). Por lo

anterior, se pretendió inducir eosinofilia en corderos con la aplicación de IL-5 por vía intravenosa de manera similar a como se había inducido en roedores. La administración de la IL-5 solo provocó un pico de eosinófilos sanguíneos a los treinta minutos post-administración y estos regresaron a valores normales a las tres horas, resultados similares fueron observados en ratones por Mould et al. (1997). Esta respuesta probablemente se debió a varios factores, entre ellos que se usó IL-5 recombinante humana, que no necesariamente es homóloga de la IL-5 ovina. Otro factor que probablemente influyó, es que la administración de una sola dosis de IL-5 provocó la salida de eosinófilos preformados desde la médula ósea y la respuesta no se pudo sostener por el catabolismo de la IL-5 aplicada. Este efecto no varió, aunque se aumentó en 100 veces la cantidad de IL-5 administrada (5000 pcm/kg), en el segundo experimento. Por la corta respuesta observada y el costo de la IL-5 se decidió buscar otra forma de inducir la eosinofilia.

Se ha demostrado que la administración de algunas proteínas por vía intraperitoneal o aérea producen eosinofilia (Tomaki *et al.*, 2000) en roedores. Sá-Nunes *et al.* (2004) provocaron eosinofilia inoculando intraperitonealmente diferentes fracciones de la pared de *Histoplasma capsulatum* y Faccioli *et al.* (1996) indujeron eosinofilia también en roedores mediante la inoculación de huevos larvados de *Toxocara canis*. De tal forma que con estos antecedentes, se optó por trabajar con antígenos somáticos de *Toxocara canis* y un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* administrándolos por vía intraperitoneal en diferentes ocasiones, para poder compararlos y elegir cual se podría utilizar para provocar eosinofilia en corderos. La aplicación intraperitoneal del antígeno somático de *Toxocara canis* indujo un pico en la cantidad de eosinófilos a las 32 horas y regreso a valores normales a las 56 horas. La administración en tres ocasiones de ExmTh vía i.p provocó el aumento de los eosinófilos sanguíneos desde el primer día p.a y se mantuvo hasta el día 17 p.a. Por lo anterior se decidió usar tres administraciones de ExmTh para inducir eosinofilia y evaluar su efecto sobre el establecimiento de *H. contortus* en el abomaso.

En muchos de los trabajos sobre hemoncosis se realizan infecciones naturales, en las cuales no se tiene un control sobre el número de larvas ingeridas

por los animales, tampoco se tiene control sobre la especie de éstas, pues en forma natural son comunes las infecciones mixtas y aunque *H. contortus* es de los nematodos gastroentéricos más frecuentes, pueden estar presentes otros géneros como *Nematodirus sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Strongyloides papillosus* (Torres Acosta *et al.*, 2000), en este tipo de infección tampoco se tiene conocimiento del momento exacto de la infección, lo cual implica que los resultados observados se deban a una respuesta en diferente momento de la infección por lo que es más complicado analizar los resultados. En el caso de infestaciones diferidas, como en el trabajo realizado por Muñoz-Guzmán *et al.* (2006), implica un contacto repetido del hospedador con el parásito, en forma similar a una inmunización, lo cual en cierta forma provoca una inducción de la respuesta inmune de tipo celular y humoral que conlleva a la producción de anticuerpos específicos contra la fase infectante, que puede enmascarar el efecto de los eosinófilos. Ya que uno de los objetivos del trabajo, fue tratar de aislar en lo posible el fenómeno de la eosinofilia, del resto de la respuesta inmune, para observar su efecto sobre la hemoncrosis, se realizó una inoculación única con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*.

Aunque el número de huevos presentes en la materia fecal no siempre es indicador de la carga parasitaria, este es un parámetro que se toma en cuenta en la mayoría, si no es que en todos los trabajos con nematodos gastroentéricos, para relacionarlo de cierta forma con la cantidad de parásitos presentes y con la resistencia al la hemoncrosis (Buddle *et al.*, 1992, Shaw *et al.*, 1996, Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006).

Los conteos de hgh demostraron que los corderos con un menor número de eosinófilos en sangre presentan estadísticamente un mayor número de hgh ($p < 0.05$), que los corderos con eosinofilia inducida con ExmTh. Esta diferencia se presentó a partir del día 43 y hasta el sacrificio de los animales el día 57 p.i. Estos datos son parecidos a los obtenidos por Terefe *et al.* (2005), que provocaron eosinofilia inoculando larvas 1 de *Oestrus ovis* en corderos y posteriormente 5000 larvas de *H. contortus*. En su trabajo observaron un número menor de hgh en el

grupo que tenía valores de eosinófilos sanguíneos elevados al momento de la inoculación con *H. contortus*.

