



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“PATOGENIA E INMUNIDAD DE LA EPIDIDIMITIS INFECCIOSA DEL CARNERO  
PRODUCIDA POR *Brucella ovis*”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA  
GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA

TUTOR PRINCIPAL: Dr. JORGE LUÍS TÓRTORA PÉREZ  
FES-CUAUTITLÁN UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: Dr. EFRÉN DÍAZ APARICIO  
CENID MICROBIOLOGÍA PALO ALTO DF  
Dr. ENRÍQUE SALAS TÉLLEZ  
FES-CUAUTITLÁN UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## **Dedicatoria**

A mis hijos Germán Gaspar y Luis Eduardo

A mi madre Hellen Fariña García

A mi padre Gaspar Garrido Aguirre

A mis abuelas y abuelos, en cualquier lugar que se encuentren.

### **Agradecimientos institucionales:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias

Dirección General de Personal Académico  
Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA)  
Por la beca otorgada durante los estudios de Doctorado.

Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y educación  
(PACIVE) Cátedra “Enfermedades de los rumiantes”

CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias de la Secretaría de Agricultura Ganadería SAGARPA.

Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dra. Gabriela Palomares, por la donación de la cepa de *B. ovis*, para la infección experimental y las pruebas de Inmunodifusión en gel de agarosa para el seguimiento serológico de la presentación de la enfermedad. CENID-Microbiología en Palo Alto DF

Dr. Francisco Morales, por todas las facilidades otorgadas para utilizar las instalaciones para el rebaño en el CENID-Microbiología en Palo Alto DF.

Dr. Carlos Romero Ramírez, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa. Departamento de Biología de la Reproducción. Por la medición del cortisol mediante RIA.

Dr. Jorge Acosta-Dibarrat Dibarrat, Universidad Autónoma de Estado de México, Laboratorio de Microbiología, por permitirnos trabajar la PCR para el diagnóstico de *B. ovis*.

MC José Luis Gutiérrez Hernández por el apoyo para la estandarización de la PCR múltiple.

MC Gabriela Castillo Hernández; por el apoyo para el trabajo de inmunohistoquímica.

Al personal que se reúne en el Laboratorio de apoyo a Histología y Biología.

Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez

Respaldo y aliento de principio a fin durante el desarrollo, no solo de este proyecto académico, sino también durante mi formación como explorador de la infinita riqueza de la materia biológica.

## RESUMEN

Este trabajo permitió conocer la relación entre el estrés moderado y las lesiones en el tracto reproductor del carnero producidas por la infección experimental con *B. ovis*, las variaciones en el cortisol sanguíneo y la presencia de células reactivas del sistema inmunitario. En 24 carneros libres de enfermedades genitourinarias, se indujo estrés por manejo grupal y 21 se infectaron experimentalmente con *B. ovis* para evidenciar diferencias en cortisol, presencia de células de respuesta inmune, lesiones en tracto genitourinario, entre animales con diferentes índices de leucocitospermia (LE) y tasa de dominancia (TD). Los animales se dividieron en: 5 grupos, I control químico con dexametazona (n=6), II estrés alto (n=6), III estrés moderado (n=6) con infección intradérmica y conjuntival. El grupo IV estrés alto (n=3) con inoculación intraepididimal. Y el grupo control (n=3) sin inoculación. La TD se estableció observando y registrando las conductas agonistas en dos eventos diarios durante 50 días. Se obtuvieron muestras de sangre para conocer la cantidad de cortisol sanguíneo y semen para evaluar LE y células epiteliales (CE), durante 12 y 23 semanas respectivamente. Al sacrificio se colectaron muestras de: testículo, cola y cabeza del epidídimo, ámpulas del deferente, uretra pélvica, pene, prepucio, vesículas seminales, glándula bulbo uretral, próstata diseminada y proceso uretral, se procesaron de rutina en parafina y fueron teñidas con hematoxilina-eosina para descartar daños estructurales o debidos a patologías previas y con azul de toluidina-bórax, para cuantificar la presencia de células cebadas (CCs), linfocitos CD4+ y CD8+. Mediante radioinmunoensayo (RIA) se evidenció la cantidad de cortisol circulante antes, durante y después del estímulo estresante y de la infección experimental con la cepa de referencia *B. ovis* (REO 198) a una concentración de  $4.7 \times 10^9$ .

El objetivo del trabajo fue inducir la epididimitis por *B. ovis* en condiciones de estrés experimental y analizar sus efectos en el daño tisular y en los mecanismos de respuesta inmune local, procurando un modelo que ayude a explicar la patogenia de la enfermedad.

Al emplear un algoritmo sencillo para calcular la TD, se pudo hacer el seguimiento de las jerarquías dentro del rebaño. La TD disminuyó en 16 animales y se mantuvo una tendencia a la homogeneidad dentro de los grupos a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos de la TD permitió conocer en que condición de jerarquía (Dominantes, dominancia intermedia y sumisos) se encontraban los animales a lo largo del experimento.

La presentación de LE se pudo estimular con un evento de manejo rutinario. La LE solo presentó correlación positiva con las CE, pero estas últimas también se correlacionaron con el cortisol y la infiltración. La TD tuvo correlación matemática con cortisol e infiltración. A partir de la infección experimental en la semana 10, la LE aumentó gradualmente en los grupos experimentales, manteniéndose hasta el sacrificio.

Mediante inmunodifusión doble en gel de agarosa (IDD) se observó seroconversión en la semana 1 postinoculación (PI). Se detectaron 13 carneros positivos y 7 animales fueron positivos de forma intermitente más de una vez.

La infección experimental por la vía intraepidermal, conjuntival e intraepididimal, provocaron la presencia de lesiones microscópicas insipientes principalmente en epidídimo y el ámpula del conducto deferente; El semen de 5 carneros resultó positivo a la PCR para *B. ovis*, 2 de dominancia media y 3 sumisos. El volumen del eyaculado disminuyó después de la infección con *B. ovis*.

Las lesiones microscópicas son consistentes con las reportadas en la literatura para la epididimitis infecciosa del carnero a partir de la semana 3 PI. La infiltración en los tejidos observados fue mayor en los animales de dominancia alta.

Se presentaron mayores niveles de cortisol en los animales de dominancia alta y sumisos. La curva de LE tuvo una relación inversa con las de cortisol y TD a lo largo del experimento. Los animales de dominancia media presentaron mayor cantidad de CD4+ y un aumento significativo de CE en semen y una menor cantidad de CCs.

Las CE en el semen de todos los animales presentaron una aparente tendencia cíclica, presentando correlación positiva con la concentración de cortisol y daño.

Aunque LE y TD no presentaron correlación matemática, la aplicación del análisis de redes, permitió observar las relaciones topológicas y las relaciones entre los individuos y sus constantes LE y TD.

Los animales sometidos a mayor estrés y mayor cantidad de cortisol presentaron mayor daño en los estadios iniciales de la infección.

La actividad generada por el cortisol podría no solo ser inmunodepresora en animales con estrés crónico, sino también de protección en animales con estrés agudo, coincidiendo con la supervivencia del individuo con mejor manejo del estrés dentro de la teoría del Síndrome general de adaptación, por lo que la menor cantidad de cortisol generado por los animales de dominancia intermedia, que aunque fueron estresados y desafiados de la misma forma, la infiltración en los tejidos de tracto fue menor que en los dominantes y la cantidad de CD4+ fue mucho mayor que en los grupos de dominantes y sumisos, por lo que podría pensarse un efecto de protección, lo cual podría explicar el mantenimiento dentro de los rebaños de la infección subclínica por *B. ovis* en animales de dominancia media.

## SUMMARY

This work allowed to know the relationship between moderate stress and injuries to the reproductive tract of the ram caused by experimental infection with *B. ovis*, changes in blood cortisol and the presence of reactive immune cells. 24 healthy rams free of genitourinary diseases, stress was induced by group management and 21 were experimentally infected with *B. ovis* to demonstrate differences in cortisol, the presence cells of immune response and genitourinary tract injuries, between animals with different levels of leucocytospermia (LE) and dominance rate (TD). The animals were divided into 5 groups, I chemical control with dexamethasone (n = 6), high stress II (n = 6), III moderate stress (n = 6) with intradermal and conjunctival infection. High stress Group IV (n = 3) with intraepididimal inoculation. And the control group (n = 3) without inoculation. The TD was established observing and recording agonistic behavior in two events daily for 50 days. Blood samples were obtained to determine the amount of cortisol blood and semen for evaluating LE and epithelial cells (EC), for 12 and 23 weeks respectively. Slaughter samples were collected: testis, head and tail of the epididymis, ampulla ductus deferens, pelvic urethra, penis, prepuce, seminal vesicles, bulbo urethral gland, disseminated prostate and urethral process and processed routinely in paraffin and stained with hematoxylin-eosin to discard structural damage or pathologies and toluidine blue-borax for quantifying the presence of mast cells (CCs), CD4 + and CD8 + lifocitos. By radioimmunoassay (RIA) the amount of circulating cortisol was evidenced before, during and after the stressor and experimental infection by injecting 0.5 ml of inoculum with the reference strain *B. ovis* (REO 198) at a concentration of  $4.7 \times 10^9$ .

The objective of this work was induce *B. ovis* epididymitis in experimental stress conditions and analyze their effects on tissue damage and the mechanisms of local immune response, seeking a model that helps to explain the pathogenesis of the disease.

