



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL.

“Efecto de la administración oral de partículas de óxido de cobre en ovinos sobre el establecimiento de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* y posibles alteraciones en la mucosa abomasal”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Oscar Bautista Cerón

TUTOR

M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz (UNAM-FESC)

COMITÉ TUTORAL

Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez (UNAM-FESC)
Dr. Pedro Mendoza de Gives (CENIID-PAVET-INIFAP)



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.



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 la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme el uso de sus instalaciones y realizar mis estudios de posgrado.

Al programa de Maestría en Ciencias de la Salud y la Producción Animal por la formación académica recibida.

Al M. en C. César Cuenca Verde, por todas las aportaciones intelectuales, intervenciones técnicas asesoría y apoyo otorgado durante el proceso experimental de este trabajo.

A la M. en C. Sandra Lizeth Iturbe Requena por su destacada intervención durante el proceso de experimentación que integró este trabajo.

Al proyecto PAPIIT 222814 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz por haber dirigido este proyecto de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Jorge Luis Tortora Pérez, por ser parte del comité tutorial que dirigió este trabajo y por su intervención durante la realización del proyecto.

Al Dr. Pedro Mendoza de Gives, por ser parte del comité tutorial que dirigió este trabajo y por su valiosa intervención intelectual en la integración del proyecto.

A la doctora Alma Virginia Lara Sagahón por su asesoría para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos en este trabajo

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones a este escrito.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por su valiosa intervención y aportaciones intelectuales otorgadas a este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por su valiosa intervención y aportaciones otorgadas a este trabajo.

A la M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño por la asesoría y apoyo recibidos durante el procesamiento de las muestras para la determinación de las concentraciones de cobre.

Agradecimientos.

Al M. en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez por su asesoría y apoyo recibidos durante el procesamiento e interpretación de resultados de las muestras de histología.

Al Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado para la asistencia a congreso

Al PAEP por los recursos otorgados para la asistencia al Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias y por el apoyo para la impresión de este documento.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	3
PANORAMA GENERAL DE LA OVINOCULTURA	3
PRINCIPALES PROBLEMAS QUE ENFRENTA LA PRODUCCIÓN OVINA NACIONAL	3
IMPORTANCIA DE LAS PARASITOSIS CAUSADAS POR NEMATODOS GASTROENTÉRICOS EN LOS REBAÑOS OVINOS EN MÉXICO	4
CARACTERÍSTICAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	5
CICLO DE VIDA DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	5
PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD	7
MORFOLOGÍA Y FUNCIONAMIENTO DEL ABOMASO	8
PRINCIPALES ALTERACIONES OCASIONADAS DENTRO DEL ABOMASO POR LA INFECCIÓN POR <i>H. CONTORTUS</i>	11
MÉTODOS DE CONTROL DE LAS NEMATODIASIS GASTROINTESTINALES DE OVINO	12
COBRE	14
IMPORTANCIA DEL COBRE	14
DISTRIBUCIÓN	14
FUNCIONES DEL COBRE	15
METABOLISMO Y ABSORCIÓN	16
SIGNOS CLÍNICOS DE LA DEFICIENCIA DE COBRE	18
INTOXICACIÓN POR COBRE	19
PREVENCIÓN CONTROL DE LA DEFICIENCIA DE COBRE EN RUMIANTES	20
UTILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE COMO MECANISMO DE CONTROL DE LAS PARASITOSIS ABOMASALES OCASIONADAS POR <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	20
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
METODOLOGÍA	26
RESULTADOS	30
PORCENTAJE DE ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE L3 DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> SOBRE TEJIDO DE LA REGIÓN FÚNDICA Y PILÓRICA	31
CANTIDAD DE ADULTOS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> RECUPERADOS	30
CONCENTRACIONES DE COBRE EN TEJIDO HEPÁTICO, ABOMASAL (REGIÓN FÚNDICA Y PILÓRICA) Y CONTENIDO DE ABOMASO	34

CANTIDAD DE MASTOCITOS EN TEJIDO DE LA REGIÓN FÚNDICA Y PILÓRICA	39
CANTIDAD DE EOSINÓFILOS EN TEJIDO DE LA REGIÓN FÚNDICA Y PILÓRICA	41
CANTIDAD DE LEUCOCITOS GLOBULARES EN TEJIDO DE LA REGIÓN FÚNDICA Y PILÓRICA	44
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	47
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS.....	58
ANEXOS DE IMAGENES	73

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	6
Figura 2. Anatomía de la mucosa abomasal (estomacal)..	10
Figura 3. Empleo de partículas de óxido de cobre.....	22
Figura 4. Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de L3 de <i>H. contortus</i> sobre tejido de la región fúndica abomasal	32
Figura 5. Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de L3 de <i>H. contortus</i> sobre tejido abomasal de la región pilórica	33
Figura 6. Fases adultas de <i>H. contortus</i> recuperadas de abomaso.	30
Figura 7. Concentraciones de cobre en hígado	35
Figura 8. Concentraciones de cobre en tejido abomasal (región fúndica)	36
Figura 9. Concentraciones de cobre en tejido abomasal (región pilórica). ..	37
Figura 10. Concentraciones de cobre en contenido abomasal.....	38
Figura 11. Conteo de mastocitos en la región fúndica abomasal.....	39
Figura 12. Conteo de mastocitos en la región pilórica abomasal.....	40
Figura 13. Conteo de eosinófilos en la región fúndica abomasal.....	42
Figura 14. Conteo de eosinófilos en la región pilórica abomasal.....	43
Figura 15. Conteo de leucocitos globulares (fondo).....	45
Figura 16. Conteo de leucocitos globulares (pilóro).....	46

RESUMEN

Las partículas de óxido de cobre (PC) tienen efecto antihelmíntico sobre el nematodo hematófago *Haemonchus contortus* que generalmente afecta a los ovinos, sin embargo, la falta de conocimiento acerca de su mecanismo de acción ha limitado su uso. En este trabajo se estimó el efecto de la administración oral de partículas de óxido de cobre (PC) en ovinos sobre la infección por larvas y adultos de *H. contortus*. Además, se evaluó si la acción antihelmíntica de las PC tiene relación con alteraciones ocasionadas por su presencia sobre la mucosa abomasal en el número de células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares. Se formaron cinco grupos (n=45) de 9 ovinos F1 con distintos tratamientos: Testigo: sin tratamiento; PC: 2g de PC; L3: 10000 L3 de *H. contortus*; PC+L3: 2 g de PC y 10000 L3 72 horas del sacrificio y Hc+PC: 10000 L3 seis semanas antes del tratamiento con PC. Se sacrificó a tres animales de cada grupo a las 72 horas, dos y cuatro semanas postratamiento y el abomaso y el hígado se recuperaron para ensayos de establecimiento larvario *in vitro* sobre tejido abomasal y la cuantificación de cobre (Cu) en hígado, tejido y contenido abomasal. Una reducción en la cantidad de adultos de *H. contortus* ocurrió en los ovinos del grupo Hc+PC (p=0.01) sacrificados a las 72 horas (p=0.01) y un menor establecimiento de L3 de *H. contortus* en la región fúndica se observó a la cuarta semana en los ovinos de los grupos con tratamiento (PC: p=0.014; HcPC: p=0.013; L3: p=0.014; PC+L3: p=0.003). La mayor concentración de Cu se observó en contenido abomasal e hígado de los ovinos sacrificados a las 72 horas de los grupos PC y PC+L3 (p<0.00001; p=0.01), y tejido fúndico de ovinos del grupo Hc+PC (p=0.00001). La mayor cantidad de células en la mucosa del órgano se observó en los ovinos infectados con alguna fase del parásito. Los resultados obtenidos sugieren que la administración oral de PC reduce inmediatamente la cantidad de adultos de *H. contortus* en abomaso a diferencia del establecimiento larvario, donde el efecto es retardado y que el efecto antihelmíntico no es mediado por células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares ni totalmente por un efecto tóxico del cobre.

ABREVIATURAS

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

NGE: Nematodos Gastrointestinales.

L3: Larvas infectantes del tercer estadio de *Haemonchus contortus*.

HCl: Ácido clorhídrico.

EC: Células Enterocromafines.

ANP: Péptido Natriurético Atrial.

ECL: Células Semejantes a las Enterocromafines.

SMCP: Proteasa de los Mastocitos de los Ovinos.

FAMACHA: Faffa Malan Chart.

Cu: Cobre.

SOD: Superóxido Dismutasa.

CCO: Citocromo oxidasa C.

MTs: Metalotieninas.

A_{Cu}: Absorción de Cobre.

S²⁻: Sulfuro.

CuS: Sulfuro de Cobre.

CuSO₄: Sulfato de Cobre.

PC: Partículas de Óxido de Cobre.

ICP: Plasma de Acoplamiento Inductivo.

PC+L3: Partículas de Óxido de Cobre más y Larvas infectantes del tercer estadio de *Haemonchus contortus*.

Hc+PC: Ovinos con hemoncosis tratados con partículas de óxido de cobre.

LG: Leucocitos Globulares.

INTRODUCCIÓN

Panorama general de la ovinocultura

La ovinocultura tiene un papel importante en países en desarrollo y es reconocida como una actividad importante dentro del sector ganadero por el alto valor que representa al constituir un componente beneficioso para la economía del campesino de escasos recursos y por la gran demanda de sus productos (Cuellar y col., 2012). En 2010, la población de ovinos en el mundo excedió el billón de cabezas y se ubicó entre los últimos lugares con respecto a las demás especies productivas en cuanto a actividad pecuaria se refiere (FAO, 2013a; 2013b).

Sin embargo, la producción ovina en el mundo continúa elevándose. Pronósticos realizados por la FAO estiman que esta actividad aumentó un 1.2 % en el año 2013, llegando a 13.8 millones de toneladas de carne de ovino. Así mismo, se calcula que en este mismo año en el mundo se consumieron 13.733 millones de toneladas de carne de ovino y que el consumo *per capita* anual fue de 43.1 kilogramos (FAO 2013b).

En México, el censo ovino nacional de 2011 se ubicó en 8.1 millones según cifras reportadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y la producción para este mismo año, se estimó en 56,215 toneladas; mientras que datos del 2007 estiman que el consumo *per capita* fue de 800 g por habitante. Actualmente el abasto de ovinos, tanto en pie como en canal, es insuficiente, por lo cual se tiene que importar alrededor del 33% de países como Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y Chile para cubrir el total de la demanda nacional (Cuellar y col., 2012).

Principales problemas que enfrenta la producción ovina nacional

Existen diversos problemas que afectan a la ovinocultura nacional. Uno de ellos es que la mayor parte de los ovinos se encuentra en manos de campesinos sin tierra, que no piensan en su rebaño como alternativa para lograr un beneficio

económico más allá del simple ahorro, y lo ven como un patrimonio al cual recurrir sólo en situaciones económicas de emergencia. Este tipo de productores depende para la alimentación de sus animales de pastizales nativos, cuya calidad y cantidad varían enormemente durante todo el año, lo que provoca estados de subnutrición (Cuellar y col., 2012).

Dichos rebaños se encuentran constantemente afectados por problemas de índole infeccioso, por ejemplo, neumonías, infecciones por coliformes o asociadas a micobacterias, ectima contagioso, linfadenitis caseosa, pododermatitis, queratoconjuntivitis, enfermedades de índole reproductivo como epididimitis, brucelosis, mastitis y aquellas derivadas de factores asociados al mal manejo como la acidosis ruminal (Pijoan y Tortora, 1986). Por otro lado, existen enfermedades asociadas a ectoparásitos, como la pediculosis y padecimientos ocasionados por parásitos internos, entre los cuales está la verminosis gastroentérica (Taylor, 2012).

Importancia de las parasitosis causadas por nematodos gastroentéricos en los rebaños ovinos en México

Uno de los principales problemas sanitarios que enfrenta la producción ovina nacional es causada por los nematodos gastrointestinales (NGE) (Cuellar, 2007). La infección por NGE se presenta en los sistemas productivos donde se practica el pastoreo, llamados extensivos o semintensivos y es un problema sanitario frecuente en los sistemas con praderas irrigadas y en donde hay un clima tropical húmedo (Meana y Rojo, 1999).

Dentro de los principales géneros de nematodos que afectan a los rebaños ovinos en el país se encuentran: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, que se encuentran localizados en el abomaso, *Cooperia*, *Nematodirus* y *Bunostomum*, en intestino delgado y por último *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Chabertia* y *Skrjabinema* que afectan el intestino grueso de los ovinos. De la amplia gama de NGE que afectan a los ovinos sobresale *Haemonchus contortus*, que por sus hábitos hematófagos se convierte en uno de los que tiene mayor grado de patogenicidad (Urquart y col., 2001; Cuellar, 1986).

Características de H. contortus

Su distribución es mundial, pero con gran importancia en áreas tropicales y subtropicales. Los adultos son fácilmente identificables debido a su localización específica en el abomaso y su gran tamaño (con una longitud de hasta 30 mm). Poseen una cavidad bucal armada con una lanceta y en especímenes frescos, los ovarios blancos están enrollados en espiral alrededor del intestino repleto de sangre produciendo una apariencia de palo de barbería. Bajo el microscopio, el macho tiene un lóbulo dorsal asimétrico y espículas barbadas; la hembra tiene usualmente una solapa vulvar. En ambos sexos existen papilas cervicales (Urquhart y col., 1996; Bowman, 2004).

Ciclo de vida de H. contortus

El ciclo de vida de *H. contortus* (Figura 1) y en general de los NGE es directo y está dividido en una fase externa y otra interna (fase parasita). La fase externa ocurre en el pasto y corresponde al desarrollo en la materia fecal de los huevos producidos por las hembras del parásito que son expulsados en las heces. El primer estadio larvario eclosiona del huevo. Posteriormente la larva 1 se alimenta de bacterias y experimenta dos mudas para convertirse en larvas infectantes del tercer estadio (L3) (Soulsby, 1988; Levine, 1980). La infección del hospedero se produce por la ingestión de L3. Este proceso, aparentemente simple, tiene complicaciones en donde se combinan factores extrínsecos e intrínsecos. Entre los más relevantes se mencionan las especies y cantidad de tricostrongilidos presentes, inmunidad y resistencia natural del hospedero, condiciones de macro y microclima, tipo de suelo, naturaleza de la vegetación, carga animal y hospederos de otra especie que pastan en los mismos potreros (Quiroz, 2011).

Una vez dentro del animal las L3 penetran a los tejidos del abomaso e intestino, mudando a larva 4, para después transformarse en larva 5 o preadultos y consecuentemente originar adultos sexualmente maduros. Tras la cópula, las hembras comienzan a ovipositar, cerrándose así el ciclo; esto ocurre por lo menos a los 21 días después de ingeridas las L3 (Soulsby, 1988; Meana y Rojo, 1999;

Quiroz, 2011). Así, los animales parasitados que eliminan huevos en sus heces representan una fuente de infección, puesto que se calcula que una hembra de *Haemonchus contortus* pone entre 5,000 y 10,000 huevos por día.

La humedad ambiental es esencial para la supervivencia de las larvas y su desarrollo, por lo que la frecuencia y la gravedad de los brotes de la enfermedad están muy ligadas a las lluvias. En las áreas templadas, las larvas infectantes que se desarrollaron de los huevos expulsados en las heces de los animales infectados en la primavera son ingeridas por las ovejas y los corderos al inicio del verano. La mayoría de ellas detienen su desarrollo (hipobiosis) en el abomaso como L4 y es finalizado hasta la primavera siguiente (Taylor y col., 2007).

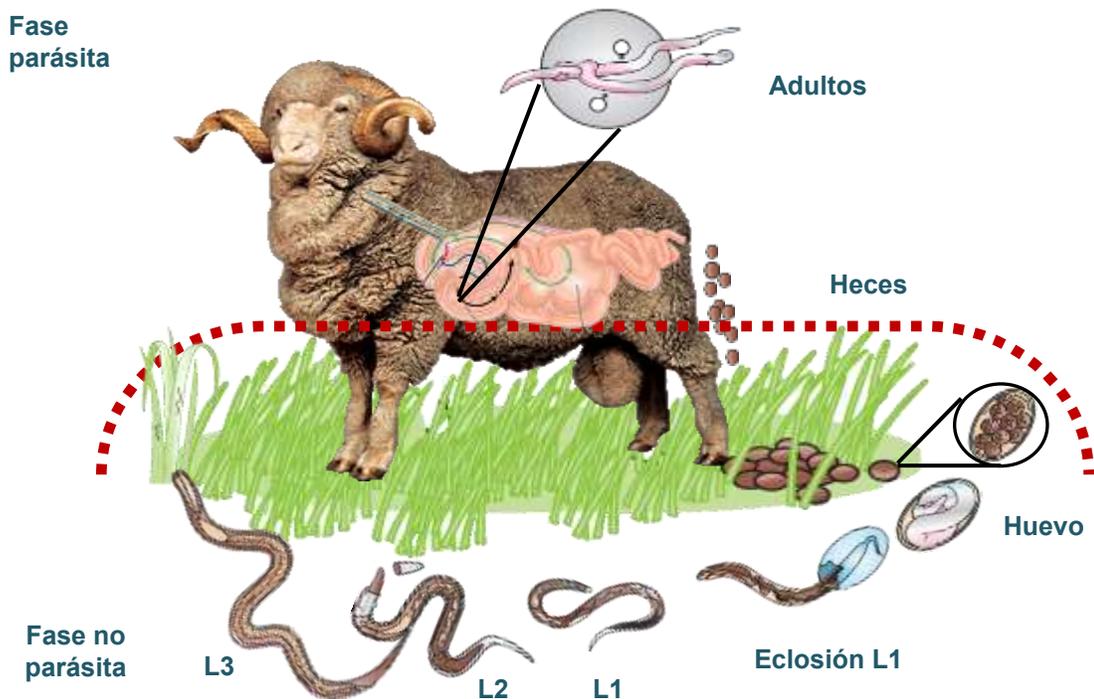


Figura 1. El ciclo de vida de *Haemonchus contortus* es directo, se divide en una fase no parásita desarrollada fuera del hospedador y otra fase parásita, desarrollada dentro del rumiante. Los huevos embrionados son eliminados en las heces. La larva uno se desarrolla y eclosiona en un día o dos y se alimenta de microorganismos presentes en las heces. Después muda a larva dos y también se alimenta de microorganismos. La segunda muda se inicia pero no se completa en el ambiente, por lo que la larva tres que es la fase infectante queda encerrada en la cutícula de la segunda larva hasta que es ingerida por un ovino. La vaina es eliminada en el rumen de los ovinos, posteriormente la larva de tercer estadio muda al cuarto estadio. Esta fase tarde o temprano muda a larva cinco y posteriormente a adulto o puede entrar en estadio de hipobiosis (Adaptado de Bowman, 2011).

Patogenia de la hemoncosis.

El principal daño causado por la hemoncosis consiste en la anemia causada por los hábitos hematófagos de los parásitos (Taylor y col., 2007). Aunado a esto, se agregan cambios hiperplásicos en el epitelio de la mucosa abomasal y un incremento en el pH abomasal (Dakkak y col., 1981; Nicholls y col., 1987, Simpson y col., 1997; Mc Kellar, 1993, Scott y col., 1999, Charleston, 1965, Hunter y McKenzie, 1982). Esta elevación del pH se ha asociado con una reducción en el número de células fúndicas que secretan ácido clorhídrico (HCl), ocasionadas por modificaciones en las glándulas gástricas relacionadas con la presencia de las fases larvarias y los adultos del parásito (Christie y col., 1975; 1978; Simpson y col., 1997; 2000). Las células que producen HCl y las que secretan pepsina son reemplazadas por células indiferenciadas y no funcionales. En consecuencia, la condición local llega a ser menos favorable para la producción de las principales enzimas gástricas (pepsina) resultando en alteraciones en la digestión de los ingredientes de la dieta, principalmente proteínas, comprometiendo severamente el estatus nutricional del hospedero (Hoste, 2006; Parkins y Holmes, 1989; Simpson, 2000).

Los signos clínicos de la hemoncosis aguda, que se producen durante el periodo de maduración de las larvas hipobióticas en las ovejas, suelen coincidir con los partos y conducen a un incremento en la excreción fecal de huevos. La historia clínica y los signos descritos muchas veces son suficientes para el diagnóstico de la presentación aguda, especialmente si se complementa con el recuento de huevos en las heces. En la necropsia se pueden llegar a encontrar entre 2,000 y 20,000 vermes en la mucosa del abomaso que causan numerosas y pequeñas lesiones hemorrágicas. El contenido del abomaso es de color pardo oscuro debido a la presencia de sangre digerida (Brunsdon, 1967; Taylor y col., 2007; Meana y Rojo, 1999).

Dependiendo de varios factores (número de parásitos, principales géneros involucrados, edad del hospedador o su estado nutricional), la presencia de vermes llevará a la enfermedad clínica. Con la mayoría de los géneros de NGE se

observa pérdida de apetito, diarrea y palidez de las mucosas. En algunos casos severos puede presentarse la mortalidad en ovinos y caprinos. Sin embargo, generalmente la presencia de nematodos está asociada a manifestaciones subclínicas que producen sus mayores efectos en la producción animal. Los daños económicos debidos a los vermes son por la disminución de la producción o retraso en el crecimiento (Coop y Kyriazakis, 1999; Parkins y Holmes, 1989). Además, es claro que estas infecciones parasitarias pueden afectar la calidad de la lana, carne o leche y también se producen efectos en la reproducción del hospedador (Hoste y Chartier, 1993).

Morfología y funcionamiento del abomaso

Puesto que la hemoncosis ocasiona diversas modificaciones en la morfología y el funcionamiento del abomaso a continuación se presenta una breve reseña de su estructura y funciones de sus componentes.

La descripción del estómago glandular aplica para el abomaso. Posee numerosas invaginaciones o poros, conocidos como criptas gástricas que están organizadas en una unidad constituida por la región apical, recubierta de células productoras de mucina superficiales que secretan un mucus espeso que protege el epitelio del estómago frente a las condiciones ácidas y de molturación presentes en la luz del órgano; un istmo (cuello) donde se localiza el área progenitora que da origen a todas las células epiteliales gástricas y la región glandular (base) localizada en la parte más baja de la unidad (Banks, 1993; Schubert y Peura, 2008; Thomas, 2009).

El abomaso está dividido en dos regiones glandulares equivalentes al fondo y píloro del estómago del monogástrico. La región cárdica esta confinada al área adyacente al orificio omaso-abomasal. El interior del abomaso tiene alrededor de 12 pliegues que se extienden sobre el fondo y el cuerpo pero están ausentes del píloro, donde se ubica una constricción que lo separa del duodeno. El área glandular del fondo (oxíntica o fúndica), cuyo sello distintivo son las células parietales u oxínticas, comprende 80% del órgano. Estas células secretan HCl que disminuye el pH del estómago a 1.5-3.5. Este pH tiene diversas funciones: 1) es

necesario para la función de la pepsina, 2) provee un ambiente hostil para las bacterias ingeridas con el alimento, 3) desnaturaliza las proteínas e inactiva enzimas en el alimento y 4) destruye paredes celulares, material vegetal y tejido conectivo. Distribuidas entre las células parietales se disponen las células mucosas del cuello, que secretan moco más diluido y menos viscoso que las células mucosas superficiales (Thomas, 2009).

Otro tipo celular presente entre las glándulas oxínticas, está constituido por las células zimogénicas (principales) que predominan en la base de la glándula y secretan pepsinógeno y leptina, esta última también se encuentra presente en las células parietales. La pepsina se produce en las células principales como proenzima inactiva (zimógeno) denominada pepsinógeno y se almacena en las células en forma de gránulos hasta el momento de su secreción a la luz de las glándulas gástricas. Después de su secreción, es expuesto al contenido ácido del estómago lo que determina la escisión de una pequeña porción de la molécula proteica que produce la activación de la enzima. Este patrón de activación es necesario, ya que las enzimas activas podrían digerir y destruir las células que las sintetizan (Thomas, 2009).

Al interior de la glándula fúndica existen células neuroendocrinas. Esta población está conformada por las células enterocromafines (EC) que contienen péptido natriurético atrial (ANP), serotonina y adrenomedulina; las células similares a las enterocromafines (ECL) secretoras de histamina; las células D productoras de somatostatina y amilina y las células Gr que contienen grelina y obestatina (Schubert y Peura, 2008).