El número de hgh tuvo correlación significativa ($p < 0.05$) con el número de fases adultas y el porcentaje de establecimiento de adultos. Lo anterior, es lógico puesto que un mayor número de gusanos adultos repercute en un mayor número de huevos eliminados en heces. La correlación de hgh con eosinófilos sanguíneos aunque no fue significativa ($p > 0.05$) si fue alta (-0.58). Múltiples trabajos han reportado que la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos de ovinos, tiene una correlación negativa con la cantidad de eosinófilos en sangre (Buddle *et al.*, 1992; Dawkins *et al.*, 1989).

La mejor forma de evaluar el establecimiento de una infección por *H. contortus* es contar directamente en el abomaso el número de FA. En el presente estudio se observó que los corderos con un número normal de eosinófilos presentaron un mayor número ($P < 0.05$) de FA que los corderos con eosinofilia inducida a través la administración de un extracto parasitario. En otro estudio se correlacionó un mayor número de ES con un menor número de FA (Yacob *et al.*, 2004), sin embargo, la eosinofilia se midió después de la inoculación y no se comparó con animales sin eosinofilia previa.

La administración ExmTh en corderos produjo no solo un aumento de los ES, sino también un mayor número ($p < 0.05$) de ET en RPA y LNA que en los corderos del grupo testigo. En condiciones fisiológicas normales se ha considerado que por cada eosinófilo circulante hay de 300 a 500 en los tejidos (Lampinen, 2000; Brito *et al.*, 2003), por lo que no es de extrañar que un estímulo que provoque aumento de ES provoque un aumento mayor de ET.

En todos los animales que recibieron el ExmTh (grupos ExmTh y ExmTh+L3) se observó una reducción de ES entre los días 6 y 10 después de la última administración, independientemente de si fueron infectados o no con L₃ de *H. contortus*. Lo anterior, probablemente es efecto de la migración de los ES a los tejidos (Lampinen, 2002) y a la falta de un nuevo estímulo que induzca la producción y salida de eosinófilos de la médula ósea. La inoculación de L3 indujo

un aumento de ES entre los días 13 y 16 p.i, pero este aumento fue menor al inducido por la administración del ExmTh.

Los corderos del grupo con eosinofilia inducida en el momento de la inoculación y con un menor número de FA, presentaron un menor número de eosinófilos en la pared abomasal, que los corderos con un número normal de eosinófilos en el momento de la inoculación. Lo anterior parece contradictorio, pues se había observado una correlación entre ES y eosinófilos en pared abomasal, pero estos eventos habían ocurrido antes de la necropsia puesto que en el momento del sacrificio (día 57 p.i) no había eosinofilia en ninguno de los grupos. El efecto de la eosinofilia sobre el establecimiento del parásito probablemente se da pocas horas después de la inoculación, que es cuando el número de eosinófilos es mayor en sangre y en pared abomasal como se observó en el grupo de animales que recibieron el ExmTh y se sacrificaron el día 0 p.i. Además, el criterio para identificar eosinófilos en pared abomasal es la presencia de gránulos en el citoplasma, en el caso de los corderos con menos gusanos sus eosinófilos pudieron haber desgranulado y no detectarse por esta razón.

Mosmann y Coffman (1989) demostraron en ratones, que hay dos tipos de respuesta inmune, la Th1 y la Th2, y que estas respuestas son antagónicas. Los resultados de este trabajo sugieren que posiblemente la administración de ExmTh induce una respuesta Th2 en los corderos, puesto que este tipo de respuesta es la responsable de incrementar el número de eosinófilos y células cebadas en los tejidos, en las infecciones parasitarias por helmintos (Schallig 2000). Aunque no se ha demostrado completamente este tipo de respuesta en los ovinos, algunos autores como Gill et al. (2000) demostraron que células de linfonodos abomasaes y mesentéricos en animales infectados con *H. contortus* incrementan su producción de IL-5 y decremanta la de interferon γ , lo que sugiere una respuesta antagónica. Además se ha demostrado que la inoculación experimental con *H. contortus* produce un aumento de RNA mensajero que codifica para IL-4 e IL-13 en linfocitos abomasaes, que típicamente se han asociado a una respuesta tipo Th2 (Lacroux *et al.*, 2006).

