



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN SOBRE LA CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN DE LARVAS INFECTANTES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* EN EXPLANTES ABOMASALES DE OVINOS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

P R E S E N T A :

VÍCTOR HUGO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

TUTOR:

JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ (FES CUAUTITLÁN-UNAM)



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por darme la oportunidad de vivir y de haberme regalado una familia tan maravillosa, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr terminar mi carrera.

A mi madre †: Por ti estudié esta maestría y estoy aquí terminando lo que algún día comencé ahora que no estás; te entrego el último pendiente que tenía contigo, no sabes cuánto te extraño. Ahora miro el cielo y siento la tranquilidad de que alguien me cuida, **TE AMO Y SIEMPRE TE AMARÉ.**

A mi padre Margarito: Por t  cario, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida.

A mi abuelo Tomás: Porque simplemente gracias a usted abuelo yo me decidí a estudiar esta carrera, por todas sus enseñanzas en el campo, porque paso de ser mi abuelo a mi gran amigo y a cada momento de mi vida me ha aconsejado y alentado para seguir adelante.

A mis hermanos "Tuzita" y "Pocho": Aunque s  que nunca he sido verdaderamente un hermano mayor que los aconseje y los ayude a superar obstáculos, aunque s  que nunca se los demuestro o se los expreso, saben ustedes dos han sido los mejores hermanos del mundo que dios me pudo dar, se que ustedes dos siempre me han apoyado y aunque no han respetado algunas de mis decisiones siempre han estado ahí a un lado mío, el concluir este trabajo es en gran medida gracias a ustedes. LOS AMO!!!!

A la Universidad Nacional Autónoma de México, alguna vez alguien me dijo que cuando logras comprender y amar a esta Universidad nunca la dejas, es cierto... "Por mi raza hablar  el espíritu"...

A mi comité tutor: Por el tiempo, la confianza y dedicación que me dieron para que lograra terminar este trabajo.

Al Dr. Alfredo Cuéllar: Por todas sus enseñanzas como profesor, por aceptarme como tutor, por apoyarme y darme la confianza de pertenecer a su equipo de trabajo.

A mis sinodales: Que se tomaron la molestia de leer y corregir mi trabajo para poder mejorarlo.

A todos y cada uno de los profesores con los que tome clases: Gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

A todos y cada uno de mis amigos pasados y presentes.

Y finalmente a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de este trabajo, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Victor Hugo

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.	2
Morfología de <i>Haemonchus contortus</i>	3
Ciclo biológico.....	3
Epizootiología.	5
Patogenia.....	8
Signos clínicos.....	10
Diagnóstico.....	11
Control y prevención de la hemoncosis ovina.....	12
Resistencia y resiliencia a la hemoncosis.....	13
Resistencia genética a la hemoncosis.....	14
Blackbelly.....	15
Cultivos celulares como base de los explantes abomasales.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	17

HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares.	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Localización.....	20
Animales.....	20
Cepa de <i>Haemonchus contortus</i>	21
Diseño experimental.....	22
Obtención posmortem de tejido abomasal.....	23
Técnica de explantes abomasales.....	24
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1 Efecto del nivel de nutrición sobre la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly..... 27

Cuadro 2 Distribución anatómica de la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly que recibieron el 100% de sus requerimientos nutricionales..... 28

Cuadro 3 Distribución anatómica de la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly que recibieron el 50% de sus requerimientos nutricionales..... 28

RESUMEN

La desnutrición en ovinos Blackbelly produce disminución de su resistencia a *Haemonchus contortus* y se desconoce si está relacionado con una mayor capacidad de las larvas para penetrar la mucosa abomasal. El objetivo fue evaluar el efecto de la desnutrición sobre la capacidad de asociación al tejido abomasal de larvas infectantes de *H. contortus* en corderos Blackbelly mediante una técnica *in vitro* de explantes. Ocho corderos Blackbelly libres de nematodos gastrointestinales, se distribuyeron en dos grupos, seis semanas recibieron 50% o 100% respectivamente de sus requerimientos nutricionales; posteriormente se sacrificaron para la obtención de los abomasos y se realizaron explantes de mucosa abomasal expuestos a larvas de *H. contortus*. Se calculó el porcentaje de larvas asociadas al tejido abomasal. Los datos se procesaron por ANOVA para conocer las diferencias entre los grupos. El porcentaje de larvas de *H. contortus* que se asociaron al tejido abomasal fue mayor ($p > 0.05$) en los animales que recibieron el 50% de sus requerimientos en relación a los que accedieron a la totalidad de los nutrientes (72.3% vs. 58.5%) respectivamente. El porcentaje de larvas de *H. contortus* que penetraron a los explantes de las regiones anatómicas del abomaso fueron similares ($p > 0.05$), oscilando entre el 70 a 75% para los desnutridos y del 58 al 60% para los bien nutridos. Se concluye que el estatus nutricional afectó ligeramente la asociación de las larvas de *H. contortus* al tejido abomasal, sin que pueda aún aclararse si este es un mecanismo relacionado con la resistencia al parásito.

Proyecto apoyado por PAPIIT: IN222814-2: *El uso de explantes abomasaes en el estudio de la infección y actividad antihelmíntica contra Haemonchus contortus en ovinos.*

INTRODUCCIÓN.

La nematodiasis o verminosis gastroentérica en los pequeños rumiantes, continúa representando la causa más importante de disminución en la productividad en todo el mundo (Fox, 1997). El mayor impacto se observa en los sistemas de producción en pastoreo especialmente en los países tropicales de climas cálido-húmedos, en los que existen abundantes lluvias durante el verano (George y col., 1993; Radostits y col., 2002). Además, ocasiona elevadas pérdidas económicas relevantes en todo el mundo (Fox, 1997; Chandrawathani y col., 1999; Velázquez, 2000). Esta enfermedad, es producida por nematodos gastroentéricos (NGE) de varios géneros localizados en el tracto gastrointestinal de los rumiantes y traen como consecuencia importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Debido a su distribución e impacto en la salud y producción ovina, *Haemonchus contortus* es considerado a nivel mundial como el NGE más importante en esta especie (Kooyman y col., 2000; Vervelde y col., 2001).

En México se han descrito prácticamente todos los géneros de NGE que afectan el abomaso, intestino delgado, ciego y colon de los rumiantes. No obstante, el género más frecuente y abundante en casi todos los ecosistemas del país es *H. contortus* (Cuéllar, 2003). Este parásito está ampliamente distribuido en México y se presenta todo el año en las pasturas (Liébano y col., 1992). Es más frecuente durante la época de lluvias, ya que es cuando se dan las condiciones más adecuadas para la maduración de larvas infectantes, además que hay mayor cantidad de forraje contaminado que consumirán los borregos (Cuellar, 1986). Las pérdidas más importantes se producen en los corderos, especialmente en aquellos recién destetados (Radostits y col., 2002).

Morfología de *Haemonchus contortus*.

Los adultos de *H. contortus* parasitan la mucosa del abomaso, los machos miden de 10 a 20 mm son de color rojo, las hembras miden de 18 a 30 mm y adoptan forma de espirales rojas y blancas (Soulsby, 1988). Por eso se ha sugerido el nombre de gusano “en poste de barbería” (Lapage 1981; Quiroz, 2003). Otra sinonimia de *H. contortus* es gran gusano del estómago de los rumiantes (Soulsby, 1988).

En la parte anterior tiene una pequeña cavidad bucal con una lanceta y sobre su superficie del cuerpo hay un par de papilas cervicales. Los machos terminan en bolsa copulatriz bien desarrollada, poseen dos espículas iguales que sobresalen del cuerpo. Las hembras terminan en punta roma, con la vulva localizada al finalizar el segundo tercio del cuerpo y está cubierta por una prolongación de la cutícula llamada labio vulvar (Soulsby, 1988; Alba, 2007).

