



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Determinación de IgG sérica anti- L3 de *Haemonchus contortus* en ovinos con protección inducida contra la hemoncosis experimental.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

CASAS ALVARADO ALEJANDRO

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN

COASESOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos La Tesis:

Determinación de IgG sérica anti-L3 de Haemonchus contortus en ovinos con protección inducida contra la hemoncosis experimental

Que presenta el pasante: ALEJANDRO CASAS ALVARADO
Con número de cuenta: 41003479-0 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	
SECRETARIO	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
1er SUPLENTE	M.V.Z. María de Lourdes Jara Ramírez	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

HHA/Vc

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para recibir la educación y preparación para hacerme un buen profesionalista.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme el espacio y capacitación necesaria para mi formación de estudios superiores.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por su dedicación en tiempo, conocimiento y apoyo para dirigir este trabajo.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por el tiempo y todos los consejos para realizar este trabajo.

Al proyecto PAPIIT IN- 216913 “Cuantificación de RNAm codificador de citocinas asociadas a la protección inducida en la hemoncosis ovina” y al PAPIIT IN- 215314, cuyos fondos fueron utilizados para llevar a cabo este proyecto.

Al M. en C. Cesar Cuenca Verde por su apoyo técnico y su contribución con mi información.

A los miembros del jurado: M. en C. Juan Pablo Martínez Labat, MVZ. José A. Licea Vega, Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, MVZ. María de L. Jara Ramírez MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes. Por sus contribuciones para mejorar este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis PADRES:

Arturo Casas García y Nora Alvarado Rodríguez por todo su tiempo, consejos, apoyo y educación, brindándome no lo que quise sino lo que necesite para ser un hombre de bien.

A mi HERMANA:

Lucero por su compañerismo y enseñanzas para ser un buen hermano.

A Diana:

Por su compañía, apoyo, comprensión, consejos y paciencia para ayudarme a superarme y ser una buena persona, te amo.

A mis amigos:

Mabel, Moisés, Luis, M. en C. Ismael, MVZ. Elisa, Dra. Sandra, Dr. Ricardo, Dra. Tabata, Samantha, Armando, Lili, Jessica, Yuli y a todos aquellos que me faltaron nombrar por sus valiosos consejos ofreciéndome su valiosa amistad.

A mi familia:

Por todo su apoyo en este largo camino de mas de 5 años para ser un profesionista exitoso.

A todos aquellos que ya no están conmigo:

María Elena, Cristina y Lizet que gracias a sus grandes enseñanzas que logrado ser un hombre de bien.

ÍNDICE

ÍNDICE	-----	I
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	-----	II
ABREVIATURAS	-----	
III		
1.	RESUMEN	----- 1
2.	INTRODUCCIÓN	----- 2
2.1	Generalidades de <i>Haemonchus contortus</i>	----- 4
2.2	Ciclo biológico	----- 5
2.3	Epizootiología	----- 7
2.4	Patogenia	----- 9
2.5	Signos clínicos	----- 10
2.6	Control y prevención	----- 11
2.7	Respuesta inmunológica contra <i>Haemonchus contortus</i>	----- 14
2.8	Respuesta específica humoral contra <i>Haemonchus contortus</i>	----- 15
2.9	Resistencia del hospedador a la hemoncosis ovina	----- 16
2.10	Efectos moduladores asociados a moléculas de <i>Taenia sp.</i>	----- 18
3.	JUSTIFICACIÓN	----- 19
4.	OBJETIVOS	
4.1	General	----- 20
4.2	Particulares	----- 20
5.	Hipótesis	----- 20
6.	Materiales y métodos	
6.1	Lugar de realización	----- 21
6.2	Animales	----- 21
6.3	Obtención del extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>	----- 21
6.4	Obtención de inóculos de L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	----- 22
6.5	Diseño experimental	----- 22
6.6	Conteos de huevos en materia fecal	----- 23
6.7	Preparación del antígeno de <i>Haemonchus contortus</i>	----- 23
6.8	ELISA para determinación de IgG específica a <i>Haemonchus contortus</i>	----- 23
6.9	Análisis estadístico	----- 24
7.	RESULTADOS	----- 25
8.	DISCUSIÓN	----- 28
9.	CONCLUSIONES	----- 32
10.	BIBLIOGRAFÍA	----- 33

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Nematodos gastroentéricos más frecuentes en los ovinos de México -----	3
Figura 1. Morfología de <i>Haemonchus contortus</i> -----	5
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> -----	7
Tabla 1. Diseño experimental de la inoculación del ExMTh e infección con 5000 L3 de <i>H. contortus</i> en corderos de la raza Columbia -----	22
Figura 3. Promedio (\pm EE) del número de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> eliminados en materia fecal de corderos Columbia infectados con 5000 L3 (grupo 2) y corderos protegidos con un extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> e infectados con 5000 L3 (grupo 3) -----	26
Figura 4. Promedio (\pm EE) de porcentajes relativos de absorbancia (%Abs) der producción de IgG anti-L3 de <i>Haemonchus contortus</i> en corderos Columbia, al grupo 1 se mantuvo como testigo, infectados con 5000 L3 de <i>Haemonchus contortus</i> (Grupo 2), infectados con 5000 L3 de <i>Haemonchus contortus</i> e inoculados con ExMTh (Grupo 3) y administrados solo con ExMTh (Grupo 4) -----	27

ABREVIATURAS

ExMTh	Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>
p.i.	post infección
hgh	Huevos por gramos de heces
NGE	Nematodos gastroentéricos
ELISA	Enzyme- linkedimmunosorbentassay
PBS	Solución buffer de fosfatos
ABS	Albumina Sérica Bovina
OPD	Ortho- phenilendiamine
ANDEVA	Análisis de Varianza
EE	Error estándar
% Abs.	% de Absorbancia
Ag	Antígeno

RESUMEN

Haemonchus contortus es el nematodo gastroentérico más importante de los ovinos en todo el mundo. Se ha demostrado que la administración de un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExMTh), induce protección en corderos contra *H. contortus* asociada a algunos efectores inmunológicos. En el presente trabajo, se evaluaron los niveles de anticuerpos de la clase IgG en corderos con protección inducida por dicho extracto. Se utilizaron corderos de raza Columbia divididos en cuatro grupos: Los corderos del grupo 1 ($n=5$) se utilizaron como grupo testigo, los corderos del grupo 2 ($n=15$) recibieron 5000 larvas 3 de *H. contortus* el día 0 del experimento, los corderos del grupo 3 ($n=15$) recibieron por vía parenteral el ExMTh los días -10, -6, y -2, y el día 0 recibieron 5000 larvas 3 (L3) de *H. contortus*; los corderos del grupo 4 ($n=15$) recibieron sólo por vía parenteral el ExMTh los días -10, -6, y -2. Semanalmente se tomaron muestras de materia fecal de todos los corderos para el conteo de huevos por gramo de heces (hgh) en materia fecal y se tomaron muestras de sangre para la medición de los niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* durante las siguientes 7 semanas post-infección. Los corderos del grupo 2 eliminaron mayor cantidad ($p<0.05$) de hgh que los corderos grupo 3 en la semana 7 post-infección (p.i.). Tanto la infección como la administración de ExMTh, indujeron la producción de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus*. Los corderos del grupo 4 mostraron mayores niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* a partir de la semana 1 y hasta el final del experimento ($p<0.05$) que los corderos del grupo 1. Los corderos del grupo 3 mostraron mayores niveles ($p<0.05$) de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* solo en la semana 7 p.i que el grupo 1 y mayores niveles en esta misma semana que los corderos del grupo 3 aunque esto último no fue significativo ($p=0.39$). Los corderos del grupo 2 mostraron mayores niveles de IgG anti-L3 de *H. contortus* que los corderos del grupo 1 sin embargo esto no fue significativo ($p=0.15$). Se observó correlación negativa entre los niveles de IgG anti-L3 y el número de hgh ($r = -0.40$). Estos resultados confirman la protección previamente observada inducida por el ExMTh, indican posibles fenómenos de reacción cruzada entre antígenos del ExMTh y antígenos de *H. contortus* y, sugieren que la protección observada está relacionada con los niveles de anticuerpos producidos.

1. Introducción

Los nematodos gastroentéricos (NGE) constituyen uno de los principales problemas en las unidades de producción ovina, diferentes géneros de NGE pueden alojarse en el tracto digestivo de los pequeños rumiantes y producir importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Los NGE más frecuentes en los ovinos de México, son: *Haemonchus contortus*, *Teladostargia circumcincta*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.* y *Trichuris ovis* (Quiróz, 2003), cada uno tienen afinidad por ciertas partes del tracto digestivo, así hay especies que se localizan en abomaso, en el intestino delgado y otras en ciego y colón, (cuadro 1).

Debido a su alta incidencia en todo el mundo, su patogenicidad y su distribución geográfica, se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante en los ovinos de México y el mundo, (Cuéllar, 1986; Quiróz, 2003). La infección por este parásito se denomina hemoncosis y su consecuencia más importantes es la pérdida de la eficiencia biológica del rebaño (afectando la nutrición y desarrollo normal de los individuos) y el favorecimiento de la aparición de enfermedades secundarias, produciendo en consecuencia cuantiosas pérdidas a la producción (Cuéllar, 2003; Montero *et al.*, 2004).

El mayor impacto económico se observa en los sistemas de producción en pastoreo, especialmente en los países con clima tropical, en los que existen abundantes precipitaciones pluviales durante el verano (George, 1993; Radostitis *et al.*, 2002), lo que favorece la dinámica de la infección en los pequeños rumiantes (Leathwick *et al.*, 1992, Learmount *et al.*, 2006). La transmisión se realiza por la ingestión de pasturas contaminadas con larvas del tercer estadio de desarrollo (L3). La enfermedad tiene un curso agudo, subagudo y crónico o subclínico (Soulsby, 1998; Quiróz, 2003).