La administración del ExmTh posiblemente induce la producción de anticuerpos específicos contra el extracto, los cuales podrían tener algún tipo de cruce antigénico con *H. contortus* y contribuir a la menor tasa de establecimiento del parásito. Sin embargo, es una respuesta inespecífica asociada a los eosinófilos la probable responsable de la reducción del establecimiento, como fue reportado por Terefe *et al* (2005) quienes reportaron una disminución en la producción de huevos de *H. contortus* asociada a eosinófilos en borregos previamente infectados con *Oestrus ovis*.

Los resultados observados en este trabajo no dejan duda que la administración del extracto de *T. hydatigena* previa a la inoculación protege parcialmente el establecimiento de *H. contortus*, pero esta protección probablemente no es únicamente atribuible al papel de los eosinófilos, puesto que el extracto puede funcionar estimulando otras células de la respuesta inflamatoria inespecífica como células cebadas y leucocitos globulares, o de respuesta específica como los linfocitos y que en conjunto contribuyan a impedir el establecimiento de los gusanos. El análisis futuro de subpoblaciones linfocitarias, las citosinas y los anticuerpos producidos por ellos, que estén presentes en el abomaso de animales con administración y sin administración de ExmTh podrán probablemente clarificar este hecho.

8. CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal de un extracto del metacestodos de *Taenia hydatigena* provocó un aumento de los eosinófilos sanguíneos y abomasales en los corderos.
- La administración de un extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena* previa a la inoculación con *Haemonchus contortus* disminuyó la eliminación de huevos y el establecimiento del parásito.
- Existe una relación positiva entre la eliminación de huevos en heces con el número de fases adultas de *Haemonchus contortus*.
- El aumento en el número de eosinófilos sanguíneos no afecta el tamaño de las fases adultas de este nematodo.
- El aumento en el número de eosinófilos sanguíneos y abomasales tiene un efecto negativo sobre el establecimiento de las larvas de *Haemonchus contortus*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alba-Hurtado F. Parasitología Veterinaria. Manual de laboratorio. UNAM, 2007.
- Albers, G.A.A., Gray G.D. 1987. Breeding for worm resistance: a perspective. Int. J. Parasitol. 17: 559-566.
- Balic, A., Veron, M.B., Els, N.T.M. 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infection in ruminates. Adv. Parasitol. 45: 182-227.
- Blood, D.C., Radostits, O.M., Henderson, J.A., Arundel, J.H., Gay, C.C. 1986. Medicina veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. 7ª Edición. México.
- Bouix, J., Krupinski, J., Rzepecki, R., Nowosad, B. 1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. Int. J. Parasitol. 28 (11): 1797-1804.
- 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.
- Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Olivera-Sequeira, T.C.G., Vaz, C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves, I., Echevarria, F.A.M. 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small Ruminant. 51: 75-83.
- Brito, G.F., Yamazaki, A.M., Espinosa, P.S., Vazquez, T.O., Huerta, L.J. y Berron, P.R. 2003. Eosinófilos revision de la literatura. Alergia, Asma e Inmunologia Pediátricas. 12 (2): 56-62.
- Bueno, M.S., Cunha, E.A., Verísimo, C.J., Santos, L.E., Lara, M.A.C., Oliveira, S.M., Spósito Filha. E., Reboucas, M.M. 2002. Infección por nematodos en razas de ovejas cárnicas criadas intensivamente en la región del sudeste del Brasil. Arch. Zootec. 51: 271-278.
- Buddle. M.B., Jowett, G., Green, S.R., Douch, C.G.P., and Risdon L.P. 1992. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. International Journal for Parasitology. 22. 7: 955-960.
- Caballero, S.M.L. 1998. Inmunología de la infección por helmintos. Rev. Esp. Alergol Immunol Clín. Vol 13. Núm. 6. pp. 297-313.
- Claerebout, E. and Vercruyse, J. 2000. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. Parasitology. 120: s25-s42.

Coadwell, W.J., Ward, P.F.V. 1981. The development, composition and maintenance of experimental populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitol.* 82: 257-261.

Coyne, M.J., Smith, G., Johnstone, C. 1991. A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. *Int. J. Parasitol.* 21: 847-853.

Coyne, M.J., Smith, G. 1992. The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naïve and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *Int. J. Parasitol.* 22: 315-325.