Los huevos son ovales e incoloros, miden de 70 a 85 μm de largo por 41 a 48 μm de ancho y están blastomerados. Los huevos de este parásito son muy parecidos a los de otros nematodos por lo que los huevos de *H. contortus* se reportan como huevos de NGE, siendo necesario realizar un cultivo larvario para precisar el género (Soulsby, 1988; Alba, 2007).

Ciclo biológico.

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo, el ciclo completo tiene una duración de 28 a 35 días dependiendo de la zona y el clima (Quiroz, 2003). Los huevos son eliminados en la materia fecal contaminando los pastizales, en los cuales se desarrollan tres etapas larvarias no parásitas (Lapage, 1981; Quiroz, 2003; Bowman y col. 2004).

Se requieren condiciones adecuadas de humedad, temperatura y oxígeno para el desarrollo de la larva de primer estadio (L_1) dentro del huevo (Quiroz, 2003). Las L_1 eclosionan uno o dos días después de que fueron eliminados los huevos y se alimentan de bacterias, hongos y materia orgánica de sus alrededores, después de algunos días, mudan su epidermis (primera ecdisis) y se transforman en larva dos (L_2) que también se alimentan de bacterias y materia orgánica, siguen creciendo hasta que maduran y forma una nueva epidermis y se transforman en larvas de tercer estadio (L_3) que son las infectantes (Lapage, 1981; Soulsby, 1998; Meana y Rojo, 1999).

En la segunda ecdisis, la epidermis se conserva temporalmente como una envoltura o una vaina protectora suelta alrededor de la L_3 y no se desprende de ella hasta que encuentra al hospedador adecuado (Bowman y col., 2004), por lo tanto no se puede alimentar y se mantiene de los gránulos de material alimenticio que se almacenaron dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1981). Esta envoltura protege a la larva L_3 de la desecación y otros factores ambientales a los cuales se encuentra expuesta fuera del hospedador y puede resistir condiciones desfavorables sobre los pastos, en esto difieren de las L_1 y de las L_2 además de que estas últimas no pueden infectar a un nuevo hospedero y si son ingeridas por algún animal son digeridas (Lapage, 1981). En condiciones adecuadas el desarrollo de la L_3 se alcanza de 4 a 7 días después de haber sido eliminados los huevos (Lapage, 1981). La L_3 es muy activa y es capaz de desplazarse verticalmente sobre superficies húmedas de los vegetales. 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, 1988).

Las ovejas se infectan al ingerir larvas 3 junto con el pasto (Bowman y col., 2004). Tras la ingestión, aproximadamente a los 30 minutos, las L_3 pierden su vaina en el rumen (Lapage, 1981; Meana y Rojo, 1999). Pasan hacia el abomaso y

penetran las criptas glandulares gástricas, *H. contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Meana y Rojo, 1999), una vez ahí la L₃ comienza a alimentarse de sangre y muda a larva cuatro (L₄) en el interior de las glándulas gástricas, causando daños tisulares diversos durante todo este proceso (Soulsby, 1988; Simpson y Lawton, 1997; Gómez y col., 1999; Velázquez, 2000), posteriormente sale de la mucosa a la luz abomasal y muda a larva cinco (L₅) o preadulto (Norman, 1978; Meana y Rojo, 1999). Esta quinta larva se desarrolla directamente, sin ecdisis hasta transformarse en el gusano adulto, macho o hembra (Lapage, 1981).

Los adultos se localizan en abomaso y las hembras producen de 5,000 a 10,000 huevos al día (Lapage, 1981; Meana y Rojo, 1999). Las fases adultas copulan y la hembra comienza a producir huevos en aproximadamente 18 días, según las condiciones de la estación del año. La producción de huevos aumenta hasta alcanzar una descarga máxima de los mismos en un periodo de 25 a 30 días (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

Epizootiología.

La epidemiología de la hemoncosis es diferente dependiendo de la región, ya sea en áreas tropicales, subtropicales o en zonas templadas (Urguhart y col., 2001). Los factores predisponentes de la enfermedad son la sobrecarga del pastoreo, pastos succulentos, climas húmedos y cálidos. Además existen otros factores propios del hospedador, entre los que se encuentran: la raza, estado nutricional y el estado fisiológico (Cuéllar, 1992; Miller y col., 1998; Bowman y col., 2004).

La hemoncosis está condicionada principalmente a la elevada fecundidad de las hembras y por la velocidad a la que las larvas infectantes pueden desarrollarse (Cuéllar, 1986; Soulsby, 1988).

El rango de temperatura ideal para su desarrollo es de 15 a 27° C. La humedad relativa para que las larvas se desarrollen oscila del 70 al 100%, de lo contrario mueren (Meana y Rojo, 1999), 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 infestación se encuentran limitadas por la susceptibilidad de las larvas a la deshidratación y al frío (Radostits y col., 2002). Los hábitos alimenticios de los ovinos favorecen la infección, estos son altamente selectivos, consumen forraje fresco, tierno, que contiene mucha humedad, por lo tanto pueden contener un gran número de larvas infectantes que desencadenan cuadros clínicos de la enfermedad, este puede ser uno de los motivos por los que los ovinos son la especie en que más frecuentemente se encuentran cuadros clínicos por *H. contortus* (Cuéllar, 1992).

Las larvas poseen varios tropismos: hidrotropismo positivo, fototropismo a la luz tenue positivo, un termotropismo positivo y un geotropismo negativo. La combinación de estos tropismos provoca una migración vertical en los pastos hacia su extremo libre cuando hay rocío. Esta situación favorece la infección de los rumiantes (Cuéllar, 1986; Soulsby, 1988).

La presencia de *H. contortus* ocurre tanto en animales jóvenes como en adultos, sin embargo, la presentación clínica de la enfermedad es más común en corderos de seis a ocho meses de edad (Cuéllar, 1992).

El factor racial es uno de los que determina la severidad de la hemoncosis. Es una opinión generalizada el hecho de 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 que ha ocurrido en los animales nativos, dando lugar a una progenie con las mismas características, es decir, resistente a este nematodo (Cuéllar, 1992; Coop y Sykes, 2002).

El estado nutricional del animal juega un papel muy importante en la susceptibilidad a la hemoncosis. Los animales subnutridos por lo regular presentan cargas parasitarias mayores en relación a aquellos que mantienen condiciones nutricionales óptimas (Cuéllar, 1992).

El estado fisiológico, puede influir en la mayor población de nematodos adultos en abomaso. Particularmente el *alza posparto* o *alza lactacional*, hay un aumento en la eliminación de huevos de NGE en las ovejas que están cerca del parto o lactando (Soulsby, 1988).

Otro fenómeno relacionado con la epidemiología es la *hipobiosis*, en el cual las larvas detienen su desarrollo en la fase de L₄ durante 4 ó 5 meses esto ocurre en la pared abomasal después de la infección (Meana y Rojo, 1999). Este fenómeno posiblemente a una combinación de factores genéticos del parásito, inmunológicos en el hospedador y ambientales (Gotongi y col., 1998; Quiroz, 2003).

La expulsión de parásitos adultos ocurre por la respuesta inmune del hospedador o por el envejecimiento de los gusanos. En caso de *H. contortus* se ha observado que animales con 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).

Patogenia.

La actividad hematófaga de *H. contortus* en la mucosa del abomaso provoca abomasitis catarral (Lapage, 1988; Cuéllar, 1986) pérdida continúa de sangre que, si el hospedador no es capaz de remplazar con suficiente rapidez, se presenta anemia e hipoproteinemia. También hay edema en diferentes partes del cuerpo, producto de la baja concentración de proteínas en la sangre (Radostits y col., 2002).