El área de las glándulas pilóricas, donde está ubicada las células de gastrina o células G, comprende 20% del órgano. En el interior de la glándula, además se encuentran las células D que secretan somatostatina, la cual es liberada al fluido intersticial que baña a las células G e inhibe la liberación de gastrina. Al igual que las glándulas oxínticas, son capaces de secretar pepsinógeno. (Banks, 1993; Akers y Denbow, 2008; Schubert y Peura, 2008; Joseph y col., 2003, Thomas, 2009).

La distribución de las células que conforman ambos tipos glandulares se esquematiza en la figura 2.

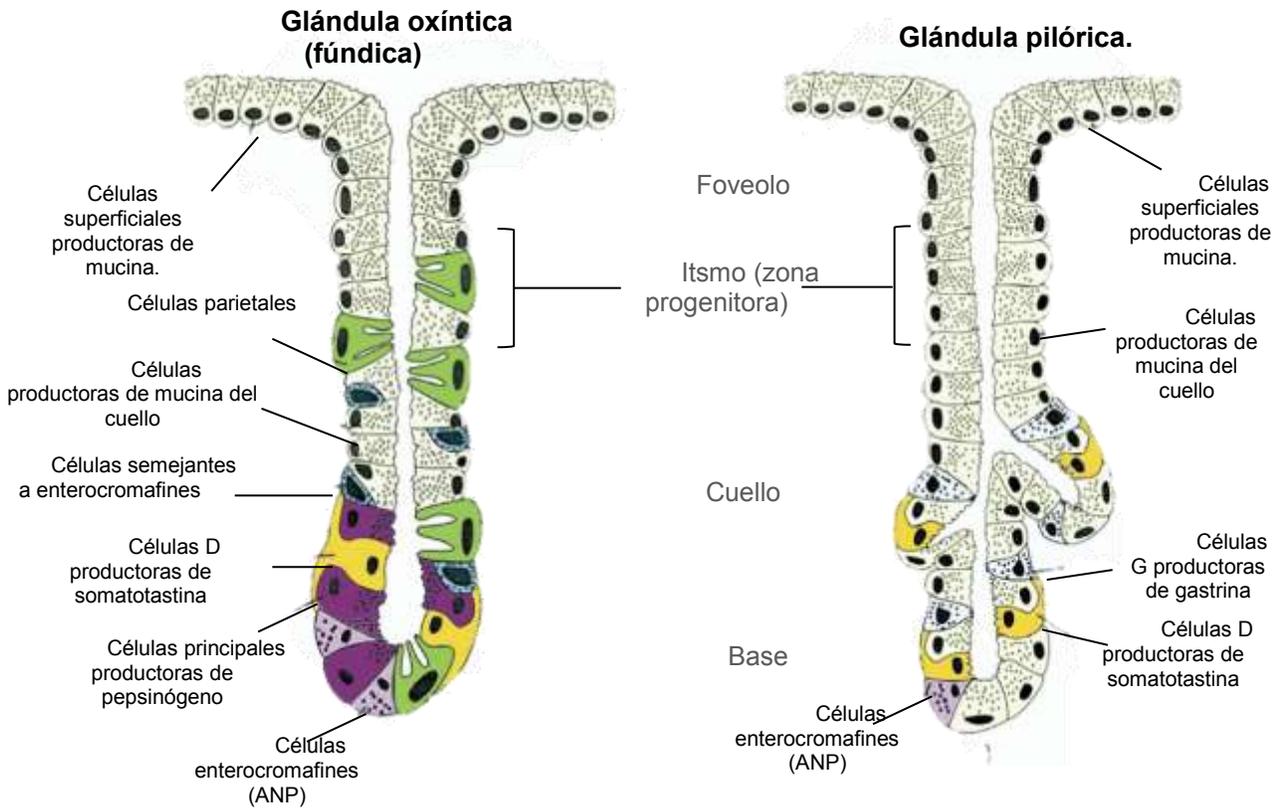


Figura 2. Anatomía funcional de la mucosa abomasal (estomacal). En el área glándular oxíntica (fúndica) se localizan las células D productoras de somatostatina que poseen procesos citoplasmáticos que terminan en la cercanía de las células parietales secretoras de ácido clorhídrico y de las células semejantes a las enterocormafines secretoras de histamina, y en la región pilórica se localizan las células G secretoras de gastrina. La correlación funcional de esta conjunción anatómica es un tónico moderador paracrino a cargo de la somatostatina ejercido directamente sobre la secreción ácida de la célula parietal e indirectamente inhibiendo la secreción de histamina y gastrina (Schubert y Peura, 2008).

*Principales alteraciones ocasionadas dentro del abomaso por la infección por *H. contortus**

Entre los cambios provocados sobre la mucosa abomasal por la infección ocasionada por *H. contortus* se encuentran: una apariencia granular sobre la superficie y la presencia de algunas hebras de sangre. A nivel microscópico se observa un engrosamiento del tejido fúndico, que en ocasiones duplica su profundidad debido a la presencia generalizada de hiperplasia a nivel medio de la mucosa. En esta área existe una hipertrofia de las poblaciones de células productoras de moco al igual que una disminución de las células principales. Las criptas se vuelven estrechas, numerosas y densamente empaquetadas sobre la superficie de la mucosa; las células parietales disminuyen a nivel medio, pero aún son numerosas en la profundidad de la glándula (Hunter y Mackenzie 1982, Scott y col., 1998; 1999; Al-Zubaidy y col. 1986).

Aunado a los cambios morfológicos, una característica de la hemoncosis es el reclutamiento e hiperplasia de mastocitos mucosales, La mastocitosis mucosal que incluye la presencia de leucocitos globulares intraepiteliales, definitivamente se relaciona con la helmintiasis gastrointestinal y su efecto relacionado con la expulsión de parásitos es en función de la proteasa de los mastocitos ovinos (SMCP) ampliamente vinculada con la presencia de estas células. Por otro lado, existe eosinofilia tisular, ya que los eosinófilos son reclutados desde la infección primaria por *H. contortus*, y una respuesta más rápida se observa en ovinos inmunes, además, los eosinófilos son capaces de acumularse alrededor de las larvas. Estas células se caracterizan por tener poseer gránulos con moléculas como la proteína catiónica eosinofílica, una peroxidasa eosinofílica y una neurotoxina. El infiltrado de eosinófilos coincide con el de células mononucleares, principalmente linfocitos T CD4+, $\gamma\delta$ -TCR+ y linfocitos B, que se observa desde los 3 días pos-infección y continúa incrementándose conforme avanza la infección. Las proporciones relativas de linfocitos y eosinófilos son muy variables incluso dentro de una pequeña sección de tejido. Aproximadamente 16 días después de la infección un número mayor de linfocitos y células plasmáticas pueden ser

observados. (Charleston, 1965; Huntley y col., 1992; Balic y col., 2000; 2002; 2005; Rainbird y col., 1998; Schaling, 2000; Rothenberg y Hogan, 2006).

Métodos de control de las nematodiasis gastrointestinales de ovino

El control de los NGE debe contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de control que limiten los riesgos de la infección. En el cuadro 1 se presentan los principales grupos de antihelmínticos que existen en el mercado utilizados en el tratamiento de los NGE (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

La utilización de los antihelmínticos se puede clasificar de acuerdo a su momento de aplicación, y este puede ser: **curativo**, cuando es aplicado en el momento en que la enfermedad ha sido diagnosticada y algunas muertes se han presentado; **táctico**, cuando se tiene conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y es aplicado durante la época de condiciones óptimas para el desarrollo de las fases infectantes; **estratégico**, el cual tiene como objeto reducir contaminaciones de los pastos teniendo el conocimiento de los cambios estacionales de la infección y **supresivos**, en momentos cuando las poblaciones parasitarias declinan tanto en los pastos como en los animales, esto resulta en beneficio porque habrá menos contaminación de los potreros (Torres y col., 2008).

La aplicación de fármacos contra NGE en el pasado resultaba una actividad fácil de realizar, económica y eficaz, sin embargo, el uso continuo e indiscriminado de los antihelmínticos ha favorecido la aparición de parásitos resistentes a esos productos, lo cual representa uno de los problemas de salud más importantes en el mundo y que ha orillado al desaliento y en muchos casos hasta el desaparición de la producción ovina (Prichard y col., 1980; Kaplan, 2004; Torres-Acosta y col., 2012).

La resistencia antihelmíntica se relaciona con la selección de individuos por fármacos que afectan únicamente a la porción parásita de una población de nematodos. Puesto que no se espera que ningún antihelmíntico sea 100% efectivo sobre el 100% de las especies parasitas y sus diferentes fases de desarrollo, el

pequeño número de parásitos que sobreviven, los cuales representan la porción resistente de la población, tienen una elevada oportunidad para contribuir en la siguiente generación aumentando la cantidad de individuos resistentes (Waller, 1994).

Grupo	Principio activo	Dosis mg/kg	Vía de administración
Bencimidazoles	Tiabendazol	50.0	Oral
	Albendazol	5.0	Oral
	Mebendazol	15	Oral
	Fenbendazol	5.0	Oral
	Oxfendazol	5.0	Oral
Probencimidazoles	Febantel	6.0	Oral
	Tiofanato	50.0	Oral
	Netobimín	7.5	Oral
Imidazotiazoles	Levamisol	7.5	Subcutánea
	Morantel	6.0	Oral
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	0.2	Subcutánea y oral
	Moxidectina	0.2	Subcutánea
	Doramectina	0.2	Subcutánea
Nitrofenoles	Nitroxinil	10	Subcutánea
Salicilanilidas	Closantel	10	Subcutánea y oral

Cuadro 1. Principales grupos de antihelmínticos que se emplean en ovinos existentes en el mercado (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Las estrategias actuales de control se enfocan a evitar o retrasar la presentación de resistencia de los NGE a los antihelmínticos, dentro de las cuales

se encuentran el manejo del pastoreo; el empleo de animales de razas resistentes o individuos resistentes de la misma raza; el sistema FAMACHA; hongos con actividad nematófaga; compuestos que se encuentran naturalmente en plantas, árboles, semillas y frutos; vacunas elaboradas a partir de antígenos intestinales de *H. contortus*, además del uso de partículas de óxido de cobre (Barger, 1996; Torres-Acosta y Hoste, 2008; Bishop y Morris, 2007; Van Wyk y col., 1997; Mendoza y col., 1998; Hammond y col., 1997; Newton y col., 1995 Knox, 2002).

COBRE

Importancia del cobre

En 1928 Hart y Envejhem demostraron que el cobre (Cu) es esencial para el crecimiento y la formación de hemoglobina en roedores, y posteriormente para la prevención de un amplio rango de desórdenes clínicos y patológicos en diversas especies de animales monogástricos. Diversas enfermedades degenerativas que ocurren naturalmente en animales de pastoreo que responden a la terapia con Cu, fueron descubiertas poco después (Suttle, 2010).

Distribución

Un animal grande puede almacenar de 50 a 120 mg (780 a 1889 μmol) de Cu. Muchas de las especies no rumiantes tienen concentraciones hepáticas de Cu de entre 2 y 10 $\mu\text{g/g}$ (0.032 a 0.16 $\mu\text{mol/g}$). Las concentraciones más elevadas ($>5 \mu\text{g/g}$; $>0.079 \mu\text{mol/g}$) están normalmente en hígado, cerebro y pelo. Los tejidos con niveles intermedios (1.5 a 0.5 $\mu\text{g/g}$; >0.024 a 0.078 $\mu\text{mol/g}$) incluyen renal, pancreático, piel, muscular y óseo. Tejidos con bajas concentraciones ($>1.5 \mu\text{g/g}$; $>0.024 \mu\text{mol/g}$) incluyen pituitario, tiroideo, el tímico, el ovárico y testicular (Keen y col., 2003; Mason, 1979, Smart y col., 1981; Stern y col., 2007).

El rango normal de Cu en la sangre de animales saludables esta entre 0.5 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (7.9 a 23.6 $\mu\text{mol/litro}$) (Mason, 1979). Los rumiantes tienen una elevada capacidad de almacenamiento de Cu en su hígado, a menudo excediendo dos terceras partes del total corporal. Las concentraciones típicas de Cu en ovinos y

bovinos van de 20 a 150 µg/g (0.315 a 2 a 36 µmol/g). Las elevadas concentraciones en rumiantes, aparentemente reflejan una elevada capacidad de retención de Cu más que una diferencia en el consumo o absorción. Las concentraciones en otros tejidos son similares a aquellas reportadas para no rumiantes. En muchas especies, el neonato se caracteriza por tener concentraciones hepáticas que son significativamente más elevadas que en un adulto. Sin embargo, el cobre en muchos otros tejidos tiende a ser más elevado en el adulto que en el recién nacido. (Stern y col., 2007)

Funciones del cobre

El cobre tiene dos funciones principales: puede ser un componente estructural en macromoléculas actuando como un centro de coordinación y es también un cofactor reductor común para un sinnúmero de oxigenasas y monooxigenasas que son esenciales para la vida, debido a su habilidad para transitar entre estados reducidos y oxidados (Rucker y col., 2008).

Las alteraciones inmunológicas, de la función neurológica, de las defensas oxidantes y la despigmentación resultado de la deficiencia de Cu están relacionadas con enzimas específicas como la cobre-zinc superóxido dismutasa, la cual cataliza la dismutación del anión superóxido convirtiéndolo en oxígeno y peróxido de hidrogeno: $2 \text{HO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (Lipard y col., 1994). La actividad de las superóxido dismutasas SOD1 y SOD2 se reduce en los neutrófilos por la deficiencia de cobre (Keen y col., 2003; Rucker y col., 1998; Stities y col., 2000; Tinker y Rucker, 1985; Prohaska 2006).

El cobre es parte estructural de la ceruloplasmina, que oxida hierro ferroso a hierro férrico para su transporte por la transferrina al sitio de formación de la hemoglobina; de la diaminoxidasa, que destruye la histamina, particularmente en placenta y de la dopamina β-hidroxilasa, responsable de la producción de adrenalina y noradrenalina (Maintz y col, 2008; Keen y col., 2003). En el complejo enzimático, citocromo oxidasa C (CCO), el Cu es responsable por la transferencia

terminal de electrones en la cadena respiratoria y consecuentemente para la generación de energía en todos los tejidos. (Jones y Suttle, 1987).

Además el Cu puede proteger tejidos contra el “estrés respiratorio” de los radicales libres, incluyendo aquellos generados durante la respiración, e interactúa con otros nutrientes con propiedades antioxidantes. También es un componente de la lisil-oxidasa, una enzima que participa en la síntesis de colágeno y la elastina, dos importantes proteínas estructurales encontradas en el hueso y el tejido conectivo. Asimismo, es importante para la producción de la hormona tiroxina. Una tirosinasa que contiene Cu, convierte la tirosina a melanina, necesaria para la formación de los pigmentos de la piel, pelo, lana y ojos. El Cu también es necesario para la síntesis de fosfolípidos encontrados en la cubierta de mielina en los nervios periféricos. (Suttle, 2010; Uriu-Hare y col., 1998; Araya y col., 2006; Harris, 2001; Groff y col., 1995).

Existen más proteínas fijadoras de cobre que cuproenzimas, aunque no todas tienen funciones probadas. Las metalotieninas (MTs) especialmente MTII, unen cobre y pueden tener papeles protectores durante la exposición al exceso de cobre. Dos agentes de la coagulación, los factores 5 y 8, son cuproproteínas con actividad dependiente de Cu y su carencia debilita la adhesión plaquetaria (Lee y col., 1994; Bonham y col., 2002; Lominadze y col., 1997; Prohaska, 2006).

Metabolismo y absorción

En rumiantes la absorción de cobre (A_{Cu}) está determinada enormemente por procesos digestivos en el rumen que degradan fuentes inorgánicas y orgánicas de azufre a sulfuro (S^{2-}) mientras que fallan para digerir 30-50% de la materia orgánica (Suttle, 1974). Gran parte del Cu liberado durante la digestión ruminal es precipitado como sulfuro de cobre (CuS) y permanece sin absorberse, mientras sea liberado durante la digestión post-ruminal puede llegar a ser parcialmente unido a constituyentes sin digerir. Los protozoarios del rumen son importantes generadores de S^{2-} y su remoción por aislamiento o la administración de ionoforos

antiprotozoarios incrementa el A_{Cu} . La retención fraccional de cobre en el hígado puede reflejar el A_{Cu} (Bird, 1970; Ivan, 1988; Barrowman and van Rysse, 1987).

El Cu que es absorbido en el intestino se une a albumina y es transportado al hígado, donde la ceruloplasmina lo transporta hacia otros tejidos (Hellman y Gitlin, 2002). El transporte y metabolismo celular del Cu depende de una serie de proteínas de membrana y péptidos solubles más pequeños que constituyen un sistema integrado para el mantenimiento de la homeostasis celular. El transportador de alta afinidad (CTR1) de la membrana plasmática media casi todo el consumo de Cu en condiciones de concentraciones bajas y se degrada en concentraciones elevadas. Asociada con este transportador está una reductasa de cobre que lo mantiene en el estado +1 (la forma más soluble) en las proximidades del transportador. Después es transferido a las chaperonas, cuya función es llevar Cu a proteínas específicas dentro de la célula (Rucker y col., 2008).

La salida de Cu es mediante el transporte en vesículas secretoras vía procesamiento pos-Golgi. Sobre la membrana de las vesículas, dos ATPasas catalizan su transferencia a los compartimientos intracelulares, o lo expelen de la célula. El ATP7B dirige el Cu hacia la ceruloplasmina plasmática o hacia la excreción biliar en conjunto con otra chaperona (Murr1). Además el ATP7A dirige el Cu dentro de la red *trans* Golgi hacia las proteínas dopamina β -monooxigenasa, peptidilglicina, α -monooxigenasa amidante, lisil-oxidasa y tirosinasa, dependiendo del tipo celular (Rucker y col., 2008; Stern y col., 2007; Theile, 2003).

Consecuentemente, las cuproproteínas secretadas con la actividad enzimática, como la lisil-oxidasa o la ceruloplasmina, frecuentemente reflejan el estatus del cobre o su consumo en la dieta. Otra característica importante en su regulación incluye el papel de la metalotienina, una proteína divalente fijadora de Cu, Zn, Hg y Cd, que actúa amortiguando los cambios en las concentraciones de Cu y Zn (Rucker y col., 2008).

Signos clínicos de la deficiencia de cobre

Una amplia variedad de enfermedades relacionadas con el cobre han sido asociadas con un bajo nivel y son ocasionadas por alteraciones funcionales (Suttle, 2010; Rucker y col., 2008); algunos de estos padecimientos se describen a continuación:

Ataxia. Existe particular vulnerabilidad del cordero a la ataxia neonatal y está relacionada a una fase de rápida mielinización en el sistema nervioso fetal en la gestación media. Si la deficiencia de cobre ocurre en la gestación tardía la ataxia aparece unos cuantos días después del parto (Suttle 1988).

Anomalías en lana y pelo. La deficiencia produce anomalías en la lana de los ovinos provocando la aparición de fibras casi rectas que producen lana fibrosa y rígida con reducidas propiedades de resistencia a la tensión y elasticidad. Los ovinos de lana negra desarrollan lana blanca y la pigmentación es tan sensitiva a cambios en el consumo de cobre que pueden ser producirse bandas sin pigmentar por deficiencias intermitentes (Underwood, 1977).

Anemia. La anemia se desarrolla después de una severa o prolongada deficiencia de cobre. En corderos es de tipo microcítica hipocrómica, mientras que en vacas y ovejas puede ser macrocítica hipocrómica. La deficiencia de cobre ocasiona alteraciones en la absorción, la movilización y utilización normal de hierro particularmente debido al papel del cobre como un cofactor redox en varias ferroxidasas que oxidan Fe^{+2} y Fe^{+3} (Suttle, 1987; O'Dell y Sunde, 1997; Rucker y col., 2008).

Alteraciones óseas. La lesión bioquímica subyacente al desarrollo de las lesiones óseas en animales con deficiencia de cobre es ocasionada por una reducción en la actividad de la lisil-oxidasa. Las alteraciones de la osificación endocondral que dan origen al crecimiento anormal del hueso (osteocondrosis) pueden afectar únicamente a animales en crecimiento (Tinker y Rucker, 1985; Suttle, 2010).

Claudicación. La cuproenzima lisil-oxidasa es responsable de formar las cadenas polipeptídicas de colágeno. Los problemas asociados con la deficiencia de Cu son fracturas, inflamación y endurecimiento de articulaciones; además existen defectos en la queratina que produce uñas blandas e irregulares (Uriu-Hare y col., 1998; Swenson y col., 1993; Keen y col., 1989).

Alteraciones cardiovasculares. En bovinos, la deficiencia de cobre puede provocar degeneración severa del miocardio con fibrosis que frecuentemente ocasiona muerte súbita. Las lesiones bioquímicas que subyacen los cambios en el corazón incluyen disminución de la actividad de la citocromo oxidasa, anomalías en la estructura de la elastina y la colagenasa de la pared cardiaca y los vasos y bajos niveles de norepinefrina (Tinker y Rucker, 1985).

Intoxicación por cobre

La toxicidad aguda por Cu es un serio problema en animales domésticos, probablemente debido al fuerte efecto emético del elemento. En contraste, la toxicosis de este elemento es un evento frecuente en ovejas debido a su baja capacidad de síntesis de metalotieninas (Radostits y col., 2007). Existen dos fases asociadas con la toxicosis por Cu. En la primera fase existe una acumulación gradual en tejidos y una elevación en la aspartato aminotransferasa sérica, lactato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa, la arginasa y la glutámico deshidrogenasa. Conforme se acumula en el hígado, existe tumefacción y necrosis de las células del parénquima y las células de Kupffer. La lesión bioquímica primaria resultado de la toxicosis se cree iniciada por el daño de los radicales libres del cobre. Puede ocurrir hemólisis. Durante la crisis hemolítica, las ovejas tienen hígados edematosos parcialmente cirróticos y riñones oscuros teñidos por la hemoglobina. Los tejidos de ovinos intoxicados por Cu con crisis hemolítica tienen gránulos citoplasmáticos de lipofuccina en el epitelio tubular renal y parénquima hepático, que sugieren ruptura lisosomal. Una patología adicional puede ocurrir en la materia blanca del cerebro, puente y cerebelo (Rucker y col., 2008).

Prevención control de la deficiencia de cobre en rumiantes

Una amplia variedad de métodos para proveer suficiente Cu al ganado han sido desarrollados, sin embargo difieren en eficacia y conveniencia. Entre ellos se encuentra la aplicación de fertilizantes con Cu en la pradera, el suministro de sales en bloque y la incorporación de sulfato de cobre (CuSO_4) en mezclas minerales o concentrados ofrecidos directamente al ganado, la suplementación como complejos de glicinato; la administración oral mensual o en intervalos más largos con CuSO_4 , evitar el contacto con antagonistas como el hierro y el molibdeno, la existencia de variación genética en el metabolismo de Cu entre razas y la suplementación oral de lenta liberación con partículas de óxido de Cu (MacFarlane, 1989; Haynes, 1997; Suttle, 2010; Hansen y col., 2008; Underwood y Suttle, 1999; Woolliams y col., 1986; Dewey 1977; Deland y col., 1979).

*Utilización de las partículas de óxido de cobre como mecanismo de control de las parasitosis abomasales ocasionadas por *H. contortus**

Las partículas de óxido de cobre (PC) de elevada gravedad específica se administran en capsulas por sondeo bucoruminal y son retenidas en el abomaso, donde el Cu es liberado por un periodo de varias semanas (Dewey 1977; Deland y col., 1979). La dosis óptima para ovinos y bovinos es 0.1 g kg^{-1} de peso vivo (Suttle, 1981; Whitelaw y col., 1984) y la reserva de Cu en hígado puede permanecer elevada incluso meses después de la última dosis (McFarlane y col., 1991). Aunque el óxido de Cu contiene Cu de intrínsecamente poca disponibilidad (25% relativo al CuSO_4), las enormes dosis que pueden ser administradas con seguridad como PC lo vuelven una fuente efectiva de lenta liberación (Baker, 1999). La eficacia puede reducirse cuando existen problemas de diarrea (Suttle, 2010).