Using a simple algorithm to calculate the TD, it was possible to track the hierarchy within the herd. The TD 16 animals decreased and a tendency to homogeneity within the groups over time was maintained. The results of TD allowed to know that status hierarchy (dominant and submissive intermediate dominance) were encouraged him throughout the experiment.

LE filing could stimulate a routine event management. The LE only was positively correlated with the EC, but EC were also correlated with cortisol and infiltration. TD had mathematical correlation with cortisol and infiltration. From the experimental infection in week 10, the LE gradually increased in the experimental groups, until the slaughter.

By agarose gel double immunodiffusion (IDD) seroconversion was observed at week 1 post-inoculation (PI). 13 rams was positive and 7 were intermittently positive more than once.

The experimental infection by the intraepidermal, conjunctival and intraepididimal way, the presence of incipient caused mainly microscopic lesions in the epididymis and vas deferens ampulla; The semen of 5 sheep was positive to PCR for *B. ovis*, 2 of half dominance and 3 submissive. The volume of ejaculate was decreased after infection with *B. ovis*.

Microscopic lesions are consistent with those reported in the literature for infectious epididymitis of rams from week 3 PI. Infiltration into the tissue was observed in animals with high dominance.

Higher levels of cortisol in animals with high and submissive dominance were observed. LE curve was inversely related to cortisol and TD throughout the experiment. Animals showed higher dominance average number of CD4 + and a significant increase in EC semen and fewer CCs.

EC in the semen of all animals exhibited an apparent cyclical trend, showing positive correlation with the concentration of cortisol and damage.

Although TD and LE showed no mathematical correlation, application of network analysis allowed to observe the topological and relationships between individuals and LE-TD.

Animals subjected to greater stress and cortisol presented much more damage in the initial stages of infection. The activity generated by cortisol could not only be immunosuppressive in animals with chronic stress, but also could be protective in animals with acute stress, coinciding with the survival of the individual to better manage stress within the theory of general adaptation syndrome, so the least amount of cortisol produced by animals of intermediate dominance, that although were stressed and challenged in the same way, the infiltration of tissues tract was lower than in the dominant and the amount of CD4 + was much higher than in the groups dominant and submissive, so it might be thought a protective effect, which could explain the maintenance within herds of subclinical infection by *B. ovis* in animals of half dominance.

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>2 EPIDIDIMITIS INFECCIOSA DEL CARNERO</b>	<b>22</b>
<b>2.2. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>22</b>
<b>2.3. MICROBIOLOGÍA</b>	<b>22</b>
<b>2.4. AGENTE CAUSAL</b>	<b>23</b>
<b>2.5. BRUCELOSIS OVINA</b>	<b>24</b>
<b>2.6. PATOGÉNESIS DE <i>B.ovis</i>.</b>	<b>25</b>
<b>2.7. INMUNIDAD INNATA</b>	<b>26</b>
<b>2.8. INMUNOLOGÍA CELULAR</b>	<b>27</b>
<b>2.9. CÉLULAS CEBADAS</b>	<b>28</b>
<b>3 DIAGNÓSTICO</b>	<b>29</b>
<b>3.1. REVISIÓN CLÍNICA</b>	<b>29</b>
<b>3.2. DETECCIÓN DEL AGENTE</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1. TINCIONES ESPECÍFICAS</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2. CULTIVO</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4. SONDAS MOLECULARES DE DNA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</b>	<b>30</b>
<b>(PCR)</b>	
<b>3.2.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS</b>	<b>30</b>
<b>3.2.6. DOBLE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (IDD)</b>	<b>30</b>
<b>3.2.7. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)</b>	<b>31</b>

<b>4 BIENESTAR ANIMAL, ETOLOGÍA Y ESTRES.</b>	<b>33</b>
<b>4.1. BIENESTAR ANIMAL</b>	<b>33</b>
<b>4.1.1. MIEDO</b>	<b>33</b>
<b>4.1.2. SUFRIMIENTO</b>	<b>33</b>
<b>4.1.3. DOLOR</b>	<b>33</b>
<b>4.1.4. CONCEPTO DE NECESIDAD O SATISFACTOR</b>	<b>33</b>
<b>4.2. ETOLOGÍA</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1. COMPORTAMIENTO</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2. AFRONTAMIENTO “COPING”</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3. EMOCIONES POSITIVAS</b>	<b>36</b>
<b>4.2.4. DOMINANCIA</b>	<b>36</b>
<b>4.2.5. JERARQUÍA DE DOMINANCIA</b>	<b>36</b>
<b>4.2.6. RANGO SOCIAL</b>	<b>36</b>
<b>4.2.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DOMINANCIA.</b>	<b>36</b>
<b>4.3. ESTRÉS</b>	<b>37</b>
<b>4.3.1. CONTROL HORMONAL DEL ESTRÉS</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2. HIPOTÁLAMO</b>	<b>39</b>
<b>5 LEUCOCITOSPERMIA</b>	<b>41</b>
<b>6 CÉLULAS EPITELIALES DEL TRACTO GENITOURINARIO</b>	<b>43</b>
<b>7 ANÁLISIS DE REDES SOCIALES</b>	<b>43</b>
<b>8 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>45</b>

<b>9 HIPÓTESIS</b>	<b>46</b>
<b>10 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>47</b>
<b>10.1. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>47</b>
<b>11. METODOLOGIA</b>	<b>48</b>
<b>11.1. CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN DEL REBAÑO</b>	<b>48</b>
<b>11.2. ETOLOGÍA</b>	<b>50</b>
<b>11.2.1. MANEJO DEL REBAÑO</b>	<b>50</b>
<b>11.2.2. AGRUPACIÓN DE LOS CARNEROS</b>	<b>50</b>
<b>11.2.3. EVALUACIÓN DE LA DOMINANCIA</b>	<b>50</b>
<b>11.2.4. EVALUACIÓN DE LA LE MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE SEMEN BAJO CONDICIONES DE MANEJO RUTINARIO</b>	<b>52</b>
<b>11.3. INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL DE AGAROSA</b>	<b>53</b>
<b>11.4. INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y CEPA DE REFERENCIA</b>	<b>55</b>
<b>11.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO</b>	<b>55</b>
<b>11.6. CONTEO CELULAR</b>	<b>56</b>
<b>11.7. RADIO INMUNO ENSAYO (RIA)</b>	<b>56</b>
<b>11.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>56</b>
<b>11.9. CULTIVO BACTERIANO</b>	<b>57</b>
<b>11.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>57</b>
<b>12. RESULTADOS</b>	<b>58</b>
<b>12.1. ETOLOGÍA Y MANEJO DEL ESTRÉS.</b>	<b>58</b>
<b>12.2. ORGANIZACIÓN DE LOS GRUPOS DE ACUERDO AL ÍNDICE DE DOMINANCIA Y LEUCOCITOSPERMIA.</b>	<b>60</b>

<b>12.3. LEUCOCITOSPERMIA.</b>	<b>62</b>
<b>12.4. PRUEBA DE INMUNO DIFUSIÓN DOBLE EN GEL DE AGAROSA.</b>	<b>64</b>
<b>12.5. EXPLORACIÓN CLÍNICA</b>	<b>66</b>
<b>12.6. EVALUACIÓN DEL EYACULADO</b>	<b>66</b>
<b>12.7. PATOLOGÍA</b>	<b>67</b>
<b>12.7.1. LESIONES MACROSCÓPICAS RELACIONADAS CON EL TRACTO REPRODUCTOR DE CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR <i>B. OVIS</i>.</b>	<b>67</b>
<b>12.7.2. LESIONES MICROSCÓPICAS RELACIONADAS CON EL TRACTO REPRODUCTOR DE CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR <i>B. OVIS</i>.</b>	<b>69</b>
<b>12.8. CÉLULAS CEBADAS</b>	<b>75</b>
<b>12.9. CORELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE TD, LE, CORTISOL, INFILTRACIÓN Y CC, EN CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR <i>B. OVIS</i>.</b>	<b>78</b>
<b>12.10. CÉLULAS EPITELIALES</b>	<b>78</b>
<b>12.11. CONTEO DE CÉLULAS CD4+ Y CD8+.</b>	<b>82</b>
<b>12.12. RADIO INMUNO ENSAYO POR COMPETENCIA PARA CONOCER LA CANTIDAD DE CORTISOL CIRCULANTE.</b>	<b>85</b>
<b>12.13. REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA PARA EVIDENCIAR <i>B. OVIS</i>, EN ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.</b>	<b>89</b>
<b>12.14. BACTERIOLOGÍA.</b>	<b>90</b>
<b>12.15. ANÁLISIS DE REDES Y GENERACIÓN DE GRÁFICAS BIDIMENSIONALES.</b>	<b>90</b>
<b>13 DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
<b>14 CONCLUSIONES.</b>	<b>108</b>

<b>15 BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>127</b>
<b>APROBACIÓN DE SICUAE.</b>	<b>135</b>
<b>CRONOGRAMA</b>	<b>136</b>
<b>Empleo de redes sociales para el análisis de las relaciones entre dominancia y leucocitospermia en carneros con estrés experimental. REDES- Revista hispana para el análisis de redes sociales Vol.26,#2, Diciembre 2015 <a href="http://revistes.uab.cat/redes">http://revistes.uab.cat/redes</a></b>	<b>137</b>
<b>Stress-induced leokocytospermia in rams with healthy reproductive tract. Small Rhminant Research, 137 (2016), 34-39.</b>	<b>138</b>