La patogenia está relacionada con la actividad expoliatriz hematófaga de las L₄ así como la de los adultos (Dunn, 1983; Quiroz, 2003; Blood y col., 1986; Soulsby, 1987; Martín y Aitken, 2000; Radostits y col, 2002). 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 (Blood y col., 1986; Martín y Aitken, 2000; Radostits y col., 2002). La pérdida diaria es de alrededor de 0.05 ml de sangre completa por verme (Quiroz, 2003; Soulsby, 1987; Radostits y col., 2002).

Las larvas ejercen acción mecánica y traumática cuando penetran a las cavidades de 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 y col, 1986; Cuéllar, 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 su dilatación y una marcada protusión sobre la superficie de la mucosa. Las células de las glándulas parasitadas son reemplazadas por células indiferenciadas (Meana y Rojo, 1999). Las larvas en desarrollo alojadas en las glándulas gástricas producen una distensión local, histolisis y pérdida de células parietales (Martín y Aitken, 2000). Durante este periodo las larvas ejercen también una acción antigénica, debida a la muda, al líquido de muda y a secreciones y excreciones, que en algunos casos

necrosan el tejido circunvecino y otros provocan una respuesta inmune local y humoral (Quiroz, 2003).

Una vez que las primeras larvas salen, después de 17 a 21 días de la infección, se aprecian alteraciones en las glándulas circundantes a las parasitadas. La salida de las larvas produce lisis de las células epiteliales del borde superior de las glándulas, estimulando la rápida división celular y originando una hiperplasia con engrosamiento de la mucosa, edema submucoso y aumento de las células plasmáticas. Los espacios intercelulares epiteliales se encuentran dilatados y los complejos de unión entre las células desaparecen (Meana y Rojo, 1999).

Macroscópicamente, la lesión que se produce es un nódulo circular abultado, si la larva ya ha salido, es de dos a tres milímetros de diámetro, con un orificio central. Una vez que las larvas salen de las glándulas se producen los daños más graves debido a la hematofagia ya que provocan pequeñas úlceras con hemorragias capilares (Meana y Rojo, 1999).

Los adultos generan también una acción tóxica por medio de sustancias anticoagulantes que infiltran en los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasiona 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, este incremento en el pH repercute negativamente en la digestión proteica ya que el pepsinógeno no se convierte en pepsina y por tal motivo el proceso digestivo se altera y se pierde el efecto bacteriostático del pH bajo, lo que trae como consecuencia una proliferación bacteriana y un cuadro de diarrea (Meana y Rojo, 1999). Esto es contrario a lo que describen Martín y Aitken (2000) quienes dicen que por lo general no se observa

diarrea en la hemoncosis. Por su parte, Dunn (1983) afirma que nunca se observa diarrea en las infecciones de campo ni en las experimentales.

También aumenta la síntesis de gastrina, que va aunado a un aumento de la contractilidad del abomaso y del peristaltismo intestinal (Meana y Rojo, 1999).

A la necropsia puede observarse líquido en la cavidad abdominal (ascitis), en pericardio (hidropericardio) y en la cavidad torácica (Soulsby, 1988; Le Jambre, 1995). El hígado muestra degeneración grasa y, por esta razón, aparece de color claro o amarillo y friable (Jubb y Kennedy, 1985).

Los corderos presentan signos mayores de la hemoncosis. Entre los animales de más edad, los peores efectos se observan en individuos que, por alguna razón están débiles o presentan estrés. Así las hembras durante la gestación o lactancia manifiestan intensamente la enfermedad, al igual que los individuos que padecen otras enfermedades, disminuyen su resistencia a la hemoncosis (Quiroz, 2003).

Signos clínicos.

La hemoncosis se puede presentar de tres formas: hiperaguda, aguda y crónica. La hemoncosis hiperaguda o sobreaguda se presenta muy rara vez, se debe a la ingestión de grandes cantidades de larvas infectantes que atacan simultáneamente al animal, que al perder tanta sangre puede morir en forma repentina y no se observan signos preliminares. En otros, sólo se aprecian mucosas pálidas y las heces son de color casi negro (Dunn, 1983).

La hemoncosis aguda se observa en animales de todas las edades, presentan anemia a las dos semanas posinfección y se caracteriza por la presencia de edema

submandibular, facial y ascitis, pérdida de lana y heces oscuras, los corderos jóvenes muestran debilidad y entran en estado de letargo. Se produce hipoproteinemia, hipoalbuminemia y la morbilidad es elevada (Dunn, 1983; Martin y Aitken, 2000; Urguhart y col., 2001).

En la hemoncosis crónica no aparecen los signos clínicos clásicos de la enfermedad, las ovejas se aprecian muy delgadas, aparentando una situación de malnutrición, con pérdida progresiva de peso y caída de la lana en los animales adultos y falta de crecimiento en los corderos. En casos intensos hay letargo, debilidad y anorexia (Dunn, 1983, Martin y Aitken, 2000).

Diagnóstico.

En las formas aguda y sobreaguda donde hay signos manifiestos y el diagnóstico se facilita. Se debe sospechar de hemoncosis en los rebaños que pastorean (Cuéllar, 1986; Meana y Rojo, 1999; Quiroz 2003). El diagnóstico clínico de la forma crónica de la hemoncosis es difícil pues los signos son poco manifiestos e inespecíficos, sin embargo, esta presentación es muy importante porque influye negativamente en la ganancia de peso lo cual muchas veces no es percibido (Mendoza, 2000).

Aunque algunos signos son muy sugestivos, se deben enviar al laboratorio muestras de materia fecal colectadas directamente del recto de los animales, para detectar la presencia de huevos de los parásitos. Lo anterior debe hacerse en forma cuantitativa por medio de la técnica de Mc Master y cualitativa por medio de cultivos larvarios (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003; Alba, 2007).

Control y prevención de la hemoncosis ovina.

La medida de control más utilizada para la hemoncosis consiste en la desparasitación estratégica (Campos y Herrera, 1992; Fox, 1997; Figueroa y col., 2000; Quiroz, 2003). Se deben contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de la infección. Estas medidas deben ser diseñadas para cada zona de acuerdo con los sistemas de producción y las condiciones climáticas (Meana y Rojo, 1999). La rotación de potreros puede utilizarse en el control de nematodos (Cuéllar, 1986). La separación por edades permite utilizar los potreros con mayor carga de larvas por kilogramo de pasto para los animales adultos debido al 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).

Una buena nutrición aumenta la resistencia de los ovinos contra la infección por *H. contortus*. La suplementación alimenticia con proteína estimula la capacidad de algunas razas más susceptibles a resistir los efectos patógenos de la infección (Datta y col., 1999; Torres y Aguilar, 2000). El suplemento de minerales como el cobalto y el molibdeno en las dietas, ha demostrado aminorar los efectos de la hemoncosis (Suttle y col., 1992).

Recientemente se están utilizando partículas de óxido de cobre para reducir la infección por *H. contortus* en corderos administrando 2.5 ó 5 g de éstas (Bang y col., 1990; Knox, 2002). Las partículas de óxido de cobre pasan del rumen al abomaso, donde se mantiene durante al menos 32 días, aumentan las concentraciones de cobre en el líquido abomasal y, posteriormente, pasa a ser reserva en el hígado (Bang y col, 1990; Burke y col., 2004). Esta concentración de cobre soluble crea un entorno que de alguna manera afecta a los gusanos

disminuyendo su capacidad de establecimiento en el abomaso para su expulsión (Knox, 2002; Burke y col., 2004).