Cuadro 1. Nematodos gastroentéricos más frecuentes en los ovinos de México. (Cuéllar, 2003)

Orden	Familia	Género y especie	Hospedador	Localización
Strongylida	Trichostrongylidae	<i>Haemonchus contortus</i>	Ovino, caprino	Abomaso
		<i>Mecistocirrus digitatus</i>	Rumiante	Abomaso
		<i>Teladorsagia sp.</i>	Ovino, caprino	Abomaso
		<i>Marshallagia marshalli</i>	Ovino, caprino	Abomaso
		<i>Trichostrongylus axei</i>	Rumiantes, cerdos, equinos	Abomaso
Rhabdatida	Strongyloidea	<i>Strongyloides papillosus</i>	Rumiantes	Intestino delgado
Strongylida	Trichostrongyloidea	<i>Trichostrongylus sp.</i>	Rumiantes	Intestino delgado
		<i>Nematodirus sp.</i>	Ovino	Intestino delgado
		<i>Cooperia cuticei</i>	Ovino, caprino	Intestino delgado
Strongylida	Ancylostomatoidea	<i>Bunostomum tricocephalum;</i>	Ovino	Intestino delgado
		<i>Gaigeria pachyscelis</i>	Ovino, caprino	Intestino delgado
Strongylida	Trichosnemastidae	<i>Oesophagostomum sp.</i>	Ovino, caprino	Colón
		<i>Chabertia ovina</i>	Rumiantes	Colón
Ascaridia	Oxyuridae	<i>Skrajbinema ovis</i>	Ovino, caprino	Ciego
Enoplida	Trichuridae	<i>Trichuris ovis</i>	Rumiantes	Ciego

2.1 Generalidades de *Haemonchus contortus*

Este gusano, también es conocido como gran gusano del estómago, gusano del cuajar (Soulsby, 1987), gusano en poste de barbero (Lapage, 1976), gusano contorneado (Borchert, 1981). Su clasificación taxonómica es:

Reino: Animalia

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Strongylida

Superfamilia: Trichostrongyloidea

Familia: Trichostrongylidae

Género: *Haemonchus*

Especie: *contortus*

Se localiza en el abomaso de ovinos y caprinos principalmente, además se le puede encontrar en bovinos y numerosos rumiantes silvestres (Quiróz, 2003), mide en promedio de 10 a 30 mm de longitud. El extremo cefálico es muy delgado, posee 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, uno dorsal pequeño y asimétrico en forma de Y invertida. Las papilas son relativamente cortas, hay papilas prebursales y posee un gobernáculo. La vulva está en la parte posterior del cuerpo y está cubierta por una protuberancia, solapa o proceso lingüiforme (Figura 1). El macho tiene un color rojizo uniforme, mientras que en la hembra, los ovarios son blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo, le dan un aspecto rayado. 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).

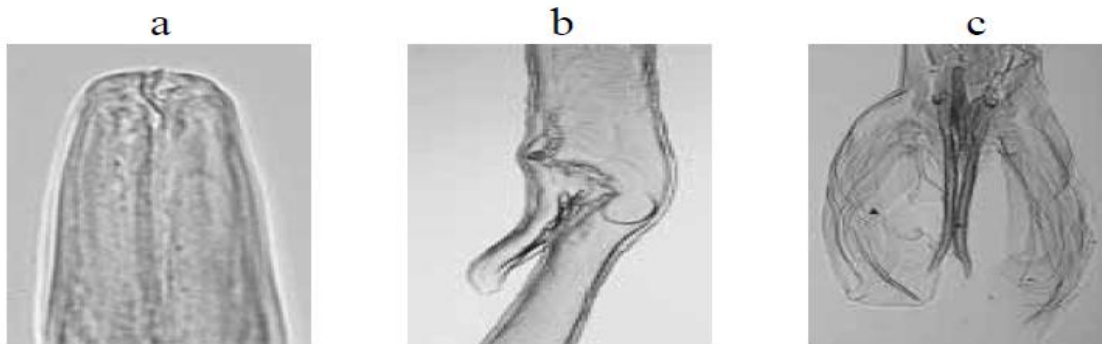


Figura 1.- a) extremo anterior de *H. contortus*, b) hembra: membrana vulvar, c) Macho: bolsa copulatriz (Thekebun, 2008).

2.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo y fue descrito originalmente por Veglia en 1915 (Nikolaou y Gasser, 2006). Las hembras pueden producir de 5,000 a 10,000 huevos al día; la producción aumenta hasta que se alcanza una puesta máxima aproximadamente por el día 26 post-infección y, posteriormente son eliminados en la materia fecal.

Si las condiciones ambientales son adecuadas, se desarrolla la larva 1 (L1) dentro del huevo que eclosiona en la materia fecal en 1 ó 2 días (Quiróz, 2003). Esta se alimenta de bacterias del medio donde se encuentra. La larva crece, muda de cutícula (ecdysis) y se transforma en larva 2 (L2), que también se alimenta de bacterias y crece hasta que madura, produce una nueva cutícula, pero la cutícula de la L2 no se desecha y permanece como una envoltura alrededor de la larva 3 (L3), esta cutícula la aísla del ambiente y de condiciones climáticas desfavorables (Soulsby, 1987), sin embargo, bloquea su cavidad bucal por lo que la L3 no puede alimentarse y se mantiene de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1976).

La L3 es muy activa y capaz de desplazarse verticalmente sobre las superficies húmedas de los vegetales, presenta diferentes tropismos: hidrotropismo positivo; (busca las zonas húmedas); fototropismo negativo (evita la luz intensa); termotropismo positivo (migra a donde la temperatura es ideal para su mantenimiento de 15 a 37 °C) y, un geotropismo negativo (se aleja del suelo); esto la lleva a buscar la parte alta de los pastos

cuando estos se encuentran húmedos y con poca luz solar (que regularmente se describe como pastos frescos y húmedos en las primeras horas de la mañana), esta situación favorece la ingestión de las larvas por parte del ganado (Cordero *et al.*, 1999; Quiróz, 2000).

La infección de los animales se realiza por la ingestión de la L3 con el pasto. En los 30 minutos posteriores a su ingestión, la larva pierde la vaina en el aparato digestivo del animal por efecto de diversos estímulos del hospedador (bicarbonato, CO₂ gaseoso). El CO₂ hace que la larva secrete un fluido de muda que actúa sobre la cutícula provocando su ruptura, con lo que la larva ayudada por sus movimientos puede salir (Maena y Rojo, 1999), este líquido de muda contiene leucinopeptidasa una enzima que actúa sobre la cutícula de la larva en un área de aproximadamente 20 µm a partir del extremo anterior (Lapage, 1976; Cordero *et al.*, 1999)

Las larvas en el hospedero ya liberadas en el abomaso, penetran la mucosa por las fosas de las glándulas gástricas (Lapage, 1976, Soulsby, 1987), las larvas tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Maena y Rojo, 1999). Dentro de la glándula, la L3 se alimenta de sangre, crece y muda a larva 4 (L4), ésta también crece e ingiere sangre, sale a la luz del abomaso y muda a larva 5 (L5) ó también llamada fase juvenil. La L5 se desarrollan directamente, ya sin mudar, hasta transformarse en adulto, macho o hembra (Maena y Rojo, 1999). Después de la cópula las hembras comienzan a producir huevos aproximadamente a los 21 días post- infección con un máximo de eliminación hacia el día 26, cerrando así el ciclo (Jacobs *et al.*, 1995); el ciclo completo se ilustra en la figura 2.

En circunstancias climáticas adversas veranos muy secos y calientes o inviernos fríos y/o secos, la L4 puede detener su desarrollo por varios meses, a este fenómeno se le conoce como hipobiosis o inhibición larvaria en el hospedador. La reactivación del desarrollo de las larvas hipobióticas se produce cuando mejoran las condiciones ambientales para la supervivencia de las fases libres y probablemente está asociada a estímulos estacionales (Lapage, 1976; Blitz y Gibbs, 1971). Al parecer la capacidad de inhibición del desarrollo es un carácter heredable y se considera una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador, a factores ambientales adversos o ambos a la vez (Cordero *et al.*, 1999; Nikolaou y Gasser, 2006; Quiróz, 2003).

La reactivación sincrónica de muchas larvas hipobióticas puede dar lugar a cuadros agudos graves. También cobra importancia desde un punto de vista epizootiológico, ya que al llegar a la madurez sexual de los adultos procedentes de larvas hipobióticas, se eliminan grandes cantidades de huevos que contaminan los pastizales, 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 período de prepatencia es de 15 a 20 días (Soulsby, 1987; Maena y Rojo, 1999).

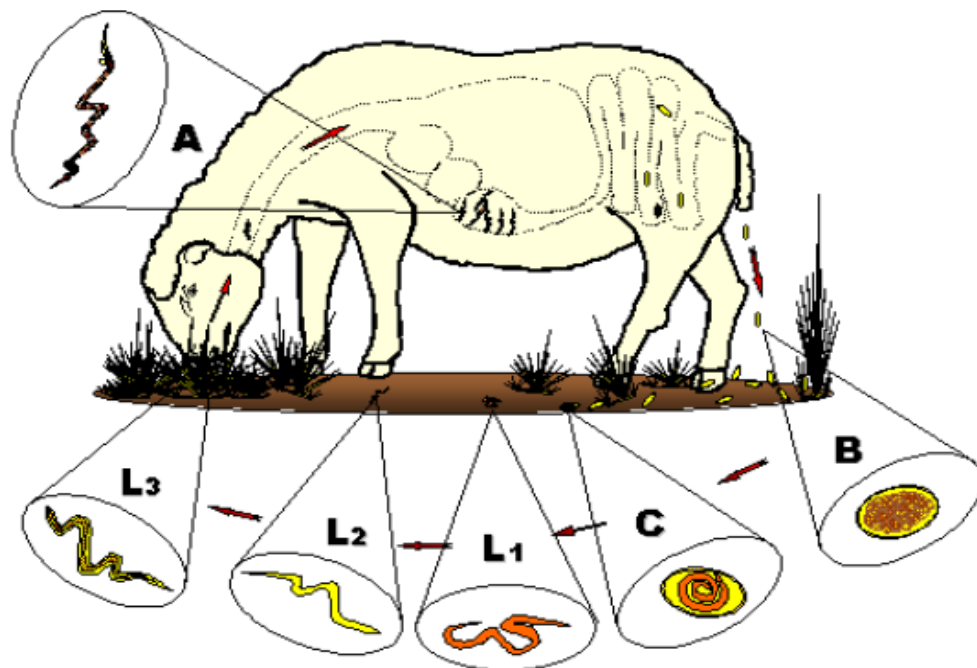


Figura 2. Ciclo biológico de *H. contortus*. A) Adultos en la mucosa abomasal, B) huevo eliminado en heces, C) huevo larvado, L₁) larva 1 libre en suelo, L₂) larva 2, L₃) larva 3 (fase infectante). (Tomado de Cuenca, 2008).

2.3 Epizootiología

En México la hemoncosis es 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; Arace, 2007). La L₁ y L₂ son susceptibles a la desecación, las larvas dependen de las

condiciones climáticas y micrometeorológicas, tipo de suelo, terreno, naturaleza y cantidad de vegetación mientras que la L3 es más resistente. La L3 migra mejor en clima húmedo y cálido, en condiciones adecuadas el desarrollo de la L3 se alcanza en 4 a 7 días (Lapage, 1976).