## INDICE DE TABLAS.

	<b>pagina</b>
Tabla 1 Jerarquía de cada uno de los animales en experimentación, de acuerdo a la dominancia se les asigno una literal, D, d y s, que corresponden a los grupos Dominante, dominancia media y sumiso, respectivamente.	<b>51</b>
Tabla 2. Agrupación de la Asignación de los carneros en los grupos experimentales de acuerdo a TD, LE y D.	<b>54</b>
Tabla 3. Resultados de LE, TD y dominancia de todos los animales del grupo de experimentación.	<b>59</b>
Tabla 4. TD de los carneros antes y después de la inoculación experimental y desplazamiento en la TD. ↑ aumento, ↓ disminución, = sin movimiento.	<b>60</b>
Tabla 5 Comparación entre LE y dominancia, D dominante, d dominancia media y s sumiso.	<b>61</b>
Tabla 6. Leucocitospermia en los grupos experimentales antes y después de la infección experimental.	<b>63</b>
Tabla 7. Carneros desafiados experimentalmente con <i>B. ovis</i> , positivos por IDD y su dominancia. (D dominantes, d dominancia media y s sumisos).	<b>65</b>
Tabla 8. Correlación entre las variables estudiadas en los animales con infección experimental. TD, tasa de dominancia; LE, leucocitospermia; CORT, cortisol; INF, infiltración; CE, células epiteliales.	<b>78</b>
Tabla 9. Prueba de rangos múltiples a partir de ANOVA, se muestran solo los grupos con diferencias significativas en la cantidad de CE.	<b>79</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Comparación entre tres métodos para calcular la jerarquía en el rebaño experimental mediante los eventos agonistas.	<b>58</b>
Figura 2. Índice de leucocitospermia promedio en el hato a lo largo del experimento	<b>62</b>
Figura 3. Lecocitospermia por grupo experimental entre las semanas 7 y 16 del experimento	<b>64</b>
Figura 4 Promedios de la Infiltración por grupos de dominancia, en animales con infección experimental con <i>B. ovis</i> .	<b>74</b>
Figura 5. Promedios de la infiltración acumulada encontrada en los órganos del sistema genitourinario y glándulas anexas, por grupo en animales con infección experimental con <i>B. ovis</i> .	<b>74</b>
Figura 6. Promedios de la cantidad de células cebadas en los carneros agrupados por dominancia.	<b>75</b>
Figura 7. Promedios de la cantidad de células cebadas en los grupos de carneros con infección experimental en epidermis y conjuntiva, intraepididimal y testigos.	<b>76</b>
Figura 8. Cantidad total de CE en los grupos experimentales.	<b>79</b>
Figura 9. CE antes (semana 5) y después (semana 13) de la infección experimental.	<b>80</b>
Figura 10. Cantidad de CE a lo largo del experimento.	<b>80</b>
Figura 11. Células CD4+ presentes en cada grupo experimental.	<b>82</b>
Figura 12. Células CD8+ presentes en cada grupo experimental.	<b>83</b>
Figura 13. Cantidad de CD4+ yCD8+ en los sitios de conteo.	<b>84</b>
Figura 14. Cantidad de CD4+ yCD8+ después del desafío, de acuerdo a los tres grupos de dominancia en el rebaño.	<b>84</b>
Figura 15. Promedios totales de cortisol en los grupos por dominancia, la literal denota diferencia significativa.	<b>85</b>
Figura 16. Cantidad de cortisol promedio en los grupos experimentales. La literal denota diferencia significativa.	<b>86</b>

Figura 17. Comparación del índice de de cortisol en los grupos entre las semanas 7 y 18 del experimento	<b>87</b>
Figura 18 Comparación entre los índices de cortisol, células epiteliales y LE entre las semanas 3 y 16 del experimento, en animales con infección experimental.	<b>88</b>
Figura 19. Relación entre LE y TD donde se puede observar la cantidad de células por mm <sup>2</sup> presentes en el eyaculado contra la tasa de dominancia, antes del estímulo estresante.	<b>90</b>
Figura 20. Relación entre LE y TD donde se puede observar la cantidad de células por mm <sup>2</sup> presentes en el eyaculado contra la tasa de dominancia, después del estímulo estresante.	<b>91</b>
Figura 21. Características de una gráfica generada con los datos de una distribución teórica homogénea para generar una distribución perfecta.	<b>91</b>
Figura 22. Gráfica bidimensional con datos teóricos para obtener homogeneidad, se puede observar la correlación que se obtiene con una distribución de datos homogénea en la población, con las variables, LE y TD.	<b>92</b>
Figura 23. Gráfica bidimensional para los datos de Leucocitospermia antes y después del estímulo estresante controlado, en donde se han integrado todos los carneros del rebaño.	<b>93</b>
Figura 24. . Gráfica bidimensional para los datos de la Tasa de dominancia, antes y después del estímulo estresante controlado, en donde se han integrado todos los carneros del rebaño.	<b>94</b>
Figura 25. Gráficas bidimensionales para correlacionar los datos entre LE y TD antes del estímulo estresante, datos de todos los carneros del rebaño	<b>95</b>
Figura 26. Gráficas bidimensionales para correlacionar los datos entre LE y TD después del estímulo estresante, datos de todos los carneros del rebaño	<b>96</b>

## INDICE DE IMÁGENES

	<b>Página</b>
Imagen 1. Muestras de semen teñidas con hematoxilina-eosina..	<b>64</b>
Imagen 2. Apariencia normal del aparato genitourinario del carnero número 2, grupo control sin infección.	<b>67</b>
Imagen 3. Aparato genitourinario del Carnero 11, grupo IV infección intraepididimal con <i>B. ovis</i> .	<b>68</b>
Imagen 4. Carnero 12 grupo IV infección intraepididimal.	<b>68</b>
Imagen 5. Tejidos de carneros infectados experimentalmente por vía intraepididimal (semana 5 PI),	<b>70</b>
Imagen 6. Tejidos de carneros infectados experimentalmente (semana 5 PI).	<b>71</b>
Imagen 7. Tejidos de carneros infectados experimentalmente (semana 3 PI).	<b>72</b>
Imagen 8. Tejidos de carneros infectados experimentalmente (semana 3 PI).	<b>73</b>
Imagen 9. Carneros infectados experimentalmente (semana 3 PI).	<b>77</b>
Imagen 10. Células epiteliales en carneros infectados experimentalmente, en donde se observan los cuatro estadios considerados para calificar su presencia.	<b>81</b>
Imagen 11. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, con los productos de la PCR múltiple.	<b>89</b>



“...my goals are the same: to help in the art of healing or, better, preventing disease,  
at the same time satisfying my insatiable curiosity about the mysteries of life and happiness”.

Hans Selye.

“Intuitively it would seem that to cope with a situation is to attempt to control it – whether by altering the  
environment, changing the meaning of the situation, and/or managing one’s emotions and behaviours”

R S Lazarus.

## INTRODUCCIÓN.

La *Brucella ovis* (*B. ovis*) fue aislada en ovejas abortadas 1952 en Nueva Zelandia por Mc Farlane, en 1953 se reporta la epididimitis en carneros por *B. ovis* en Australia y Nueva Zelanda y en 1956 Kennedy la reporta por primera vez en América (Robles, 2008). En México se reportó por primera vez en Tabasco en 1974, pero se aisló en Guanajuato hasta 1979 (Méndez-Náres *et al.*, 1999).

La epididimitis infecciosa o contagiosa del carnero, es una enfermedad de distribución mundial, infectocontagiosa y difícil de diagnosticar en sus formas subclínicas (animales portadores). El cuadro es determinado por la infección por *B. ovis*, la inflamación en el órgano determina la rotura de la barrera “hemato-testicular” y el contacto de los espermatozoides con el intersticio y las células de respuesta inmune, con el desarrollo de respuestas autoinmunes y la formación de granulomas con estasis en el flujo espermático y consecuente degeneración testicular. Pueden ocurrir cuadros semejantes, en particular en la infección por *Actinobacillus seminis* y ocasionalmente con otros organismos considerados como parte de la flora normal del tracto reproductor (Mejía-Sánchez *et al.*, 2004; Acosta-Dibarrat, 2007), por lo que se discute su condición de patógenos primarios (Acosta-Dibarrat, 2006). El examen clínico de los animales para determinar la presencia de epididimitis, no permite diferenciar la epididimitis infecciosa de las de otro origen y menos aún detectar animales portadores (Bulgin, 1990b; Ficapal *et al.*, 1998).

En la epididimitis infecciosa, la respuesta inflamatoria es mayor que en los granulomas congénitos o mecánicos (Trigo, 1998). La epididimitis afecta a las explotaciones ovinas debido a los bajos índices reproductivos, eliminación de machos reproductores por acortamiento de su vida reproductiva (Bulgin, 1990a; Robles, 1998).

La patogenia de la enfermedad no es clara y no se ha podido explicar “el tropismo” de la bacteria por el aparato genital del carnero. Se ha señalado la posible participación de mecanismos endócrinos relacionados a la pubertad, o la posible interacción con lesiones traumáticas en la cola del epidídimo, así como factores

medioambientales, de manejo y de alimentación (Jansen, 1983), pero los intentos por inducir la enfermedad experimental, simulando estos mecanismos, han fallado (Acosta-Dibarrat, 2007).