Otra alternativa es el uso del sistema FAMACHA. Su nombre proviene de las siglas de su primer ideólogo Francois (FAffa) MAIan CHArt. Es un sistema que tiene como objetivo identificar clínicamente el desarrollo de la anemia de los animales parasitados con *H. contortus*. Este se basa en la coloración de la conjuntiva y es representado en una escala numérica (1 al 5) donde índices 1 y 2, son animales con infecciones bajas, mientras que animales clasificados con los números 3, 4 y 5 son animales que presentan infecciones severas (Van Wyk, 2002; Kaplan y col., 2004).

Resistencia y resiliencia a la hemoncosis.

El término resistencia 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 (Albers y Gray, 1987).

Los animales resistentes no son completamente refractarios a la enfermedad, sólo albergan menos parásitos que los animales susceptibles y por tanto eliminan menos huevos en las heces (Hooda y col., 1999). Esta variabilidad tiene su base en la capacidad inmunológica de cada individuo a la parasitosis (Pernthaner y col., 1995).

El término resiliencia ha sido utilizado para definir la capacidad que tiene un animal de compensar los efectos negativos del parasitismo, lo cual se refleja en el mantenimiento de sus parámetros productivos a pesar de tener una carga parasitaria relativamente alta (Coop y Kyriazakis, 1999; Paolini y col., 2005).

Resistencia genética a la hemoncosis.

Se han reportado variaciones importantes en la resistencia a NGE entre diferentes razas ovinas; razas de pelo como la Red Massai (Preston y Allonby, 1979), Blackbelly (Yaswinski y col., 1980; Muñoz-Guzmán y col., 2006), son más resistentes a nematodos que las razas de lana.

Los diversos mecanismos de la resistencia a la infección por *H. contortus* no son totalmente conocidos. Varios autores han sugerido que estos pueden tener una base inmunológica (Gómez-Muñoz y col., 1999). Para valorar el grado de resistencia, se ha adoptado el conteo de huevos por gramo de heces como una medida indirecta (Bisset y col., 1996). La forma más confiable, para evaluar la resistencia genética, es conocer la cantidad de parásitos (larvas y adultos) presentes en el tracto gastrointestinal de los animales evaluados (Gray, 1992; Hooda, 1999).

La resistencia a fase adulta de *H. contortus* se puede manifestar de tres formas: La primera es la eliminación de la población de gusanos adultos, la segunda son cambios en su morfología y la tercera es una disminución en la fecundidad de las hembras del parásito (Balic y col., 2000).

La variación genética de la resistencia a *H. contortus* entre y dentro de razas para seleccionar ovinos resistentes, se está utilizando en programas de mejoramiento genético principalmente en Australia y Nueva Zelanda (Gray, 1997; Hooda y col., 1999). La identificación de razas ovinas más resistentes a los parásitos puede contribuir al aumento de la producción, con lo cual se podría recomendar a los productores incluir hembras de estas razas como reproductoras en sus rebaños (Bueno y col., 2002).

Blackbelly.

El Blackbelly, Barbados o Panza Negra es un ovino de pelo originario de las islas de Barbados. En la actualidad se encuentra diseminado por todo el Caribe y por el norte, centro y sur de América. En México se ha difundido en todos los climas, desde el trópico hasta las áreas templadas (AMCO, 2000).

Fueron comerciantes holandeses los que introdujeron a Barbados borregos de lana, mismos que cruzaron con ovinos africanos traídos a la isla al igual que los esclavos. El resultado de esta combinación fue el cordero hoy conocido como Barbados, Panza Negra o Blackbelly, que ha sido seleccionado por más de 300 años buscando prolificidad, ganancia de peso y carne magra, así como por su resistencia a parásitos y enfermedades (AMCO, 2000).

Este ovino se caracteriza por ser un animal muy rústico, no estacional, con excelente habilidad materna y abundante producción de leche. Si cuentan con una adecuada alimentación, estas cualidades permiten a las hembras criar dos o tres corderos con facilidad (AMCO, 2000).

Cultivos celulares como base de los explantes abomasales.

El cultivo de tejidos se desarrolló como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. RG Harrison, un zoólogo americano, es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, iniciando su ensayos en 1907 (Pelayo y col., 2009).

Harrison empleó las técnicas *in vitro* para el explicar los fenómenos que ocurren *in vivo*, realizó cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. La

primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows en 1910 empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel (Pelayo y col., 2009).

Puede ser cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, entre otros), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etcétera), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos (Pelayo y col., 2009).

Los primeros trabajos realizados en tejidos de mamíferos fueron evaluando la implantación de *Helicobacter pylori*, utilizaron explantes de estómago de cerdo, los cuales sólo permanecieron viables por 72 horas (Rosberg y col., 1991).

Estudios efectuados en corderos y cabritos desafiados inmunológicamente utilizando explantes abomasales, se ha demostrado una reducción significativa ($p < 0.05$) en el número de larvas de *Teladorsagia circumcincta* asociadas al tejido abomasal. El método también se ha utilizado para demostrar la influencia de la nutrición proteica sobre el establecimiento de las larvas de *T. circumcincta* en los tejidos del abomaso (Jackson y col., 2004).

En 2008 Brunet y colaboradores, realizaron otro estudio *in vitro* con una planta rica en taninos *Onobrychis viciifolia* (esparceta), de la que se agregó su extracto a los explantes de abomaso realizados, observaron que hay una disminución en la asociación al tejido de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* y *H. contortus*.

JUSTIFICACIÓN.

Por su elevada prevalencia en México y el mundo *H. contortus*, representa uno de los principales problemas sanitarios y económicos en los rebaños ovinos (Cuéllar, 2003), esto aunado al aumento de cepas de este nematodo resistentes a los fármacos antihelmínticos, han llevado a la búsqueda de nuevas estrategias para el control de esta enfermedad. Dentro de estas, se encuentra la introducción de razas resistentes o resilientes a la hemoncosis (Miller y col., 1998; Burk y Miller 2004; Muñoz-Guzmán y col., 2006).

Las características productivas y de resistencia genética a la verminosis gastroentérica que posee la raza ovina Blackbelly podrían ayudarnos a entender los mecanismos fisiológicos que conllevan a dicha resistencia y que difieren de los animales de otras razas susceptibles.

Estudiar en dos grupos de corderos Bb con diferente estatus nutricional (50 ó 100% de sus requerimientos nutricionales) puede ayudar a entender si este es un que factor fisiológico que modifica la permisibilidad de la mucosa abomasal a las L₃ de *H. contortus* y por lo tanto influir en la expresión genética de su resistencia.

HIPÓTESIS.

Si la desnutrición favorece el relajamiento de la resistencia a *Haemonchus contortus* en corderos de la raza Blackbelly, entonces habrá una mayor asociación de las L₃ a explantes de tejido abomasal, de corderos Bb con nutrición diferente.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la desnutrición en corderos de la raza Blackbelly sobre la capacidad de asociación al tejido abomasal de larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus* mediante una técnica *in vitro* de explantes abomasales.

Objetivos particulares.

1. Desarrollar explantes abomasales a partir de la ya establecida por Jackson y col. (2004) utilizando 2,500 L₃ de *H. contortus*.
2. Determinar y comparar el grado de asociación al tejido abomasal de larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* en corderos de la raza Blackbelly subnutridos y bien nutridos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Localización.

El trabajo se efectuó en el Módulo de Ovinos de la Unidad de Posgrado así como en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, de la FES Cuautitlán de la UNAM (carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5 en Cuautitlán Izcalli, Estado de México).

Animales.

Se emplearon ocho ovinos machos de la raza Blackbelly libres de parásitos. Fueron adquiridos en una unidad de producción de pie de cría en estabulación y se mantuvieron en corrales con piso de cemento y carentes de humedad, recibieron alimento comercial seco (15% de proteína cruda) y agua *ad libitum*. Se identificaron individualmente por medio de un arete de plástico.