La epizootiología de la hemoncosis está condicionada principalmente por la elevada fecundidad de las hembras y por la velocidad a la que las larvas infectantes pueden desarrollarse en temperaturas altas, por lo que la hemoncosis es una enfermedad del ganado ovino en climas cálidos y húmedos, por lo tanto, cuando las condiciones son favorables se pueden acumular una gran cantidad de larvas infectantes sobre los pastos en muy poco tiempo. Sin embargo, las posibilidades de transmisión se encuentran limitadas por la susceptibilidad de las larvas a la deshidratación (Urquar *et al.*, 2001; Radostis *et al.*, 2002).

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, la raza, el sexo, el estado nutricional y el estado fisiológico (Cuéllar, 1992). Diferentes autores han descrito que los animales nativos o comúnmente llamados “criollos”, resisten mejor 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 por lo regular criados y mantenidos bajo condiciones estabuladas en las que difícilmente tienen contacto con los parásitos, 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 hemoncosis. 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. El “alza postparto” o “alza de primavera”, 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 nematodos adultos se favorece por la prolactina, la cual está presente hacia el final de la gestación y durante la lactación (Cuéllar, 1992). El aumento de primavera también se presenta en hembras jóvenes y en machos, pero es de menor intensidad (Quiróz, 2003).

2.4 Patogenia

El daño que ejerce *H. contortus* en el hospedador varía influido por distintos factores como el estado evolutivo del parásito, su estado metabólico y la carga parasitaria. El parásito puede estar en mucosa abomasal como L4 tisular en desarrollo o L4 en hipobiosis y en la luz del abomaso como adulto (Radostis *et. al.*, 2002). La patogenia está relacionada con la actividad hematófaga de las L4 y los adultos (Dunn, 1983). Al ingerir grandes cantidades de sangre del hospedador se producen pérdidas de los componentes sanguíneos, sobretodo 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 traumática al penetrar en las glándulas de las criptas abomasales de la mucosa, ocasionando la formación de pequeños coágulos, dentro de los cuales la larva se alimenta. Paralelamente a esto, la larva ejerce acción mecánica por compresión y obstrucción de las glándulas fúndicas. Durante este periodo, también se ejerce acción antigénica debido a que los estadios de la tercera y la cuarta larva se desarrollan en la mucosa. El líquido de muda junto con proteínas de secreción y excreción de la larva, promueven necrosis inmunomediada del tejido circunvecino y respuesta inmune local y humoral (Quiróz, 2003).

La presencia de la larva en las criptas del abomaso trae otras alteraciones histológicas del tejido glandular como son la hiperplasia de la mucosa abomasal, la sustitución de las células parietales secretoras de HCl por células jóvenes no secretoras

producen aumento del pH en la luz abomasal. Esto repercute negativamente en la digestión proteica, disminuye la conversión de pepsinógeno en pepsina y además se pierde el efecto bacteriostático del pH ácido, aumentando el número de bacterias en el abomaso.

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 (Quiróz, 2003). También aumenta la síntesis de gastrina, que es provocado por un aumento de la contractibilidad del abomaso y del peristaltismo intestinal (Meana & Rojo, 1999).

2.5 Signos clínicos

Los signos clínicos de la hemoncosis se han agrupado en tres diferentes cuadros:

1. Hemoncosis hiperaguda: Es poco común, pero puede darse en animales susceptibles expuestos a una repentina infección masiva. El gran número de parásitos provoca el rápido desarrollo de anemia, heces oscuras 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).
2. Hemoncosis aguda: Se observa principalmente en animales jóvenes susceptibles con infecciones intensas (Soulsby, 1987). Afecta a pocos animales, pero en brotes graves puede afectar a un gran porcentaje del rebaño si no recibe tratamiento. El cuadro incluye baja considerable de peso y/o retardo en el crecimiento. Se observa diarrea intermitente de color café oscuro, emaciación, mucosas pálidas y presencia de edema submandibular. Los animales están débiles, dejan de comer y se atrasa 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).

3. 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 para el productor o el responsable de la sanidad del rebaño, trae como consecuencia grandes pérdidas económicas a largo plazo, dada la ineficiencia productiva y biológica de los animales afectados (Cuéllar, 1986).

2.6 Control y prevención

En la actualidad el control de la hemoncosis ovina en México, se basa principalmente en la administración de antihelmínticos (Torres-Acosta *et al.*, 2003) pero a nivel mundial se ha generado la aparición de cepas resistentes por el uso indiscriminado de estos fármacos, situación que es un problema de grandes dimensiones (Chartier *et al.*, 1998; Van Wyk *et al.*, 1999); debido a la cantidad de factores que intervienen, no es factible administrar medicamentos eficientes en una situación dada. Sin embargo, se deberá buscar siempre el costo beneficio óptimo, para lo cual es necesario llevar registro de ganancia de peso, producción de lana, leche, crías y relacionarlos con el programa o calendario de desparasitación ensayado (Quiróz, 2003). Por lo anteriormente expuesto se han diseñado diversas estrategias de prevención y control de la hemoncosis, algunas de ellas se mencionan a continuación.

1. Desparasitación selectiva: basado en la idea del Dr. Faffa Malan Chart (FAMACHA®), es un sistema que tiene como objetivo la identificación clínica del grado de anemia de los animales con NGE del tipo hematófago y en función de esta tratar de disminuir la presentación de cepas de nematodos resistentes a los antihelmínticos.

Este sistema se basa en la comparación visual de la coloración de la mucosa conjuntival con una tarjeta o carta de referencia con cinco niveles de coloración: 1 y 2 indican anemia leve, 3 anemia moderada, 4 y 5 anemia grave (Van Wyk *et al.*, 1997). Los animales con anemia moderada y grave son desparasitados mientras que los animales con anemia leve no reciben tratamiento, esto tiene un doble propósito: por un lado se reducen los costos por tratamientos no necesarios en animales que no están gravemente afectados, como para limitar su estado productivo, por otro

lado, se reduce la presión selectiva hacia las cepas de helmintos con resistencia a los antihelmínticos, se supone que los animales que no están gravemente afectados no tienen infección masiva, de esta forma solo se desparasita la población afectada (Van Wyk y Bath, 2002).

2. Manejo de sistemas de rotación de potreros y la suplementación alimenticia: El manejo de pastizales va encaminado a evitar al máximo el contacto de los animales con las larvas infectantes, a través de la obtención de praderas de buena calidad nutricional e infestadas con pequeñas poblaciones de estadios de vida libre de NGE, lo cual permite que los animales desarrollen inmunidad y adquieran resistencia (Vázquez *et al.*, 2006). El pastoreo rotacional ha mostrado ser una opción útil para el control de los NGE, la rotación de los animales en distintas praderas con períodos de ocupación de 3 a 5 días en los que se regresa a la misma a los 35 días, disminuye por si solo a la mitad las tasas de eliminación de huevos en heces, debido a que se incrementa la mortalidad de las larvas en el suelo antes de ser ingeridas. Sin embargo, existen estudios controversiales como el presentado por Vázquez *et al.* (2006), en donde compararon el pastoreo rotacional contra el pastoreo continuo en el control de la hemoncosis ovina, ellos reportaron menores índices de eliminación de hgh en el sistema continuo que en el rotacional, sin embargo, también reportan mayores índices de hematocrito, condición corporal y coloración de las mucosas en el sistema rotacional que en el continuo. La razón de que aparentemente los animales más parasitados tuvieran mejores resultados en los parámetros observados, fue que evaluaron animales de diferentes edades y en distintos momentos productivos

Por otra parte, existen muchos trabajos que demuestran el efecto negativo de los NGE en la conversión alimenticia, la capacidad de digestión y la utilización de energía metabolizable en los rumiantes, (Haile *et al.*, 2004). Algunos trabajos han demostrado al evaluar el efecto de la alimentación con dieta moderada y alta en proteína metabolizable en dos distintas razas ovinas infectadas con *H. contortus*, que las suplementación de altas cantidades de proteína metabolizable mejoran la resistencia y resiliencia de los corderos a infecciones únicas o mixtas de NGE (Fox,

1997; Wallace *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1999; Haile *et al.*, 2002, Bricarello *et al.*, 2005).

3. La selección de animales resistentes y/o resilientes a la infección por NGE: Se ha demostrado que la resistencia es una característica heredable, ciertas razas ovinas son más resistentes que otras a los NGE. Esta característica genética se puede fijar a través de la selección de ovinos resistentes o resilientes a la infección (Woolaston, 1993; Eady *et al.*, 1996; Alba- Hurtado y Muñoz- Guzmán, 2014).

Estos conceptos involucran necesariamente tanto la participación de los mecanismos de defensa inespecíficos como de los específicos en el estado de resistencia. La participación en esto de los mecanismos inmunológicos no es totalmente conocida, pero se ha establecido que es una característica heredable que es típica de algunas razas ovinas (Sréter *et al.*, 1994).

4. Uso de vacunas: Varios grupos de investigación en el mundo se han dedicado al desarrollo de vacunas específicas contra NGE, particularmente en caso de nematodos hematófagos, los trabajos se han intensificado con la hipótesis de que hay protección cuando el hospedador monta una respuesta inmunológica contra los antígenos intestinales del parásito (Jasmer y McGuire, 1991; Hohenhaus *et al.*, 1995; Jasmer *et al.*, 1996). Debido a la acción directa que tendrían los anticuerpos sobre la digestión del parásito, cuando se ingieren con la sangre, se ha seguido la estrategia utilizada en la vacunas contra garrapatas. Jasmer *et al.* (1991), lograron inmunizar cabritos de dos edades diferentes con antígenos obtenidos del intestino de *H. contortus*, los resultados logrados fueron variables, mostrando porcentajes de reducción en la eliminación de huevos en heces del 97 al 95% y de adultos en el abomaso del 65 al 89%.

Por otro lado, Schallig *et al.* (1997), consiguieron protección en corderos con dos antígenos intestinales purificados, posteriormente este mismo autor logró clonar y expresar en bacterias estos antígenos, logrando el reconocimiento de los mismos por corderos hiperinmunizados con *H. contortus*.

5. Control mediante depredadores naturales: Todavía no es un procedimiento bien establecido. Han sido empleados exitosamente distintos tipos de hongos saprofitos para el hospedador pero nocivos para las larvas de nematodos parasitarios (Mendoza *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1999). Sin embargo, trabajos como el de Eysker *et al.* (2006), los cuales dosificaron dos lotes ovinos diariamente con 500 mil clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* y encuentran un pobre o nulo efecto sobre el control parasitario, no resultan alentadores.