La utilización de la PC como método de control de las parasitosis gastrointestinales derivó de un hallazgo accidental, ya que su administración provocó una reducción del pepsinógeno sérico en ovinos infectados con vermes gastrointestinales (Judson y col. 1982), cuyo aumento por encima de los niveles

normales está directamente relacionado con las parasitosis abomasales (Dakkak y col., 1981; Lawton y col., 1996; Simpson y col., 1997). En trabajos posteriores, donde se evaluó la eficacia sobre la reducción en la eliminación de huevos y la cantidad de fases adultas presentes en abomaso, se observaron valores entre 70 y 95 % para en la eliminación de huevos por gramo de heces y de 50 a 95 % de eficacia sobre fases adultas (Bang y col., 1990a; Chartier y col., 2000; Knox, 2002; Soli y col., 2010, Waller y col 2004; Burke y col., 2007; Vatta y col., 2009; Galindo y col., 2011).

Existen propuestas del mecanismo de acción de las PC dentro del abomaso y su posible efecto sobre *H. contortus*, basadas en las alteraciones morfológicas provocadas por los iones de Cu liberados en el ambiente ácido del abomaso sobre la cutícula del verme (Bang y col., 1990; Burke y Miller, 2006); sin embargo, esto podría resultar inexacto, puesto que la liberación de los iones de Cu desde las partículas depende del pH ácido del abomaso (Dewey, 1977) el cual bajo condiciones de parasitosis se encuentra elevado, por lo que incluso no se recomienda su uso para controlar la deficiencia de cobre cuando la parasitosis está presente (Bang y col., 1990b).

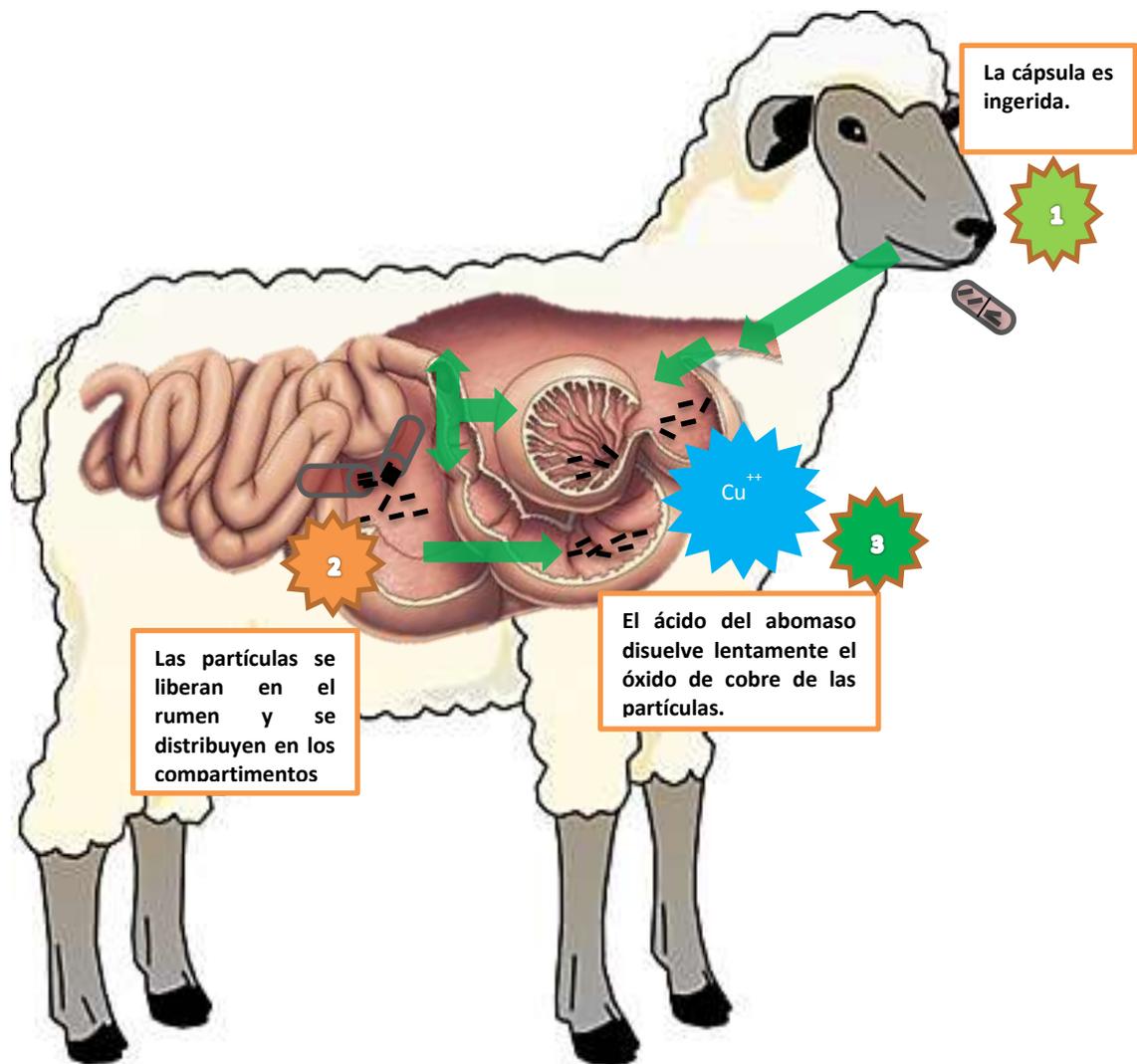


Figura 3. Empleo de partículas de óxido de cobre. El esquema muestra la forma de aplicación y el destino de las partículas de óxido de cobre. Las partículas de CuO son administradas en una cápsula de gelatina y una vez dentro del rumen son liberadas. Desde este sitio se distribuyen al resto de los compartimentos. La mayor parte de las partículas de CuO se alojan en el abomaso y principalmente en los pliegues del órgano donde son disueltas por acción de la secreción ácida del órgano. El cobre que se desprende de las partículas es arrastrado junto con la ingesta y es absorbido en intestino delgado (Adaptado de Hale y col., 2007).

JUSTIFICACIÓN

La infección por el nematodo abomasal *H. contortus* en ovinos ocasiona enormes pérdidas desde el punto de vista productivo, las cuales han sido asociadas con los hábitos hematófagos del verme que pueden desencadenar anemia e incluso la muerte (Hoste y Chartier, 1993, Coop y Kyriazakis, 1999; Parkins y Holmes, 1989). Aunado a los hábitos del verme se encuentran las alteraciones ocasionadas en la fisiología del abomaso, que derivan en la mal digestión y mala absorción de nutrientes (Simpson, 2000). Sin embargo, estas alteraciones se originan desde el momento en que la larva infectante del parásito (L3) entra en contacto con la mucosa del órgano (Christie y col., 1978), por lo que control para la enfermedad no solo debería realizarse una vez que el parásito ha completado su desarrollo. El tratamiento con partículas de óxido de cobre se ha utilizado desde hace tiempo para el tratamiento contra las fases adultas de *H. contortus* (Burke y Miller, 2004, 2006; Chartier y col., 2000); sin embargo, su uso para la prevención de la infección contra las fases larvarias causales de la infección ha sido poco estudiada (Galindo y col., 2011; Waller; 2004; Vatta, 2009). Asimismo, existe escasa información sobre el mecanismo por el cual de las partículas de óxido Cu (PC) poseen actividad nematocida contra *H. contortus*. Por lo anterior, el presente trabajo se diseñó enfocándose en profundizar en los procesos mediante los cuales las PC interfieren con la infección ocasionada por *H. contortus* en el abomaso. Además, con la realización del presente estudio se generará información que servirá para sentar las bases para el uso potencial de partículas de cobre en el control de esta la nematodiasis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración oral de partículas de óxido de cobre (PC) sobre el establecimiento de larvas infectantes (L3) de *H. contortus* en ovinos y las posibles alteraciones en la mucosa abomasal.

Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de establecimiento *in vitro* de larvas de *H. contortus* en tejido de la región fúndica y pilórica abomasal de ovinos tratados con partículas de óxido de cobre.

- Evaluar posibles el número de células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares en la mucosa abomasal de ovinos partículas de óxido de cobre.

- Cuantificar la concentración de cobre en hígado, tejido y contenido abomasal de ovinos tratados con partículas de óxido de cobre.

- Relacionar las concentraciones de cobre, las modificaciones en el número de células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares y el porcentaje de establecimiento de L3 de *Haemonchus contortus*.

HIPÓTESIS

Las partículas de óxido de cobre administradas por vía oral al momento de interactuar con la mucosa abomasal provocan un aumento en la proporción de células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares en la mucosa abomasal, que impiden el establecimiento de las larvas infectantes de *H. contortus* y ocasionan reducciones en la población de adultos del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron cuarenta y cinco ovinos machos F1 finalizados (en promedio 40 kg de peso) de aproximadamente 6 meses de edad, procedentes de un rancho de engorda en estabulación con corraletas elevadas, ubicado en el estado de Querétaro, los cuales no habían sido expuestos previamente a NGE. Estos animales se mantuvieron en confinamiento en condiciones controladas que evitaron la infección por NGE. Recibieron alimento balanceado comercial para ovinos (Purina® Ovinos®, 14% de proteína) de acuerdo al 4% de su peso corporal y tuvieron acceso al agua *ad libitum*.

Larvas 3 de H. contortus. Las larvas se obtuvieron de las heces de animales infectados una cepa de *H. contortus* aislada y caracterizada en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM; mediante la técnica de cultivo larvario (Alba, 2007). Las larvas 3 se almacenaron a 4 °C hasta su utilización por un periodo no mayor 3 semanas.

Diseño experimental. Los 45 corderos se distribuyeron en cinco grupos de 9 animales cada uno. El grupo 1 (grupo testigo) no recibió tratamiento; el grupo 2 estuvo integrado por corderos tratados exclusivamente con 2 g de partículas de óxido Cu (PC); el grupo 3 se infectó artificialmente con 10,000 larvas 3 (L3) de *H. contortus*; el grupo 4 recibió inicialmente 2 g PC y posteriormente fue infectado con 10,000 L3 del parásito 72 horas antes del sacrificio el grupo 5 recibió inicialmente un inóculo de 10,000 L3 y una vez confirmada la infección, recibió 2 g de PC. Después de administrados los tratamientos, los corderos de cada grupo fueron sacrificados de forma humanitaria a distintos periodos según el esquema descrito en el cuadro 2 y los abomasos se extrajeron de la canal para la realización de la técnica de establecimiento larvario y la determinación de las concentraciones de cobre en tejido del órgano y contenido. Con este mismo propósito además, se colectaron muestras de hígado.

Tratamientos				
Grupo	Infección	Partículas de óxido de cobre (día 0)	Sacrificio post-tratamiento	No. de ovinos
Testigo	-----	-----	72 horas	3
			2 semanas	3
			4 semanas	3
L3	10000 larvas 3 de <i>Haemonchus contortus</i> (día 0).	-----	72 horas	3
			2 semanas	3
			4 semanas	3
PC	-----	2 g	72 horas	3
			2 semanas	3
			4 semanas	3
PC+L3	10000 larvas 3 de <i>Haemonchus contortus</i> 72 horas antes del sacrificio.	2 g	72 horas	3
			2 semanas	3
			4 semanas	3
Hc+PC	10000 larvas 3 de <i>Haemonchus contortus</i> .	2 g seis semanas pos-infección	72 horas	3
			2 semanas	3
			4 semanas	3

Cuadro 2. Diseño experimental. Conformación de 5 grupos experimentales.

Metodología

Administración de tratamientos. A su llegada, todos los animales fueron desparasitados con 7.5 mg/kg de levamisol (Ripercol[®], Pfizer[®], 12.5%) y se monitorearon mediante la técnica de McMaster para verificar que no existiera infección por NGE por un período de 7 días. Durante este periodo además, se adaptó a los animales a la dieta de mantenimiento: 80% alimento balanceado (Purina[®] Ovinos[®], 14% de proteína) y 20% de heno de alfalfa. Transcurrido este periodo se inició la infección artificial con L3 de *H. contortus*, siguiendo la técnica descrita por Wood y colaboradores (1995), comenzando con el grupo cinco, seis semanas antes de la aplicación del resto de los tratamientos. Posteriormente fueron administradas las PC (UltraCruz Goat Copper Bolus[™], Santa Cruz Animal Health) dentro una cápsula de gel mediante sondeo buco-ruminal para depositar el total del inoculo en el rumen.

Procesamiento de vísceras. Después del sacrificio se recuperaron los abomasos y se llevaron inmediatamente al laboratorio, manteniéndose en todo momento a 37°C. Al mismo tiempo se tomaron muestras de tejido hepático, las muestras de contenido y de la región pilórica y fúndica del abomaso se tomaron una vez que el órgano se encontraba en el laboratorio las cuales se congelaron a -20°C para la determinación posterior de concentraciones de cobre. Al llegar al laboratorio los abomasos se incidieron por la curvatura menor para evitar dañar en la medida de lo posible la arquitectura de la mucosa del órgano y fueron lavados con solución salina fisiológica a 37°C.

Ensayo in vitro de establecimiento larvario. El ensayo de establecimiento larvario se realizó siguiendo las recomendaciones de Jackson y colaboradores (2004). Brevemente se tomaron aleatoriamente 6 muestras de aproximadamente 2 centímetros de diámetro tanto de la región fúndica como de la pilórica. Cada porción de tejido se colocó en una sección de una placa Corning de seis pozos. A continuación se agregó solución de Hank con 20 mmol L⁻¹ de Hepes a 37°C alrededor del tejido.

Se fabricaron cilindros de aislamiento con jeringas de 5 ml sin el extremo anterior y se colocaron sobre el tejido; dentro se introdujeron dosis de 2500 L3 de *H. contortus* desnudadas previamente con hipoclorito de sodio. Las placas se sometieron a incubación a temperatura de 38° C en una estufa de cultivo celular por un lapso de tres horas.

Al finalizar la incubación, los cilindros de aislamiento y los tejidos se enjuagaron con solución salina fisiológica al 0.9% en tubos para centrifuga de 50 ml para remover todas las larvas que no se asociaron con la mucosa. Posteriormente, el tejido fue lavado vigorosamente sumergiéndolo treinta veces en 25 ml de solución salina fisiológica en un tubo para centrifuga de 50 ml. Por último el tejido fue colocado en un tercer tubo y digerido en una solución de 50 ml de pepsina y HCl al 1% a 38° C por 12 horas.

Para el conteo de L3 de *H. contortus* asociadas al tejido, el volumen de todos los tubos fue ajustado a 50 ml y su contenido fijado con 2 ml de yodo helmintológico (250 g de yoduro de potasio, 50 g de yodo resublimado en 500 ml

de agua destilada). El número de larvas presentes en una alícuota al 2% de cada muestra fue cuantificado mediante el uso de un microscopio estereoscópico y el porcentaje de establecimiento fue determinado utilizando la siguiente fórmula (Jackson y col., 2004):

$$\text{Porcentaje de asociación} = \frac{\text{Total de larvas en el tubo de digestión}}{\text{Larvas enjuague} + \text{larvas lavado} + \text{larvas digestión}} \times 100$$

Recuperación de las partículas de cobre. Las partículas de óxido de Cu se recuperaron colocando el contenido abomasal en un cernidor sometiéndolo a un flujo abundante de agua para retirar los restos de arena y contenido de abomaso. Una vez terminado el proceso se dejaron secar a temperatura ambiente y su peso fue determinado con ayuda de una balanza analítica.

Conteo de fases adultas de Haemonchus contortus posmortem. Se recuperaron los adultos del parásito de los abomasos para cuantificar las poblaciones siguiendo las recomendaciones de la WAAVP, (Wood y col., 1995).

Conteo de células inflamatorias. Se tomaron secciones de 2 cm de tejido de las áreas fúndica y pilórica abomasal, las cuales fueron preservadas en formaldehído al 10% para su posterior procesamiento. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 0.5 µm con la ayuda un micrótopo (AO Scientific Instruments), los cuales se colocaron en una solución de gelatina bacteriológica a 37 °C para el montaje del tejido. Al finalizar se tiñeron con hematoxilina-eosina para la búsqueda de células asociadas a la inflamación y poder observar cambios en la morfología de la mucosa además de localizar larvas 3 de *H. contortus*. Además se utilizó una técnica de azul de toluidina modificada para detectar la presencia probable de células cebadas (Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells, *IHC World*). El conteo de células se realizó en 10 campos con el objetivo 20x utilizando el programa Image Pro Premier (Media cybernetics®)

Determinación de las concentraciones cobre. Se procedió a descongelar las muestras de hígado y de tejido y contenido abomasal a 4°C. Posteriormente 500 mg de cada una de las muestras se sumergieron en una solución de 4 ml agua Mili-Q + 3 ml de ácido nítrico al 70%+ 1 ml de peróxido de hidrogeno al 30% (JT Baker®) por 20 minutos para posteriormente ser sometidas a digestión en un horno de microondas (MARS®) a 170 °C por 35 minutos. Al finalizar todos los tubos se ajustaron a un volumen de 25 ml. Las concentraciones de cobre se determinaron mediante espectrofotometría de plasma utilizando un equipo de plasma de acoplamiento inductivo (ICP; Thermo Jarrel ASH Corporation).

Análisis de datos. El porcentaje de establecimiento *in vitro* de larvas de *H. contortus*, la cantidad de adultos del parásito, la concentración de cobre en las distintas muestras y la cantidad células fueron procesados mediante análisis de varianza y una prueba de diferencias mínimas significativas para evidenciar las diferencias entre tratamientos. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson para establecer si existía asociación entre la concentración de Cu, el establecimiento larvario y la cantidad de células. Todos los datos se procesaron mediante el programa SPSS 21 (IBM®). Los efectos se consideraron significativos cuando el nivel de confianza excedió el 95% ($p < 0.05$)

RESULTADOS

Cantidad de adultos de H. contortus recuperados

La figura 4 presenta el conteo de las fases adultas de *H. contortus* recuperadas del abomaso de ovinos infectados artificialmente con el parásito tratados con PC y fueron sacrificados a las 72 horas, 2 y 4 semanas de aplicado el tratamiento. Una menor cantidad de adultos se detectó desde las 72 horas (90 ± 30 vs 2073 ± 762.68 ; $p=0.01$) y además se observó a las 2 y 4 semanas ($20 \pm 20 < 2073 \pm 762.68$ ($p=0.01$) y $130 \pm 115.32 < 2073 \pm 762.68$ ($p < 0.01$) respectivamente) comparado con los animales infectados con *H. contortus* sin tratamiento con PC.

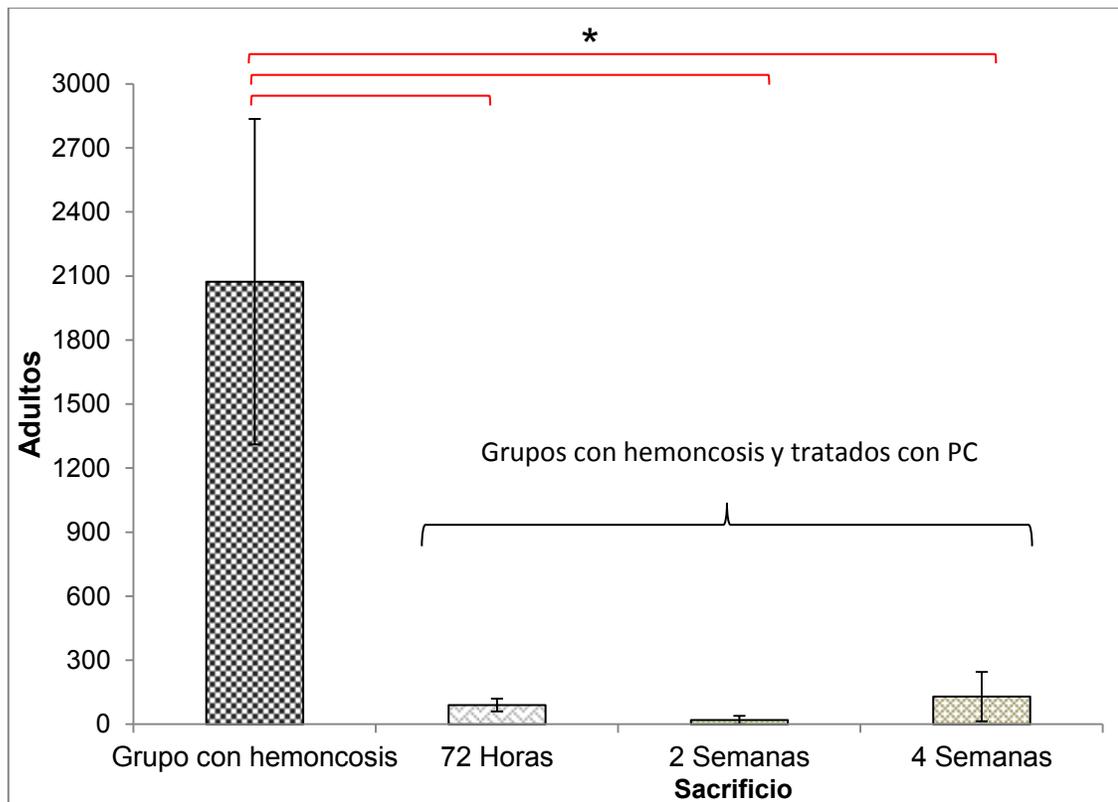


Figura 4. Total \pm EE de fases adultas de *H. contortus* recuperadas de abomasos de ovinos infectados con el parásito con y sin tratamiento con partículas de óxido de cobre. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

Porcentaje de establecimiento in vitro de L3 de H. contortus sobre tejido de la región fúndica y pilórica

La figura 5 muestra el porcentaje de establecimiento *in vitro* de L3 de *H. contortus* en la región fúndica del abomaso. Puede observarse que en el tejido de los ovinos sacrificados a las 72 horas, una mayor reducción en el establecimiento ocurrió en los animales inoculados con L3 de *H. contortus* y tratados con PC en comparación con los animales testigo ($27.9 \pm 3.15 < 47.8 \pm 3.33$; $p=0.04$) y con el grupo con hemoncosis que recibió PC ($27.9 \pm 3.15 < 45 \pm 5.51$; $p=0.046$). Dos semanas después, un menor porcentaje de establecimiento de L3 se observó en los grupos de ovinos que recibieron L3 de *H. contortus* ($27.9 \pm 4.15 < 46.8 \pm 3.72$; $p=0.035$) y PC y L3 del parásito, donde además se recuperó la menor cantidad de L3 con respecto al testigo ($26.9 \pm 3.97 < 46.8 \pm 3.72$; $p=0.05$). Por último, el porcentaje de establecimiento de los individuos sacrificados a las 4 semanas postratamiento fue menor en todos los grupos que recibieron algún tipo de tratamiento con respecto al testigo (Testigo: $49.61 \pm 7.09 > PC: 25.57 \pm 4.73$ ($p=0.014$); L3: 17.23 ± 3.06 ($p=0.014$); PC+L3: 19.21 ± 3.32 ($p=0.003$); Hc+PC: 25.38 ± 3.16 ($p=0.013$)).