## **2. EPIDIDIMITIS INFECCIOSA DEL CARNERO**

### **2.2. EPIDEMIOLOGÍA**

La distribución en México de la epididimitis infecciosa del carnero ocasionada por *B. ovis*, no se ha establecido, si bien se han hecho estudios serológicos y de aislamiento, que la ubican en la zona central del país, su prevalencia tampoco está bien definida (Núñez-Torres *et al.*, 1997).

### **2.3. MICROBIOLOGÍA**

Dentro del género *Brucella* se reconocen 10 especies que se clasifican por la naturaleza del Lipopolisacárido (LPS) en especies de fenotipo liso y rugoso, grado de patogenicidad y por su hospedero preferente, aunque la mayoría de las especies pueden afectar a más de una especie animal. Las especies de fenotipo liso tienen el LPS completo y son: *B. abortus* que afecta principalmente a bovinos, *B. suis* a cerdos, *B. melitensis* a caprinos, *B. neotomae* a la rata del desierto, *B. pinnipedialis* a pinnípedos (lobos y leones marinos, focas, elefantes marinos y morsas), *B. ceti* a cetáceos (ballenas, delfines y orcas), *B. microti* al ratón de montaña y *B. inopinata* que fue aislada en 2010 de una infección de un implante mamario. Mientras que las especies con LPS de fenotipo rugoso por carecer de la cadena O; únicamente son *B. ovis* que afecta a ovinos y *B. canis* a perros. (Álvarez Martínez *et al.*, 2003; Barun *et al.*, 2008; Diez, 2002; Scholz *et al.*, 2008).

Las especies lisas: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* (Jiménez de Bagues *et al.*, 2005a) y la rugosa *B. canis* tienen carácter zoonótico (Ratushna *et al.*, 2006). No se han comprobado casos humanos por *B. ovis* o por *B. neotomae* (Diez, 2002). En México se ha estimado una seroprevalencia endémica en humanos de 3.42 % (López-Merino *et al.*, 1992) y de 3.8% en el año 2000, siendo el estado de México y Guanajuato, los de mayor incidencia respectivamente (Velásquez-Monroy *et al.*, 2002). Recientemente ha recibido atención por su posible uso como arma bacteriológica ya que entre 10 y 100 bacterias pueden producir una asperción infectante para un ser humano (Jiménez de Bagues *et al.*, 2005b; Gómez-Cardoso *et al.*, 2006), por su capacidad de producir

dolor de cabeza y la mortalidad relacionada con daños al endocardio o sistema nervioso central (Di Giovanni, 1999).

El género *Brucella* pertenece al grupo 2 de las  $\alpha$ -proteo bacterias, relacionadas filogenéticamente con otros parásitos celulares, tanto de plantas y animales como con bacterias de vida libre. Al comparar los cromosomas de las brucelas y otras  $\alpha$ -proteo bacterias se confirma que los genes críticos para su progresión cíclica, maquinaria de translación, respuesta al estrés, membranas lipídicas, metabolismo heterotrópico básico y conversión energética, están conservados en las brucelas. Se ha sugerido que la capacidad de sobrevivencia del género *Brucella* está muy relacionada con las características de sus dos cromosomas, concentración de G+C (1, 57.23% y 2, 57.18%) y una cantidad similar de regiones codificantes potenciales. Lo anterior sugiere características altamente conservadas en los replicones bacterianos heredados de un mega replicón del mega plásmido ancestral, condiciones muy similares a las  $\alpha$ -proteo bacterias con que están relacionadas las brucelas. Lo que hace al género *Brucella* interesante, ya que aun siendo mono filetico, las especies que lo conforman presentan una gran variabilidad en sus factores de virulencia y preferencia de hospedador. (Moreno *et al.*, 2002).

#### **2.4. AGENTE CAUSAL**

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, miden entre 0.7 a 1.2 $\mu$ m de largo por 0.5 $\mu$ m a 0.7  $\mu$ m de ancho, con dos cromosomas circulares de aproximadamente 1164 Kbp y 2111 Kbp respectivamente (*B. ovis* ATCC 25840), es inmóvil, no esporula, ocasionalmente se puede agregar en pares o cadenas cortas, presenta características de patógeno intracelular facultativo, aunque se ha tratado de redefinir por sus características patógenas, Gorvel en 2002 propuso denominarlo “parásito facultativo extra/intracelular”. Se tiñe de rojo con la coloración de Stamp o Ziehl Neelsen modificada y se tiñe de azul con la coloración de Koster modificada. Crece bien en medios basales como el tripticasa-soya, agar sangre y agar Columbia, enriquecidos con 7% de suero o sangre desfibrinada en una atmósfera con un 10% a 20% de Dióxido de carbono (Robles, 1998).

Estudios recientes de biología celular y molecular, han caracterizado genes de virulencia importantes en la interacción parásito-hospedero, que modifican la respuesta inmune, la inhibición de la fagocitosis y la modulación de la apoptosis (Jiménez de Bagues *et al.*, 2005a). Se han propuesto algunas secuencias de virulencia, como: las necesarias para el reclutamiento de actina y activación de GTPasas para la internalización,

para la producción de adhesinas, invasinas, hemolisinas, proteasas y la inhibición de la apoptosis, esta última sin interferir con la mitosis (Moreno *et al.*, 2002). También se han confirmado similitudes de al menos un 98% en secuencias a nivel proteico, lo que ha permitido identificar tanto genes comunes, como genes para diferenciar biovariantes del género *Brucella*, estos último con utilidad diagnóstica (Ratushna *et al.*, 2006).

Para *B. ovis* se han caracterizado los antígenos del lipopolisacárido Rugoso (LPS-R), proteínas de la membrana externa (Omp, grupos 1, 2 y 3 de 25 a 94 kilodaltones [kDa]) y una proteína de 67 kDa, así como proteínas periplasmáticas y citoplasmáticas, esto permite el diagnóstico preciso de *B. ovis* (Mejía-Sánchez *et al.*, 2004).

El conocimiento más amplio del genoma y proteoma del género *Brucella*, ha permitido caracterizar procesos de la fisiología bacteriana dentro de la célula blanco relacionados con su virulencia, principalmente componentes del sistema de secreción VirB y BvrB, así como genes relacionados con procesos metabólicos necesarios durante la proliferación (Cascales, 2003 *et al.*; Jiménez de Bagües *et al.*, 2005a, Gómez-Cardoso *et al.*, 2006; Álvarez-Martínez *et al.*, 2003). Para el género *Brucella* como patógeno intracelular, la interacción con la célula hospedadora o blanco tiene consecuencias importantes relacionadas con su supervivencia, proliferación, diseminación y desarrollo de inmunidad. (Jiménez de Bagües *et al.*, 2005a).

## 2.5. BRUCELOSIS OVINA

La brucelosis ovina puede ser ocasionada por especies lisas principalmente *B. melitensis*, que produce un cuadro de aborto y por especies rugosas *B. ovis* con un cuadro de epididimitis, aunque las dos especies pueden producir abortos y cuadros relacionados con testículo y epidídimo. *B. ovis* afecta particularmente al carnero y los tejidos relacionados con el aparato reproductor, generando el cuadro denominado epididimitis infecciosa del carnero (Díaz-Aparicio, 2001; Méndez-Náres *et al.*, 1999).

La epididimitis producida por *B. ovis* está asociada a cuadros en ovinos adultos, mientras que en corderos o carneros jóvenes se puede encontrar una asociación entre *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*, en donde los dos últimos se consideran parte de la flora normal de estos animales (Borges, 1982). Otros organismos asociados a la microbiota normal del tracto reproductor bajo distal, son *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides sp*, *E. coli*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp*, los cuales se pueden aislar del

epidídimo y estar relacionados con lesiones en epidídimo y testículo (Méndez-Náres *et al.*, 1999; Mejía-Sánchez *et al.*, 2004).

En hembras, *B. ovis* puede producir abortos aunque en bajos porcentajes (3-5%), al final de la gestación y al infectar a sus crías, se mantiene la infección en el rebaño (Mejía-Sánchez *et al.*, 2004).

## 2.6. PATOGÉNESIS DE *B. ovis*.

La transmisión de la enfermedad en los animales puede ser a través de la piel, la mucosa respiratoria y conjuntival, aunque la principal ruta de infección es la oral y en el caso de *B. ovis* la venérea. Una vez que la bacteria ingresa al organismo del animal, coloniza los linfonodos regionales donde se multiplica, localizándose principalmente en órganos como riñón hígado, bazo y finalmenter en los linfonodos relacionados con los genitales, en forma crónica alrededor de los 30 días postinfección. (Biberstein, 1964; Robles 1998).

En los macrófagos la *Brucella* inhibe la fusión de fagosoma-lisosomas, replicándose dentro de estos compartimentos que contienen componentes del retículo endoplásmico, esta vía se ve favorecida por el sistema de secreción tipo IV. Si el macrófago activa mecanismos microbicidas, la bacteria destruye a su célula hospedadora, para replicarse extracelularmente en los tejidos adyacentes o infectando células cercanas. La respuesta celular del hospedador puede generar infiltración linfocitaria, la formación de un absceso o un granuloma con necrosis caseosa (He, *et al* 2006).

Las defensas del huésped pueden controlar eventualmente la infección por *Brucella*, el complemento puede lisar algunas cepas de brucelas rugosas, pero tienen poco efecto sobre cepas lisas (Gómez-Cardoso *et al.*, 2006).