2.7 Respuesta inmunológica contra *Haemonchus contortus*

No son completamente claros los mecanismos inmunológicos a través de los cuales los animales tienen o adquieren resistencia a la infección de *H. contortus* (Saddiqi *et al.*, 2010; Shakya *et al.*, 2011), se han realizado varios estudios y aún se tienen dudas al respecto, no obstante, se ha observado que la respuesta es diferente dependiendo de la edad, la raza, el estado nutricional así como del estadio de desarrollo parasitario y las exposiciones previas (Muñoz, 2007).

El tipo de respuesta está condicionada por las variaciones antigénicas que presentan los nematodos *H. contortus* en el desarrollo de sus diferentes estadios L3, L4, L5 y adulto, cada uno de éstos, presenta diferencias en cuanto a las moléculas de superficie. Así, se han identificado antígenos estadio-específicos de L3 y L4 que no están expresados en la superficie de las fases adultas (Bowles *et al.*, 1995). El sistema inmune de los ovinos en principio es estimulado por distintas moléculas antigénicas de las larvas que son distintas a los antígenos que se encuentran en la superficie de las fases adultas por lo que el rápido cambio en los antígenos dificulta la respuesta del hospedero en las etapas iniciales de la infección, por lo que cada estadio del desarrollo es inmunológicamente un organismo antigénico distinto (Meeusen *et al.*, 2005). Por lo anterior el tiempo que toma la aparición de una respuesta eficiente en los animales es prolongado y es necesario que ocurran varias reinfecciones.

La respuesta sobre las larvas, esta relacionada con cantidades elevadas de inmunoglobulinas IgA e IgE, histamina y leucotrienos en el moco abomasal (Montaraz, 1997). Los mecanismos por los cuales las inmunoglobulinas IgG e IgA contribuyen en la

inmunidad contra *H. contortus* 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 de *H. contortus*, pero en general, se ha observado un incremento en los anticuerpos séricos contra antígenos larvarios y de adultos después de una infección (Gasbarre, 1997).

2.8 Respuesta específica humoral contra *H. contortus*

Las infecciones naturales y experimentales con *H. contortus* inducen la producción de anticuerpos específicos. La respuesta por anticuerpos séricos ha sido ampliamente estudiada y los resultados obtenidos han sido variables. Mientras que algunos estudios muestran asociación entre los niveles de anticuerpos séricos del isotipo IgG con la resistencia (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006), otros trabajos sólo han reportado una asociación con la infección pero no con la resistencia (Gómez- Muñoz *et al.*, 2005). Los anticuerpos abomasales posiblemente son más importantes para la protección contra NGE que los anticuerpos séricos (Alba- Hurtado y Muñoz- Guzmán, 2014). Así, se ha demostrado que la presencia de niveles altos de IgA disminuyen la fertilidad y la longitud promedio de *Teladorsagia circumcincta* que es otro nematodo abomasal de los ovinos (Martínez-Valladares *et al.*, 2005). También se ha observado una correlación negativa entre la cantidad de IgA específica en moco abomasal y la carga parasitaria en infecciones con *H. contortus* (Amarante *et al.*, 2005).

Las larvas infectantes de *H. contortus* son las responsables del estímulo antigénico a nivel abomasal, este estímulo provoca el incremento de los niveles de anticuerpos en la mucosa abomasal, también es dependiente de la dosis (Byszewska-Spocinska y Stankiewicz, 1985). Para el mantenimiento de los niveles elevados de IgA e IgG en abomaso es necesaria la presencia del estímulo antigénico constante, hecho también observado en la infecciones ovinas por *Teladorsagia circumcincta* (Smith, 1999).

Se ha encontrado que en corderos con infecciones concomitantes entre *Oestrus ovis* y *H. contortus* hay un aumento de eosinófilos, mastocitos y leucocitos abomasales, que se han asociado a una menor carga parasitaria por *H. contortus* comparados con corderos no infectados y corderos infectados solamente con *H. contortus* (Dorchies *et al.*, 1997, Yacob

et al., 2005). También se ha reportado la reducción significativa en el tamaño promedio de las hembras de *H. contortus*, así como el número de huevos dentro del útero de las mismas (Tefere *et al.*, 2005). De la misma forma observaron la reducción de la carga parasitaria de *Trichostrongylus colubriformis* en infecciones mixtas con *Oestrus ovis* (Yacob *et al.*, 2004, Yacob *et al.*, 2006).

2.9 Resistencia del hospedador a la hemoncosis ovina

El término resistencia a nematodos es definida como la habilidad de los animales para prevenir el establecimiento de las fases larvarias y/o de promover la eliminación espontánea de las fases adultas, lo cual se refleja directamente en la disminución de la carga parasitaria de los animales (Albers y Gray, 1987; Bricarello *et al.*; 2004). Desde esta perspectiva, la causa de la resistencia es multifactorial e involucra factores tales como el estado nutricional, la edad, el sexo, la raza, el tipo de hemoglobina, la respuesta eosinofílica, el comportamiento del animal al pastar, las barreras naturales de defensa del hospedador y los mecanismos de la respuesta inmune (Hoehenhaus y Outteridge, 1995). La participación de los mecanismos inmunológicos no es totalmente conocida, pero se ha establecido que es una característica heredable típica de algunas razas ovinas (Sréter *et al.*, 1994). La resistencia puede ser en realidad, la expresión conjunta de diversos mecanismos en un inicio, pero que continúan de manera natural al desarrollo de mecanismos específicos de defensa, los cuales en su conjunto, impiden el establecimiento eficiente del parásito (Muñoz, 2007).

Se han descrito anteriormente que los tipos de resistencia frente a las enfermedades parasitarias y se clasifican en dos categorías: La primera, también llamada resistencia innata, esta asociada a la especie, la edad y la raza. La segunda categoría, la inmunidad adquirida, depende de los estímulos antigénicos y de la posterior respuesta humoral y celular (Urquhart, 2001), diferenciándose entre la resistencia natural de origen genético y la resistencia adquirida con la edad también llamada inmunidad (Cordero, 1999).

Por otra parte se ha demostrado que algunas razas ovinas son mas resistentes que otras a la hemoncosis, un ejemplo de ello son la resistencia de las cruas $\frac{3}{4}$ de la Red

Maasai en comparación de las cruzas de la raza Dorper. Algunas razas en las que se ha demostrado resistencia natural son: Blackbelly (Yanswinski *et al.*, 1980), Florida (Amarante *et al.*, 1999), Saint Croix (Burke y Miller, 2004), Katahdin (Burke y Miller, 2004) y Red Maasai (Mugambi *et al.*, 2004). La selección de los animales resistentes se realiza con base en la menor carga parasitaria relacionada por el aumento de la eosinofilia principalmente, así como la eliminación de los animales no responden favorablemente (Hooda *et al.*, 1999).

De esta misma forma se han encontrado elementos de la respuesta inmune, como la eosinofilia periférica y los niveles de anticuerpos específicos contra los parásitos, relacionados con la menor susceptibilidad a la hemoncosis, por lo que se ha sugerido que esto puede tener una base inmunológica (Muñoz, 2007).

La resistencia de ciertas razas puede explicarse por el lugar donde fueron seleccionadas. En general, éstas fueron seleccionadas en lugares donde las características climáticas favorecían el desarrollo de las larvas de NGE lo que originó que muchas generaciones, al seleccionar ciertos parámetros productivos indirectamente se seleccionaran para la resistencia. Lo anterior parece confirmarse por el hecho de que razas autóctonas de estos lugares, con nulo o pobre manejo zootécnico y ausencia de tratamientos antihelmínticos son más resistentes, que razas altamente productivas seleccionadas en lugares con niveles óptimos de sanidad y manejo zootécnico (Alba- Hurtado *et al.*, 2010).

Aunque existen diferentes formas de evaluar la resistencia genética a los NGE, hay dos que son las más utilizadas la primera y más común es el medir la reducción de huevos por gramo de heces (hgh), con las limitaciones que eso implica, pues la cantidad de huevos eliminados no necesariamente está relacionada con la carga parasitaria en el animal (Stear y Murray, 1994). La segunda y más confiable para conocer el efecto racial sobre la resistencia a los NGE en los ovinos, es determinar la cantidad de parásitos (larvas y adultos) presentes en el tracto gastrointestinal de los animales analizados, sin embargo, la única forma de hacerlo es por necropsia, debido a esto, este criterio no puede ser usado para la selección genética de ovinos (Pfeffer *et al.*, 1996; Hooda *et al.*, 1999).

2.10 Efectos moduladores asociados a moléculas de *Taenia sp.*

Dissanayake *et al.* (2004, 2002) observaron que la administración de un complejo de glicanos obtenidos de *Taenia crassiceps* tiene actividad adyuvante cuando se aplican junto a antígenos de *Leishmania mexicana*, debido a que alteran el balance de Th-1/Th-2, aumentan los niveles de anticuerpos IgG-1 e IgG-2a y se asocian a protección inducida en ratones infectados experimentalmente con *Leishmania mexicana* (Dissanayake *et al.*, 2005).

Segura- Velázquez *et al.* (2006, 2009) demostraron en humanos que la administración de un péptido derivado del cisticerco de *Taenia crassiceps* incrementa la proliferación de células CD4+ y los niveles de anticuerpos anti-influenza antes y después de la infección; esto llevó al desarrollo de un coadyuvante para una vacuna intranasal y subcutánea contra influenza en medicina (Segura- Velázquez *et al.*, 2013).

En estudios previos a este trabajo, Cuenca-Verde *et al.* (2011), reportaron que la administración de un extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExMTh) reduce significativamente la eliminación de huevos en la materia fecal de corderos infectados con *H. contortus*, lo cual posiblemente está asociado con un fenómeno de protección inducida. La inoculación previa del extracto indujo además el aumento de eosinófilos en sangre así como de linfocitos CD4+ y gama-deltas en el abomaso de estos corderos.

2. JUSTIFICACIÓN

La hemoncosis ovina es una enfermedad de gran importancia, principalmente en aquellos lugares donde se practica el pastoreo, ocasiona ineficiencia productiva en los sistemas pecuarios de México y el resto del mundo, disminuye la productividad de los animales y produce pérdida en las utilidades del productor (Urquhart, 2001).

En la respuesta inmune están involucrados tanto componentes específicos (respuesta celular y humoral), como inespecíficos (respuesta inflamatoria). Los corderos resistentes a la hemoncosis tienen niveles más altos de eosinófilos sanguíneos y anticuerpos séricos que los corderos susceptibles (Alba- Hurtado y Muñoz- Guzmán, 2014).