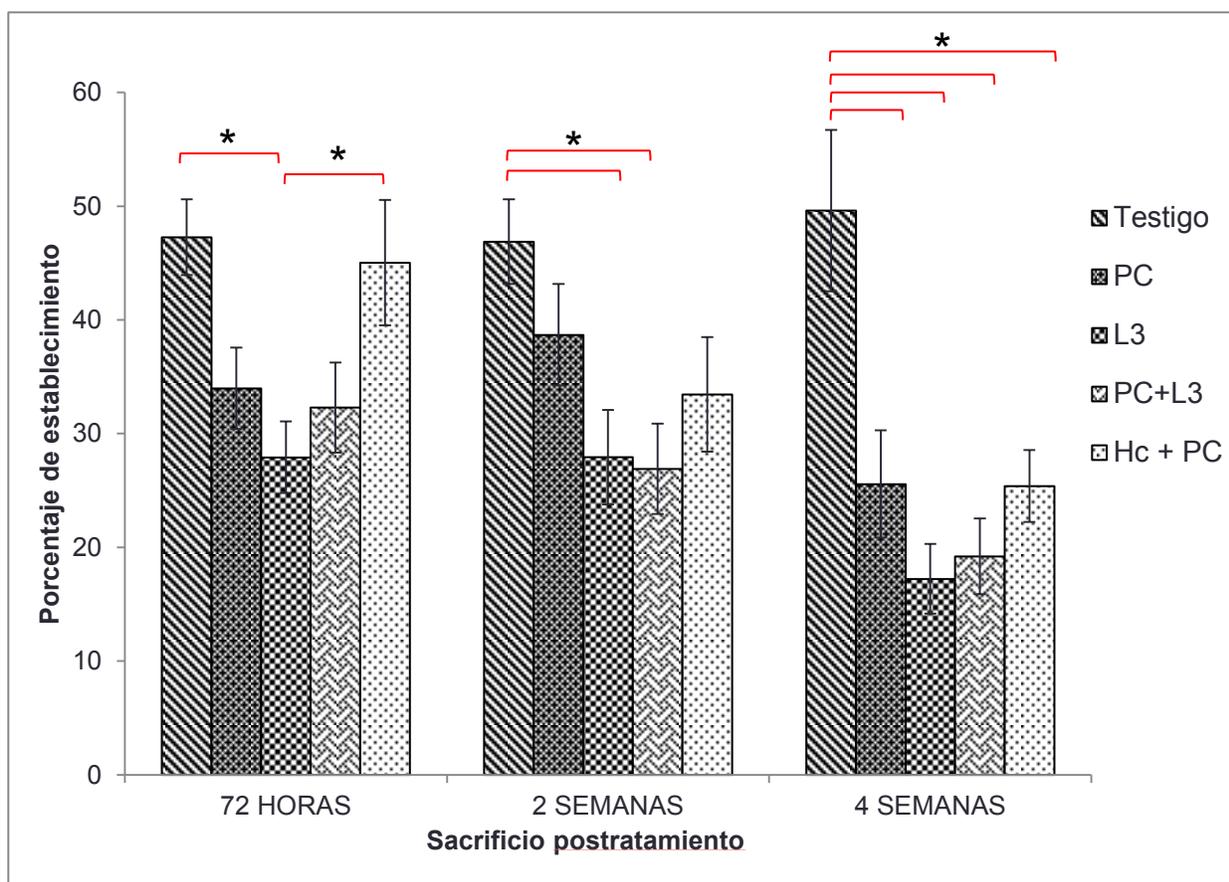


Figura 5. Media \pm EE de los porcentajes de establecimiento *in vitro* de L3 de *H. contortus* sobre tejido de la región fúndica abomasal de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. * diferencia significativa entre medias $p < 0.05$;

La figura 6 muestra el porcentaje de asociación de L3 de *H. contortus* sobre tejido de la región pilórica del abomaso. No se observó disminución en el establecimiento en ninguno de los animales de los grupos que recibieron tratamiento con respecto al grupo de corderos testigo en el sacrificio realizado a las 72 horas ($p > 0.05$), aunque un porcentaje menor de establecimiento fue observado en el grupo de animales que recibió L3 de *H. contortus* (29.7 ± 3.77) y el mayor porcentaje de establecimiento de L3 se observó en el grupo de animales tratados con PC más L3 de *H. contortus*, a diferencia de los corderos inoculados con L3 ($60.57 \pm 2.22 > 29.7 \pm 3.77$; $p = 0.009$). No se obtuvieron diferencias entre los tratamientos sobre el porcentaje de establecimiento de L3 en los animales sacrificados a las 2 semanas y el menor porcentaje de asociación de L3 se presentó en el grupo donde se administraron PC y L3 de *H. contortus* (30.4 ± 5.0).

Cuatro semanas después fue posible observar un menor porcentaje de establecimiento de L3 en los animales que recibieron PC en comparación con los ovinos del grupo testigo y el grupo con hemoncosis y tratado con PC ($19.5 \pm 2.8 < 49.5 \pm 8.11$ ($p = 0.03$) y $19.5 \pm 2.81 < 49.5 \pm 3.58$ ($p = 0.011$) respectivamente). Este último, además obtuvo mayores porcentajes de establecimiento que los animales inoculados exclusivamente con L3 ($22.7 \pm 3.11 < 49.5 \pm 3.58$; $p = 0.021$).

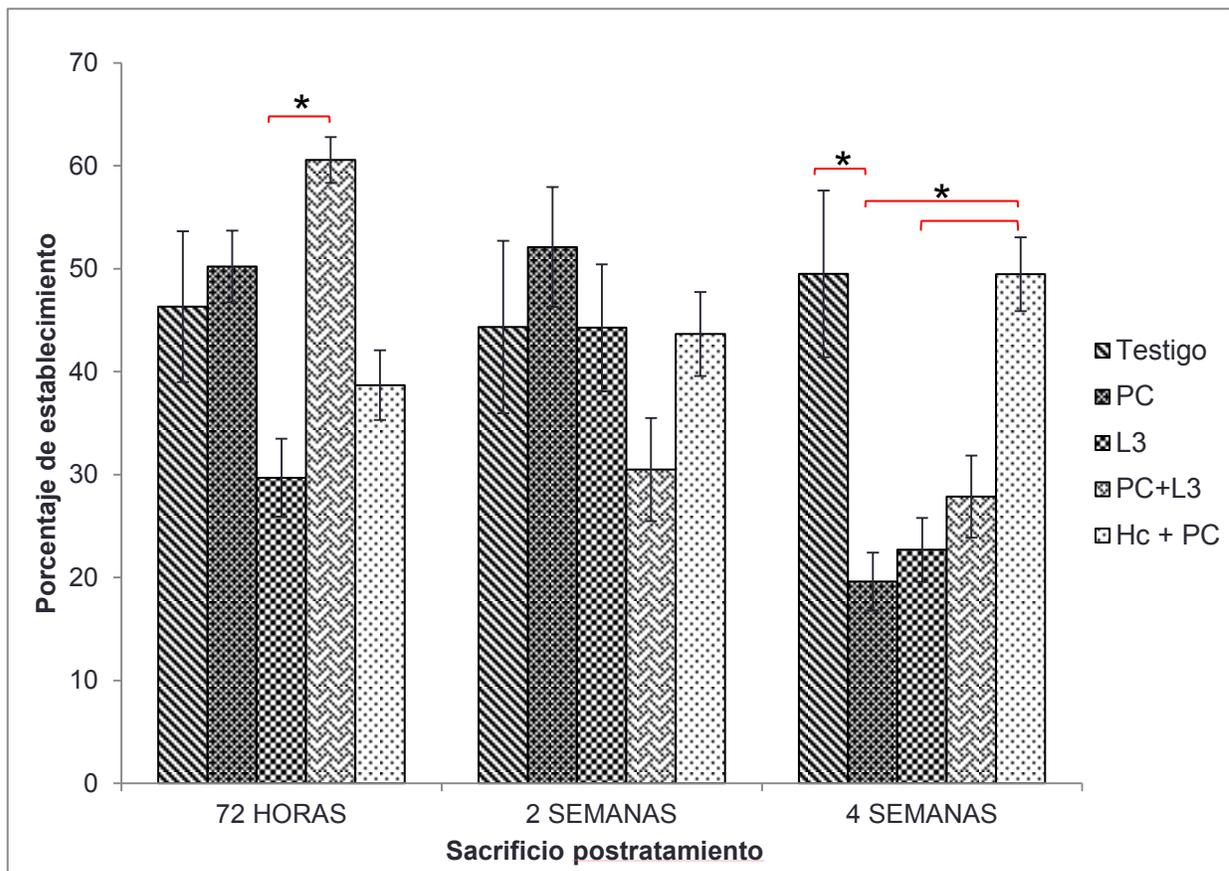


Figura 6. Media \pm EE de establecimiento *in vitro* de los porcentajes de establecimiento de L3 de *H. contortus* sobre tejido abomasal de la región pilórica de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

Concentraciones de cobre (Cu) en tejido hepático, abomasal (región fúndica y pilórica) y contenido de abomaso

Los siguientes figuras muestran las concentraciones de Cu de las distintas muestras obtenidas de los animales sometidos a los distintos tratamientos. En la figura 7 se pueden observar las concentraciones de Cu obtenidas en el tejido hepático, donde una mayor cantidad de Cu se observó en los animales sacrificados a las 72 horas y 2 semanas postratamiento con respecto al testigo (61.5 ± 9.50 vs 28.7 ± 8.43 ; $p=0.03$ y $65.5 \pm 7.03 > 28.7 \pm 8.43$; $p=0.01$). A pesar de que el grupo tratado con PC y L3 de *H. contortus* obtuvo concentraciones elevadas de Cu en hígado, no se encontraron diferencias con respecto al grupo testigo ($p < 0.05$). Finalmente, un valor reducido de cobre se apreció en los ovinos que inoculados con L3 en comparación con los animales tratados con PC en el sacrificio realizado a las 72 horas ($33.2 \pm 4.71 < 65.5 \pm 7.03$; $p=0.02$) y cuatro semanas ($20 \pm 7.78 < 50.6 \pm 13.55$; $p=0.01$). Este fenómeno además ocurrió entre el grupo de PC y los corderos con hemoncosis que recibieron PC sacrificados a las 72 horas y dos semanas de aplicado el tratamiento (65.5 ± 7.03 vs 24.3 ± 4.74 ($p < 0.03$) y 61.5 ± 9.50 vs 20.2 ± 8.45 ($p=0.004$) respectivamente).

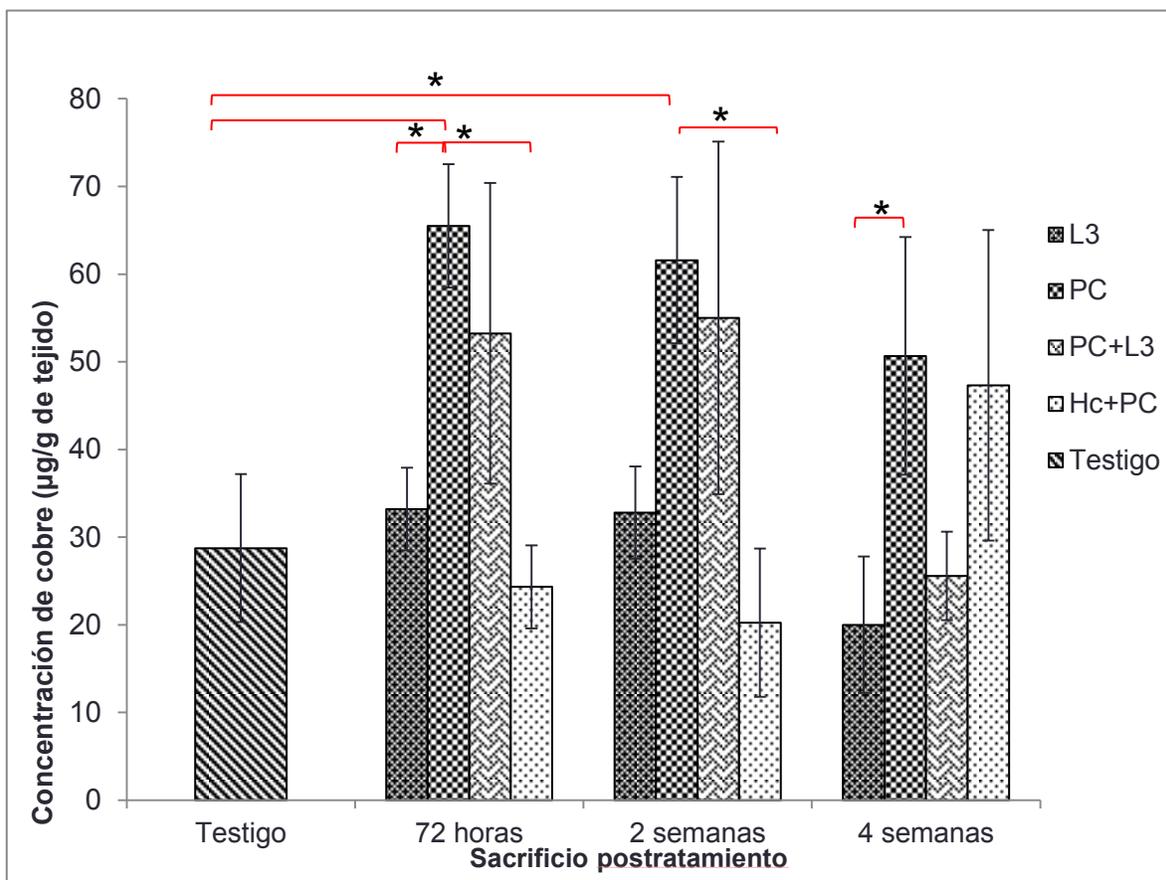


Figura 7. Concentraciones (media±EE) de cobre en hígado de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *Haemonchus contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

La figura 8 muestra las concentraciones de Cu en tejido proveniente de la región fúndica. Una mayor concentración en el grupo tratado con PC en comparación con los animales testigo fue registrada en el sacrificio realizado a las 72 horas ($15.5 \pm 3.07 > 4.5 \pm 1.33$; $p = 0.0003$) y a las 2 semanas ($13.1 \pm 3.53 > 4.5 \pm 1.33$; $p < 0.004$), lapso en el cual además hubo una mayor cantidad de Cu en el tejido de ovinos tratados con PC a diferencia del grupo de animales con hemoncosis tratados con PC ($13.1 \pm 3.53 > 6.3 \pm 1.85$; $p = 0.04$). La cantidad más sobresaliente de Cu se obtuvo del tejido perteneciente a los animales con hemoncosis que recibieron PC y fueron sacrificados a las 72 horas y fue diferente de comparación con los grupos restante sacrificados dentro del mismo lapso (Hc+PC: $24.9 \pm 4.74 >$ testigo: 4.47 ± 1.33 ($p < 0.00001$); L3: 6.69 ± 0.43 ($p = 0.00002$); PC: 15.5 ($p = 0.01$); PC+L3: 6.4 ($p = 0.00006$)).

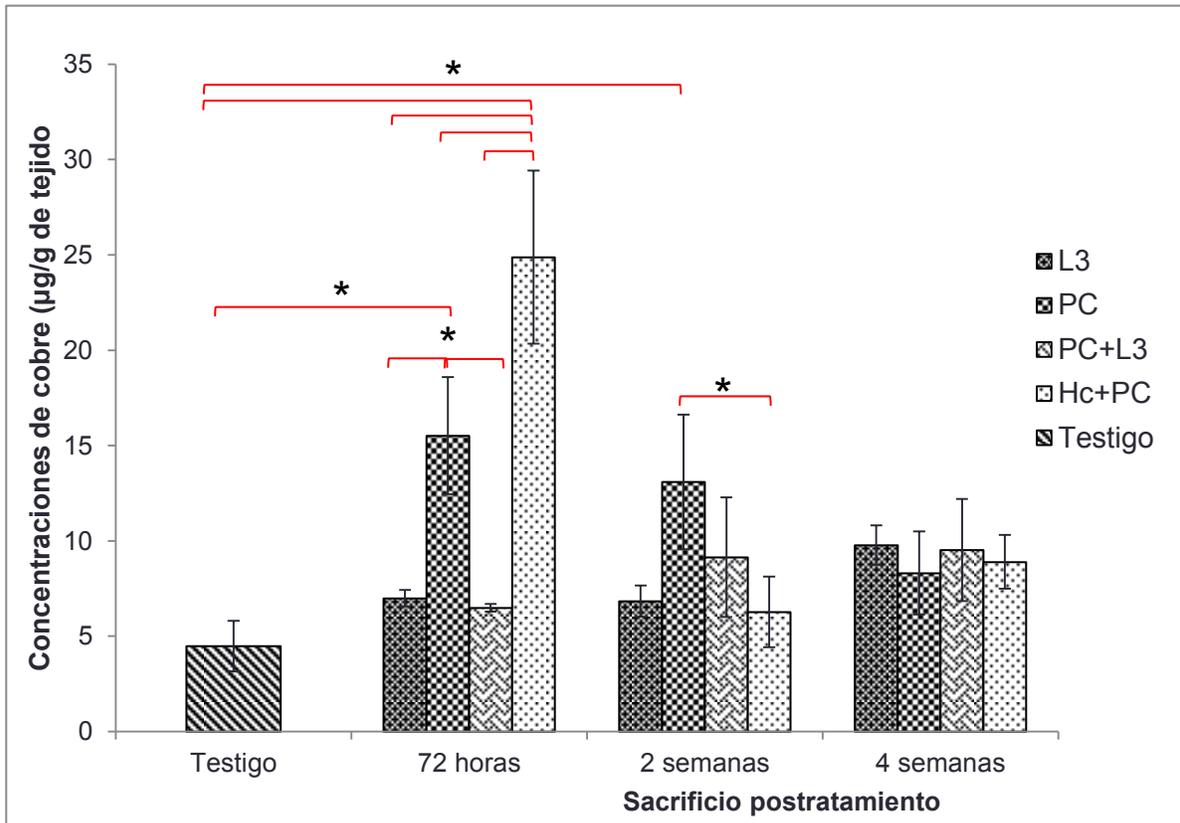


Figura 8. Concentraciones (media±EE) de cobre en tejido abomasal de la región fúndica de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

La figura 9 muestra las concentraciones de elemento en tejido de la región pilórica, donde no se obtuvieron diferencias entre ningún grupo en los distintos momentos de sacrificio ($p < 0.05$), sin embargo, una alta concentración de Cu se encontró en los animales que se sometieron al tratamiento con PC una vez que la infección por *H. contortus* estaba establecida.

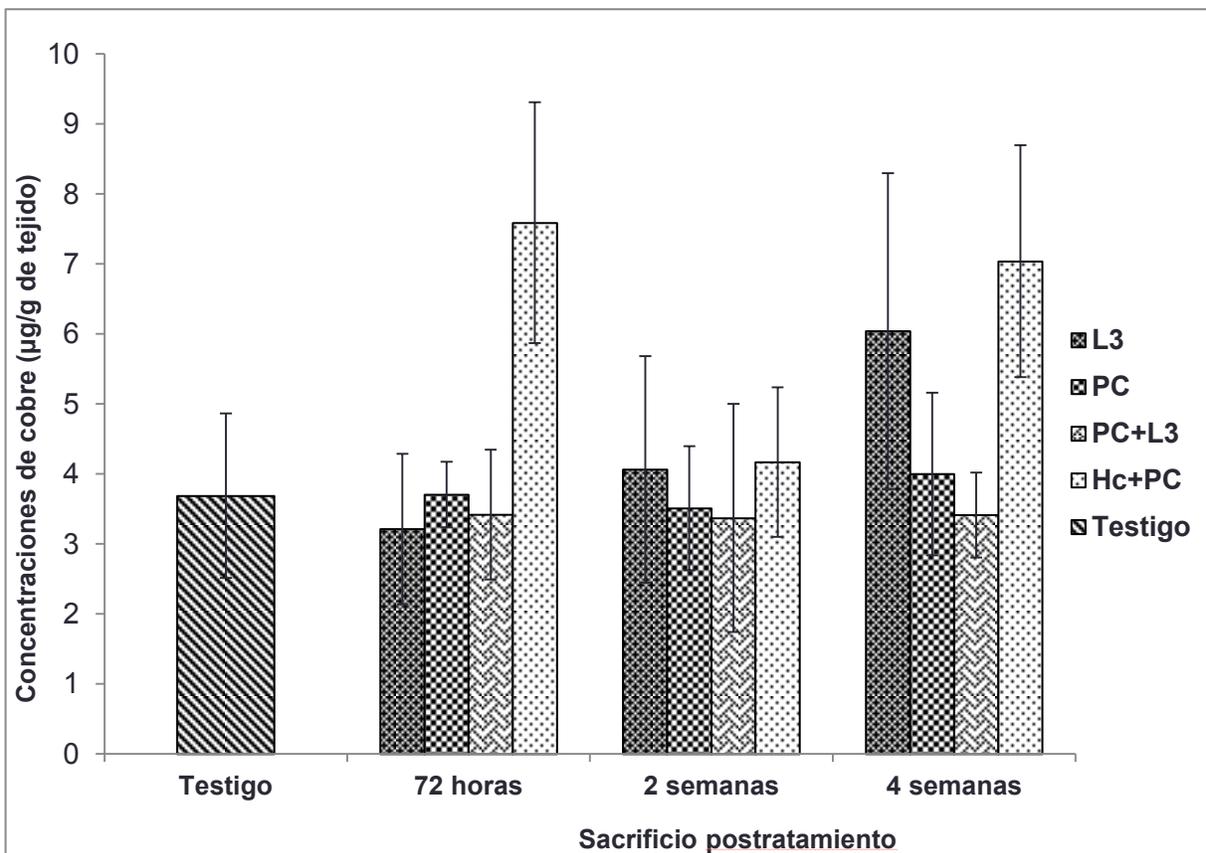


Figura 9. Concentraciones (media±EE) de cobre en tejido abomasal de la región pilórica de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

En la figura 10 pueden apreciarse las concentraciones de Cu en contenido abomasal, donde una mayor cantidad de Cu se obtuvo en los corderos sacrificados a las 72 horas en los grupos PC y PC más L3 de *H. contortus* en comparación con el grupo testigo (Testigo: $5.7 \pm 1.61 < 1217.3 \pm 419.98$ y 1083.4 ± 299.89 ; $P < 0.00001$); el inoculado con L3 (L3: $7.1 \pm 2.58 < 1217.3 \pm 419.98$ ($p = 0.00001$) y 1083.4 ± 299.89 ($p = 0.0001$)); y el de corderos con hemoncosis tratados con PC (Hc+PC: $9 \pm 3.01 < 1217.3 \pm 419.98$ ($p < 0.00006$) y 1083 ± 299.89 ($p = 0.0001$)). Una menor concentración de Cu se presentó a las dos semanas en los grupos tratados con PC y PC más L3; no obstante en el primero los niveles de Cu aún fueron mayores que en la mayor parte de los grupos (PC: $117.9 \pm 19.99 > \text{testigo: } 5.7 \pm 1.61$ ($p = 0.03$); L3: 6.2 ± 2.27 ($p = 0.0095$); PC+L3: 10.7 ± 2.24 ($p = 0.02$) con excepción del grupo con hemoncosis tratado con PC. Este último grupo además fue mayor respecto al testigo ($62.4 \pm 33.42 > 5.7 \pm 1.61$;

p<=0.01) y al grupo inoculado con L3 ($62.4\pm33.42 > 6.2\pm2.27$; p=0.03). Cuatro semanas después una menor concentración de Cu se obtuvo del tejido de la mayor parte de los ovinos, con excepción de aquellos pertenecientes al grupo con infección establecida y tratamiento con PC, que mostro valores muy similares con su homólogo tratado dos semanas antes del sacrificio.

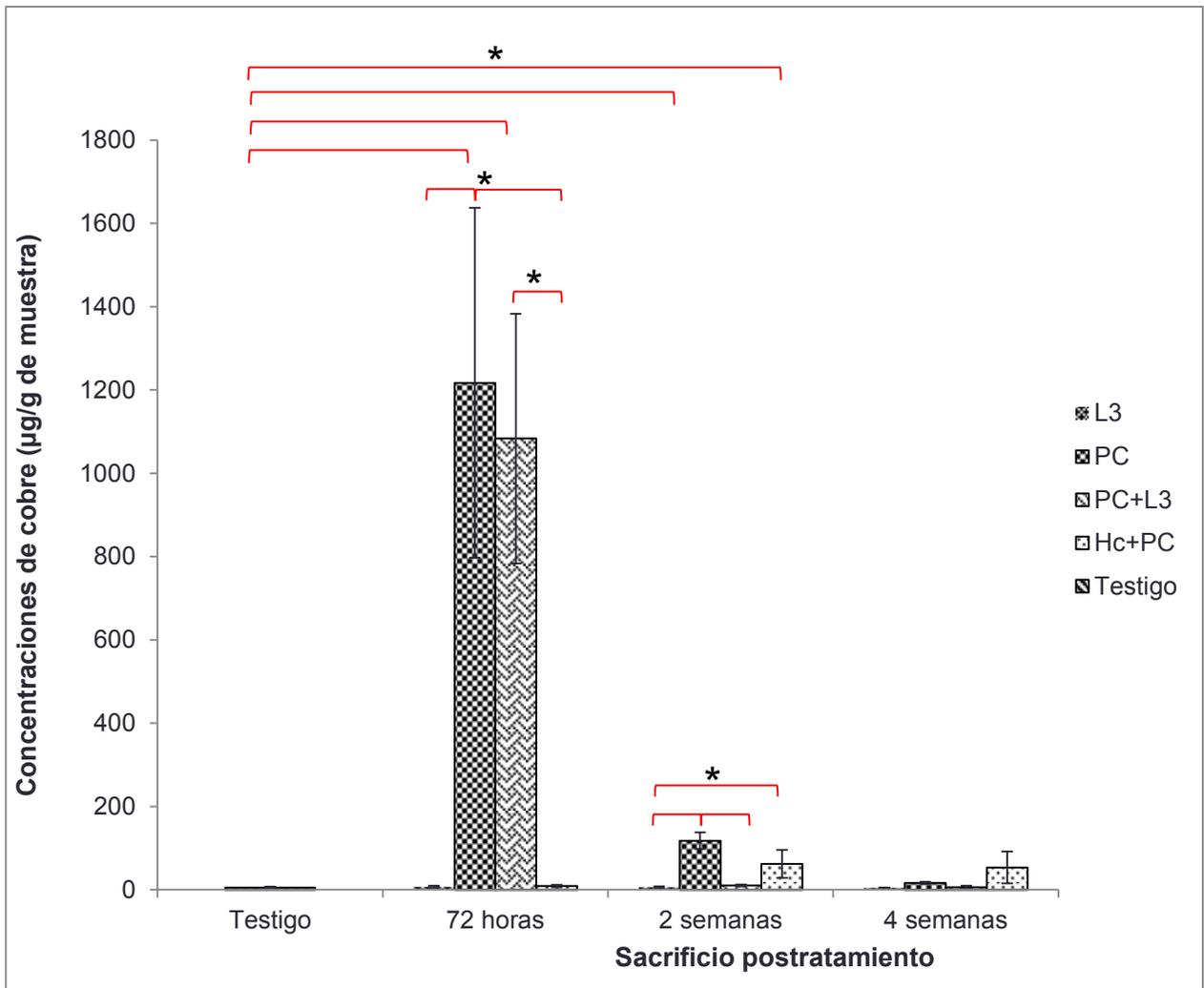


Figura 10. Concentraciones (media±EE) de cobre en contenido abomasal de ovinos sometidos a distintos tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *Haemonchus contortus*. *diferencia significativa entre medias p<0.05.