El registro del peso corporal se realizó en forma individual con un dinamómetro (capacidad máxima de 150 kg, con un nivel de precisión mínimo de un kg). El peso promedio corporal de los corderos fue de 33 kg para el grupo que recibiría el 100% de sus requerimientos nutricionales y de 33.5 para el grupo que recibiría el 50 %. La condición corporal promedio de los animales fue de 3 en una escala del 1-5.

La evaluación parasitaria se realizó tomando muestras de heces directamente del recto de los animales con una bolsa de plástico en forma individual, se identificaron y se mantuvieron en refrigeración (por un periodo no mayor a las 48 horas) hasta su procesamiento para verificar si contaban con alguna carga parasitaria a su llegada, posteriormente se realizó el conteo de huevos por

gramo de heces por medio de la técnica coproparasitológica de Mc Master (Alba, 2007).

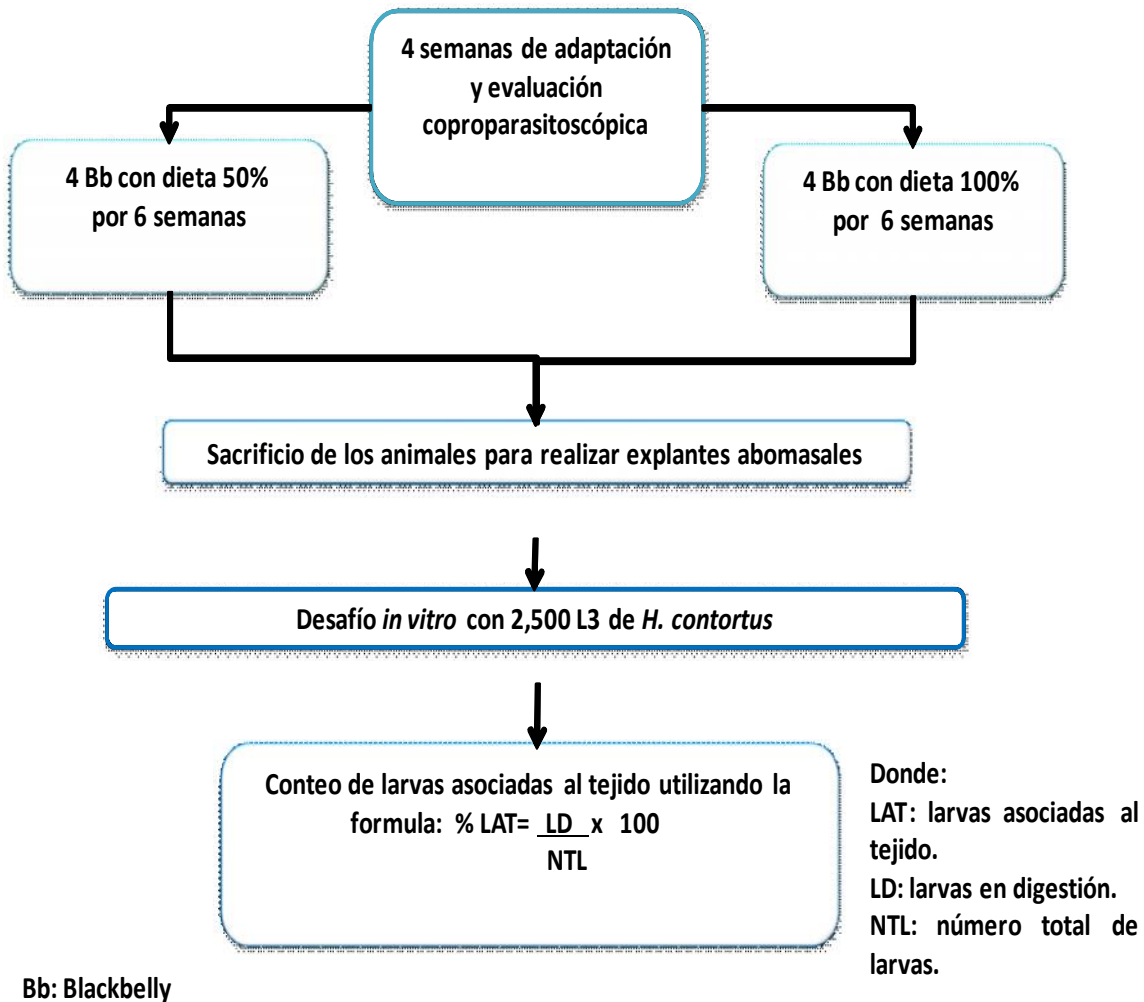
Cepa de *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica, 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 criados bajo condiciones de estabulación total y con alimentación basada en forraje henificado y alimento balanceado comercial (Ramírez y col., 2006).

Para la obtención del inóculo se utilizó un ovino libre de nematodos gastrointestinales el cual fue inculado mediante sondeo con 3,000 L₃.

Una vez que el animal eliminó cantidades elevadas de huevos (4,000 hgh) se le colocó una bolsa o calzón colector para recuperar la mayor cantidad de heces posible con la que se realizaron cultivos larvarios para obtener las L₃ de *H. contortus* del inóculo. Se elaboraron inóculos individuales de 2,500 L₃ cada uno.

Diseño experimental.



A su llegada los ocho corderos se mantuvieron durante cuatro semanas en un periodo de recuperación y de adaptación. Después se formaron dos grupos distribuidos aleatoriamente, de cuatro animales cada uno. A partir de la quinta semana un grupo fue alimentado con una dieta similar a la que tendrían en un sistema de producción extensivo, es decir aproximadamente al 50% de sus necesidades nutricionales (dieta restringida) según el *National Research Council* (NRC) y el otro grupo se alimentó con una dieta al 100% de las necesidades nutricionales (dieta no restringida) según las recomendaciones del NRC.

La alimentación consistió en proporcionar una mezcla de 90% de un alimento comercial (15% de proteína cruda) y 10% de forraje molido (avena achicalada).

La estimación de la condición corporal de cada uno de los animales se efectuó a partir del día siete posterior a la primera inoculación con *H. contortus*. Se hizo por tacto directo en las vertebrae sacras (apófisis transversa y apófisis espinosa), así como en el área muscular del ojo del lomo basado en una escala que va de 0 a 5 dependiendo la cantidad de grasa y músculo que contengan las estructuras mencionadas.

Después de seis semanas, los animales de ambos grupos se sacrificaron para obtener los abomasos de los cuales se obtuvieron explantes de mucosa abomasal.

Obtención posmortem de tejido abomasal.

Los animales se sacrificaron atendiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995: sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, la cual señala que se debe insensibilizar al animal utilizando una pistola de perno cautivo y desangrados a través de las arterias carótidas y las venas yugulares. El abdomen se abrió a lo largo de la línea media para permitir la remoción del tracto digestivo. Posteriormente se ligo el abomaso de los animales para impedir la salida del contenido abomasal y fue trasladado inmediatamente al laboratorio en hielera con botellas de solución salina fisiológica a una temperatura de 38° C.

Técnica de explantes abomasales.