Cuéllar, O.J.A. 1986. Nematodiasis gastroentérica. En: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Edit. P. Pijoan A. y J. Tórtora. México. 112-118.

Cuéllar, O.J.A. 1992. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo en ovinos y caprinos. Mem. Curso: *Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos*. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Cuenca, V.C., y Cuenca, V.N.M. Comparación de la cantidad, tamaño y prolificidad de fases adultas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Blackbelly. Tesis de licenciatura, UNAM, México, 2005.

Dawkins, S.J.H., Windon, G.R., Eagleson. 1989. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology.* 19. 2: 199-205.

De Lucas, T.J. 2001. La Columbia, gregaria y buena madre. La revista del borrego. Editorial Eklipse. 8:39.

Doligalska, M., Moskwa, B. and Otear, M.J. 1999. Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and fecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 70. 299-308.

Dunn, A.M. 1983. Helmintología veterinaria. Editorial El Manual Moderno. México. 221-223.

Eady, S.J., Woolaston, R.R., Mortimer, S.I., Lewer, R.P., Raadsma, H.W., Swan, A.A., Ponzoni, R.W. 1996. Resistance to nematode parasites in Merino Sheep: sources of genetic variation. *Aust. J. Agr. Res.* 47: 895-915.

Faccioli, L.H., Mokwa, V.F., Silva, C.L., Rocha, G.M., Araujo, J.I., Nahori, M.A. and Vargaftig, B.B. 1996. IL-5 drives eosinophils from the bone marrow to blood and

tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. *Mediators of inflammation*. 5: 24-31.

Faedo, M., Larsen, M., Waller, P.J. 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.* 72 (2): 149-155.

Gasbarre, L.C. 1997. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Veterinary Parasitology*. 72: 327-343.

Gaxiola, S.M., Borbolla, J.E. y Rubio, M.C. 1996. Contribución al estudio de los nematodos abomasales de ovinos en Culiacán, Sinaloa. *Memorias del XII Congreso Nacional de Parasitología*. México. Po: 105.

George, S., Quiroz, H. 1993. Frecuencia de parásitos gastrointestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos de La Magdalena Soltepec, Tlaxcala, México *Vet. Méx.* 24: 195-198.

Giembycz, A.M., and Lindsay, M. 1999. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacological reviews*. 51 (2): 215-225.

Gill, H.S., Husband, A.J., Watson, D.L. 1992. Localization of Immunoglobulin-containing cells in the abomasums of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15,178-187.

Gill, H.S., Colditz, I.G., Watson, D.L. 1993. Immune responsiveness of lambs selected for resistance to haemonchosis. *Res. Vet. Sci.* 54: 361-365.

Gill, H. S., Altmman, K., Cross, M.L., Husband, J.A. 2000. Induction of T helper1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99, 458-463.

Gleich, G.J. Adolphson, R.C. Leiferman, K.M. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annual Reviews of Medicine*. 44: 85-101.

Gómez-Muñoz, MT., Cuquerella, M., Gómez, I.L.A., Méndez, S., Fernández, P.F.J., Fuente, C. 1999. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81 (4): 281-293.

Gray, G.D., Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Douch, P.G.C. 1992. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22 (4):417-425.

Hernández, M.F.R., Caracterización fenotípica y de virulencia de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino. Tesis de licenciatura, UNAM, México, 2005.

Hohenhaus M.A., Outteridge P.M. 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. Brit. Vet. J. 151. 119-140.

Hohenhaus M.A., Josey, M.J., Dobson, C., Outteridge P.M. 1998. The eosinophil leukocyte, a fenotipic marker of resistance to nematode parasites, is associated with calm behaviour in sheep. Immunol. Cell Biol. 76: 153-158.

Hooda, V., Yadav, C.L., Chaudhri, S.S., Rajpurohit, B.S. 1999. Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus* J. Helminthol. 73 (2): 137-142.

Kabagambe, E.K., Barras, S.R., Li, Y., Peña, M.T., Smith, W.D., Miller, J.E. 2000. Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. Vet. Parasitol. 92: 15-23.

Kooyman, F.N.J., Van Kooten, P.J.S., Huntley, J.F., Mac Kellar, A., Cornelissen A.W.C.A. and Schallig H.D.F.H. 1997. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. Parasitology. 114: 395-406.

Kühnel, W. Atlas a color de citología e histología 11^a edición corregida y aumentada. Ed. Médica Panamericana. México D.F., México, 2005. pp. 106.