Cantidad de células cebadas en tejido de la región fúndica y pilórica

A continuación se presenta la cantidad de células cebadas por cm^2 en tejido de la región fúndica. Aquí puede observarse que la mayor concentración de células fue encontrada en los animales con infección establecida y tratados con PC 72 horas antes del sacrificio a diferencia de los animales tratados únicamente con PC ($9.9 \pm 2.01 > 2.6 \pm 0.42$; $p=0.02$). No aparecieron más diferencias entre ninguno de los grupos conforme transcurrió el tiempo restante del experimento.

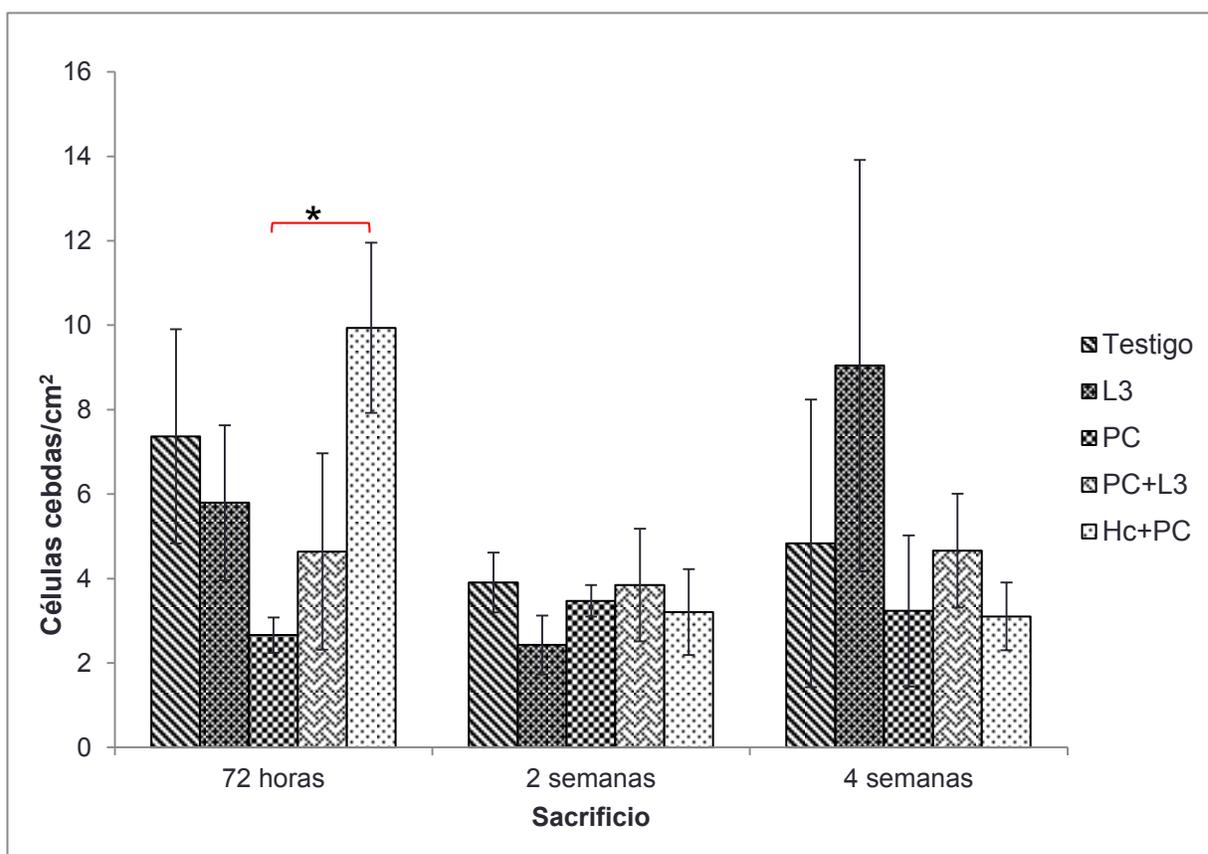


Figura 11. Media (\pm EE) del número de células cebadas por cm^2 en la región fúndica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *Haemonchus contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

En la figura 12 se presenta el total de células cebadas por cm^2 en tejido de la región pilórica. Al igual que en la región fúndica se observa un menor número de células en el grupo que recibió únicamente PC 72 horas antes del sacrificio y tuvo un valor más reducido que el grupo testigo y el tratado con L3 de *H. contortus*

($3.6 \pm 0.68 < 11.8 \pm 1.88$ ($p=0.008$) y $3.6 \pm 0.68 < 13.1 \pm 3.58$ ($p=0.01$) respectivamente). En el sacrificio realizado a las dos semanas, el mayor número de células cebadas se encontró en el grupo de ovinos testigo, a diferencia de los corderos inoculados con L3 ($17.3 \pm 0.57 > 2.1 \pm 0.80$; $p=0.002$), los animales que recibieron PC y L3 ($17.3 \pm 0.57 > 2.8 \pm 1.52$; $p<0.008$) y los ovinos con hemoncosis tratados con PC ($17.3 \pm 0.57 > 5.2 \pm 2.09$; $p<0.04$). En este lapso de tiempo, los ovinos tratados con PC también obtuvieron un mayor cantidad de células cebadas en comparación con los animales inoculados con L3 ($10.4 \pm 4.43 > 2.1 \pm 0.80$; $p<0.007$) y con el grupo con hemoncosis que tratado PC ($10.4 \pm 4.43 > 5.2 \pm 2.09$; $p=0.02$). Finalmente en los animales sacrificados a las cuatro semanas de la aplicación de los tratamientos no se observó desigualdad.

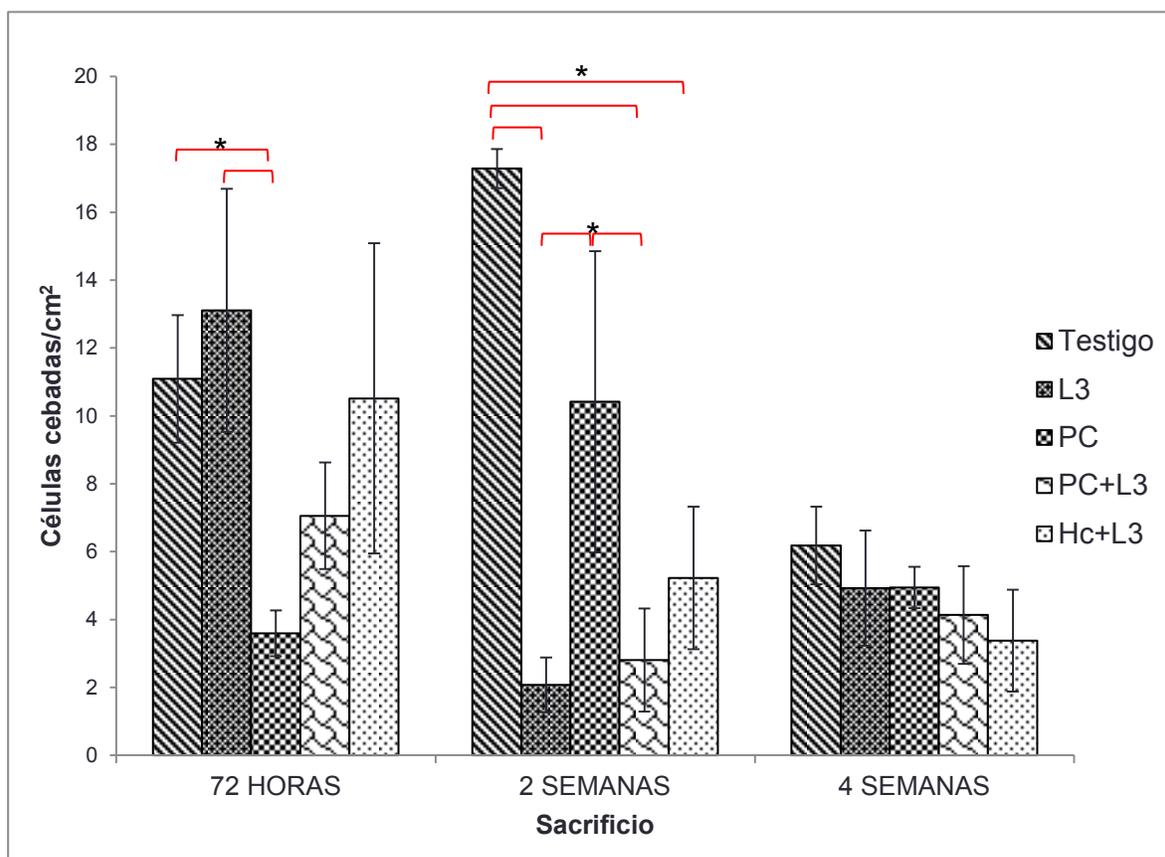


Figura 4. Media (\pm EE) del número de células cebadas por cm^2 en región pilórica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *Haemonchus contortus*. *diferencia significativa entre medias $p<0.05$.

Cantidad de eosinófilos en tejido de la región fúndica y pilórica

En la figura 13 se puede apreciar la cantidad de eosinófilos/cm² en tejido de la región fúndica. Puede observar que en el sacrificio realizado a las 72 horas, el mayor número de células se registró en los corderos tratados con PC y L3 y en los animales con hemoncosis que recibieron PC en comparación con el grupo testigo ($29.9 \pm 8.26 > 7.2 \pm 6.21$ ($p < 0.05$) y $30.8 \pm 10.38 > 7.2 \pm 6.21$ ($p < 0.05$) respectivamente), con el grupo inoculado con L3 de *H. contortus* ($29.9 \pm 8.26 > 9.1 \pm 3.16$ ($p < 0.05$) y $30.8 \pm 10.38 > 9.1 \pm 3.16$; ($p < 0.05$) respectivamente) y finalmente con el grupo tratado con PC ($29.9 \pm 8.26 > 4.6 \pm 1.89$ ($p < 0.05$) y $30.8 \pm 10.38 > 4.6 \pm 1.89$ ($p < 0.05$) respectivamente). Dos semanas después, el número mayor de células perteneció a los animales inoculados con L3 y fue diferente respecto al grupo testigo y al grupo tratado con PC (L3: $102.5 \pm 32.79 >$ testigo: 7.1 ± 3.79 ($p < 0.021$); PC: 3.19 ± 1.32 ($p = 0.0002$). Dentro de este mismo lapso, el grupo de animales tratados con PC y L3 y el de hemoncosis tratado con PC obtuvo un mayor número de células a diferencia de los animales del grupo testigo ($34.2 \pm 0.53 > 7.1 \pm 3.79$ ($p = 0.03$) y $35 \pm 27.56 > 7.1 \pm 3.79$ ($p = 0.03$)). Un número reducido de células grupo tratado con PC también fue observado en los animales sacrificados a las dos semanas y con excepción de los animales testigo, fue diferente en comparación con los grupos restantes (PC: $3.19 \pm 1.32 < L3: 102.4 \pm 32.79$ ($p = 0.000002$); PC+L3: 34.2 ± 0.53 ($p = 0.0002$); Hc+PC 35 ± 27.56 ($p = 0.001$)). Cuatro semanas después, la mayor cantidad de células se observó en los ovinos inoculados con L3 y fue mayor que en los demás grupos (L3: $130.1 \pm 30.83 >$ Testigo: 3.8 ± 2.83 ($p < 0.00001$); PC: 10.7 ± 25.32 ($p < 0.00001$); PC y L3: 29.9 ± 6.07 ($p = 0.006$); Hc+L3: 14.1 ± 3.37 ($p = 0.0003$)). Por último, a las cuatro semanas una mayor cantidad de células el grupo tratado con PC y L3 al igual que el grupo de hemoncosis y tratamiento con partículas comparado con el testigo ($29.9 \pm 6.07 > 3.8 \pm 2.83$ ($p = 0.003$) y $14.1 \pm 3.37 > 3.8 \pm 2.83$ ($p = 0.04$)).

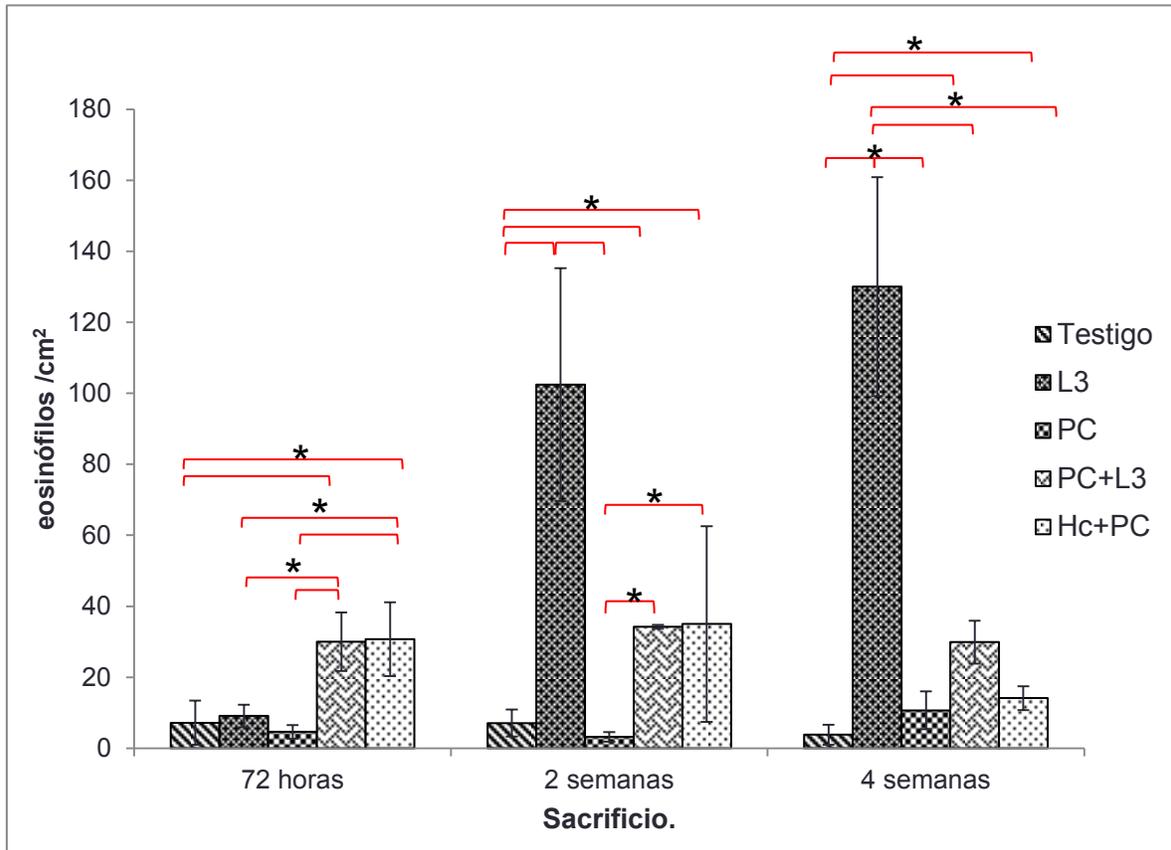


Figura 5. Media (\pm EE) del número de eosinófilos por cm^2 en región fúndica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *Haemonchus contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

Respecto a las cantidad de eosinófilos en la región pilórica del abomaso, la figura 14 muestra como el número de células por cm^2 en los corderos sacrificados a las 72 horas fue mayor en los grupos tratados con PC más L3 y en los animales con hemoncosis y tratados con PC en comparación con el testigo (Testigo: $2.9 \pm 0.20 < \text{PC} + \text{L3}: 42.5 \pm 13.22$ ($p = 0.0004$) y $\text{Hc} + \text{PC}: 32.3 \pm 3.80$ ($p = 0.002$)). Además, el grupo de animales con PC y L3 tuvo una mayor concentración de células en este último el grupo de animales inoculados con L3 en este mismo lapso ($11.3 \pm 8.16 < 42.5 \pm 13.22$; $p = 0.01$). Transcurridas dos semanas, una mayor cantidad de células se observó en el grupo que recibió L3 y el tratado con PC e inoculado con L3 en comparación con el testigo ($84.5 \pm 27.52 > 16.2 \pm 12.5$ ($p = 0.007$) y $181.4 \pm 81.36 > 16.2 \pm 12.5$ ($p < 0.0004$) respectivamente), por otro lado una menor concentración de células se observó en el grupo tratado con PC en comparación

con los animales inoculados con L3 ($PC:5.15\pm1.67 < L3:84.47\pm27.52$ ($p=0.00009$) y los tratados con PC y L3 ($5.15\pm1.67 < 181.4\pm81.36$; $p=0.000003$). Este último tuvo una mayor cantidad de eosinófilos que el grupo con hemoncosis y tratado con PC ($181.4\pm81.36 > 17.2\pm2.59$; $p < 0.001$). Al final del experimento (4 semanas postratamiento) la cantidad de células en los corderos inoculados fue mayor en relación con casi todos grupos (L3: $125.7\pm65.69 > \text{Testigo}: 9.7\pm2.54$ ($p=0.001$); PC: 48.5 ± 18.85 ($p=0.003$); Hc y PC: 18 ± 5.12 ($p=0.005$)) con excepción del conjunto de los animales tratados con PC y L3, el cual obtuvo conteos de células más elevados que el grupo testigo ($48.5\pm18.85 > 9.7\pm2.54$ ($p=0.03$)).

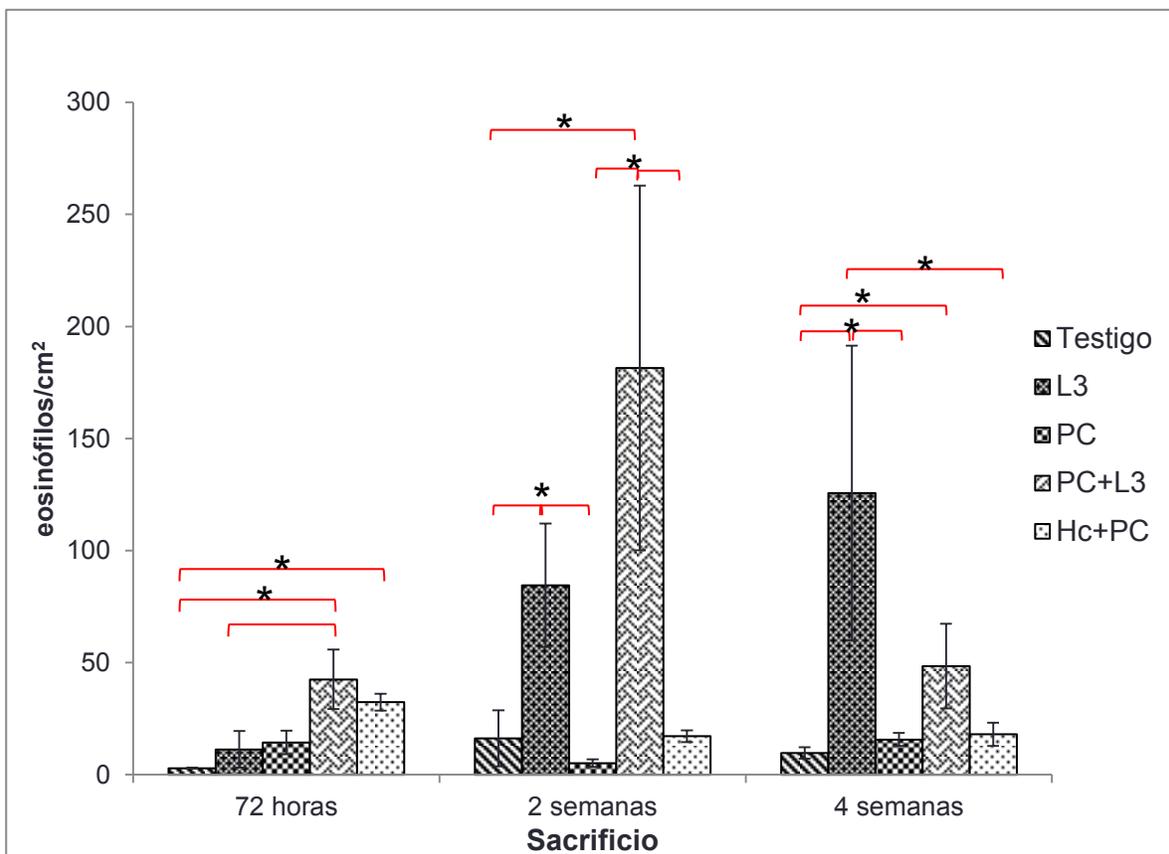


Figura 6. Media ($\pm EE$) del número de eosinófilos por cm^2 en la región pílorica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa entre medias $p < 0.05$.

Cantidad de leucocitos globulares en tejido de la región fúndica y pilórica

El total de leucocitos globulares (LG) encontrados en la región fúndica se muestra en la figura 15. Fue posible observar a las 72 horas que el grupo con hemoncosis y tratado con PC tuvo el mayor número de LG en comparación con el resto de los grupos (Hc+PC: 95.8 ± 57.27 > Testigo: 0.8 ± 0.80 ($p=0.0003$); L3: 7.6 ± 4.00 ($p=0.00007$); PC: 0.6 ± 0.11 ($p<0.00001$); PC+L3: 0.7 ± 0.38 ($p<0.00001$). Además, el conjunto de animales inoculados con L3 obtuvo un mayor número de LG que los ovinos tratados con PC ($7.6 \pm 4.00 > 0.6 \pm 0.11$ ($p=0.02$)) y partículas en conjunto con L3 ($7.6 \pm 4.00 > 0.7 \pm 0.38$ ($p=0.01$)). Por otro lado, no se hallaron diferencias entre ninguno de los grupos de animales sacrificados a la segunda semana. Finalmente, a las cuatro semanas una mayor cantidad de LG en los animales tratados con L3 generó diferencias en comparación con los demás grupos (L3: 25.1 ± 15.54 > Testigo: 1.22 ± 0.80 ($p<0.01$); PC: 2.4 ± 0.84 ($p<0.004$); PC+L3: 2.98 ± 2.77 ($p<0.001$); Hc+PC: 2.2 ± 0.87 ($p<0.005$)).