Los explantes abomasales se efectuaron de acuerdo a la técnica descrita por Jackson y col. (2004):

1. Sacrificio de los animales y remoción inmediata del abomaso.
2. Apertura y colección del contenido abomasal.
3. Lavados con SSF (solución salina fisiológica, 0.85% de NaCl) tibia (37° C)
4. Se tomaron tres muestras de las diferentes regiones del abomaso de aproximadamente 2 x 2 cm.
5. Cada muestra abomasal se colocó en placas de seis pozos y se le administraron 2 ml de medio de cultivo (medio de Hanks con 20 mmol^{-L} de solución Hepes, 2 ml de rojo de fenol y todo esto aforado para 1 L de agua destilada con pH de 7.6 con NaOH).
6. Con jeringas de 5 ml se hacen cilindros de aislamiento en el centro del tejido para contener a las larvas.
7. Cada explante se expuso a un inóculo con una dosis de 2,500 L₃ infectantes de *H. contortus*. Dichas larvas pasaron previamente por un proceso de desnudamiento con hipoclorito de sodio (5% por 10 minutos).
8. Las placas se colocaron en una estufa de CO₂ a 38° C.
9. Los explantes se incubaron expuestos a las larvas por tres horas en oscuridad.
10. Después de la incubación los tejidos se lavaron con SSF en tubos de 50 ml.
11. Después las muestras se enjuagaron vigorosamente por inmersión 30 veces en 25 ml de SSF.
12. Posteriormente, los tejidos se pusieron a digestión con solución 50 ml de pepsina al 1% y HCl al 1% a 38° C por 12 horas.
13. El contenido de cada tubo se igualó a 50 ml y se le agregaron 2 ml de iodo helmintológico.

14. Finalmente se realizó el conteo de larvas en un microscopio estereoscópico (100 x), tomando de cada una de las alícuotas el 2% de cada muestra procesada y utilizando rejillas de 55 mm.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El porcentaje de la población de larvas asociadas con la mucosa se calculó utilizando la fórmula estándar:

$$\% \text{ LAT} = \frac{\text{LD}}{\text{NTL}} \times 100$$

Donde:

LAT= Porcentaje de larvas asociadas al tejido abomasal.

LD= Cantidad de larvas en tejido abomasal digerido.

NTL= Población total de larvas, es decir, (la cantidad de larvas en enjuague + cantidad de larvas en el lavado + cantidad de larvas en el digerido).

Las diferencias estadísticas entre ambos grupos se obtuvieron mediante la prueba de Tukey por medio del programa estadístico Excel. Además se utilizó el programa Systat 13® para realizar un ANOVA factorial en todos los casos se tomó un nivel de significancia de 95%.

RESULTADOS.

El porcentaje de larvas de *Haemonchus contortus* que penetraron a los explantes de tejido abomasal de ovinos de la raza Blackbelly fue 13.8 puntos porcentuales mayor en los animales que recibieron el 50% de sus requerimientos nutricionales en relación a los que se alimentaron con la totalidad de los nutrientes (72.3 vs. 58.5%) (cuadro 1), no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$), sin embargo, la cantidad de larvas de *H. contortus* en los procesos de obtención fue diferente, siendo mayor en el paso de lavado/enjuague en las muestras de los explantes de animales bien nutridos y durante la digestión en los que tuvieron una restricción nutricional del 50% ($p < 0.05$).

Cuadro 1. Efecto del nivel de nutrición sobre la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly (promedio \pm DS).

Larvas de <i>H. contortus</i>	Requerimientos nutricionales	
	100%	50%
Lavado/enjuague	1,099.6 \pm 232.8 ^a	676.80 \pm 41.7b
Digestión	1,412.4 \pm 78.1b	1,762.6 \pm 46.5a
Asociación al tejido (%)	58.5 ^a	72.3 ^a

Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

El porcentaje de larvas de *H. contortus* que penetraron a los explantes de las diferentes regiones anatómicas del tejido abomasal de ovinos Blackbelly que recibieron el 100% de sus requerimientos nutricionales, se expone en el cuadro 2; las cifras para las tres regiones fueron similares ($p > 0.05$), oscilando entre el 58 y 60% de asociación al tejido abomasal. De forma similar, las proporciones de larvas

fueron semejantes para las tres regiones abomasales en los explantes de ovinos con subnutrición (70 a 75%) (cuadro 3).

Cuadro 2. Distribución anatómica de la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly que recibieron el 100% de sus requerimientos nutricionales (promedio \pm DS).

Larvas de <i>H. contortus</i>	Región del abomaso		
	Cardiaca	Pilórica	Fúndica
Lavado/enjuague	1,003.3 \pm 47.5a	1,333.3 \pm 584.8b	962.1 \pm 66.0a
Digestión	1,410 \pm 82.5a	1,378.75 \pm 82.4a	1,488.3 \pm 69.3a
Asociación al tejido (%)	58.4	56.9	60.1

Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Distribución anatómica de la asociación de larvas de *Haemonchus contortus* al tejido abomasal de ovinos Blackbelly que recibieron el 50% de sus requerimientos nutricionales (promedio \pm DS).

Larvas de <i>H. contortus</i>	Región del abomaso		
	Cardiaca	Pilórica	Fúndica
Lavado/enjuague	693.8 \pm 44.2a	719.6 \pm 27.8a	617.1 \pm 53b
Digestión	1,729.6 \pm 55.6b	1,725 \pm 28.6b	1,833.3 \pm 55.3a
Asociación al tejido (%)	71.4	70.6	74.8

Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN.

La raza ovina Blackbelly es considerada como resistente a *Haemonchus contortus* (Yazwinski y col., 1980), en evaluaciones previas en México, se ha demostrado esa característica en infecciones experimentales (Cuenca y Cuenca, 2005). Los factores que en los ovinos inducen resistencia a los nematodos gastroentéricos no son de todo conocidos, se ha propuesto que son mecanismos inmunológicos (Meana y Rojo, 1999) o la expresión de algunos genes de resistencia (Inham y col., 2008).

Se desconoce si la resistencia que expresan algunas razas ovinas a los parásitos es continua y permanente, o si, puede ser que se modificada por un estatus de nutrición que normalmente ocurre en el clima tropical mexicano, donde las praderas apenas alcanzan niveles del 7% de proteína cruda y 1.7 Mcal de energía metabolizable (Améndola y col., 2005), es decir aproximadamente el 50% de los requerimientos nutricionales para ovinos en crecimiento de acuerdo a las recomendaciones del *National Research Council* (NRC) (NRC, 2001). Un antecedente al respecto lo proporcionaron Alcántara y col. (2011) quienes indujeron desnutrición a ovinos Blackbelly y encontraron una ligera disminución de la resistencia a *H. contortus* que se manifestó por el incremento en la proporción de fases adultas implantadas, siendo de 3.3% en los corderos que se alimentaron con el 50% de sus requerimientos y de 0.7% en los que recibieron el 100%.

El presente trabajo se diseño para conocer si la desnutrición inducida a ovinos resistentes a *H. contortus* (raza Blackbelly) afecta la penetración o asociación de las larvas del nematodo a la mucosa abomasal, empleando la técnica *in vitro* de explantes abomasaes que ha demostrado su utilidad (Jackson y col., 2004). Se encontró que el porcentaje de larvas del nematodo que se asociaron al tejido abomasal fue ligeramente mayor en los animales que recibieron el 50% de sus

requerimientos nutricionales en relación a los que se alimentaron con la totalidad de los nutrientes (72.3 vs. 58.5%), siendo estadísticamente similares. Fueron más abundantes las larvas cuantificadas en los procesos de lavado/enjuague en las muestras de los explantes de animales bien nutridos y durante la digestión en los que tuvieron restricción nutricional, en esta última etapa se conoce la cantidad de larvas que efectivamente penetraron al tejido abomasal en los explantes (Brunet y col., 2008).

El número de larvas de *H. contortus* que se asociaron al tejido abomasal fue similar ($p \geq 0.05$) en las tres regiones anatómicas evaluadas (cárdica, pilórica y fúndica) en los animales restringidos y bien nutridos. Lo anterior no coincide con los reportes referentes al sitio donde penetran las larvas de *H. contortus* a la mucosa abomasal, los cuales coinciden que esto ocurre mayormente en la región fúndica (Dash, 1985; Meana y Rojo, 1999); las larvas de *Teladorsagia circumcincta* se asocian más en la región pilórica (Jackson y col., 2004). En contraste, se ha comprobado que la respuesta inmunológica local (eosinófilos tisulares, células plasmáticas y subpoblaciones de linfocitos) no es homogénea en toda la mucosa abomasal y es dependiente de la región anatómica (fúndica o pilórica) que se esté evaluando (Muñoz-Guzmán y col., 2012).