En trabajos previos se ha demostrado que la administración de un extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExMTh) induce protección en corderos contra *H. contortus* (Cuenca-Verde *et al.*, 2011). Sin embargo no se evaluó la cinética de producción de anticuerpos contra *H. contortus*.

En el presente trabajo se pretende evaluar los niveles de anticuerpos de la clase IgG en corderos inoculados con el ExMTh antes de la infección con *H. contortus* y correlacionar estos niveles de anticuerpos con la eliminación de huevos en materia fecal para determinar su papel en la protección inducida que produce dicho extracto.

3. OBJETIVOS

4.1 General:

Medir el efecto de la inoculación previa de un extracto de *T. hydatigena* sobre los niveles séricos de IgG anti- L3 de *H. contortus* producidos en corderos con hemoncosis experimental.

4.2 Particulares:

1.-Estandarizar una técnica de ELISA para la cuantificación de IgG Anti-L3 de *H. contortus* en ovinos.

2.-Establecer y comparar las cinéticas de producción de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* en corderos inoculados con un extracto de *T. hydatigena*, corderos inoculados con el extracto de *T. hydatigena* e infectados con *H. contortus* y corderos solo infectados con *H. contortus*.

4.- Correlacionar los niveles de IgG sérica de los grupos infectados con la carga parasitaria medida por el conteo del número de huevos por gramo de heces.

4. HIPÓTESIS

Los niveles de IgG sérica contra *H. contortus* se modifican cuando se administra un extracto de *T. hydatigena* como inductor de protección contra la hemoncosis.

5. Materiales y métodos.

6.1 Lugar de realización

El proyecto se realizó en el Laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, ubicado en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la unidad de posgrado de la misma Facultad.

6.2 Animales

Se utilizaron 50 corderos de la raza Columbia, de aproximadamente 6 meses de edad, procedentes de una explotación ovina dedicada a la producción de animales para pie de cría, para garantizar la homogeneidad y la pureza racial. Se les realizó una valoración clínica y fueron desparasitados con albendazol. Se verificó la ausencia de huevos de nematodos gastroentéricos en la materia fecal por exámenes coproparasitoscópicos. Los corderos fueron adaptados por 3 semanas a condiciones de confinamiento total en corraletas con capacidad para cinco corderos. La alimentación consistió en forraje seco molido de alfalfa a razón de un 4% del peso vivo y agua *ad libitum*.

6.3 Obtención del extracto de metacestodo de *T. hydatigena*

Se recolectaron metacestodos de *T. hydatigena* a partir de ovinos sacrificados en rastro. Las larvas recolectadas fueron mantenidas en congelación hasta su utilización. Para obtener los extractos, se descongelaron los metacestodos y se colectó el líquido vesicular, al cual se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10µg/mL; leupeptina 10 µg/mL; iodoacetamida 1.8 mg/mL y PMSF 1mM SIGMA Labs). Las proteínas del líquido vesicular fueron precipitadas con sulfato de amonio a razón de 0.42g por mL y se centrifugó por una hora a 5000 rpm a 4° C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en solución buffer de fosfatos (PBS). El extracto fue filtrado a través de membrana millipore de 0.22 µm, alicuotado y almacenado a -20° C, hasta su utilización

(Cuenca-Verde *et al.*, 2011). La cantidad de proteína contenida en el extracto se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.4 Obtención de inóculos de L3 de *H. contortus*

Se obtuvo larvas 3 de *H. contortus* mediante la técnica de Corticelli-Lai (Alba-Hurtado, 2003) a partir de materia fecal de corderos infectados mono específicamente con una cepa de *H. contortus* (Cuenca-Verde, 2008). Cada inóculo consistió en una suspensión de 5000 larvas 3 de *H. contortus* y éstas se depositaron por sondeo bucoesofágico directamente en el rumen de los corderos experimentales (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2012).

6.5 Diseño experimental

Los corderos se dividieron en cuatro grupos. Los corderos del grupo 1 ($n=5$) se utilizaron como grupo testigo y solo se les administró agua. Los corderos del grupo 2 ($n=15$) recibieron 5000 L3 de *H. contortus* el día 0 del experimento, los corderos del grupo 3 ($n=15$) recibieron por vía intraperitoneal (I.P.) e intramuscular (I.M.) el ExMTh el día -10 y sólo por I.P. los días -6, y -2, el día 0 recibieron 5000 L3 de *H. contortus*. Los corderos del grupo 4 ($n=15$) recibieron por I.P. e I.M. el ExMTh el día -10 y sólo por I.P. los días -6, y -2, los corderos de este grupo no fueron infectados. Semanalmente se tomaron muestras de materia fecal de todos los corderos para el conteo de huevos de *H. contortus* en materia fecal y se tomaron muestras de sangre para la medición de los niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* durante las siguientes 7 semanas pos-infección.

Cuadro 2. Diseño experimental de la inoculación del ExMTh e infección con 5000 L3 de *H. contortus* en corderos de la raza Columbia.

Grupos	Días previo a la infección			Día de Infección
	-10	-6	-2	0
1	---	---	---	---
2	---	---	---	5000 L3 de <i>H. contortus</i>
3	600 µg I.M. ^a 600 µg I.P. ^a	600 µg I.P. ^a	600 µg I.P. ^a	5000 L3 de <i>H. contortus</i>
4	600 µg I.M. ^a 600 µg I.P. ^a	600 µg I.P. ^a	600 µg I.P. ^a	---

I.M. Intramuscular

I.P. Intraperitoneal

^a Inoculación con extracto de *T. hydatigena* (ExMTh)

5.6. Conteos de huevos en materia fecal.

La eliminación de huevos en la materia fecal de los corderos se determinó semanalmente mediante la técnica de McMaster modificada (Alba- Hurtado, 2007) y se expresó como la media del número de huevos por gramo de heces (hgh).

5.7. Preparación del antígeno de *H. contortus*.

Se obtuvieron extractos proteicos a partir de 10^6 L3 de *H. contortus* obtenidas como se describió anteriormente. Las larvas fueron lavadas tres veces en solución salina fisiológica estéril con antibiótico y antimicótico (penicilina 10,000 UI, estreptomycin 100 µg/mL, anfotericina B 10 µg/mL SIGMA Labs) y maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/mL, iodoacetamina 1.8 mg/mL y PMSF 1 mM SIGMA Labs), hasta la obtención de una pasta homogénea sin fragmentos identificables de larvas. Posteriormente el extracto fue centrifugado por 1 hora a 20,000 rpm 4° C y el sobrenadante fue filtrado con membrana de 0.22 µm, alícuotado y conservado a -20 ° C hasta su utilización (Camargo *et al.*, 1992). La cantidad de proteína total fue determinada por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como referencia.

5.8. ELISA para determinación de IgG específica a *H. contortus*

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp NUNC Labs) sensibilizadas con 10 µg/mL de antígeno de L3 de *H. contortus* en buffer de carbonatos pH 9.6 durante toda la noche a 4° C. Posteriormente las placas se bloquearon con Albumina Sérica Bovina (ASB) [5%] y se conservaron a 4° C hasta su utilización. Para cada muestra se utilizaron por triplicado 50 µl por pozo de una dilución 1:100 del suero en solución buffer de fosfatos (PBS) con ASB [1%] por 2 horas a 37° C, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.01% y a cada pozo se le colocarán 50 µl de IgG ovina (Bethyl A130-101P) a una dilución 1:5000 por una hora a 37° C. Las placas se lavaron cuatro veces como se describió anteriormente y el desarrollo del color se realizó con ortho- phenilendiamine (OPD) al 0.05% y peróxido de hidrogeno 0.001% en solución reguladora de citratos (Gómez-Muñoz *et. al.*, 1999). La lectura de las placas se realizó con un filtro de 492 nm en el lector de ELISA (Mulyiscan Ascent). En todos los sueros se probaron pozos sin ExMTh, el valor en

D.O. resultado de estos pozos fue sustraído al resultado de los pozos probados con el mismo suero en presencia de Ag de *H. contortus*, lo anterior fue realizado para restar la reacción inespecífica (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2010). Los datos por duplicado de los sueros fueron promediados y posteriormente transformados a valores de porcentaje de absorbancia (% Abs) tomando como referencia un *pool* de todos los sueros de los corderos infectados con *Haemonchus contortus* del día 49 p.i. mediante la siguiente fórmula (Alvarez-Guerrero *et al.*, 2011).

$$\% \text{ Abs} = \frac{(\text{DO del suero problema})(100)}{\text{DO del } \textit{pool} \text{ positivo}}$$

6.9. Análisis estadístico

Los datos de hgh fueron transformados mediante la fórmula $\log_{10}(n+100)$ para estabilizar las varianzas. Los datos corregidos de hgh y los datos de % Abs de los sueros fueron analizados por ANDEVA para muestras repetidas y las diferencias entre las medias de los grupos se establecieron por Diferencia Mínima Significativa de Fisher. Los valores de hgh y % Abs fueron correlacionados utilizando la correlación de Pearson. Para todos los análisis se utilizó un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1 Eliminación de huevos en materia fecal

Previo al experimento los resultados de las pruebas coproparasitológicas mostraron la presencia de *Nematodirus sp.* en dos corderos (un huevo en cada uno), los cuales fueron tratados. Al inicio del experimento los conteos de hgh de todos los animales fue cero. Los resultados de la eliminación de huevos de los corderos experimentales se muestran en la figura 3. Los corderos del grupo 2 solo a quienes se infectaron con *H. contortus* eliminaron mayor cantidad de hgh que los corderos de los que se les aplicó el extracto previo a la infección desde la semana 4 hasta el final del experimento, sin embargo estas diferencias fueron significativas hasta la semana 7 p.i. ($p < 0.05$).

7.2 Cinética de anticuerpos

La cinética de producción de anticuerpos contra L3 de *H. contortus* se presenta en la figura 4. Los corderos del grupo 4 con respecto a los corderos del grupo 1 mostraron mayores niveles de IgG sérica anti-L3 a partir de la semana 1 ($p < 0.05$) hasta el final del experimento. Los corderos del grupo 3 mostraron mayores niveles ($p < 0.05$) de IgG sérica anti-L3 en la semana 7 p.i que el grupo 1 y mayores niveles en esta misma semana que los corderos del grupo 2 aunque esto no fue significativo ($p = 0.39$).

Los corderos del grupo 2 mostraron una elevación de sus niveles de IgG anti-L3 a lo largo del experimento, sin embargo sus niveles no fueron significativamente mayores que los valores de los corderos del grupo 1 en la semana 7 del experimento ($p = 0.15$).