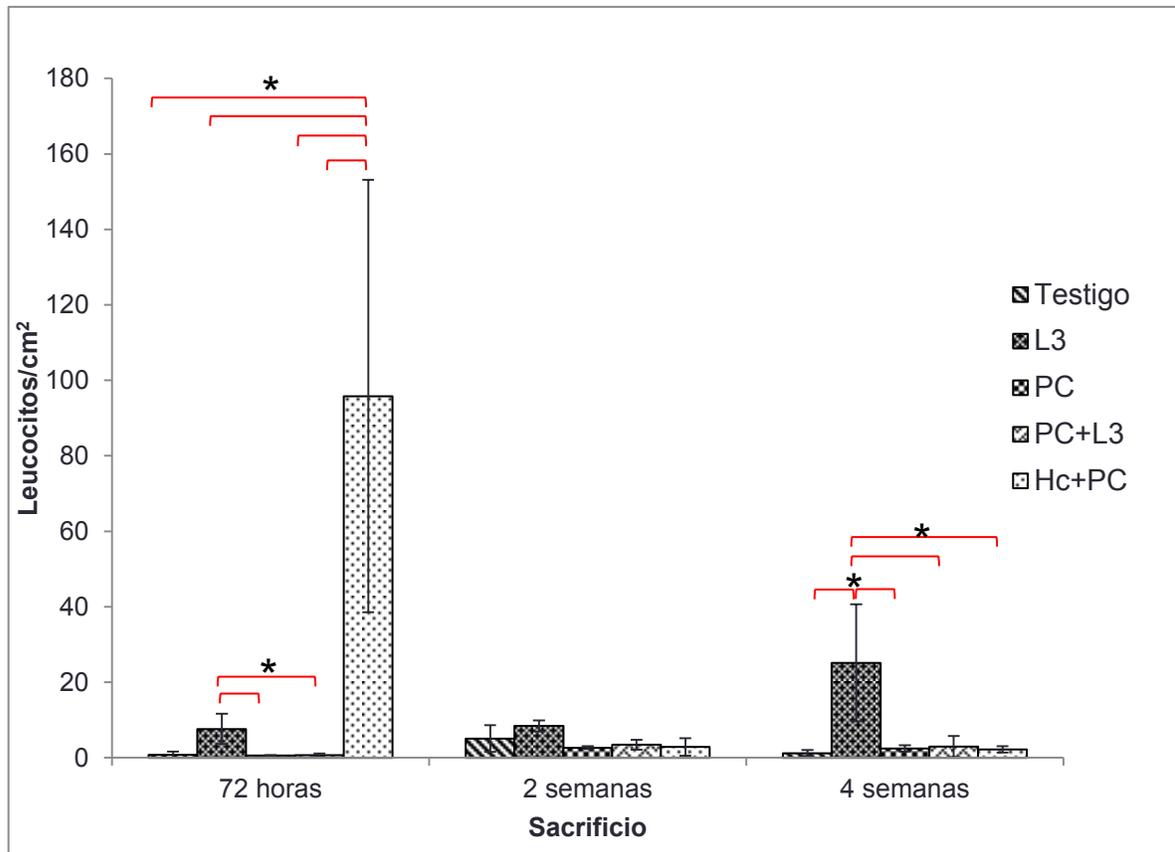


Figura 7. Media (\pm EE) del número de leucocitos globulares por cm^2 en la región fúndica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa de medias $p < 0.05$.

Finalmente, en la figura 16 puede observarse un número mayor de LG en la región pilórica en el grupo de animales inoculados con L3 en comparación con el grupo testigo, tratado con PC y con el de ovinos con hemoncosis que recibieron PC en los individuos sacrificados en la cuarta semana ($5.3 \pm 3.53 > 0.4 \pm 0.22$ ($p=0.004$), 0.3 ± 0.27 ($p=0.042$) y 0.1 ± 0.13 ($p=0.01$); no obstante, puede observarse que el valor más elevado se obtuvo a las 72 horas en el grupo de animales con hemoncosis aunque no fue estadísticamente diferente del resto.

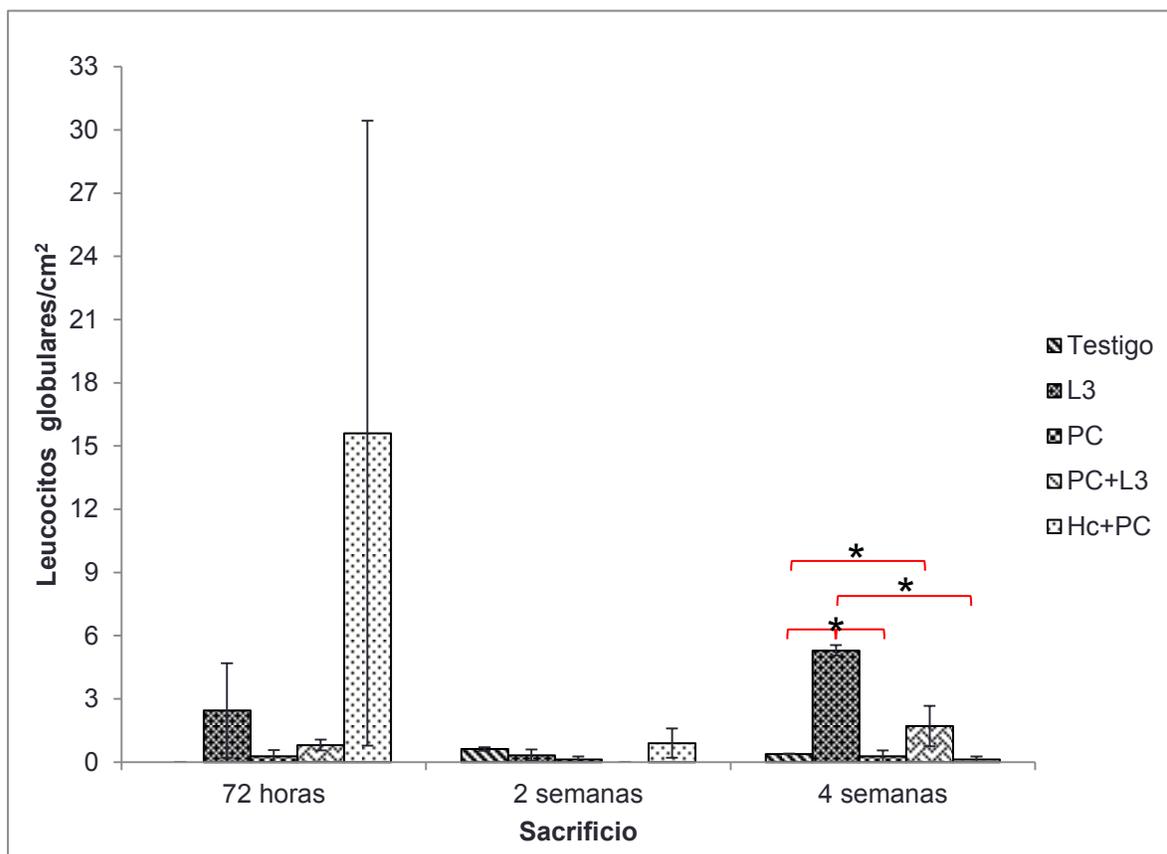


Figura 8. Media (\pm EE) del número de leucocitos globulares por cm^2 en la región fúndica abomasal de ovinos sometidos a diferentes tratamientos con partículas de óxido de cobre y L3 de *H. contortus*. *diferencia significativa de medias $p < 0.05$.

Análisis de correlación.

Respecto a las correlaciones en los diferentes tratamientos, en el grupo tratado con PC no existió asociación entre las concentraciones de Cu en hígado, fondo, píloro y contenido abomasal, el establecimiento *in vitro* de L3 de *H. contortus* y las células presentes en la mucosa abomasal ($p > 0.05$). Por otro lado, en el grupo tratado con PC y L3, una correlación negativa elevada (-0.772) se observó entre las concentraciones de Cu en tejido de la región fúndica abomasal y el establecimiento de L3 ($p = 0.015$). En relación con el grupo de ovinos con hemocosis y tratados con PC, una correlación positiva media-alta se presentó entre la cantidad de cobre en tejido del fondo del abomaso, el establecimiento larvario (0.674; $p = 0.47$) y la cantidad de células cebadas en la mucosa fúndica (0.780; $p = 0.13$). Por último en relación con los adultos, no existió correlación entre

las concentraciones de Cu en fondo, la la celularidad y la disminución de la población de adultos y el porcentaje de establecimiento larvario.

DISCUSIÓN

La infección por el nematodo abomasal *H. contortus* en ovinos provoca pérdidas productivas asociadas con los hábitos hematófagos del parásito y las alteraciones que ocasiona en la fisiología abomasal, las cuales derivan en mal digestión y mala absorción de nutrientes. El tratamiento con partículas de óxido de cobre se ha utilizado desde hace tiempo contra las fases adultas de *H. contortus* (Burke y Miller, 2004, 2006; Chartier y col., 2000). En nuestro ensayo, el tratamiento con PC redujo en un 95.65 % el número de fases adultas desde las 72 horas de aplicadas las PC en comparación con el grupo con infección. Esta eficacia es similar a la obtenida en otros trabajos (Bang y col., 1990a y Waller, 2004). Por otro lado la reducción en las fases adultas coincidió con una elevada concentración de Cu en tejido abomasal observada 72 horas de aplicado el tratamiento, aunque no existió correlación entre ambos parámetros ($p < 0.05$). Estos datos indican que puede existir un efecto inmediato sobre las fases adultas del parásito que aparentemente está relacionado con una acción tóxica de las PC según lo reportado anteriormente en otros estudios (Bang y col. 1990^a).

Por otro lado, aunque se sabe que alteraciones en la fisiología abomasal observadas en la infección por adultos de *H. contortus* se originan desde el momento en que la larva infectante del parásito (L3) entra en contacto con la mucosa del órgano y continúan durante el desarrollo del verme (Christie y col., 1978), la mayor parte de las estrategias para el control de la enfermedad están dirigidas hacia las fases adultas del parásito. Actualmente existe poca información disponible sobre la utilización de las PC para la prevención de la infección por las fases larvianas del parásito (Galindo y col., 2011; Waller; 2004; Vatta, 2009). En los estudios realizados en este trabajo probando el efecto de la administración oral PC en ovinos sobre el establecimiento *in vitro* de L3 en tejido de fondo y píloro se obtuvo una disminución en la cantidad de larvas recuperadas del tejido cuatro semanas después de la aplicación y este evento coincidió con los niveles más bajos de Cu en hígado, tejido y contenido abomasal encontrados durante todo el experimento. Nuestros hallazgos contrastan con lo reportado por otros autores,

quienes en estudios *in vivo* tomando en cuenta la cantidad de parásitos adultos hallados a la necropsia para determinar el porcentaje de establecimiento, encontraron relación entre las elevadas concentraciones del mineral en hígado y las reducciones observadas en el establecimiento larvario (Galindo y col., 2011; Waller; 2004; Vatta, 2009), sin embargo la dosis de PC y el momento de aplicación no son similares a las utilizadas en este trabajo. Los datos encontrados en nuestro ensayo sugieren que no existe un efecto tóxico directo sobre de las PC las fases larvarias del parásito, por lo que el mecanismo de acción puede involucrar factores más complejos.

En relación con la concentración de Cu en muestras de hígado, otros autores han reportado incrementos en tejido hepático después de la administración de PC (Burke y Miller, 2006; Vatta, 2009). Las concentraciones de Cu en hígado obtenidas en este trabajo en los grupos de ovinos tratados con PC y PC más L3 respondieron positivamente poco tiempo después de la administración de las PC a diferencia de lo ocurrido en los animales con hemoncosis, donde un aumento en la concentración de Cu hepático se presentó cuatro semanas después de la aplicación del tratamiento y coincidió con una disminución en los niveles de Cu hepático en los ovinos con infección en curso. El fenómeno observado en los grupos con infección en progreso y con hemoncosis y tratados con PC puede deberse a las alteraciones en el organismo ocasionadas por el parasitismo, puesto que bajo esta condición se ha reportado una reducción en los niveles de cobre hepático y puede ser reflejo de la hipoalbuminemia causada por la afección (Hucker y Yong, 1986), debido a que el transporte de cobre hacia el hígado depende de albumina (Hellman y Gitlin, 2002). Además, durante una infección gran parte del cobre se encuentra en circulación unido a ceruloplasmina (Mills, 1987) y este fenómeno podría afectar las concentraciones de Cu en hígado. Todas las alteraciones mencionadas anteriormente explican la elevación del cobre hepático conforme la infección comenzara a ceder en los animales con hemoncosis y tratados con PC y están relacionadas con la disminución en los niveles de Cu hepático en los animales con infección en curso. Por lo tanto, es evidente que existe una relación entre la parasitosis y los niveles de Cu hepático.

Un fenómeno similar al observado en hígado ha sido reportado con anterioridad en relación con la concentración de cobre en contenido abomasal (Langlands y col., 1989). Los resultados obtenidos en este ensayo a partir del contenido de abomaso de los ovinos que recibieron PC o que alojaron en sus abomasos partículas por un periodo previo antes de la inoculación con L3, tuvieron cantidades considerables del elemento transcurridas 72 horas de la administración de las PC a diferencia de los animales con hemoncosis tratados con PC, donde el incremento en los niveles de Cu se manifestó dos semanas después del tratamiento y no llegó a ser tan elevado como en los dos grupos anteriores al inicio del tratamiento. Este fenómeno puede relacionarse con el incremento sobre el pH abomasal ocasionado por la hemoncosis (Dakkak y col., 1981; Nicholls y col., 1987, Simpson y col., 1997), el cual interfiere con la liberación del cobre desde las PC (Bang y col. 1990b). Por lo tanto, los bajos niveles encontrados en los animales con hemoncosis se relacionan en un principio con la infección y el incremento posterior con la resolución de la parasitosis. Un evento contrastante ocurrió en el tejido de los ovinos tratados con PC, donde altas concentraciones de Cu fueron encontradas al inicio del tratamiento, sin embargo, el mayor efecto sucedió en los animales con hemoncosis que recibieron PC, lo cual sugiere que las diferencias entre tejido y contenido pueden influenciar enormemente las concentraciones dependiendo de la localización. Este evento podría tener relación con la naturaleza de las partículas de óxido de cobre, las cuales se alojan en los pliegues del abomaso (Waller, 2004), permaneciendo en estrecho contacto con la mucosa del órgano y con la secreción ácida de las glándulas del órgano, independientemente de las modificaciones en el pH observadas en el contenido abomasal a causa del parasitismo. Asimismo esta baja concentración del contenido abomasal evidentemente pudo influir en las bajas concentraciones de Cu hepáticas en el grupo de ovinos con hemoncosis y PC.

Debido a que no se ha establecido una asociación convincente entre tratamiento con PC y su efecto antihelmíntico sobre *H. contortus*, la hipótesis de

este trabajo incluyo la posibilidad de que las alteraciones en la mucosa abomasal ocasionadas por su interacción con las PC, que en este ensayo se valoraron por medio del infiltrado de células que intervienen en un proceso parasitario, pudiesen impedir la infección por *H. contortus*.

La respuesta inespecífica hacia *H. contortus* en los ovinos se caracteriza por la presencia de células cebadas, eosinófilos y leucocitos globulares (Charleston, 1965; Huntley y col., 1992; Balic y col., 2000; Balic y col. 2002; Balic y col. 2005; Rainbird y col., 1998; Schaling, 2000; Rothenberg y Hogan, 2006), por lo tanto, se esperaba encontrar un incremento en estas poblaciones celulares posteriores al tratamiento con PC que a su vez se relacionara con elevadas concentraciones de cobre en tejido y contenido abomasal y explicara el efecto negativo sobre la infección por *H. contortus*, sin embargo durante todo el experimento no se observó ningún indicio que apoyase nuestra hipótesis, por ejemplo, en los ovinos tratados exclusivamente con PC, no existió ninguna correlación entre el número de células y la concentración de cobre en tejido y contenido abomasal a pesar del efecto sobre negativo sobre el porcentaje de establecimiento larvario. Por otro lado, un mayor número de mastocitos y leucocitos globulares fue encontrado en el tejido fúndico y pilórico de los animales con hemoncosis 72 horas después del tratamiento con PC, aunque únicamente existió correlación positiva entre los mastocitos y la cantidad de cobre en tejido de la región fúndica. Este hallazgo coincidió con la reducción en la población de parásitos adultos y puede estar relacionada con la resolución de la infección, ya que la presencia de estas células, en particular de los leucocitos globulares, ha sido ampliamente relacionada con la expulsión de parásitos del tracto gastrointestinal (Stankiewics y col., 1993; Ortalani y col., 2013; Nikander 1991). Un fenómeno interesante fue el hecho de que los altos número de leucocitos globulares se observó cuando se presentaron las concentraciones más elevadas de Cu en tejido fúndico del abomaso y aunque no se observó un correlación entre la concentración de Cu y los LG, no puede descartarse que la presencia de PC pudiese haber tenido influencia sobre este tipo celular, debido a que se ha descrito la capacidad del cobre para inducir la degranulación de las células cebadas (Oliveira y col., 1995) y puesto que algunos

autores sugieren que este tipo celular y los leucocitos globulares están estrechamente emparentados (Rothwell, 1989; Nikander 1991) posiblemente el cobre sobre pueda influir en la actividad de los LG.

Existe escasa información acerca de la relación del cobre y los eosinófilos (Percival, 1998). Una mayor cantidad de estas células se observó en los animales tratados con PC y L3 72 horas antes del sacrificio durante todo el experimento en comparación con el grupo inoculado con L3 72 horas antes del sacrificio, además obtuvo una mayor reducción sobre el establecimiento larvario respecto a los animales tratados exclusivamente con PC y fue similar al grupo inoculado con L3. Asimismo, esta reducción en el establecimiento tuvo una correlación positiva con la concentración de Cu en tejido de la región fúndica. Lo anterior podría indicar que existe un efecto directo del cobre que impide el establecimiento larvario. Sin embargo debido a que este grupo no fue exclusivamente tratado con cobre y este comportamiento no fue observado en los animales que solo recibieron PC, se sugiere que puede existir un efecto combinado de ambos tratamientos. En contraste con los animales tratados con PC y L3, en los ovinos con hemoncosis que recibieron PC, a pesar de la infección, no fue posible apreciar cantidades considerables de eosinófilos, y un ligero incremento se presentó conforme las concentraciones de cobre comenzaron a descender. Este efecto observado sobre los eosinófilos en los animales con hemoncosis y PC puede tener una estrecha relación con los leucocitos globulares, ya que se ha observado una relación inversamente proporcional entre estos dos tipos celulares (Balic, 2002; Kemp y col., 2009).

Aunque aparentemente existe una relación entre la celularidad, las concentraciones elevadas del mineral y la reducción sobre la población de adultos que sugieren un efecto tóxico según lo reportado (Bangs y col., 1990a; Chang y col., 2012), esto no explica del todo el efecto del cobre sobre el establecimiento larvario. Por lo tanto se sugiere que pueden existir otros mecanismos involucrados con la reducción en el establecimiento más allá de un efecto tóxico directo o una respuesta mediada por células. Algunos autores han demostrado el efecto irritativo que se desencadena por el contacto de diversos tejidos con cobre (Schmalz y col.,

1997, Mishell, 1998; Suska y col., 2001; 2003; 2005; Hujanen y col., 1995, Kennedy y col., 1998) incluyendo mucosa de tejido estomacal, donde se observó aumento en la secreción de mucina en la mucosa del estómago relacionada con el aumento en la producción de prostaglandina 2 α (PGF-2 α) mediada por el cobre (Rainsford y Whitehouse 1976; Lewis, 1978; Franco y Velo, 1996).

El fenómeno anteriormente mencionado no fue considerado en este estudio, sin embargo su importancia radica en la posibilidad de que se hubiera presentado un aumento en la secreción de mucina en el estómago ocasionada por el cobre que pudiese explicar la reducción en el establecimiento de L3 de *H. contortus* en los animales tratados con PC, debido a que el papel de la mucina como una barrera inespecífica contra patógenos, incluyendo parásitos es ampliamente reconocido (Gururaja y col., 1999; Kawakubo y col., 2004; Hasnain y col., 2011). Aunado a lo anterior se ha sugerido que la mucina puede estar involucrada inclusive en el proceso de asociación del parásito, que podría reconocer su nicho por un proceso análogo a la interacción del receptor ligando. Esta propuesta surgió debido a que existen variaciones regionales en la composición y grosor de la mucina gastrointestinal, aunado a una gran cantidad de glicoproteínas y glicolípidos que pueden proveer una señal apropiada o un punto de unión para las larvas (Miller, 1987, Castro, 1982).

Además, otros autores han observado que en ovinos inmunizados por inoculación diaria con bajas dosis de larvas infectivas con larvas, las propiedades y la distribución de la de la mucina se modifican presentándose una reducción en la mucina neutra dentro del epitelio de superficie y un incremento en la mucina ácida en el interior de las glándulas. Además, en estos ovinos, gran parte de las larvas se adhieren a la superficie de la mucosa y solo una pequeña proporción entran a la glándula abomasal. Aunado a estas alteraciones, se ha observado que algunas sustancias presentes en el moco, como los leucotrienos liberados desde los mastocitos tienen efecto inhibitorio sobre la motilidad larvaria (Newland, 1990; Miller, 1984; Douch y col., 1983).

Por otro lado se ha descrito que existen alteraciones en la permeabilidad de la mucosa después de una primoinfección por vermes, lo cual deriva en pérdida de

proteínas plasmáticas en la luz del órgano, un aumento en la respuesta secretora de las glándulas productoras de moco y cambios inflamatorios en la mucosa conforme las células se acumulan. Los efectos combinados son capaces de alterar la calidad y la composición del moco superficial (Miller, 1987). La importancia de este fenómeno para este trabajo radica en un hallazgo incidental no cuantificado que consistió en congestión de la mucosa del abomaso de los corderos que recibieron partículas de cobre, acompañada por una gran cantidad de mononucleares, presuntamente linfocitos y células plasmáticas. La presencia de linfocitos en animales tratados con PC fue descrita por Judson en 1982 sin embargo, fue relacionada con la parasitosis abomasal que presentaban estos animales. Este tipo de células en la mucosa abomasal se ha asociado con afecciones por parásitos (Charleston, 1965, Balic y col., 2002), en particular linfocitos T CD4+, $\gamma\delta$ -TCR+ o linfocitos B secretores de inmunoglobulina A (IgA), que incrementan durante la infección y son casi inexistentes en su ausencia (Salman y Duncan, 1984; Gill y col., 1992; 1994; Balic y col., 2000; 2002; 2005). Asimismo, se ha indicado que la IgA en conjunción con la albumina es capaz de evitar el establecimiento de las larvas, debido a su capacidad para aumentar la viscosidad del moco (Miller, 1987; Forstner y col., 1982; Murty y col., 1984).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la administración oral de las partículas de óxido de cobre puede tener un efecto tóxico sobre los parásitos adultos de *H. contortus*, sin embargo, no puede descartarse el efecto de los leucocitos globulares en la disminución de los parásitos. Por otro lado, los parámetros establecidos en este trabajo para evaluar las alteraciones sobre la mucosa abomasal que pudiesen impedir el establecimiento larvario fueron insuficientes para esclarecer por completo el mecanismo por el cual las PC impiden la infección por *H. contortus*. Por lo tanto en futuros estudios, los ensayos deben enfocarse en otros tipos celulares, inclusive no solo en células involucradas con la respuesta hacia parásitos sino también en alteraciones en las células que conforman la mucosa del órgano, y puesto existe una elevada probabilidad de que los cambios ocasionados por la interacción de las partículas de óxido de cobre y los iones de cobre liberados con la mucosa modifiquen la actividad secretora de

las células productoras de mucina, se debe poner gran énfasis en este tipo de células y las alteraciones ocasionadas en las propiedades de la mucina.

CONCLUSIONES.

- La administración oral de partículas óxido de cobre no provocó un efecto inmediato que impidiese el establecimiento de L3 de *Haemonchus contortus* sobre la mucosa abomasal.
- La administración oral de partículas óxido de cobre en corderos infectados con *H. contortus* produjo una reducción en la cantidad de parásitos adultos 72 horas después de la aplicación.
- No se observó un efecto definido de las concentraciones elevadas de Cu en tejido y contenido abomasal sobre las células cebadas, los leucocitos globulares y los eosinófilos.
- Las concentraciones elevadas de Cu en abomaso no se relacionaron con la reducción en establecimiento *in vitro* de L3 de *H. contortus* sobre la mucosa abomasal.
- No se observó una relación definitiva entre las concentraciones elevadas de Cu en abomaso 72 horas después del tratamiento con PC y la reducción en la población de parásitos adultos de *H. contortus*.
- No existe una asociación definida entre las células cebadas, los leucocitos globulares y los eosinófilos y el efecto antihelmíntico de las partículas de óxido de cobre contra *H. contortus*.