*B. ovis*, al igual que las otras brucelas, entra al organismo a través de las membranas mucosas. Una vez traspasado el epitelio de la mucosa, puede ser fagocitada, sigue el curso a los vasos linfáticos aferentes y llega a los nodos linfáticos regionales. Por vía sanguínea la bacteria invade todo el organismo infectando el tracto genital, hígado, bazo, pulmones, riñón y otros nodos linfáticos. Ya hacia el final del segundo mes posterior a la exposición, *B. ovis* desaparece de nodos linfáticos y otros órganos, encontrándola únicamente en epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbo uretrales, ampollas de los conductos deferentes y a veces en riñón. Una vez establecida en los epidídimos produce una reacción inflamatoria caracterizada por edema peri vascular e infiltración celular del tejido conectivo. Se produce hiperplasia del epitelio de los túbulos epididimarios y se forman vesículas intraepiteliales (Méndez-Nares *et al.*, 1999; Robles, 1998).

Los cambios epiteliales conducen a la extravasación de espermatozoides al intersticio causando una fuerte reacción inflamatoria y la formación de granulomas espermáticos. Las vesículas seminales y las ampollas parecen ser el establecimiento más común de la infección por *B. ovis*. Esto explicaría la presencia de carneros positivos en la serología a *B. ovis*, pero sin lesiones palpables en el aparato reproductor. *B. ovis* ha sido aislada en carneros a partir de epidídimo, testículo, túnica vaginal, vesículas seminales, ampollas de los conductos deferentes, glándulas bulbo uretrales, hígado, riñón, bazo y ganglios linfáticos regionales, sin embargo el semen es la vía más importante de excreción y transmisión (Acosta-Dibarrat, 2007; Al-Katib, 2005; Díaz-Aparicio, 2002; Paolicchi, 2000; Robles, 1998).

Las brucelas pueden sobrevivir al medioambiente interno del macrófago o de cualquier célula con función fagocítica (Ratushna *et al.*, 2006), esto se ha tratado de explicar mediante el estudio del LPS, que está conformado por tres dominios: lípido A, el núcleo del oligosacárido y antígeno O o la cadena lateral O. El polisacárido-O de la brucela lisa es un homopolímero no ramificado con un promedio de 96 a 100 unidades glicosílicas. El núcleo del oligosacárido está compuesto por quinovosamina, glucosamina, 3-deoxi-D-mano-2-ácido octulosónico (KDO) y azúcares no identificadas. El lípido A anclado al núcleo del oligosacárido, contiene una diamino glucosa como esqueleto, amida y ester asociada a una cadena larga saturada y ácidos grasos hidroxilados. El extremo hidrofóbico del Lípido A es la parte que cubre a la membrana externa y se asocia a fragmentos proteicos (Gómez-Cardoso *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo activa vías de defensa celular que pueden ser dañinas para el tejido, al provocar una reacción autoinmune en el tracto reproductor (Vasselon *et al.*, 2002), también se ha observado que la estimulación antigénica para el reconocimiento de espermatozoides puede ser espontánea sin tener un sitio de estimulación antigénica claro, lo anterior se ha tratado de atribuir a anomalías estructurales o historia de traumatismos (Clifton *et al.*, 1992), siendo este otro factor promotor de lesiones en el tracto.

## **2.7. INMUNIDAD INNATA.**

El complemento, tanto en su activación por la vía clásica o alterna, es una de las formas de resistencia del hospedador, en *B. abortus* y *B. melitensis* la respuesta es inducida por el lipopolisacárido (LPS), el componente más importante de estas especies. En contraste *B. canis* y *B. ovis* no poseen la cadena O del polisacárido externo y mantienen la virulencia en su hospedador respectivo. En animales con primo infección,

donde el LPS está involucrado, la vía alterna del complemento es aparentemente la primera defensa en contra de *B. abortus*, pero el suero de animales con estadios crónicos de la enfermedad, con IgG específica contra *B. abortus*, no mata a la bacteria. La vía clásica del complemento que lisa a *B. abortus*, se activa con gran cantidad de IgM específica y con bajos niveles de IgG (Splitter, 1997).

## 2.8. INMUNIDAD CELULAR.

Los neutrófilos son la primera célula del sistema inmunitario que tiene contacto con las brucelas, la endocitosis es más eficiente con la opsonización y la fijación del complemento. Algunas brucelas sobreviven dentro de los neutrófilos y son llevadas a los nodos linfoides regionales. Por otro lado, la quimiotaxia de los neutrófilos al lugar de infección, secuestra a la bacteria, limitando su diseminación. Los neutrófilos utilizan el sistema hidrógeno-mieloperoxidasa y complejos con peróxido, para matar a las bacterias, sin embargo las brucelas sobreviven dentro de la célula, siendo las especies lisas las que tienen mayor prevalencia, el LPS inhibe la degranulación y se considera el factor de virulencia en contra de los neutrófilos. *B. suis* y *B. abortus* generan factores que evitan la unión lisosoma-fagolisosoma, la actividad neutrofílica es diferente para controlar la infección por las diferentes especies de *Brucella* (Splitter, 1997).

Reportes en el modelo murino, indican que las células NK, no reconocen y no matan a las células con *Brucella* en el inicio de la infección lo que podría provocar menor cantidad de Interferon producido por las células NK, por lo tanto una disminución en la promoción de células CD4+ (Fernández *et al.*, 1995)

Las células dendríticas son estimuladas por la vía del ligando TLR9 para la secreción de IL-12, provocando una respuesta tipo Th-1 y producción de IFN- $\gamma$ . Macrófagos, neutrófilos y linfocitos responden a la quimiotaxia producida por las proteínas y polisacáridos de las brucelas, secuencialmente, responden primero los neutrófilos, después los macrófagos y finalmente los linfocitos, esta respuesta desarrolla en los tejidos infectados y colonizados, la lesión crónica granulomatosa característica de la brucelosis (Gómez-Cardoso *et al.*, 2006; Salas-Téllez *et al.*, 2005).

Los macrófagos son el blanco inicial, la bacteria inhibe la producción de TNF- $\alpha$ , la principal citocina pro inflamatoria, este evento de virulencia previene las secreciones autócrina y parácrina de los macrófagos, también se ha especulado sobre la tolerancia al patógeno, inducida por la falta del TNF- $\alpha$  durante la fase de infección e inflamación (Jiménez de Bagües *et al.*, 2005). Esta falta de citocina pro inflamatoria provoca una

disminución en la producción de IL-12 esencial para la activación de Th 0 y la acción protectora de las células Th 1, así como de las células de memoria, (Jiménez de Bagües *et al.*, 2005; Gómez-Cardoso *et al.*, 2006).

Los macrófagos fagocitan a las brucelas a un ritmo muy bajo (Jiménez de Bagües *et al.*, 2005) El reconocimiento del LPS bacteriano esta mediado por el CD14, formado por un dominio transmembranal y dominios intracelulares, necesarios para la traducción de la señalización, en conjunto con moléculas de la familia de receptores tipo “Toll” (TLR) (Campos *et al.*; 2004; Gómez-Cardoso *et al.*, 2006), la cual tiene un papel primordial en la inducción pro inflamatoria de citocinas, producción de TNF- $\alpha$  e IL-12. La señalización durante la infección con *Brucella* esta mediada por dos ligandos: para lipoproteínas por TLR2 y para el LPS la TLR4 y mientras esta activación disminuye, aumenta la vía de señalización para TLR mediante el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) siendo esta la molécula más importante para la protección del hospedador en contra de la *Brucella* (Gómez-Cardoso *et al.*, 2006).

## **2.9. CÉLULAS CEBADAS (CC).**

Pocos trabajos han explorado la relación que existe entre el estrés generado por el manejo rutinario y la reactividad generada de forma aguda por las CC, para explicar la patogenia de las infecciones genitourinarias en carneros (Garrido, 2011). La importancia de las CC en el aparato genitourinario normal de los animales domésticos y particularmente en los ovinos y caprinos, ha sido pobremente estudiada (Castillo *et al.*, 2008; Alessandro, 2007; Anton, 1998; Michaloudi, 1999; Scott, 200, Tryphonams, 1979), aunque existen algunos trabajos para determinar la cantidad de mastocitos en órganos y tejidos del sistema genitourinario en algunas especies (Anton,1998; Dimitrov, 2007; Gaytan,1989; Ohanian, 1977), recientemente se ha comenzado a ver la importancia de su distribución en diferentes órganos (Apa *et al.*, 2002; Nistal *et al.*, 198 4; Xu *et al.*, 2003; Dimitrov *et al.*, 2007). Las CC son células efectoras de la respuesta inflamatoria regional aguda, (Abraham *et al.*, 1997), siendo una de las primeras respuestas a diferentes agresiones, principalmente contaminantes inertes no biológicos y antígenos microbianos (Levine, 1995; Pier *et al.*, 2004), a través de la producción de citocinas moduladoras de las respuestas innata y adaptativa por la estimulación de respuestas Th1 y Th2 (Abraham *et al.*, 1997). Las CC han sido directamente relacionadas con la inmunidad de mucosas, quimiotaxia de células de defensa y el control de parásitos en ovinos (Amarente, 2007), por lo que la susceptibilidad a ciertas enfermedades infectocontagiosas del tracto reproductor y glándulas anexas, puede estar asociada a efectos

generados por las catecolaminas producidas en el Sistema nervioso central (SNC) y Sistema nervioso periférico (SNP) (Greenberg, 2002) y por las CC, particularmente durante las condiciones de estrés generado por manejo.