En los grupos infectados se observó una correlación significativa entre los niveles de IgG anti-L3 y el número de huevos eliminados en la materia fecal en la semana 7 del experimento ($r = - 0.40$, $p = 0.3$).

FIGURA 3

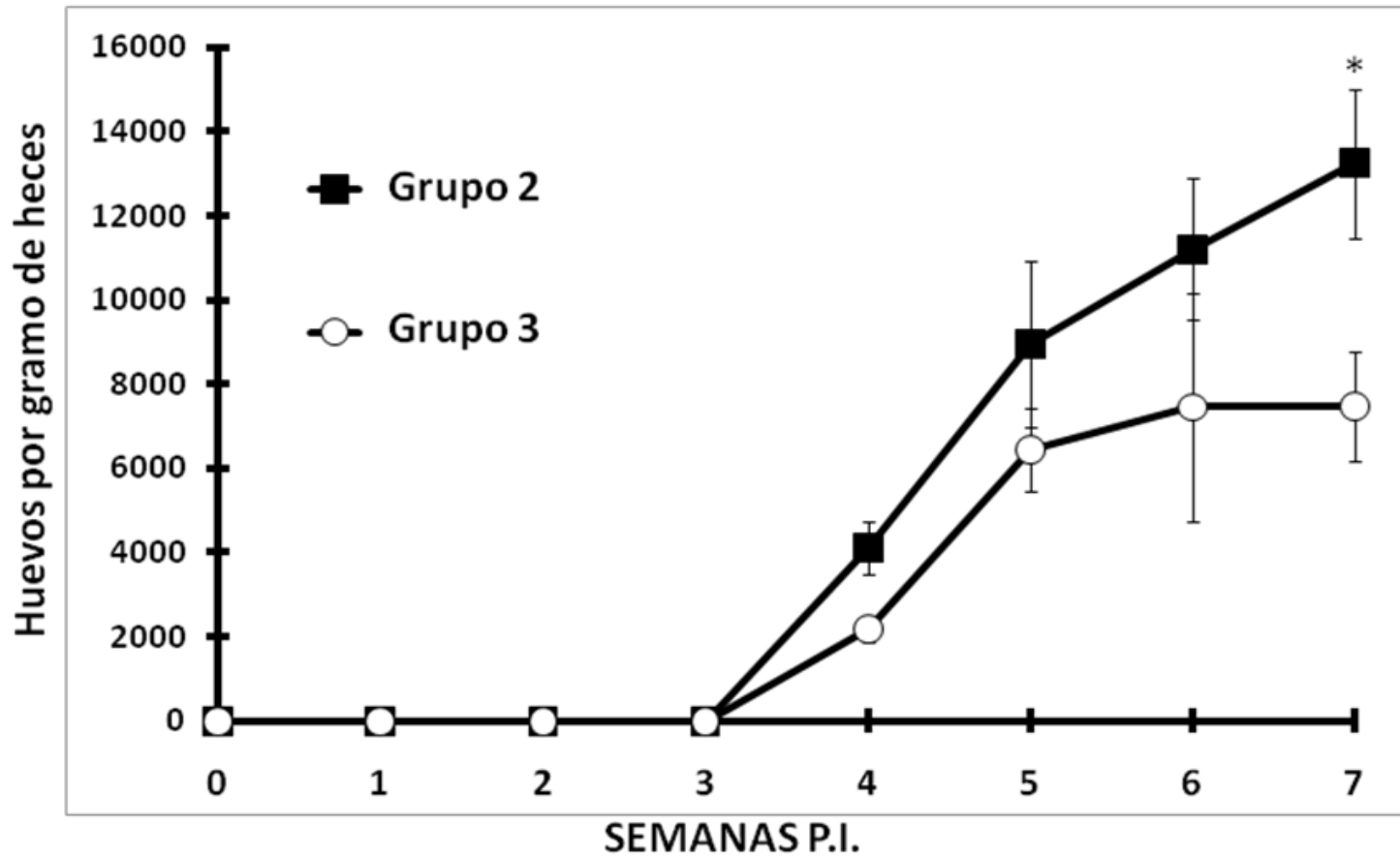


Figura 3.- Promedio (\pm EE) del número de huevos de *Haemonchus contortus* eliminados en materia fecal de corderos Columbia infectados con 5000 L3 (grupo 2) y corderos protegidos con un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* e infectados con 5000 L3 (grupo 3). * Diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

FIGURA 4

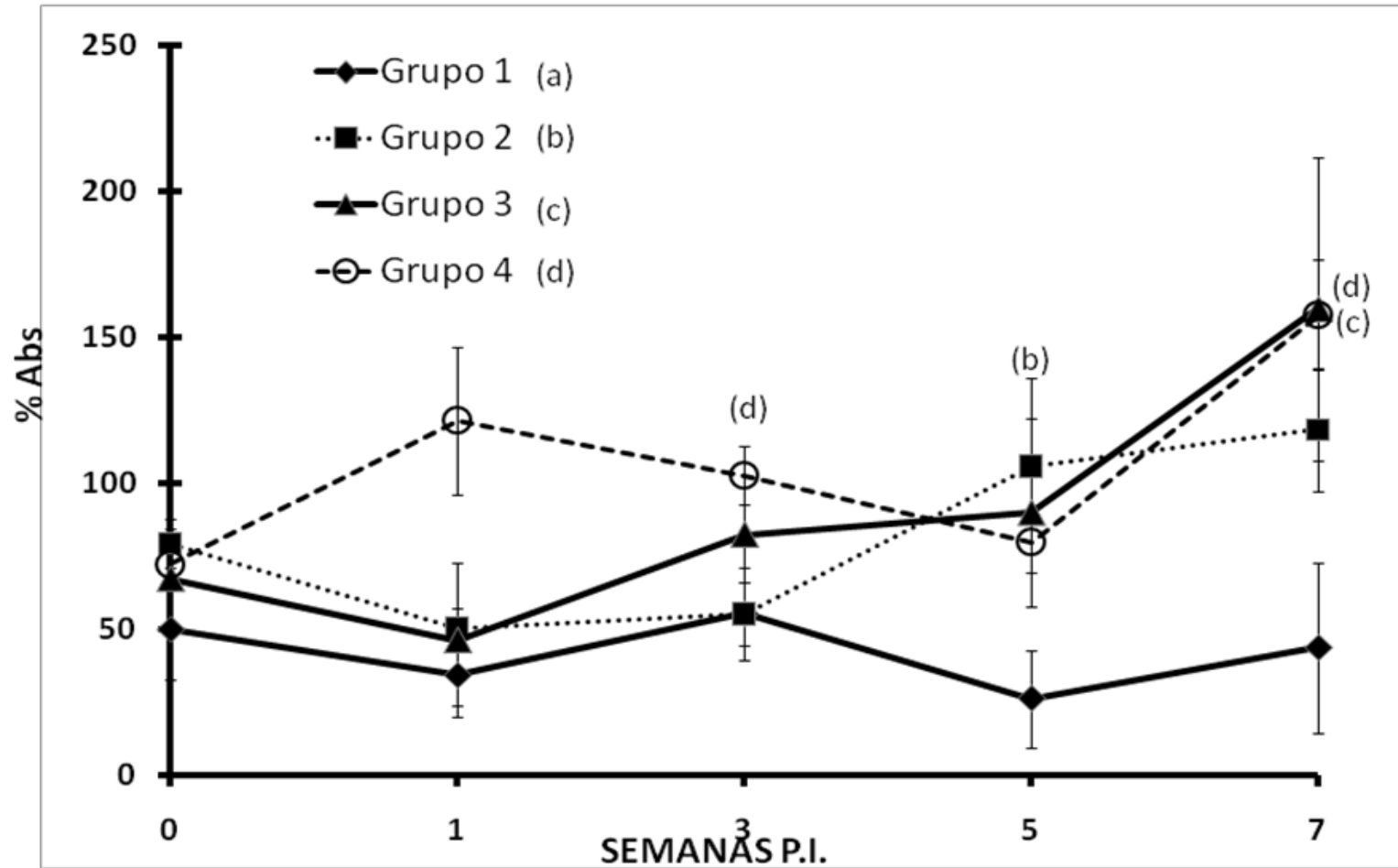


Figura 4. Promedio (\pm EE) de porcentajes relativos de Absorbancia(%Abs) de producción de IgG anti-L3 de *Haemonchus contortus* en corderos Columbia , al grupo 1 se mantuvo como testigo , infectados con 5000 L3 de *Haemonchus contortus* (Grupo 2) , infectados con 5000 L3 de *Haemonchus contortus* e inoculados con ExMTh (Grupo 3) y administrados con ExMTh (Grupo 4) . Letras diferentes indican diferencia significativa (<0.05) .

8. DISCUSIÓN

En un trabajo previo, el grupo de investigación al cual pertenece este trabajo, reportó el efecto protector de un extracto parasitario (ExMTh) sobre el establecimiento de *H. contortus* en corderos Columbia y asoció esta protección con algunos efectores de la respuesta inmune (Cuenca-Verde *et al.*, 2011). En este estudio, utilizando un diseño experimental similar, se realizaron pruebas de ELISA indirecta para determinar la presencia de IgG anti-L3 de *H. contortus* y su posible asociación con la protección inducida por el ExMTh en corderos Columbia. Los resultados indican que la administración del ExMTh produce niveles significativos de IgG anti-L3 y posiblemente la cantidad de anticuerpos producidos está relacionada con la protección observada en los corderos.

La reducción en la cantidad de hgh eliminados es un indicador de la disminución de la carga parasitaria en problemas como la hemoncosis (Rowe, 2008). Esta disminución puede ser debida a la protección inducida por el sistema inmune (Bambou, 2008). Por lo tanto cualquier factor que reduzca la carga parasitaria a través de la estimulación del sistema inmune puede ser considerado un inmunoprotector. En el presente estudio, se observaron desde la semana cuatro p.i., menores cantidades de hgh eliminados en los corderos a los que les fue administrado el ExMTh previo a la infección con *H. contortus* que en los corderos que solo fueron infectados, aunque esta observación fue significativa hasta la semana siete p.i. ($p < 0.05$). Previamente Cuenca-Verde *et al.*, (2011), observaron este mismo efecto del ExMTh en corderos hasta el día 42 p.i. (semana 6) al mismo tiempo que observaron aumento de eosinófilos y linfocitos T CD4+. Ambos trabajos, coinciden en la observación de la reducción significativa de la carga parasitaria varias semanas después de la infección, por lo que es posible que se requiera de la participación de elementos del sistema inmunológico para hacer efectiva esta reducción. Los resultados de los dos estudios demuestran que el ExMTh tiene un efecto protector contra la hemoncosis experimental y sugieren que esta protección es a través de la estimulación del sistema inmune.