REFERENCIAS

1. Akers MR, Denbow, MD (2008). *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Blackwell Publishing.
2. Alba HF (2007). *Parasitología veterinaria: manual de laboratorio*, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
3. Al-Zubaidy AJ, Altaif KI, Al-Qaisy HHK, Makkawi (1987). Gross pathology and histopathology of haemonchosis in sheep and goats in Iraq. *Vet. Parasitol*, 23: 249-256.
4. Araya M, Pizarro F, Olivares M, Arredondo M, Gonzalez M (2006). Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. *Biol Res* 39: 183-187.
5. Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2000). Cellular profiles in the abomasal mucosa Lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75:109-120.
6. Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2002). Mechanism of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24 39-46.
7. Balic A, Cunningham CP, Meeusen EN (2005). Eosinophil and nematode interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28: 107-115.
8. Baker DH (1999). Cupric oxide should not be used as a copper supplement for animals or humans. *J. Nutr.* 129:2278–2279.
9. Bang KS, Familton AS, Sykes AR (1990a). Effect of copper oxide wire particle treatment on establishment of mayor gastrointestinal nematodes in lambs. *Res. Vet. Sci.* 49:132-137.
10. Bang KS, Familton AS, Sykes AR (1990 b). Effect of ostertagiasis on copper status in sheep: a study involving use of copper oxide wire particles. *Res. Vet. Sci.* 49: 306-314.

11. Banks JW (1993). Applied Veterinary Histology. Third edition. Mosby.
12. Barger IA (1996). Prospects for integration of novel parasite control options into grazing systems. *Int. J. Parasitol.* 26:1001-1007.
13. Barrowman PR, van Ryssen JBJ (1987). Effect of ionophores on the accumulation of copper in the livers of sheep. *Animal Production.* 44: 255-261.
14. Bird PR (1970) Sulfur metabolism and excretion studies on ruminants. III. The effect of sulfur intake on the availability of copper in sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 8: 212-218.
15. Bishop SC, Morris CA (2007). Genetic resistance in sheep and goats. *Small Rum. Res.*70:48-59.
16. Bonham, M., O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ (2002). The immune system as a physiological indicator of marginal copper status. *Br. J. Nutr.* 87, 393-403.
17. Bowman DD (2011). Parasitología para veterinarios. Novena edición. Elsevier.
18. Burke JM, Miller JE, Olcott DD, Terril TH (2004). Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Vet. Parasitol.* 123: 235-243.
19. Burke JM, Morrill D, Miller JE (2007). Control of gastrointestinal nematodes with copper oxide wire particles in a flock of lactating Polipay ewes and offspring in Iowa, USA. *Vet. Parasitol.* 146:372-375.
20. Burke JM, Miller JE (2006). Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. *Vet. Parasitol.* 139 (1-3):145-149.
21. Brunsdon RV (1967). The spring rise phenomenon: the relationship between the time of lambing and the commencement of the rise in faecal worm egg counts. *N. Z. Vet. J.*, 15:35-40.

22. Chang NY, Mingyi Zhang, Xia Lin, Zhang J, Xing Gengmei (2012). The toxic effects and mechanism of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*. 5: 2850-2871
23. Castro GA, Harari Y (1982). Intestinal epithelial membrane changes in rats immune to *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:191-204.
24. Charleston WAG (1965). Pathogenesis of experimental haemoncosis in sheep, with especial reference to the development of resistance. *J. Comp. Path.* 75: 55-6
25. 22. Chartier C, Etter E, Hoste H, Pors I, Knoch C, Dellac B (2000). Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Vet. Res. Commun.* 24(6): 389-399.
26. Christie MG, Hart R, Angus KW, Devoy J, Patterson JE (1978). Resistance to *Haemonchus contortus* in sheep given repeated daily doses of 10,000 infected larvae. *J. Comp. Path.*, 1978. 88: 157-165.
27. Christie MG, Angus KW, Hotson IK (1975). Manifestations of resistance to *Haemonchus contortus* in sheep: Worm populations and abomasal changes in sheep superinfected with 1,000,000 larvae of *H. contortus*. *Int. J. Parasitol.* 5:193-198.
28. Coop RL, Kyriazakis I (1999). Nutrition-parasite interaction. *Vet Parasitol.* 84: 187-204.
29. Cuéllar OJA, Tórtora PJ, Trejo GA, Román RP (2012). La producción ovina mexicana: particularidades y complejidades. UNAM-SAGARPA.
30. Cuéllar OJA (1986). Parasitosis digestivas. En: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Edit. por P. Pijoan A. y J. Tórtora P. México.
31. Cuéllar OJA (2007). Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Memorias del V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos mayo 2-4; Mendoza, Argentina. Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camelidos Sudamericanos.
32. Dakkak A, Bueno L, Fioramonti J (1981). Effects of two consecutive experimental *Haemonchus contortus* infection on abomasal pepsin and

- electrolites and serum pepsinogen and electrolytes of sheep. *Ann. Resc Vét.* 12 (2): 65-70.
33. Deland MPB, Cunningham P, Milne ML, Dewey DW (1979). Copper administration to young calves: oral dosing with copper oxide compared with subcutaneous copper glycinate injection. *Aust. Vet. J.* 55: 493–494.
 34. Dewey DW (1977). An effective method for the administration of trace amounts of copper to ruminants. *Search.* 8: 326–327.
 35. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Greer KS (1983). *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRA-A. *Int. J. Parasitol.* Vol. 13, No 2: 207-212.
 36. FAO (2013a). Statistical yearbook 2012. Europe and Central Asia food and agriculture. <http://www.fao.org/docrep/017/i3138e/i3138e.pdf>.
 37. FAO (2013b). Food outlook: Biannual report on global food markets. <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf>.
 38. Franco L, Velo GP (1996). A copper-complex reduced gastric damage caused by acetylsalicylic acid and ethanol. *Prostaglandins.* 51:331-338.
 39. Forstner G, Wesley A, Forstner J (1982). Clinical aspects of gastrointestinal mucus. Citado por Miller HRP (1987) en: Gastrointestinal mucus, a medium for survival and elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitol.* 94: S77-S100.
 40. GalindoBAJ, Torres AJFJ, Cámara SR, Sandoval CCA, Aguilar CAJ, Ojeda RNF, Reyes RR, España EE (2011). Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 176:201-207.
 41. Gill HS, Husband AJ, Watson DL, Gray GD (1994). Antibody containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 56: 41–47

42. Gill HS, Husband AJ, Watson DL (1992). Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31: 179-187.
43. Groff JL, Gropper SS, Hunt SM (1995) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. West Publishing Company, New York.
44. Gururaja TL, Levine JH, Tran DT, Naganagowda GA, Ramalingam K, Ramasubbu N (1999). Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7)1. *Biochim. Biophys. Acta.*1431:107–119.
45. Hale M, Burke J, Miller J, Terril T (2007). Tools for managing internal parasites in small ruminant: Copper wire particles. ATTRA-National Sustainable Agriculture Information Service.
46. Hammond JA, Fielding D, Bishop SC (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.* 21: 213-228.
47. Hansen, S.L., Schlegel, P., Legleiter, L.R., Lloyd, K.E. and Spears, J.W. (2008) Bioavailability of copper from copper glycinate in steers fed high dietary sulfur and molybdenum. *J. Anim. Sci.* 86: 173–179.
48. Harris ED (2001) Copper homeostasis: the role of cellular transporters. *Nutr. Rev.* 59: 281-285.
49. Hasnain SZ, Evans CM, Roy M, Gallagher AL, Kindrachuk KN, Barron L (2011). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *J. Exp. Med.* 208: 893–900.
50. Haynes RJ (1997). Micronutrient status of a group of soils in Canterbury, New Zealand, as measured by extraction with EDTA, DTPA and HCl and its relationship with plant response to applied Cu and Zn. *J. Agric. Sci. Cambridge* 129, 325–333.
51. Hellman NE, Gitlin JD (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 439 – 458.
52. Herlich H (1956). A digestion method for post-mortem recovery of nematodes from ruminants. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 23: 102-103.

53. Hoste H, Chartier C (1993). Comparison of the effect on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1886-1896
54. Hoste H (2006). Entendiendo los mecanismos fisiopatológicos y patogénesis de la infección por nematodos parásitos en borregos. 4º Curso Internacional: Epidemiología y Control Integral de Nematodos Gastrointestinales de Importancia Económica en Pequeños Rumiantes 2006 abril 18-21; Mérida, Yucatán, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
55. Hucker DA, Yong WK (1986). Effects of concurrent copper deficiency and gastro-intestinal nematodiasis on circulating copper and protein levels, liver copper and bodyweight in sheep. *Vet. Parasitol.* 19, 67–76.
56. Hujanen ES, Seppä ST, Virtanen K (1995). Polymorphonuclear leukocyte induced by zinc, copper and nickel in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245:145-152,
57. Hunter AR, Mackenzie G (1982). The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. *J. Helminthol.* 56: 135-144.
58. Huntley JF, Newlands GFJ, Jackson F, Miller HRP (1992). The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus contortus* infected sheep. *Parasite Immunol.* 14: 429-440.
59. Ivan MM (1988). The effect of faunation on rumen solubility and liver content of copper in sheep fed low or high copper diets. *J. Anim. Sci.* 66, 1498-1501.
60. Jackson F, Greer AW, Huntley J, McAnulty RW, Bartley DJ, Stanley A, Stenhouse L, Stankiewicz M, Sykes AR (2004). Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an in vitro direct challenge method using abomasal tissue explants. *Vet. Parasitol.* 124: 73-89.
61. Jones DG, Suttle NF (1987). Copper and disease resistance. In: Trace Substances in environmental health-XXI. University of Missouri, Columbia, Missouri. 514-525.

62. Joseph IMP, Zavros Y, Merchant JL (2003). A model for integrative study of human gastric acid secretion. *J. Appl. Physiol.* 94:1602–1618.
63. Judson GJ, Brown TH, Gray DW, Edwards JB, McFarlane JD (1982). Oxidized copper wire particles for copper therapy in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 33:1073-1083.
64. Kaplan RM (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance. *Trends Parasitol.* 20: 477-481.
65. Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S (2004). Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 305:1003–6.
66. Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, and Clegg MS (2003). Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J. Nutr.* 133, 1477S – 1480S.
67. Kemp MJ, Robinson AN, Meeusen TNE, Piedrafita MD. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *Int. J. Parasitol.* 39: 1589-1594.
68. Kennedy T, Ghio JA, Reed W, Samet J, Zagorski J Quay J, Carter J, Dailey L, Hoidal RJ, Devlin BR (1998). Copper-dependent inflammation and Nuclear Factor- κ B activation by particulate air pollution. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19:366-378.
69. Knox MR (2002). Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust. Vet. J.* 80 (4): 224-227.
70. Langlands JP, Donald GE, Bowles JE, Smith AJ (1989). Trace element nutrition of grazing ruminants. III: Copper oxide powder as a copper supplement. *Aus. J. Agric. Res.* 40: 187-193.
71. Lawton DEB, Reynolds GW, Hodgkinson SM, Pomroy WE, Simpson HV (1996). Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: effects on abomasal pH and serum gastrin and pepsinogen. *Int. J. Parasitol.* 26:1063-1074.

72. Lee J, Treolar BP, Harris PM (1994) Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosages. 1. Characterization and turnover of metallothionein isoforms. *Aust. J. Agric. Res.* 45, 303-320.
73. Levine N (1980). Trichostrongyles. In: Nematode parasites of domestic animals and of man. Minneapolis: Burgess Publishing Company. 135–221.
74. Lewis AJ (1978). A comparison of the anti-inflammatory effects of copper aspirinate and other copper salts in the rat and Guinea pig. *Agents and actions.* 8 (3): 244-250.
75. Lippard SJ, Berg JM (1994) Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books: Mill Valley, CA.
76. Lominadze D, Saari JT, Miller FN, Catalfamo JM, Schuschke DA (1997) Von Willebrand factor restores platelet thrombogenesis in copper-deficient rats. *J. Nutr.* 127, 1320-1327.
77. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, Van der Ven K, Novak N (2008). Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Hum. Reprod. Update.* 14(5): 485-495.
78. Mason KE (1979). A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J. Nutr.* 109, 1979 – 2066.
79. McFarlane JD (1989). The effect of copper supply on vegetative and seed yield of pasture legumes and the field calibration of a test for detecting copper deficiency I. Subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 817–132.
80. McFarlane JD, Judson JD, Turnbull RK, Kempe BR (1991). An evaluation of copper-containing soluble glass pellets, copper oxide particles and injectable copper as supplements for cattle and sheep. *Aust. J. Exp. Agric.* 31, 165–174.
81. McKellar QA (1993). Interactions of *Ostertagia* species with their bovine and ovine host. *Int. J. Parasitol.* 23: 451-462.

82. Meana MA, Rojo VFA (1999). Tricostrogilidosis y otras nematodiasis. En: Parasitología veterinaria. Edit. por: Cordero, C.M. y Rojo, V.F.A., Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
83. Mendoza de Gives P, Crespo FJ, Rodriguez HD, Prats VV Hernández LE, Fernandez OEG (1998). Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspensión of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *J. Helminthol.* 72(4):343-347.
84. Miller HRP (1987). Gastrointestinal mucus, a medium for survival and elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitol.* 94: S77-S100
85. Miller HRP (1984). The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6: 167-259
86. Mills CF (1987). Biochemical and physiological indicators of mineral status in animal: copper cobalt and zinc. *J Anim Sci*; 65:1702-11.
87. Murty VLN, Sarosiek J, Slomiany A, Slomiany BL (1984). Efec of lipids ans proteins on the viscosity of gastric mucus glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121:521-529.
88. Newlands GFJ Miller HRP, Jackson F (1990). Immune exclusión of *Haemonchus contortus* larvae in the sheep: Effects on gastric mucin of immunization, larval challenge and treatment with dexamethasone. *J. Comp. Path.* 102:433-442
89. Newton SE, Morrish LE, Martin PJ, Montague, Rolph TP (1995). Protection against multiply drug-resistant and geographically distinct strains of *Haemonchus contortus* by vaccination with H11, a gut membrane-derived protective antigen. *Int. J. Parasitol.* 25:511-521.
90. Nicholls CD, Hayes PR, Lee DL (1987). Physiological and microbiological changes in the abomasums of sheep infected with large doses of *Haemonchus contortus*. *J. Comp. Path.* 97:299-308.
91. Nikander S (1991). Origin, morphology, histochemistry and function of the mucosal mast cell and globule leukocyte. A review. *Rangifer*, 11 (1): 4-11.

92. O'Dell BL, Sunde RA (1997). "Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements." Dekker, New York
93. Oliveira GBD, Gillespie K, Wolfreys K, Mathieson WP, Qasim Faieza, Coleman WJ (1995). Compounds that induce autoimmunity in the Brown Norway rat sensitize mast cells mediator release and interleukin 4 expression. *Eur. J. Immunol.* 25: 2259-2264.
94. Ortolani LE, Leal RML (2012). Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.*
95. Parkins JJ, Holmes PH (1989). Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. *Nutr. Res. Reviews.* 2:227-246.
96. Percival SS. Copper and Immunity (1998) *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1064S-1068S.
97. Pijoan AP y Tórtora PJ (1986). Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. México.
98. Pirchard RK, Hall CA, Kelly JD, Martín CA, Donald AD (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56: 239-260.
99. Prohaska JR (2006). Copper. In: Filer, L.J and Ziegler, E.E. (eds) *Present Knowledge in Nutrition*, 7th edn. International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation, Washington, DC.
100. Quiroz MH (2011). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Edit Limusa.
101. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Tenth edition. Elsevier. 1714-1715
102. Rainbird MA, Macmillan D Meeusen NT (1998). Eosinophil mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin 5. *Parasite Immunol.* Volume 20, 2: 93-103.

103. Rainsford KD, Whitehouse MW (1976). Gastric mucus effusion elicited by oral copper compounds: potential anti-ulcer activity. *Experientia*. 32(9):1172-1173.
104. Rothwell TLW (1989). Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Australian Journal of Parasitology*. 19 (2):139-168.
105. Rothemberg EM, Hogan PS (2006). The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 147-174.
106. Kemp JM, Robinson AN, Meussen TNE, Piedrafita MD (2009). The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *Int. J. Parasitol.* 39: 1589-1594).
107. Rucker BR, Fascetti JA, Keen LC. (2008). Trace minerals *In: Kaneko JJ, Harvey WJ, Bruss LM. Biochemistry of domestic animals. Sixth edition. Elsevier.*
108. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, Keen CL (1998). Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 996S – 1002S
109. Salman SK, Duncan JL (1984). The abomasal histology of worm-free sheep given primary infection and challenge infections of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 16: 43-54.
110. Schallig HDFH (2000). Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 120: S63-S72.
111. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller KA, Schweikl H (1997). Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci.* 105: 86-91.
112. Schubert LM, Peura AD (2008). Reviews in basic and clinical gastroenterology. *Gastroenterology.* 134:1842-1860.
113. Scott I, Hodgkinson SM, Khalaf S, Lawton DEB, Collett MG, Reynolds GW, Pomroy WE, Simpson HV (1998). Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *Int. J. Parasitol.* 28:1383–92.

114. Scott I, Dick A, Irvine J, Stear MJ, Mckellar QA, (1999). The distribution of pepsinogen within the abomasa and sheep infected with *Ostertagia spp.* And sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 82: 145-159.
115. Simpson HV (1997). Effect of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *Int. J. Parasitol.* 25 (6):741-748.
116. Simpson (2000). Pathophysiology of abomasal parasitism: Is the host or parasite responsible? *Vet. J.* 160: 177-191.
117. Smart ME, Gudmundson J, and Christensen DA (1981). Trace mineral deficiencies in cattle: a review. *Can. Vet. J.* 22: 372 – 376.
118. Soli F, Terril TH, Shaik SA, Getz WR, Miller JE, Vanguru M, Burke JM (2010). Efficacy of copper oxide wire against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 168: 93-96.
119. Soulsby E JL (1988). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Séptima edición. Edit. Interamericana.
120. Stankiewicz WE, Jonas PCG, Douch B, Rabel S, Bisset S, Cabaj W (1993). Globule Leukocytes in the lumen of the small intestine and resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J Parasitol.* 79 (6): 940-945.
121. Stern BR, Solioz M, Krewski , Aggett P, Aw TC, Baker S, Crump K, Dourson M, Haber L, Hertzberg R, Keen C, Meek B, Rudenko L, Schoeny R, Slob W, Starr T. (2007). Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 10: 157–222.
122. Stities TE, Mitchell AE, Rucker, RB (2000). Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. *J. Nutr.* 130: 719 – 727.
123. Suttle NF (1981). Effectiveness of orally administered cupric oxide needles in alleviating hypocupraemia in sheep and cattle. *Vet. Rec.* 108: 417–420.
124. Suttle NF, Jones DG, Wolliams C, Wolliams JA. (1987) Heinz body anaemia in lambs with deficiencies of copper or selenium. *Br. J. Nutr.* 58, 539-548.

125. Suttle NF (1974). Effects of organic and inorganic sulfur on the availability of dietary copper to young lambs. *J. Agric. Sci. Cambridge*. 84, 255-246.
126. Suttle NF (1988) Relationship between the trace elements status of soils, pasture and animals in relation to the growth rate of lambs. In: Thorton, I. (ed.) *Geochemistry and Health*. Science Reviews Limited, Northwood, UK, pp. 69-79.
127. Suttle NF (2010). *Mineral nutrition of livestock*. 4th Edition. CABI.
128. Suska F, Källtorp M, Esposito M, Gretzer C, Tengvall P, Thomsen P (2001). *In vivo/ ex vivo* cellular interactions with titanium and copper. *J Mater Sci Mater Med*. 12: 939-944.
129. Suska F, Esposito M, Gretzer C, Källtorp M, Tengvall P, Thomsen P (2003). IL-1 α , IL-1 β and TNF- α secretion during *in vivo/ex vivo* cellular interactions with titanium and copper. *Biomaterials*. 24: 461-468.
130. Suska F, Gretzar C, Esposito M, Emanuelsson Lena, Wennerberg A, Tengvall P, Thomsen P (2005). *In vivo* cytokine secretion and NF- κ B activation around titanium and copper implants. *Biomaterials*. 26: 519-527.
131. Swenson MJ, Reece WO. *Duke's physiology of domestic animals* (1993). 11th ed. New York: Comstock Publications Assoc.
132. Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2007). *Veterinary Parasitology*. Third edition. Editorial Blackwell Publishing.
133. Taylor MA. Emerging parasitic diseases of sheep (2012). *Vet. Parasitol*. 189: 2-7.
134. Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells. IHC World. http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/toluidine_blue.htm.
135. Tinker D, Rucker RB (1985). Role of selected nutrients in synthesis, accumulation, and chemical modification of connective tissue proteins. *Physiol. Rev*. 65: 607 – 657.
136. Thiele DJ (2003). Integrating trace element metabolism from the cell to the whole organism. *J. Nutr*. 133: 1579S –1580S.

137. Thomas HH (2009). Fisiología y metabolismo gastrointestinal. En: Fisiología Veterinaria. Edit. por: Cunningham JG y Klein BG. Elsevier.
138. Torres-Acosta JFJ, Hoste H (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rum. Res.* 77: 159-173.
139. Torres-Acosta JFJ, Mendoza de Gives P, Aguilar Caballero AJ, Cuéllar Ordaz JA (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189: 89-96.
140. Underwood EJ (1977). Trace Elements in human and animal nutrition, 4th edn. Academic Press London.
141. Underwood EJ, Suttle F (2010). Copper. In: The Mineral Nutrition of Livestock, 4rd edn. CAB International, Wallingford, UK, pp. 283–342.
142. Uriu-Hare JY, Keen CL (1998). Copper, lysyl-oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:996S – 1002S
143. Urquhart JA, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (2001). Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia.
144. Van Wyk JA, Malan FS, Batt GF (1997). Rampant anthelmintic resistnace in sheep in South Africa, what are the options? In: Van Wyk JA, Van Shalkwyk PC. Managing anthelmintic resistance in endoparasites. Workshop held at the 16th International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P). Sun City, South Africa, 51-63, 1997.
145. Vatta AF, Waller PJ, Githiori JB, Medley GF (2009). The potencial to control *Haemonchus contortus* in indigenous South African with copper oxide wire particles. *Vet. Parasitol.* 162: 306-313.
146. Waller PJ, Bernes G, Rudby-Martin L, Ljungström BL, Rydzik A (2004). Evaluation of copper supplementation to control *Haemonchus contortus* infections of sheep in Sweden. *Acta. Vet. Scand.* 45:149-160,
147. Whitelaw A, Fawcett AR, McDonald AJ (1984). Cupric oxide needles for the prevention of bovine hypocuprosis. *Vet. Rec.* 115: 357.

148. Woolliams C, Suttle NF, Woolliams JA, Jones DG, Wiener G. (1986a) Studies on lambs from lines genetically selected for low or high plasma copper status. 1. Differences in mortality. *Animal Production* 43, 293–301.
149. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB (1995). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintic in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58: 181-213.

ANEXO DE IMÁGENES.