### **3. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de *B. ovis* en carneros se basa en la revisión clínica de su aparato reproductor, la detección de anticuerpos específicos contra *B. ovis* o el aislamiento de la bacteria de semen o tejidos (Diez, 2002; Ficapal, 1998; Núñez-Torres, 1997; Robles, 1998 Worthington, 1985).

#### **3.1. Revisión clínica**

La palpación de los órganos genitales externos, permite el diagnóstico de la epididimitis, que es una de las manifestaciones clínicas frecuentes de la infección. Si bien la técnica es fácil de llevar a cabo, los resultados no son concluyentes ya que: (a) hay otros organismos que producen epididimitis palpables; (b) no todos los carneros infectados desarrollan epididimitis y (c) algunos carneros infectados con lesiones palpables a la revisión clínica, pueden estar clínicamente normales al practicarse una nueva revisión semanas más tarde. Sin embargo se deberá recomendar siempre a los productores adoptar esta técnica ya que no solo permite detectar a los animales que presentan epididimitis por causas infecciosas, sino lesiones congénitas o adquiridas en el tracto genital (Robles, 1998).

#### **3. 2. Detección del agente**

##### **3.2.1. Tinciones específicas**

Las improntas de semen o tejidos pueden ser teñidas con Gram, pero la técnica más adecuada es la coloración de Ziehl-Neelsen modificada, en la cual *B. ovis* aparece como un pequeño cocobacilo teñido de rojo. Si bien la técnica es sencilla, la presencia de otros microorganismos patógenos del tracto genital, como *Coxiella* y *Chlamydia*, pueden provocar confusiones, además *B. ovis* es excretada intermitentemente en semen. La coloración de Giemsa puede ser usada para detectar la presencia de células inflamatorias en el semen, lo que provee una indicación temprana de infección en el tracto genital, pero no determina el agente causal. Estas dos

pruebas pueden ser combinadas en una sola, ya que si se usa la coloración de Stamp, ésta detectará los microorganismos presentes y también teñirá los neutrófilos. Por su simplicidad, es una técnica que debiera usarse de rutina en la evaluación del semen de carneros donantes en programas de Inseminación Artificial (Robles, 1998).

### **3.2.2. Cultivo**

El aislamiento de *B. ovis*, para fines diagnósticos en carneros sospechosos se puede intentar de muestras de semen, sin embargo un resultado negativo no asegura que el animal no esté infectado, ya que *B. ovis* se excreta por semen en forma intermitente. Para el cultivo de muestras de campo el medio selectivo de Thayer-Martin y el medio de Skirrow modificado, son los más recomendados para el aislamiento de *B. ovis*. El aislamiento del agente causal sigue siendo la única forma de tener un diagnóstico definitivo y la prueba de oro para la evaluación de la mayoría de las pruebas diagnósticas (Robles, 1998).

### **3.2.3. Técnicas inmunológicas**

La inmunofluorescencia directa en improntas y la Peroxidasa anti-peroxidasa en cortes de parafina, han sido desarrolladas para *B. ovis*, pero hasta el presente no han sido usadas de rutina en el diagnóstico. La técnica de Peroxidasa anti-peroxidasa podría ser una buena alternativa a la bacteriología en tareas de diagnóstico, ya que permite identificar y ubicar la bacteria y ver la estructura del tejido a la vez, lo que es de suma utilidad en estudios de patogénesis (Robles, 1998).

### **3.2.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Actualmente con PCR se puede detectar con un 100% de especificidad a *B. ovis*, ya que no se producen amplificaciones de especies relacionadas, al ser capaz de distinguir las diferentes especies de *Brucella*, en las regiones donde existe la infección mixta en ovinos por *B. melitensis* y *B. ovis*., permite distinguirlas (Manterola *et al.*, 2003; Ratushna *et al.*, 2006).

### **3.2.6. Doble inmunodifusión en gel de agar (IDD)**

Desde que fuera reportada por Myers y Siniuk en 1970, la doble difusión en gel ha sido ampliamente utilizada pero con diferentes procedimientos y por lo tanto con resultados variados, pero cuando la prueba es estandarizada con una concentración adecuada de cloruro de sodio 10 % en el gel y un antígeno apropiado extraído en caliente, la doble difusión en gel es tan sensible y específica como la Fijación del complemento (FC) (Ficapal, 1998; Robles, 1998).

Los geles pueden prepararse con diferentes agares, agarosas y amortiguadores pero los geles hipertónicos (10% de Na Cl) son los recomendables. El antígeno se obtiene por la técnica del extracto salino en caliente (HS) a una concentración de entre 1.25 y 5 mg/ml (Núñez-Torres, 1997). Basándose en la IDD, se ha desarrollado una prueba de conrainmunolectroforesis, con resultados comparables a los de la IDD y (FC) con la ventaja de que los resultados se tienen en pocas horas (Robles, 1998).

### **3.2.7. Enzimoinmunoensayo (ELISA)**

El uso de ELISA para el diagnóstico de la infección por *B. ovis*, se ha incrementado, no solo es más sensible cuando se lo compara con la FC y la DDG (Mejía-Sánchez *et al.*, 2004; Nielsen, 2007), sino que tiene una serie de ventajas: (a) no es necesario inactivar los sueros como para FC (b) no tiene problemas con sueros hemolizados o anticomplementarios;(c) trabaja con una sola dilución del suero (d) requiere una mínima cantidad de antígeno, que en general es un tema crítico y (e) los reactivos son más estables que aquellos que utiliza la FC. Finalmente, la prueba de ELISA es capaz de detectar cualquier tipo de inmunoglobulina dependiendo del conjugado que se use y puede ser totalmente automatizado (Cho *et al.*, 1987; Robles, 1998).

## **4. BIENESTAR ANIMAL, ETOLOGÍA Y ESTRES.**

### **4.1. Bienestar animal**

La ciencia del bienestar animal procura medir el efecto de diferentes situaciones medioambientales desde el punto de vista de la calidad de vida del animal (Broom, 1991; Dawkins, 2008).

En general una de las mejores guías para el bienestar animal son las cinco “libertades” mencionadas en la declaración de los derechos universales de los animales: libre de hambre, sed o malnutrición, libre de miedo o estrés, libre de incomodidad física o térmica, libre de dolor daño o enfermedad y libre de expresar las pautas de comportamiento. Para entender el bienestar animal se deben considerar tres aspectos: el fisiológico, el ético y el de las legislaciones aplicables al trato de los animales y para definirlo se debe abordar desde tres puntos de vista: estado físico o fisiológico; estado mental o sentimientos y la naturalidad (Declaración de los derechos animales UDAW, WSPA, 2011).

Se puede definir al bienestar del estado físico desde dos puntos de vista, el primero en cuanto a su capacidad de equilibrio, según Fraser y Broom (1990), “Bienestar es el estado que guarda el animal en su intento de equilibrarse con su medioambiente” y del punto de vista fisiológico según Mc Glone (1993) “Un animal está en un pobre estado de bienestar solo cuando sus sistemas fisiológicos se han perturbado hasta el punto en que la supervivencia o reproducción es incompatible con la vida”

Situación o condición mental, define al bienestar desde el punto de vista de lo que siente el animal, por lo que la falta de estrés, la salud o lo saludable, son necesarios y/o suficientes para concluir si un animal se encuentra en condiciones de bienestar (Duncan, 1993).

El tercer aspecto que permite entender al bienestar como un todo es la naturalidad, ya que el bienestar no solo significa control del dolor o del sufrimiento, también se debe propiciar y cultivar la naturaleza de los animales, denominada por Rollin, 1993: *telos*.

Los efectos del medio en que se encuentra y desarrolla el individuo pueden modificar el bienestar. El miedo, sufrimiento y dolor, se relacionan directamente con la medición del bienestar (Broom, 1991; Haller, 1998).

#### **4.1.1. Miedo**

Es la influencia sobre los comportamientos fundamentales y condiciona la adaptación afectando la producción. La interpretación de los parámetros de comportamiento relacionados al miedo son en general subjetivos (Veissier, 2007). La respuesta del cerebro superior al miedo es una preparación para el peligro generado por algún evento, por ejemplo depredación, lesión por un rival o heridas, esta reacción desencadena una respuesta en la médula adrenal (Broom; 1991), se puede provocar miedo, durante el manejo, transporte y pre rastro (Broom; 1991), particularmente por aislamiento, sorpresa y la presencia de humanos (Veissier, 2007, Vandenheede 1998).

#### **4.1.2. Sufrimiento**

Es un término que se refiere a los sentimientos subjetivos no placenteros, que se pueden percibir de forma aguda o crónica y que se convierten en sufrimiento, cuando no se pueden evitar el estímulo o cuando no se puede regresar a la normalidad o estado basal. El sufrimiento provoca que el animal no pueda administrar su relación con el miedo y se refleja sobre su comportamiento o índices de producción. Se pueden emplear los signos clínicos de enfermedad o lesión como indicadores de sufrimiento y estrés (Broom, 1991).

#### **4.1.3. Dolor**

Es una sensación en extremo aversiva en sí misma, es difícil de medir pero en el comportamiento se tiene un buen indicador del dolor, su percepción genera respuesta en la corteza adrenal (Broom, 1991).