Comparativamente en ambos estudios, se utilizó la misma dosis de larvas infectivas (5000 L3 *H. contortus*) de la misma cepa y la misma ruta y técnica de inoculación. La eliminación de hgh de los corderos solo infectados con *H. contortus* en ambos estudios, fue

similar en la semana siete p.i. (aproximadamente $10,000 \pm 3547.53$ vs. $12,000 \pm 1582$ hgh respectivamente), sin embargo, la respuesta de los corderos que fueron protegidos con el ExMTh previo a la infección, fue menor en este estudio (aproximadamente 4000 ± 2241.83 vs. 8000 ± 560.8 hgh respectivamente). La menor respuesta al ExMTh observada en los corderos de este trabajo pudo ser debida a variaciones en el lote de larvas infectivas de *H. contortus* (edad de las larvas, época del año, etc.) diferencias en el ExMTh debido a que cada lote fue obtenido en su momento de utilización o diferencias en el *estatus* inmunológico de los corderos de los diferentes experimentos.

Varios autores han asociado la presencia de anticuerpos, principalmente IgG con resistencia a la hemoncosis (Gómez-Muñoz *et al.*, 1999; Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006) o con protección cuando se utilizan algunos antígenos de *H. contortus* como inmunógenos (Redmond *et al.*, 2006; De Vries *et al.*, 2009). En el presente estudio, la administración del ExMTh indujo un aumento de los niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* de manera similar a los corderos que solo fueron infectados, sin embargo, los corderos que recibieron solo ExMTh, mostraron niveles de esta inmunoglobulina significativamente mayores que los corderos testigo desde la semana 1 p.i y hasta el final del experimento ($p < 0.05$). La presencia de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* en los corderos que solo recibieron ExMTh puede ser explicada por la presencia de antígenos en el ExMTh que tenga reacción cruzada con *H. contortus*. En este sentido, Smith *et al.* (2001), reportaron una protección cruzada contra *H. contortus* producida por antígenos de *Teladorsagia circumcincta*. (Redmond, 2006). La posible reacción cruzada del ExMTh con *H. contortus*, podría ser uno de los mecanismos de estimulación del sistema inmune de este extracto para mejorar la respuesta de los corderos a la presencia de *H. contortus*.

Por otro lado, los corderos que recibieron ExMTh previo a la infección, mostraron niveles significativamente mayores ($p < 0.05$) de IgG sérica anti-L3 que los corderos del grupo testigo en la semana 7 p.i. y niveles mayores de esta inmunoglobulina que los corderos del grupo 2 que solo fueron infectados con L3 de *H. contortus* (no significativo) lo cual sugiere un efecto sinérgico entre la infección y la inoculación del extracto sobre los niveles de IgG contra el parásito. Además se observó una correlación negativa entre los niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* y el número de huevos eliminados en la

semana siete del experimento, aunque no fue significativa ($r = -0.4$, $p = 0.3$). Gill *et al.*, (1993), reportaron una correlación negativa entre niveles de IgG anti- *H. contortus* y el número de huevos eliminados mientras que Gómez- Muñoz *et al.*, (1999) reportaron una correlación negativa entre los niveles de IgG anti- *H. contortus* y el número de fases adultas presentes en el abomaso. Si bien los anticuerpos específicos a nivel sérico pueden ser un indicador de la infección, éstos pueden estar también asociados a la protección.

Existen reportes que han planteado la utilización de inmunomoduladores de origen parasitario. Dissanayake *et al.* (2002 y 2004) demostraron efectos de este tipo producidos por un extracto de cisticercos de *Taenia crassiceps*. La administración en ratones de un complejo gliccano de *Taenia crassiceps* previo a la administración de antígenos de *Leishmania mexicana*, altera el balance Th-1/Th-2 y produce aumento significativo de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2^a antileishmaniales (Dissanayake *et al.*, 2005). Un aspecto interesante a evaluar es el posible efecto inmunomodulador del ExMTh y, si este posible efecto pueda explicar la protección observada en los corderos infectados con *H. contortus*. En un trabajo paralelo a éste, se evaluó la capacidad del ExMTh de inducir la producción de diferentes citocinas en cultivos celulares del linfonodo abomasal de los corderos de este experimento (Ramírez, 2015 tesis en escritura). Los resultados de ese estudio mostraron un aumento de la producción de IL-4 e IFN gama en dichos cultivos. Este resultado aunado a la mayor producción de IgG contra el parásito encontrado en este estudio, sugiere que el ExMTh también tenga efectos inmunomoduladores y hace posible plantear la posibilidad de utilizar la inmunomodulación como una alternativa no química para el control de la hemoncosis.

La respuesta inmune del abomaso, no es una respuesta aislada, el tracto gastrointestinal responde como un sistema, por lo que la estimulación con el ExMTh por vía intraperitoneal e intramuscular también estimula en forma inespecífica el intestino y otras partes del organismo, por lo que su aplicación también podría proteger contra otras infecciones parasitarias. Futuros estudios donde se evalué su efecto en infecciones por otros géneros de parásitos podrían darnos la respuesta.

En este trabajo se comprobó que el ExMTh induce protección contra la infección experimental con *H. contortus*, sin embargo, no se conoce cuales son las moléculas o

fracciones proteicas involucradas y la duración de esta protección. Considerando lo anterior, futuros trabajos deben ir encaminados a determinar que componentes del ExMTh son los responsables de la protección y determinar cuánto dura ésta. Además, sería interesante plantear estudios en donde se utilice el ExMTh como adyuvante para mejorar la respuesta inmune a otros antígenos.

9. CONCLUSIONES

La administración previa del ExMTh indujo protección contra *H. contortus* en los corderos Columbia.

La administración del ExMTh indujo la producción de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus*.

La cantidad de IgG sérica anti-L3 fue significativamente mayor en los corderos a los que se les administró el ExMTh previo a la infección que en los corderos que solo fueron infectados.

La correlación negativa entre la cantidad de IgG sérica anti-L3 y la cantidad de hgh sugiere una asociación de esta inmunoglobulina con la protección observada, inducida por el ExMTh.

10. Bibliografía

- Alba- Hurtado F., Parasitología Veterinaria. Manual de laboratorio, UNAM, 2007.
- Alba-Hurtado, F., Muñoz- Guzman, M.A., 2014, Respuesta inmune asociada a la resistencia en la hemoncosis ovina, En: Avances recientes en el estudio de helmintos parásitos, Ortega- Pierres, M. G., Morales- Montor, J., UNAM.
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, L.R., Le Jambre, S.F., Barger, I.A. 1987. The genetics of resistente and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino lambs. Int. J. for Parasitol. 17, 1355-1363.
- Álvarez- Guerrero, C., Muñoz- Guzmán, M.A., Buendía- Jiménez, J.A., Alba- Hurtado, F., 2011, *Gnathostoma binucleatum*: pathological and parasitological aspects in experimentally infected dogs, Exp. Parasitol. Vol. 127, 84.
- Amarante, A.F., Bagnola junior, J., Amarante, M.R., Barbosa, M.A. 1997. Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. Vet. Parasitol. 73, 89-104.
- Arace, J., 2002, La epizootiología como herramienta para el control parasitario en ovinos, Pastos y Forrajes, Matanzas, Cuba, vol. 30, 35-43.
- Balic, A., Bowles, V.M. Meeusen, E.N.T. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunol. 24, 39-46.
- Balic, A., Veron, M.B., Els, N.T.M. 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infection in ruminates. Adv. Parasitol. 45: 182-227.
- Bambou J. C., de la Chevrotiere C., Varo H., Arquet R., Kooyman F.N.L, Mandonnet N., Serum antibody responses in Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*, Vet. Parasitol., 15, 2008.
- Blitz, N.M., Gibbs, H.C., 1971, An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep, Can. J. Comp. Med, 35, 178-180.
- Blood, D.C., Radostis, O.M., Henderson, J.A., Arundel, J.H., Gay, C.C., 1986, Medicina veterinaria, Nueva Editorial Interamericana, 7° Edición, México.
- Borchert, A. Superfamilia *Trichostrongyloidea*, Parasitología Veterinaria 3 ed., Acribia, Zaragoza, España. 1981, 316-353

- Borchert, A., Superfamilia *Trochostrongyloidea*, Parasitología Veterinaria, 3° ed., Ed. Acrabia, Zaragoza, España, 1981, 316-353.
- Bowles, V.M., Brandon, M.R., Meeusen, E., 1995, Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*, Immunol., 84, 669-674.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Anal Biochem., Vol. 72, 248-254.
- Bricarello P.; Gennari T.; Olivera-Sequeira T.; Vaz C. Goncalves I. and Echeverria F., 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small. Rum. Res. 51, 75-83.
- Bricarello, P.A. Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdijk, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M. 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. Vet. Parasitol. 134, 99–109.
- Burke, J.M., Miller, J.E. 2004. Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper Katahdin, and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United States. Small Rum. Res. 54, 43-51.
- Byszewska- Sponcinska, E. y Stankieeiez, M., 1985, Immunological studies on experimental hemoncosis in sheep. IV. Multiple infections of Polish long- wool sheep, Acta Parasitologica Polonica, 30(11): 95- 108.
- C. Cuenca- Verde, J.A., Buendía- Jiménez, G. Valdivia- Anda, J.A. Cuéllar- Ordaz, M.A. Muñoz- Guzman, F. Alba-Hurtado, 2011, Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate, Vet. Parasitol., 332- 338.
- Camargo, E., Nakamura, P., Vaz, A., Silva, M., Chieffi, P., Melo, E. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 34, 55-60.

- Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N. 1998, Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France, *Small Rum. Res.* 29, 33-41.
- Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martínez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernández, R.S., Navarrete, L.C.I., Diez, B.P., Quiroz, R.H., Carvalho, V.H. Parte III: Parasitosis de los rumiantes, *Parasitología veterinaria*. Mc Graw Hill-Interamericana, Madrid España, 1999. 195-448
- Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martínez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernández, R.S., Navarrete, L.C.I., Diez, B.P., Quiroz, R.H., Carvalho, V.H., Parte III: Parasitosis de los ruminantes, *Parasitología Veterinaria*, Mc Graw Hill-Interamericana, Madrid España, 1999, 195-448.
- Cuéllar, O.J.A. 1986. Nematodiasis gastroentérica. En: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Edit. P. Piojan 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.
- Datta, F.U., Nolan, J.V., Rowe, J.B., Gray, G.D. 1999. Long-term effects of short-term provision of protein-enriched diets on resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29, 479-488.
- De Vries, Bakker N., Krijgsveld J., Knox p.d., Heck A.J.R., Yatsuda, A.P., An AC-5 cathepsin B-like protease purified from *Haemonchus contortus* excretory secretoty products shows protective antigen potencial from lambs, *Vet. Res.*, 40, 2009.
- Dissanayake S., Allen Shanin, Abdul Majeed Ameen, 2005; Adjuvant effect of *Taenia crassiceps* glycans against leishmanial antigens in mice infected with *Leishmania mexicana*, *Mol. Immunol.*, 1495- 1502.
- Dissanayake S., Nasir Khan, Allen Shahin, Shanaka Wijesinghe, Miodrag Lukic, 2002, Induction of immunoglobulin G1, interleukin- 6 and interleukin- 10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates, *Immunol.*, 411- 419.