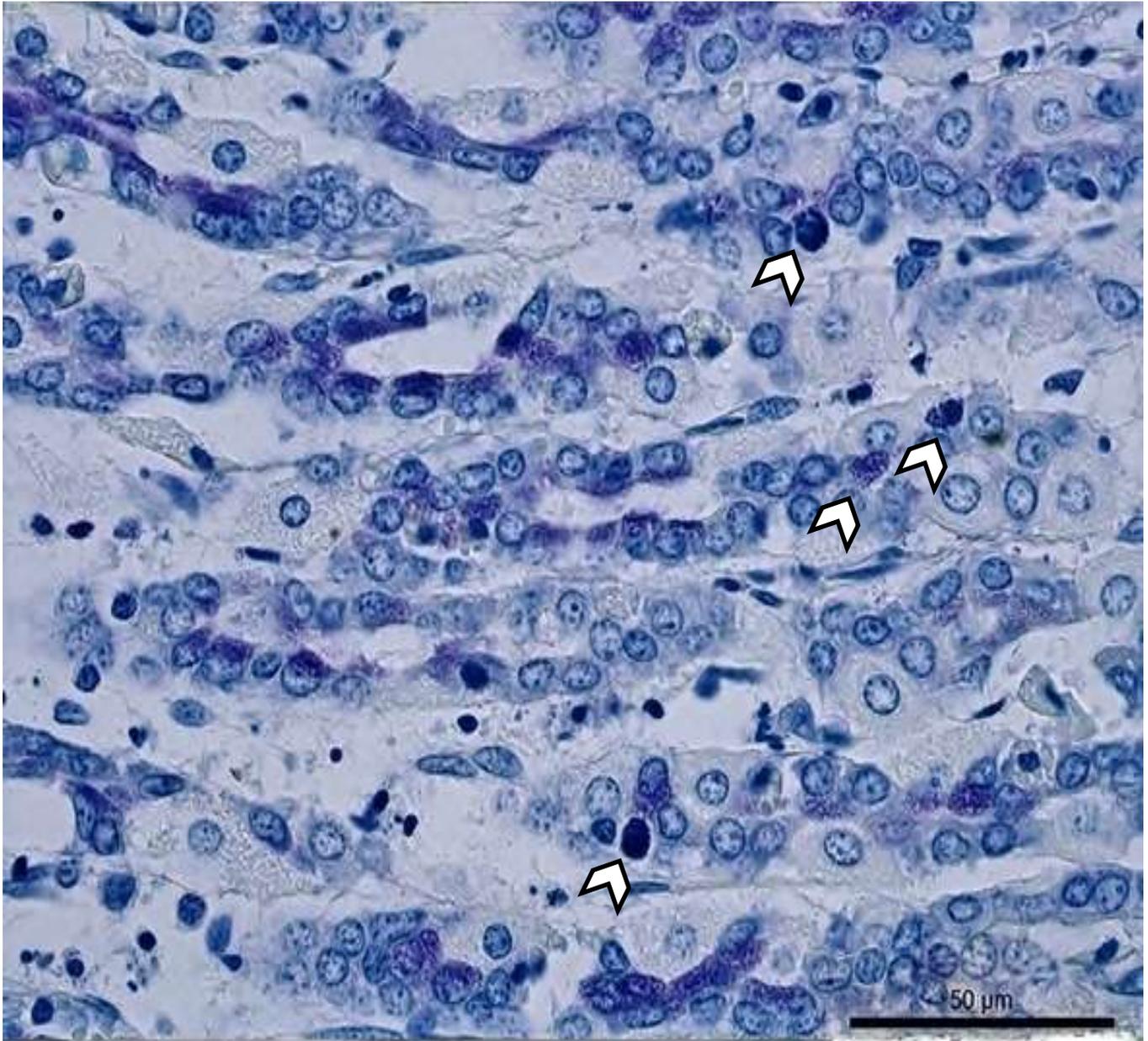


Imagen 1. Mastocitos en región fúndica abomasal (puntas de flechas). Azul de toluidina 40x.

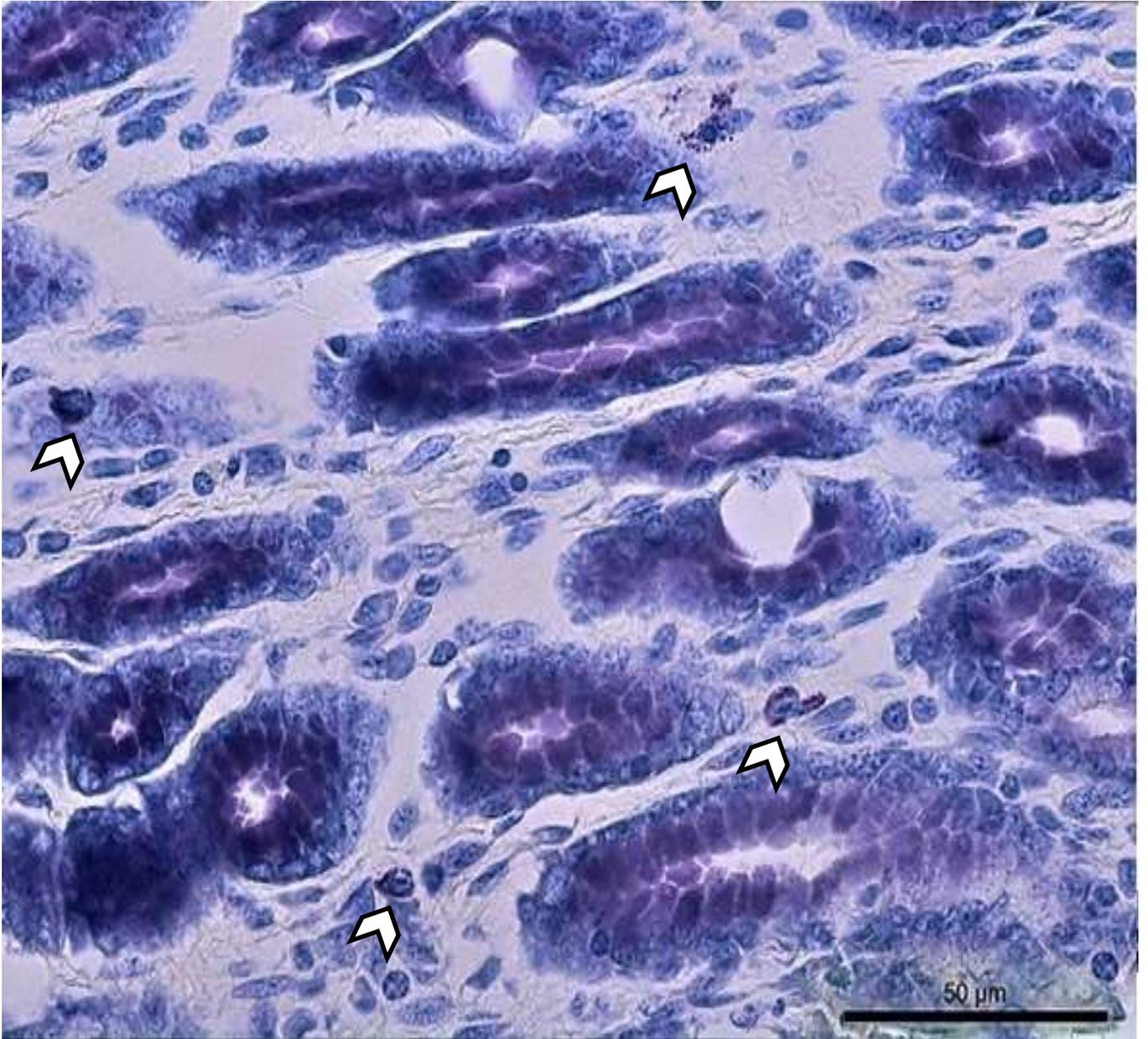


Imagen 2. Mastocitos en región pilórica abomasal observados (puntas de flechas). Azul de toluidina 40x.

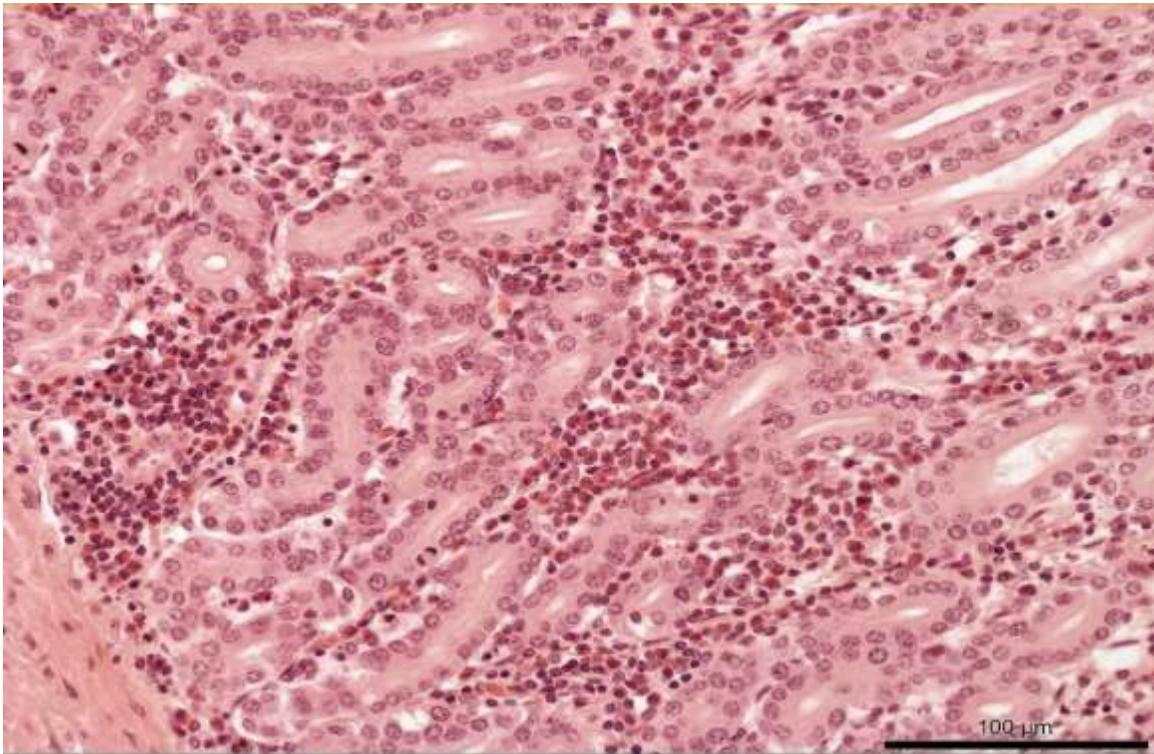


Imagen 3. Eosinófilos en mucosa de la región fúndica abomasal. Hematoxilina-Eosina. 20x.

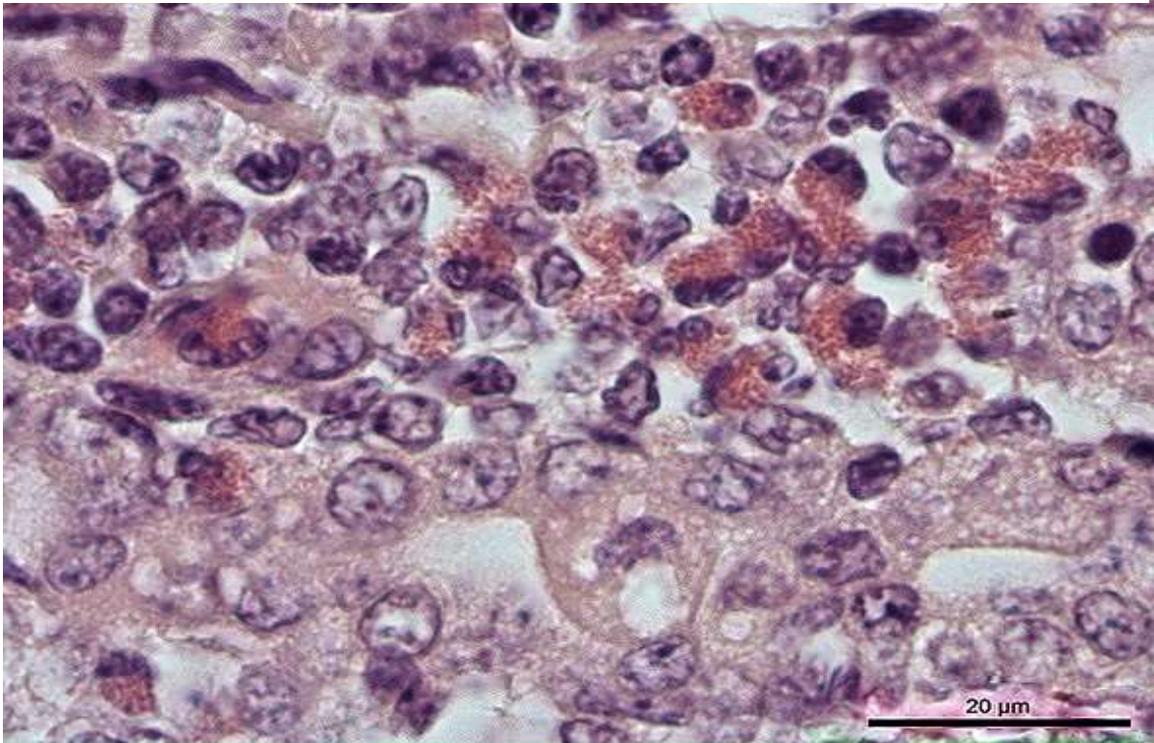


Imagen 4. Eosinófilos en mucosa de la región fúndica abomasal. Hematoxilina-Eosina. 100x.

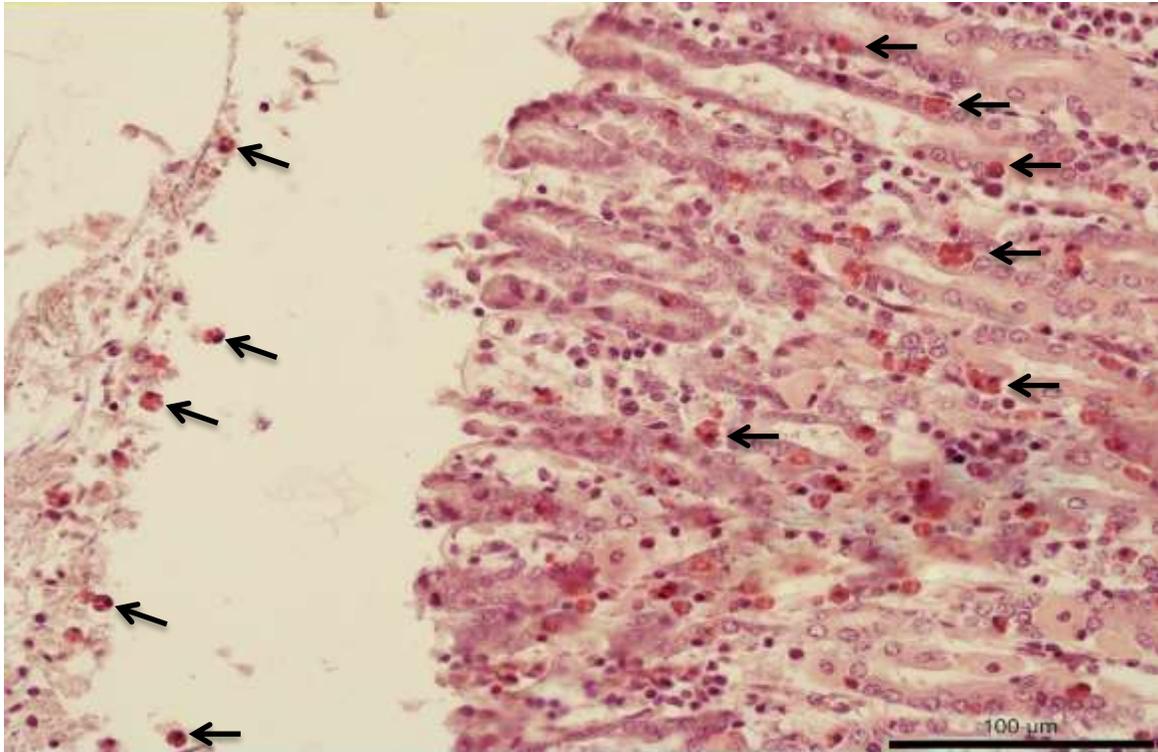


Imagen 5. Leucocitos globulares en mucosa y luz de la región fúndica abomasal (flechas negras). Hematoxilina-Eosina. 20x.

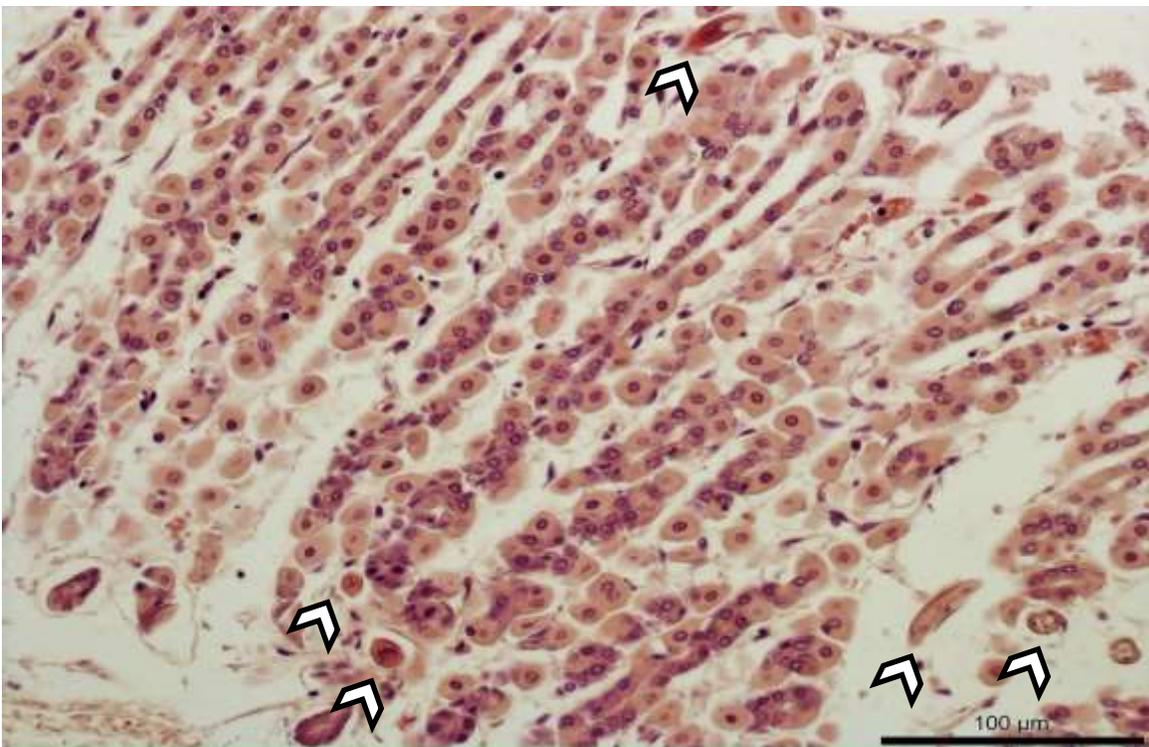


Imagen 6. Larvas 3 de *Haemonchus contortus* en mucosa de la región fúndica abomasal (puntas de flecha). Hematoxilina-Eosina. 20x

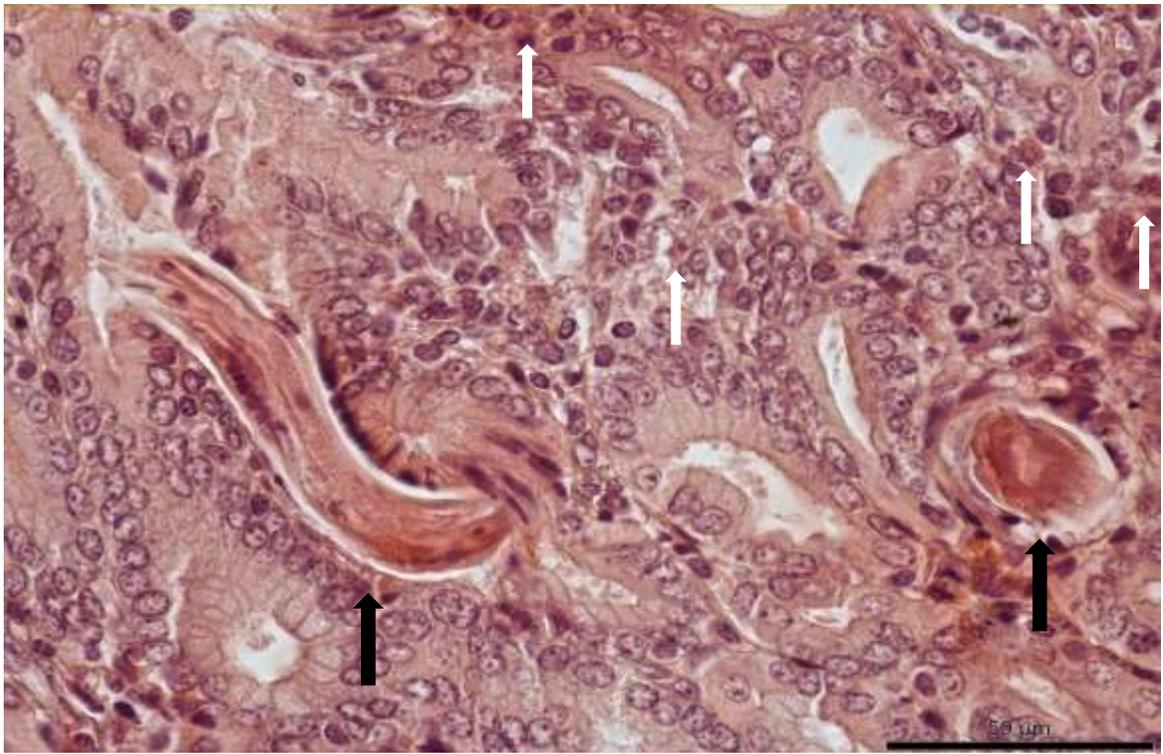


Imagen 7. Larva 4 de *Haemonchus contortus* en mucosa de la región fúndica abomasal (flechas negras) y eosinófilos en la periferia (blancas). Hematoxilina-Eosina. 40x.

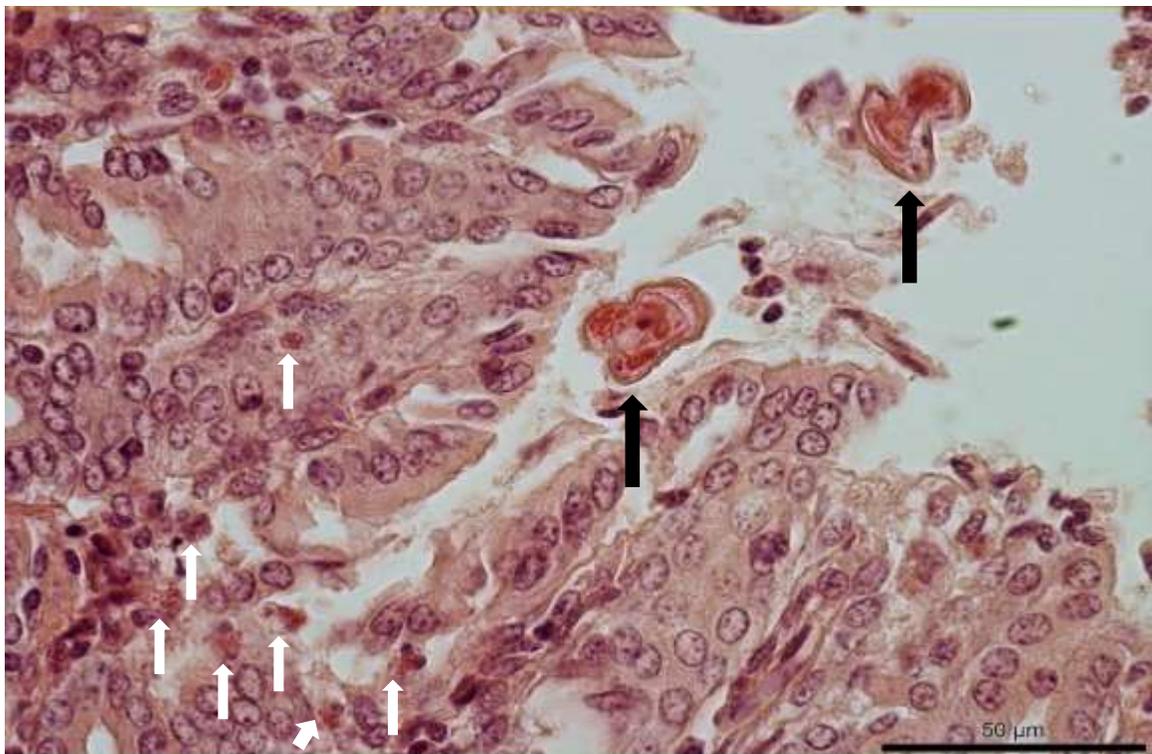


Imagen 8. Pre-adulto de *Haemonchus contortus* emergiendo de la mucosa de la región fúndica abomasal (flechas negras). Algunas eosinófilos pueden observarse en la periferia (flechas blancas). Hematoxilina-Eosina. 20x.