#### **4.1.4. Concepto de necesidad o satisfactor.**

Esto se refiere al requerimiento natural y fundamental en la biología de un animal, para obtener un recurso determinado o responder a un estímulo corporal o del medio, si el satisfactor o la necesidad no se satisfacen se

puede afectar la biología o el comportamiento. Las necesidades de cualquier animal tienen una jerarquía natural, y algunas son más importantes que otras bajo ciertas circunstancias, inicialmente se consideran agua y alimento como fundamentales, un área para descanso es menos importante, en orden de importancia se puede entender sobrevivencia sobre salud y salud sobre comodidad (Carranza, 1994).

Jensen y Toates, 1993, definen la necesidad dentro del comportamiento como una pauta específica del comportamiento en la que el animal aparentemente debe hacer, sin estar relacionada con el medio ambiente o con las necesidades fisiológicas del animal, la necesidad involucra el despliegue de comportamientos típicos sin consecuencias fisiológicas directas y sin retroalimentación de mecanismos fisiológicos de regulación (Boissy, 2007; Jensen 1983).

#### **4.2. ETOLOGÍA**

La etología proviene de las palabras griegas *ethos* (costumbre) y *logos* (tratado), definiéndose como el estudio científico de las cadenas de actos de comportamiento, fijas y características en cada especie (Carranza, 1994), los límites de la etología moderna se han extendido y explicado gracias a sus interconexiones con otras ciencias y a sus divisiones en ramas que responden a las preguntas relacionadas con las causas, ontogenia, evolución y función, del comportamiento. No se han revisado las relaciones entre los índices de estrés y bienestar, en donde la adaptación es un mecanismo vinculante entre los factores, el nivel de la respuesta al estímulo es difícil de relacionar con la intensidad del estrés generado o con la condición de bienestar en que se encuentra el animal (Broom, 1991).

El enfoque etológico fue enmarcado por Tinbergen dentro de 4 cuestiones fundamentales: la causalidad inmediata o mecanismo (causas), el desarrollo ontogénico (ontogenia), la historia filogenética (evolución) y su significado adaptativo (función). Al tratar de comprender las respuestas de cualquier organismo vivo bajo los cuatro enfoques mencionados, todas pueden ser diferentes pero igualmente ciertas, ninguna es única y todas se necesitan para una comprensión global del comportamiento, de esta forma se puede aplicar a cualquier organismo vivo, tanto animal como vegetal, a estos últimos se les puede estudiar bajo las cuatro perspectivas de Tinbergen, considerando su capacidad adaptativa, reproductiva, defensiva, de comunicación, mimetismo y engaño (Carranza, 1994).

#### **4.2.1. Comportamiento**

Es la respuesta del animal al medio ambiente y es el modo en que los seres vivos resuelven los problemas a los que deben enfrentarse, mediante los procesos fisiológicos implicados en una decisión, a lo largo de sus vidas y que pueden tener repercusión sobre su eficiencia biológica (Carranza, 1994).

El comportamiento se deberá emplear como herramienta para apoyar la producción ovina, particularmente en áreas geográficas o de condiciones críticas severas, la influencia que tiene el conocimiento del comportamiento animal sobre la producción de una raza no se ha entendido o apreciado totalmente (Hulet, 1983).

Los actos observados más simples se llaman pautas, las cuales forman parte de tácticas y estrategias que configuran las soluciones que un ser vivo adopta ante un problema, estas estrategias incluyen una gran cantidad de procesos fisiológicos (Carranza, 1994).

#### **4.2.2. Afrontamiento “coping”**

Es el cambio cognoscitivo y de comportamiento constante con la finalidad de enfrentar y manejar demandas específicas externas. El término se refiere a estrategias constructivas o adaptativas empleadas para reducir el efecto de estresores determinados y su desarrollo en el animal tiene efecto sobre la enfermedad o salud (De Miguel *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 1993; Khroné, 2009). Recientemente se ha comprobado que existe una relación directa entre los perfiles neuroendócrinos y las estrategias de afrontamiento que desarrollan los individuos sobre la activación del sistema inmune (De Miguel *et al.*, 2011).

#### **4.2.3. Emociones positivas.**

El campo de las emociones positivas, y los estados afectivos positivos son la siguiente frontera para comprender el proceso del bienestar animal. Las emociones positivas requieren una secuencia temporal: un medio ambiente gratificante, una estimación cognoscitiva del SNC, seguido por reacciones psicológicas y de comportamiento. Las experiencias emocionales positivas comúnmente desembocan en el estado global de felicidad, el cual consiste en emociones y actividades positivas (Boissy *et al.*, 2007). Se ha propuesto que los animales menos estresados, pueden tener mayor control sobre situaciones estresantes (Greiveldinger *et al.*, 2009; Keil; 2012).

#### **4.2.4. Dominancia.**

La dominancia se debe considerar como un valor relativo, desde el punto de vista del individuo y el grupo, ya que un individuo puede ser dominante en un grupo pero ser subordinado en otro, por lo que la dominancia es una variable que caracteriza la relación entre dos individuos, pero no es un carácter individual. La dominancia es considerada lineal para ovinos, los machos son dominantes sobre las hembras, los adultos sobre los jóvenes, los que conforman un rebaño inicialmente sobre los que se incorporan después. Tanto la condición de dominante como de subordinado tienen ventajas y desventajas, las cuales dependen de las variables del rebaño (número de individuos, cantidad de machos y hembras, mezcla de edades) (Carranza, 1994).

Las jerarquías generadas por dominancia son comunes en la naturaleza, en donde los rangos ordinales individuales se pueden usar para medir su posición en el orden jerárquico del rebaño, lo que supone a todos los individuos el acceso a recursos y reproducción (Boyd, 1983).

#### **4.2.5. Jerarquía de dominancia.**

Es el orden de los individuos según su rango, dentro de una unidad social (Ortiz de Montellano, 2004), la situación del individuo en la jerarquía del rebaño permite que se desarrollen adecuadamente y más rápido las asociaciones afiliativas, disminuyendo así las conductas agonistas, ya que en los ovinos las confrontaciones se resuelven de forma individual. Cada individuo genera actitudes y comportamientos basándose en la jerarquía de dominancia, tanto del oponente como de la propia. Asimismo, el grado de dominancia de un individuo con respecto a los otros miembros del grupo se le denomina rango social, siendo la jerarquía social el orden de los individuos según su rango (Carranza, 1994).

#### **4.2.6. Rango social.**

El rango social es el grado de dominancia del individuo frente al rango de los demás miembros del rebaño (Carranza, 1994).

#### **4.2.7. Determinación del grado de dominancia.**

El grado de dominancia Dial, es el porcentaje de enfrentamientos ganados entre dos animales, la frecuencia observada se compara matemáticamente y si la diferencia entre observado y esperado es significativa se puede considerar a ese individuo como dominante sobre el otro (Senar *et al.*, 1989). La tasa de dominancia, sirve para valorar la diferencia en el grado de dominancia de varios individuos, se genera a partir del número total de encuentros de un individuo con los otros miembros del rebaño, esta medida no aporta información sobre la cantidad de animales sobre los cuales el individuo es dominante. Se pueden aplicar análisis factoriales de correspondencia, en donde se conoce el grado de dominancia de cada individuo y su relación en la jerarquía con los otros, en este tipo de análisis también se sabe qué tipo de comportamiento utiliza cada animal (Carranza, 1994).

#### **4.3. ESTRÉS**

Los individuos son capaces de adaptarse mediante respuestas de comportamiento y fisiológicas, como escapar, pelear o volar. Las respuestas fisiológicas típicas a los estresores son las activaciones del eje hipotálamo-pituitaria-corteza adrenal (HPA) y del sistema nervioso autónomo, liberándose glucocorticoides y catecolaminas (Veissier, 2007), con la regulación moderada de citocinas (Turnbull, 1999). Selye (1999) llamó a este rango amplio de modificación “síndrome de adaptación general”, a la fisiología del estrés se le ha denominado fisiología de la adaptación (Veissier, 2007). En donde las respuestas fisiológicas y de comportamiento dependen de la evaluación del medio por el animal (Veissier, 2007).

El estrés inicia la respuesta adaptativa que mantiene la homeostasia del medio interno tratando de asegurar la supervivencia del individuo, la respuesta adaptativa del estrés se caracteriza por componentes fisiológicos complejos dentro de los cuales está el consumo de energía y de comportamiento que son determinados por otros factores, como la duración, severidad y tipo de estresor, así como el sexo, genética, experiencias recientes, factores cognoscitivos y la capacidad del organismo de relacionarse con el medio, lo cual disminuye el nivel de bienestar (Adams, 2004; Johnson *et al.*, 199; Ortiz de Montellano, 2004; Turner *et al.*, 2010). Una respuesta adaptativa de estrés exitosa, permite la supervivencia del mejor adaptado, generando selección natural (Adams, 2004).

En ambientes con estrés y en ambientes relativamente libres de estrés se producen diferencias esenciales en: crecimiento, competencia psicológica y de comportamiento (Johnson *et al.*, 1993).

Para los animales de granja como los ovinos, se debe considerar que el comportamiento como especie presenta limitaciones para la producción (Gonyu, 1983) y los factores estresantes más importantes son el medio ambiente, el manejo y régimen de tenencia, la alimentación, el clima y la relación parásito-hospedero (Graham, 12981; Grandin, 1993).