En las razas resistentes existen mecanismos innatos e inmunes que pueden afectar el desarrollo de los nematodos gastroentéricos, desde las larvas de tercer estadio y los adultos. En cuanto a los mecanismos inmunes, se ha detectado una relación entre la resistencia genética a *H. contortus* y el número de células productoras de anticuerpos (IgA e IgG1) presentes en la mucosa del abomaso (Gill y col., 1994). A nivel sistémico, se sabe que la inoculación de larvas de *H. contortus* induce un aumento de linfocitos en sangre, hipersensibilidad retardada hacia antígenos del parásito, proliferación de linfocitos T obtenidos de nódulos linfáticos de abomaso (Jacobs y col., 1995) y el aumento de algunas subpoblaciones de

linfocitos de sangre periférica (Bouix y col., 1998). Por otro lado, se ha encontrado un mayor nivel de IgG sérica específica contra L₃ de *H. contortus* en ovinos Blackbelly (resistentes) en comparación a los de raza Columbia (susceptibles) (Muñoz y col., 2006). En otros casos los datos a este respecto son contradictorios, por ejemplo, no se ha encontrado una relación entre los niveles de IgG, IgM e IgA séricas con el estado de resistencia de los ovinos raza Castellana infectados con *H. contortus* (Gómez-Muñoz y col., 1999).

Un factor innato asociado a la resistencia es el aumento de los eosinófilos sanguíneos y abomasales (Douch y Morum, 1993; Pernthaner y col., 1995). Se ha reportado una diferencia entre la eliminación de huevos, porcentaje de hematocrito y eosinofilia en ovejas Red Maasai en comparación a la raza Dorper tras la infección artificial con *H. contortus* (Wanyangu y col., 1997).

En México se ha demostrado que los ovinos de la raza Blackbelly, resistentes a la infección por *H. contortus*, tienen mayores niveles de eosinófilos que los animales de raza Columbia, susceptibles a la infección (Cuéllar y col., 2005). Adicionalmente, la inducción de eosinofilia en tejido abomasal y sistémica por la inoculación de un concentrado vesicular de la larva de *Taenia hydatigena* se traduce en un menor establecimiento de fases adultas de *H. contortus*, sin embargo, se demostró que existen otros mecanismos celulares (linfocitos T) que participan en el menor conteo de parásitos (Cuenca y col., 2011). No debe descartarse la respuesta inflamatoria en la mucosa como otro mecanismo innato contra los nematodos gastroentéricos (Meana y Rojo, 1999).

En resumen, se conocen algunos de los mecanismos inmunes y no inmunes asociados a la resistencia a parásitos, sin embargo, aun es desconocido el mecanismo exacto relacionado con que la resistencia.

Los resultados de este estudio arrojan datos interesantes sobre la eficacia de la técnica de explantes abomasales, además de manifestar su potencial para mostrar la primera fase en el establecimiento de las larvas en el tejido, hace suponer que existen mecanismos que afectan el establecimiento de las larvas y que al ser demostrado en este mecanismo *in vitro*, pudiera decirse que el efecto es lo más parecido a lo que sucede en el animal vivo.

Se pudo demostrar que la aplicación de la técnica de explantes abomasales, de acuerdo a la metodología desarrollada por Jackson y col. (2004) fue un modelo eficaz para demostrar *in vitro* algún aspecto relacionado con la penetración de las larvas de nematodos gastroentéricos en los pequeños rumiantes, se ha utilizado para la evaluación de toxinas, por ejemplo, lo realizado por Brunet y col. (2008) quienes estudiaron el efecto de los taninos condensados de vegetales sobre la asociación de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* y *H. contortus* a explantes abomasales.

Una ventaja adicional que ofrece el uso de explantes, es realizar experimentaciones con los tejidos de un sólo animal, en contraste a los ensayos *in vivo* donde se utilizan varios animales. De un abomaso se pueden obtener varios explantes, sin embargo, no debe olvidarse que siempre se puede encontrar variación entre animales (Brunet y col., 2008). De igual forma, se ha demostrado que el tiempo en que ocurre la implantación de las larvas es más reducido en comparación a la inoculación *in vivo* mediante cánula (Jackson y col., 2004).

Una limitante de la técnica de explantes es que sólo puede ser evaluada para las fases larvarias que penetran a la mucosa abomasal, sin embargo, por su escaso tiempo de viabilidad, resulta inviable para las fases evolutivas subsecuentes. En ese sentido, Rosberg y col. (1991), quienes trabajaron con explantes de estómago de cerdo, demostraron que los explantes cuentan con una

viabilidad de tan sólo 72 horas, tiempo insuficiente, de acuerdo al ciclo biológico de *H. contortus*, para lograr el desarrollo de larva L₃ infectante a adulto dura unos 20 días (Meana y Rojo, 1999).

CONCLUSIONES.

El estatus nutricional de corderos Blackbelly resistentes a *Haemonchus contortus*, afectó ligeramente la asociación de las larvas del nematodo en explantes de tejido abomasal, sin que pueda aún aclararse si este es un mecanismo relacionado con la resistencia al parásito.

El mayor porcentaje de asociación al tejido ocurrió en la región fúndica, seguida de la cardíaca y la pilórica.

La técnica de explantes abomasaes mostró ser eficaz para evaluar *in vitro* la asociación de larvas L₃ infectantes de *H. contortus* sobre el tejido abomasal de ovinos Blackbelly. Puede ser replicada en el laboratorio con buenos resultados y tiene un gran potencial para investigaciones posteriores que expliquen o modifiquen el grado de implantación de las larvas de *H. contortus* en la mucosa abomasal.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alba-Hurtado F. Parasitología veterinaria 2007. Manual de laboratorio. UNAM.
- Albers GAA, Gray GD. Breeding for worm resistance: a perspective. Int. J. Parasitol. 17: 559-566. 1987.
- Alcántara NJ, Ayanegui AA, De la Cruz CHA, Cuéllar OJA, Cuenca VC, García CT, García LE, Silva MR, Valdivia AG. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de resistencia a *Haemonchus contortus* en ovinos Blackbelly. Mem. VII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Huancavelica, Perú. 2011.
- AMCO. 2000. Rústico y prolífico, el Blackbelly. La Revista del Borrego. 5. Editorial Eklipse.
- Améndola MR, Castillo RE, Martínez PA Country pasture forage resource profiles in Mexico. FAO. 2005.
- Bang KS, Familton AS, Sykes AR. Effect of copper wire particle treatment on establishment of major gastrointestinal nematodes in lambs. Res. Vet. Sci. 49: 132-137. 1990.
- Bisset SA, Morris CA. Feasibility and implications of breeding of sheep for increased natural resistance to infection with nematode parasites N.Z.J. Zoology 1996; 18: 85 -86.
- Blood, D.C., Radostits, O.M., Henderson, J.A., Arundel, J.H., Gay, C.C. 1986. Medicina veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. 7ª Edición. México.