Kusama, Y., Takamoto, M., and Sugane, K. 1995 Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-nu/+ and congenitally athymic BALB/c-nu/nu miceinfected with *Toxocara canis*. Immunol. 85: 461-468.

Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Dominique, F., Dorchies, P. and Jacquiet, P. 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. Veterinary Research. 37: 607-622.

Lampinen, M. 2000. Cytokine-regulated eosinophil migration in inflammatory disorders. Acta Universitatis Upsaliensis. pp 10-20.

Lapage, G. 1976. Parasitología veterinaria. Editorial Continental. México. 121-127.

Luffau, G., Vutien, Khang, J. 1990. Resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Romanov sheep. Genetics, Selection and Evolution 22: 205-9.

Manjili, M.H., France, M.P., Sangster, N.C. and Rothwell, T.L. 1998. Quantitative and qualitative changes in intestinal goblet cells during primary infection of *Trichostrongylus colubriformis* high and low responder guinea pigs. *International Journal for Parasitology*. 28(5): 761-765.

Meana, M.A., Rojo, V.F.A. 1999. Trichostrongilosis y otras nematodosis. En: *Parasitología veterinaria*. Edit. por Cordero, C.M. y Rojo, V.F.A. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México.

Meusen, E.N.T. and Balic, A. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites. *Parasitology Today*. Vol. 16. no. 3. 95-101.

Meusen, E.N.T. and Balic, A. 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 108: 121-125.

Miller, J.E., Bahirathan, M., Lemarie, S.L., Hembry, F.G., Kearney, M.T., Barras, S.R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 74(1): 55-74.

Miller, J.E. and Horohov, D.W. 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84. E124-E32.

Mosmann, T.R., Coffman, R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46. 111.

Mould, W.A., Matthaei, I.K., Young, G.I., Foster, S.p. 1997. Relation between sheep Interleukin – 5 and eosinophil in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Vol 99. Num. 5. pp 1064 – 1071.

Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Kari, M., Owango, M.O., Duncan, J.L. 1996. Response of Dorper and red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infection. *Res. Vet. Sci.* 61: 218-221.

Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J. 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*. 69: 265-273.

Muñoz-Guzmán, M.A., Cuellar, O.J.A., Valdivia, A.A.G., Buendía J.J.A., Alba, H.F. 2006. Correlation of parasitological parameters in sheep with high and low resistance to Haemoncosis. *Canadian Journal of Animal Science*. 86: 363-371.

Muñoz, G.M.A. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Haemonchus contortus* en razas de alta y baja susceptibilidad. Tesis doctoral, UNAM. México, 2007.

Newton, S.E. and Munn, E.A. 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus* Parasitology today. 15 (3): 116-122.

Parker, C.F., Mc Clure, K.E., Herd, R.P. 1993. Hair sheep potential for specific environmental conditions and production systems in North America. Mem. Sexto Congreso Nacional de Producción Ovina. Cd. Valles, San Luis Potosí.

Pernthaner, A. Stankiewicz, M., Bisset, S.A., Jonas, W.E., Cabaj, W., Pulford, H.D. 1995. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. Int. J. Parasitol. 25 (4): 523-529.

Pernthaner, A. Stankiewicz, M., Cabaj, W., Pfeffer, A., Green, R.S. Douch, P.G.C. 1996. Immune responsiveness of nematode-resistant or susceptible Romney line-bred sheep to continuous infection with *Trichostrongylus axei*. Vet. Immunol. Parasitol. 51:137-146.

Quiroz, R.H. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 1ª ed. Edit. LIMUSA. México. 441-458.

Radostits, O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol II. 9ª ed. Mc Graw Hill España. 1599-1603.

Rocha, R.A., Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A. 2004. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. Small Ruminant Research. 55: 65-75.

Rojas, E.O. Inmunología (de memoria) 2ª edición Ed. Médica Panamericana. México D.F., México, 2001.

Ross, M.H. Lynn, J.R. Gordon, I.K. Histología texto y atlas a color tercera edición. Ed. Médica Panamericana. México D.F., México, 1997. pp. 195.

Rothenberg, M.E. 1998. Eosinophilia. The New England Journal of Medicine. 338 (22): 1592-1600.

Rothenberg, M.E. and Hogan, P.S. 2006. The eosinophil. The Annual Review of Immunology. 24: 147-174.

Sá-Nunes, A., Medeiros, A.I. and Faccioli, L.H. 2004. Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 37. 343-346.

Schallig, H.D.F.H. 2000 Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. Parasitology. 120: S63-S72.