- Dissanayake S., Ray S. Amith, Allen Shahin; 2004, *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL- 6 expression in naïve murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs), *Molecular Immunology*, 391- 398.
- Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Van Hhanh, N and Morand, S. Reduce egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophiles?. 1997. *Parasitol Res.* 83, 727-730.
- Dunn, A.A., 1983, *Helmintología veterinaria*, Editorial El Manual Moderno, México, 221-223.
- Eady, S.I., Woolaston, R.R., Mortimer, S.I., Lewer, R.P., Raadsman, H.W., Swan, A.A., Ponzonim R.W., 1996, Resistance to nematode parasites in Merino sheep: sources of genetic variation, *Aust. J. Agric. Res.*, 47:895-915.
- Eysker, M., Bakker, N., Van der Hall, Y.A., Van Hecke, I., Kooyman, FN.J., van der Linden, D., Schrama, Ploeger, H.W., 2006, The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematodes infections in their lambs in the Netherlands, *Vet. Parasitol.* , 141, 91-100.
- Fox, M.T. 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.* 72, 285-297.
- Gasbarre, L.C., 1997, Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Vet. Parasitol.*, 72, 327-343.
- George, S., Quiroz, H., 1993, Frecuencia de parasites gastrointestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos de La Magdalena Soltepec, Tlaxcala, México *Vet. Méx.* 24:195-198.
- Gill H.S., Gray G.D., Watson D.L., Husband A.J., Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep, *Parasite. Immunol.*, 15, 1999.
- Gill, H.S. 1991. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite. Immunol.* 13, 617-628.
- 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., Husband, A.J., Watson, D.L., Gray, G.D. 1994. Antibody-containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci. 56, 41-47.
- Gómez, A.P., Araujo, J.V., Ribeiro, R.C. 1999. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Manocrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. Braz. J. Med. Biol. Res. 32, 79-83.
- Gonzales A. J., Efecto de la inoculación de antígenos de los metacestodos de *Taenia hydatigena* sobre las poblaciones linfocíticas a nivel abomasal en corderos de la raza Columbia infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*, Tesis de licenciatura, UNAM, México, 2009.
- Haile, A., Tembely, S., Anidondo, D.O., Mukasa-Mugerwa E., Rege, J.E.O., Yami, A. Baker, R.L. 2002. Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in Ethiopian sheep. Small Rum. Res. 44, 247-261.
- Hohenhaus, M.A., East, J., Eisemann, C.H., Pearson, L.D., Douch, P.G.C., Green, R.S., Outteridge, P.M. 1995. Variation in immune responsiveness of sheep to the antigens of intestinal nematodes and blowfly larvae. Int. J. for Parasitol. 25, 629-636.
- 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, 137-142.
- Jacobs, H.J., Wiltshire, C., Ashman, K. and Meeusen, E.N.T., 1995, Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*, Vet. Immunol. Immunopathol, 48, 323-332.
- Jasmer, D., McGuire, T. C. 1991. Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. Infec. Immun. 59, 412-4417.
- Jasmer, D., Perryman L.E., McGuire, T.C. 1996. *Haemonchus contortus* GA1 antigens: Related, phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded

as a polyprotein and released from the nematode during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8642-8647.

- Lapage, G. 1976. Parasitología veterinaria. Editorial Continental. México. 121-127
- Learmount, J., Taylor, M.A., Smith, G.C., Morgan, C., 2006. A computer model to simulate control of parasitic gastroenteritis in sheep on UK farms. Vet. Parasitol. Vol. 142, 213-329
- Leathwick, D.M., Barlow, N.D., Vlassoff, A., 1992. A model for nematodiasis in New Zealand lambs. Int. J. Parasitol. Vol. 22, 789-799
- Maena, M.A., Rojo, V.F.A., 1999. Tricostrogilosis y otras nematodiasis. En: Parasitología veterinaria. Edit. Por Codero, C.M. Y Rojo, V.F.A. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- Martínez- Valladares, M., Vara- Del Río, M. P., Cruz- Rojo, M.A., Rojo- Vázquez, F.A., 2005, Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep, Parasitol. Immunol; Vol. 27, 213-218.
- Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V. 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematodes parasites. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 121-125.
- Mendoza de Gives, G.P.M., Davies, K.G., Clark, S.J., Behnke, J.M. 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against erf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. Parasitol. 119, 95-114.
- Mendoza de Gives, G.P.M., Flores, C.J., Herrera, R.D., Vázquez, P.V., Liébano, H.E., Ontiveros, F.G.E. 1998. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. J. Helminthol. 72, 343-347.
- Molina M. J., Ruiz A., Rodríguez- Ponce E., Gutiérrez A. C., González J., Hernández S., Cross-reactive antigens of *Haemonchus contortus* adult worms in *Teladorsagia circumcincta* infected goats, Vet. Res., 30, 1999.
- Montaraz J.A., Introducción a la inmunología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Impreso y hecho en México, 1997.
- Montero-Gomez, R. G., Torres, H. G., Nuncino, O.G., Becerril, P.C., Gallegos, S.J. y Aranda, I.E. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos

pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia*. Vol. 38, No. 4

- Mugambi, J.M., Audho, J.O., Njomo, S., Backer, R.L. 2005. Evaluation of phenotypic performance of Red Maasai and Dorper double backcross resource population: indoor trickle challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 127, 263-275.
- 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.
- Muñoz-Guzmán, M.A., Cuéllar, 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 Hemoncosis. *Can. J. Anim. Sci.*, 86: 363-371.
- Nikolaou, S., Gasser, R. B., 2006, Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*, *Int. J. Parasitol.* 36, 859-868.
- Pfeffer, A., Douch, P.G.C., Shaw, R.J., Gatehouse, T.K., Rabel, B., Green, R.S., Shirer, C.L., Jonas, W.E., Bisset, S., 1996, Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*, *Int. J. Parasitol.* Vol. 26, 765-773.
- Quiroz, R.H. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos, 1° ed. Edit. LIMUSA. México. 441-458
- Radostis, O.M., Gay, C.C., Bolood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2002, *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*, Vol. II, 9° ed., Mc Graw Hill, España, 1599-1603.
- Redmond D.L., Smith S.K., Halliday A., Smith W.D., Jackson F., Knox D.P., Matthews J.B., An immunogenic cathepsin F secreted by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, *J. Parasit.*, 36, 2006.
- Rowe A., McMaster K., Emery D., Sangster N., *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts, *Vet. Parasitol.*, 153, 2008.
- Saddiqi, H.A., Iqbal, Z., Khal, M.N., Sarwar, M., Muhammad, G., Yaseen M., Jabbar, A, 2010, Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural

resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*, *Vet. Parasitol.*, 168:141-145.

- Schalling, H.D.F.H., Van Leeuwen, M.A.W., Verstrepen, B.E., Cornelissen, A.W.C.A, 1997, Molecular characterization and expression of two putative protective excretory proteins of *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 88, 203- 213.
- Segura- Velázquez R., A. Pérez – Torres, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, F. Rosetti, G. Fragoso, S. Grinstein, E. Sciutto, 2006, A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine, *Vaccine*, 1073- 1080.
- Segura- Velázquez R., Gladis Fragoso, Edda Sciutto, Adelaida Sarukhan, 2009, Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite- Derived Peptide GK-1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine, *Clin. and Vaccine Immunol.*, 1338-1343.
- Segura- Velázquez R., J. Cervantes, E. Acosta, I. Sánchez- Betacourt, N. Villalobos, L.F. Rodarte, M. Restelli, G. Fragoso, E. Sciutto, 2013, Influenza vaccine: Development of a novel intranasal and subcutaneous recombinant adjuvant, *Vaccine*, 4009- 4016.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D., 2011, Evaluation of immune response top artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs, *Vet. Parasitol.*, 181:239-247.
- Smith W.D., Pettit D., Smith S.K., Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus conturtus* and *Teladorsagia circumcincta*, *Parasitol, Immunol.*, 23, 2001.
- Smith, W.D. (1999). Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants, *Int. J. Parasitol.* 29, 17-24.
- Soulsby, E.J.L. 1976. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7° ed. Interamericana México
- Soulsby, E.J.L., 1987, *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*, 7° 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, 871-876.
- Terefe, G., Jacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dummas, E., Bergeaud, J.P., Dorchjies, Ph., Hoste, H., Jacquet, P., 2005, *Haemonchus contortus* eg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* Vol. 271-283.
- Torres-Acosta, J.F.J., Dzul- Canche, U., Aguilar- Caballero, A.J., Rodríguez- Vivas, R.I., 2003, Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México, *Vet. Parasitol.* , 114, 33-42.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., *Helminología veterinaria, Parasitología Veterinaria, Acribia, Zaragoza, España, 2001, 3-155.*
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Bath, G.F., 1997, Rampant anthelmintic resistance in sheep African –what are the options? In: Van Wyk, J.A., Van Schalkwyk, P.C. (Eds), *Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites. Workshop held at the 16th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Sun City, South Africa, August, 1997.*
- Vázquez, H.M., González, G.R., Torres, H.G., Mendoza, G.P., Ruiz, R.M., 2006, Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo, *Vet. Méx.* 37, 15-27.
- Wallace, D.S., Bairden, K., Duncan, J.L., Eckersall, P.D., Fishwick, G., Gill, M., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Murray, M., Parkins, J.J., Stear, M.J. 1998. The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 116, 67-72.
- 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.*, 70:365-369.
- 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, *Vet. Res.*, 3: 509-529.

- 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. *Vet. Parasitol.*, 137: 184-181.
- Yacob, H.T., Dorchies, Ph., Jaquiet, 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*. *Vet. Parasitol.*, 121. 297-306.
- Yazwinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Morgan, G.W., Linnerud, A.C. 1980. *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. *J. Anim. Sci.* 51, 279-284.