- Bowman DD, Lynn CR, Eberhard LM, Georgi RJ. Parasitología para Veterinarios 8ª edic. España. Saunders Elsevier. 2004.
- Bouix J, Krupinski J, Rzepecki R, Nowosad B. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *Int J Parasitol* 1998; 28 (11): 1797-1804.
- Brunet S, Jackson F, Hoste H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology* 2008; 38: 783-790.
- Burke JM, Miller JE, Olcott DD, Olcott BM, Terrill TH. Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs, *Vet. Parasitol.* 123: 235-243. 2004.
- Campos RR, Herrera RD. Diagnóstico in vitro de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet. Méx.* 23(1): 51-56. 1992.
- Coop RL, Sykes AR. Interactions between gastrointestinal parasites and nutrients. Capítulo 14 En: *Sheep Nutrition*. Edit. Freer M, Dove H. CAB International. 2002.
- Chandrawathani P, Adnan M, Waller PJ. Antihelminthic resistance in sheep and goat farms on peninsular Malaysia; *Vet. Parasitol.* 82: 305-310. 1999.
- 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 OJA, Muñoz GMA, Valdivia AG, Buendía JJA, Alba HF. Blood eosinophil numbers and their relationship with resistance to sheep haemonchosis. In: Proceedings of the Novel Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock, 2005. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México. 2005.

Cuenca VC, Buendía JJA, Valdivia AG, Cuéllar OJA, Muñoz GMA, Alba HF. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. Vet Parasitol 2011; 117 (3-4): 332-338.

Datta FU, Nolan JV, Rowe JB, Grey GD. Long-term or 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(3): 479-488. 1999.

Douch PGC, Morum PE. The effect of age on the response of Romney sheep to gastrointestinal nematodes during grazing. Int J Parasitol 1993; 23: 651-655.

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

Fox MT. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. Vet. Parasitol. 72: 285-294. 1997.

George S, Quiroz RH. Frecuencia de parásitos intestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos de la Magdalena Soltepec, Tlaxcala México. Vet. Méx. 24: 195-198. 1993.

Gill HS, Husband AJ, Watson DL, Gray GD. Antibody-containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci 1994; 56: 41-47.

Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Gómez ILA, Méndez S, Fernández PFJ, de la Fuente C, Alunda JM. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. Vet Parasitol 1999; 81 (4): 281-293.

González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa MGJ, Cuéllar-Ordaz JA, Zermeño- García ME. Detection of anthelmintic efficiency in nematodes of hair sheep using the fecal egg reduction test. Liv Res for Rural Develop 2003; 15: 12.

Gotongi PM, Prichard RK, Ranjan S, Gathuma JM, Munyua WK, Cherviyot H, Scott ME. Hipobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infection of sheep and goats in a semi arid area of Kenya. Vet. Parasitol. 77: 49- 61. 1998.

Hooda V, Yadav CL, Chaudhri, SS, Rajpurohit, BS. Variation in resistance to Haemonchosis: Selection of female sheep resistance to *Haemonchus contortus*. J. Helminthol. 73 (2): 137-142. 1999.

Inham A., Reverter A., Windon R., Hunt P., Menzies M. Gastrointestinal nematodes challenge induced some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 431-442.

Jackson F, Greer A.W, Huntley J, McAnulty R.W, Bartley D.J, Stanley A, Stenhouse L, Stankiewicz M. and Sykes A.R. Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an in

vitro direct challenge method using abomasal tissue explant, *Vet. Parasitol.* 2004; 124: 73–89.

Jacobs HJ, Ashman K, Meeusen E. Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 48: 323-332.

Jubb KVF, Kennedy PC. Patología de los animales domésticos. Tomo 11. 3ª edic. Uruguay. Agropecuaria Hemisferio Sur. 1985.

Kaplan RM, Burke JM, Terrill TH, Miller JE, Getz WR, Mobini S, Valencia E, Williams M, Williamson LH, Larsen M, Vatta AF. Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia on sheep and goat farms in the southern United States, *Vet. Parasitol.* 123: 105–120. 2004.

Knox MR. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust. Vet. J.* 80: 224–227. 2002.

Kooyman FNJ, Shalling HDFH, Van Leeuwen MAW, Mackellar , Huntley JF, Cornelissen AWCA, Ververde L. Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is related, and correlates with IgE rather than IgG antibody. *Parasite Immunol.* 22: 13-20. 2000.

Lapage G, Gibson TE, Beeslely WN. Parasitología veterinaria. México. D.F. Continental. 1981.

Liébano HE., Vázquez PV, Cid RA. Determinación de larvas infestantes de nemátodos gastroentericos en pasto durante dos periodos del año en un clima tropical húmedo Aw; *Téc Pec Méx* 1992; 30: (1) 31-36.

Martin WB, Aitken ID. Enfermedades de la oveja. España. Acribia. 191-200. 2000.

Meana MA, Rojo VFA. Tricostrogilosis y otras nematodiasis. En: Parasitología veterinaria. Edit. por Cordero, C.M. y Rojo, V.F.A. México. Mc Graw-Hill Interamericana. 1999.

Morteo-Gómez R, González GR, Torres HG., Nuncio OG, Becerril PC., Gallegos SJ, Aranda IE. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. Agrobiencia Vol 38 No 4 Julio-Agosto 2004.

Muñoz-Guzmán MA., Cuellar-Ordaz JA, Valdivia-Anda AG, Buendía-Jiménez A, Alba Hurtado F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. Can.J Anim Sci 2006; 86: 363-371.

Muñoz GMA, Cuenca VC, Valdivia AG, Cuéllar OJA, Alba HF. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2012; 185 (2-4) 175-180.

National Research Council. The nutrient requirements in sheep. 7th edition. National Academic Press. Washington, DC. 2001.

Paolini V, De la Fargo F, Prevot F, Dorchies P. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 127: 227-283. 2005.

Pernthaner A, Stankiewicz M, Bisset SA, Jonas WE, Cabaj W, Pulford HD. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility

to gastrointestinal nematodes: lymphocyte bastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. *Int J Parasitol* 1995; 25 (4): 523-529.

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

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Vol II. 9ª ed. Mc Graw Hill Interamericana. 2002.

Ramírez L, Hernández F, Silva R, Valdivia G, Cuéllar A. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino en México. *Memorias del XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 2006* septiembre 6-8; Santiago, Chile. Colegio Médico Veterinario de Chile y Asociación de Facultades y Escuelas de Medicina Veterinaria de Chile, 2006.

Rosberg K, Hubinette R, Nygard G, Berglindh T and Rolfsen W. Studies of *Helicobacter pylori* in a gastric-mucosa in vitro animal-model, *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 43-48.

Simpson H, Lawton OE. Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* in abomasal secretion. In *J. Parasitol.* 27(7): 825- 831. 1997.

Soulsby E JL. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª edic. México. Interamericana. 1988.

Suttle NF, Knox KW, Aungus K, Jackson F, Coop RL. Effects of dietary molybdenum on nematode and hoost during *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Res. Vet. Sc.* 52: 230-235. 1992.

- Torres AJF, Aguilar CA. 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. 2000; 114-117.
- Urguhart OM, Armour JD, Durin AM, Jennings FW. Parasitología Veterinaria Zaragoza, España. Acriba. 2001.
- Van Wyk JA, Bath GF. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. Vet. Res. 33: 509-529. 2002.
- Vázquez PV, Rodríguez JMA, Méndez B, Escutia SI. Efectividad de cuatro antihelmínticos comerciales contra nemátodos gastroentéricos de ovinos Pelibuey. Téc Pec Méx 1984; 46: 25-29.
- Velázquez PVM. Agentes etiológicos y ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales. En 1er. Curso internacional "Nuevas perspectivas en el diagnóstico y control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes". Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yucatán. P. 1 -5. 2000.
- Vervelde L, Kooyman FNJ, Van Leeuwen MAW, Schalling HDFH, Mackellar A, Huntley JF, Cornelissen AWCA. Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. Parasite Immunol. 23: 419-426. 2001.
- Wanyangu SW, Mugambi JM, Bain RK, Duncan JL, Murray M, Stear MJ. Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in red Maasai and Dorper ewes. Vet Parasitol 1997; 69 (3-4): 275-282.

Yazwinski TA, Goode L, Moncol DJ, Morgan GW, Linnerud AC. *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. J Anim Sci 1980; 51: 279-284.