Seaton, D.S., Jackson, F., Smith, W. D., Angus, K. W. 1989. Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with *Ostertagia circumcincta*. Res. Vet. Cienc. 46, 241-246.

Schallig, H.D.F.H. 2000. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus* Parasitology. 120. s63-s72.

Shaw, R.J., Grimmett, D.J., Donaghy, M.J., Gatehouse, T.K., Shirer, C.L. and Douch P.G.C. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing ovine IgE. Veterinary immunology and immunopathology. 51: (3-4). 235-251.

Singh, S., Yadav, C.L., Banerjee, D.P. 1997. Comparación of the post-parturient rise in faecal egg counts of indigenous and cross-bred ewes. J. Helminthol. 71-(3): 249-252.

Soulsby, E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7^a ed. Interamericana México.

Sréter, T., Kassai, T., Takács, E. 1994. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol. 24 (6): 871-876.

Stankiewicz, M. Jonas, W. Hadas, E. Cabaj, W. and Douch, P.G.C. 1996. Supravital staining of eosinophils. International Journal for Parasitology. 26 (4): 445-446.

Stear, M.J., Murray, M. 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 54:161-176.

Stear, M.J. Strain, S. Bishop, S.C. 1999 Mechanisms underlying resistance to nematode infection. International Journal for Parasitology. 29: 51-56.

Stear, M.J., Henderson, N.G., Kerr, A., McKellar, Q.A., Mitchell, S., Seeley, C. and Bishop, S.C. 2002. Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish Blackface lambs. Parasitology. 124: 553-560.

Terefe, G., Jacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dummas, E., Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., Hoste, H. and Jacquiet, P. 2005. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. Veterinary Parasitology. 128. 271-283.

Tomaki, M., Zhao, L., Lundhal, J., Sjöstrand, M., Jordana, M., Linden, A., O'Byrn, P., Lötval, J. 2000. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: Involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor α ¹. *The journal of Immunology*. 165: 4040-4050.

Torres, H.G., Castillo, R.H., López, L.R. 1994. Resultados preeliminares con ovinos Florida en el trópico mexicano. Mem. Séptimo Congreso Nacional de Producción Ovina. Toluca, México.

Torres, A.J.F., Aguilar, C.A. 2000. Nematodos gastrointestinales de caprinos y ovinos en el trópico: Control integral. Notas de curso Medicina y enfermedades infecciosas de pequeños rumiantes en el trópico. Yucatán, México. 114-117.

Waller, J.P., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J.W. 1996. The prevalence of antihelminthic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*. 62: 181-187.

Waller, J.P. and Chandrawathani, P. 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No.1 from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*. 22 : 131-137.

Wildblood, L.A. Kerr, K. Douglas, A.S.C. Cameron, A. Darril, G.T. Douglas G.J. 2005. Production of eosinophil chemoattractant activity by ovine gastrointestinal parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 107: 57-65.

Woolaston, R.R. 1993. Factors affecting the prevalence and severity of footrot in a Merino flock selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Aust. Vet. J.* 79 (10): 365-369.

Woolaston, R.R., Manuelli, P., Eady, J.S., Barger, A.I., Lejambre, F.L. Banks D.J.D., and Windon, G.R. 1996. Te value of circulating eosinophil count as a selection criterion for resistance of sheep to *Trichostrongyle* parasites. *International Journal for Parasitology*. 26. 1: 123-126.

Woolley, K.L., Adelroth, E., Wooley, J.M., Ellis, R., Jordana, M., O'Byrne, P.M. 1994. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor, eosinophils and eosinophil cationic protein in subjects with and without mild, stable, atopic asthma. *European Respiratory Journal*. 7: 1576-1584.

Wyk, V.J.A., and Bath, G.F. 2002. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*. 3: 509-529.

Yacob, H.T., Dorchies, Ph., Jacquiet, Ph., Bleuart, C., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P. and Hoste, H. 2004. Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by a subsequent infection with *Oestrus ovis*. *Veterinary Parasitology*. 121. 297-306.

Yacob, H.T. Terefe, G. Jaquiet, Ph. Hoste, H. Grisez, C. Prévot, F. Bergeaud, J.P. Dorchies, Ph. 2006. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus columbiformis*: effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. *Veterinary Parasitology*. 137: 184-181.

Yazwinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Monrgan, GW., Linnerud, A.C. 1980. *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. *J. Anim Sci*. 51: 279-288.