Recientemente se ha observado que la inducción de los indicadores fisiológicos de estrés en ovinos, se pueden generar fácilmente, principalmente por: cambios de corraleta, introducción de nuevos integrantes a grupos, combinación entre animales dominantes y sometidos, la ubicación en solitario en una corraleta, la presencia de un espejo y escuchar a un depredador (Parrott *et al.*, 1998; Poindron *et al.* 1997; Wagenmaker *et al.*, 2008). Sin embargo se puede generar estrés bajo condiciones de transporte, por lo que si es necesario inducir un evento de estrés moderado (Al Sabbagh 2009), se podría simular un evento de traslado: comenzando con la concentración de los animales en el pasillo de servicio, contención por atado de miembros o "aborregado", posteriormente los animales se suben a la caja de una camioneta con recubrimiento plástico, se puede iniciar el movimiento o no, finalmente los animales se bajan del transporte son liberados de sus ataduras y se concentran en grupos nuevos en corraletas diferentes a las de origen (Okeudo *et al.*, 2005).

En general un estresor de intensidad moderada, provoca una elevación en el cortisol plasmático, la cual regresa a la normalidad en una hora aproximadamente, durante un conflicto social el nivel de cortisol es más elevado y se mantiene por más tiempo, principalmente cuando se mantienen animales con su oponente dominante (Audet, 2010). También tratamientos estresantes con manejos de diferentes tipos y complejidad creciente, aislamiento, presencia humana, sangrado para muestreo, exposición al ruido del trasquilado y quitar la lana (Hargreaves *et al.*, 1989; Hargreaves *et al.*, 1980; Turner, 1984).

#### **4.3.1. Control hormonal del estrés**

El estrés es desencadenado por una secuencia de estímulos sobre el sistema nervioso central (SNC) de magnitud variable, que en poco tiempo y de manera imperceptible, pueden producir que el animal pase de un estado de homeostasis a una reacción de alarma completamente desarrollada, que de no ser controlada adecuadamente compromete funciones vitales y podría producir la muerte (Johnson *et al.*, 1993). Si se considera que el estrés es la incapacidad prolongada para controlar un estresor o estímulo constante, una fuente de peligro potencial y lleva a la activación de sistemas de emergencia frente al peligro más allá de su rango de máxima

eficacia, entonces el concepto de estrés aleja al individuo del estado de bienestar y lo acerca al concepto de sufrimiento. La ansiedad es un estado en que el animal debe realizar un esfuerzo sustancial físico y psicológico y desarrollar respuestas adaptativas extremas ante cambios constantes que se generan en el entorno y que al ser crónico puede influir en su estado de salud físico y emocional (Mormede, 2007).

Aunque se han documentado diferencias en cortisol o ACTH producidos entre estresores, se presentan diferencias en la cantidad de estrés producido, estos resultados no son consistentes en estudios con tratamientos similares. También diferentes estresantes producen efectos muy distintos, se deben agregar factores del medioambiente y la dinámica del proceso adaptativo que determina la respuesta individual del eje hipotálamo-adrenal-pituitaria (HPA) en un momento determinado en rumiantes (Mormede, 2007). También se deberá tomar en cuenta la influencia de las condiciones del ciclo circadiano en los ovinos (Parraguez 1989) y que la reunión de la perspectiva etológica con la fisiológica mejoraría la comprensión del proceso en conjunto (Sapolsky *et al.*, 2000).

#### **4.3.2. Hipotálamo.**

En el hipotálamo se encuentra el centro neuroendocrino básico de la regulación de la respuesta anti estresante, responde a los estímulos medioambientales mediante múltiples conexiones que relacionan las estructuras del SNC con otras estructuras como la corteza cerebral, el sistema límbico, la formación reticular y la médula espinal mediante sistemas aferentes y eferentes neuronales extrahipotálamicos y con el sistema nervioso vegetativo (simpático y parasimpático). Sus neuronas elaboran hormonas liberadoras para controlar la producción hormonal de la adenohipófisis (hipófisis anterior), como la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Durante la respuesta al estrés el hipotálamo desencadena la respuesta endocrina a nivel de los núcleos paraventriculares anteriores. Ante el peligro inminente, traumatismo, dolor, hipovolemia, hipotensión, anoxia o hambre, se generan estímulos que son captados por el SNC, estos estímulos activan áreas específicas del sistema límbico y del mesencéfalo que estimulan a los núcleos paraventriculares de hipotálamo.

La magnitud de la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gónada (HHAG), es modulada por los niveles de las hormonas presentes y las diferencias individuales expresadas en la conducta social pueden ayudar a explicar las diferencias de los efectos del estrés y las hormonas relacionadas. La activación del eje HHAG ante estímulos de estrés desencadena cambios fisiológicos como conductuales, con la finalidad de

mejorar la adaptabilidad e incrementar la supervivencia de los organismos. Factores como sexo, estación del año, condición social y control del estresor, de un individuo pueden afectar la respuesta a situaciones estresantes y esto puede alterar la respuesta reproductiva (Álvarez, 2008; Greiveldinger *et al.*, 2009)

Cualquier tipo de estrés puede afectar la producción de cortisol (Moolchandani *et al.*, 2008), existen diferencias durante el día y estacionales en la producción de glucocorticoides y sus niveles de respuesta (Herrera-Díaz *et al.*; 1993; Luna-Muñoz *et al.*, 1992). Lo cual concuerda con la concepción general de que los estresores emocionales activan al eje HHAG, con un aumento de cortisol de forma proporcional a la intensidad del estresor, por lo tanto mecanismos psiconeuroendócrinos también pueden contribuir al aumento de cortisol durante el ciclo diario, particularmente durante la mañana y con los componentes psicológicos del estresor (Apple *et al.*, 1993), en ovinos la magnitud de la respuesta con producción de cortisol al estrés depende del sexo y tipo de estresor (Turner, 2010).

Los corticoides alteran los receptores de gonadotropinas, disminuyen la esteroidogénesis testicular y provocan apoptosis en las células de Leydig, hay una disminución de la fertilidad debido a que se inactivan las deshidrogenasas e hidroxilasas (Álvarez, 2008). Las interacciones sociales pueden afectar la función del eje HHAG, aunque no ha sido fácil asociar directamente su actividad con una jerarquía social determinada, si se ha podido demostrar estrés por subordinación, en donde los animales sumisos tiene una producción aumentada de cortisol y estrés por dominancia, los individuos dominantes que defienden su estatus también presentan una elevación en la producción de cortisol, en hembras se ha observado que el ambiente social del individuo afecta la función ovárica, en el macho se podría asimilar alguna modificación en los testículos (Álvarez, 2008).

El estrés crónico o agudo severo se asocia a una disminución en la motilidad, cuenta y malformaciones espermáticas, el estrés físico, disminuye la cantidad de testosterona y la disminución de los pulsos de LH (Skau *et al.*, 2003), esto podría estar relacionado con la actividad directa de la testosterona sobre las adrenales (Aoyama, 2003), y al disminuir los andrógenos, disminuye la motilidad en animales subordinados (Skau *et al.*, 2003), aumentando el efecto inmunosupresor del cortisol (Álvarez, 2008; Rivier *et al.*, 1991). El estrés podría predisponer a una epididimitis por sus efectos inmunosupresores con incremento de cortisol e incremento de testosterona que se asocia a linfopenia en sangre (Ortíz de Montellano, 2004).

Las enfermedades infecciosas de los animales domésticos han sido relacionadas con las condiciones de estrés generadas por el manejo inadecuado del rebaño (Sartorelli *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2010). Factores

medioambientales, alimentación y principalmente los relacionados a cambios hormonales durante la maduración sexual, se han asociado con la predisposición a epididimitis infecciosa del carnero (EIC) (Jansen, 1983).

## **5. LEUCOCITOSPERMIA (LE).**

La presencia y cantidad de leucocitos presentes en el sedimento urinario y en el semen se han empleado para monitorear el efecto del estrés sobre las subpoblaciones celulares, (Minton *et al*, 1991; Ringsrud, 2001). En humanos (Aitken, 2009;) y equinos la LE ha sido relacionada con inflamación e infecciones del tracto genitourinario (Gallegos Ávila, 2010). Se ha propuesto que no necesariamente la inflamación o infección provoca LE, se ha reportado que en humanos la abstinencia y el estrés la pueden provocar (Minton *et al*, 1991; Somolinos *et al.*, 2007) y se relaciona con la integridad celular (Moskovtsev, 2005). En caprinos se ha vinculado con las condiciones de manejo rutinario durante las épocas reproductivas (Ortiz de Montellano, 2004). La presencia de neutrófilos evidencia daño en algún lugar del tracto genitourinario y aunque la presencia de LE se relaciona con infecciones, la presencia de bacterias o neutrófilos se puede dar una sin la otra (Johanisson, 2000). Los leucocitos no son comunes en el eyaculado normal de ninguna especie (Baumber *et al.*, 2002), sin embargo se pueden encontrar en animales sanos y fértiles (Henkel, 2011, Wolff, 1995), pero la presencia de células blancas tiene impacto sobre la fertilidad del macho, los leucocitos contaminantes en el eyaculado son fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), y en gran cantidad pueden inhibir la motilidad y los eventos de fertilización e incluso la fragmentación del DNA (Baumber *et al.*, 2002; Henkel *et al.*, 2011). Los espermatozoides también generan especies reactivas de oxígeno como protección y equilibrio del tracto (Bansal *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2011), En los procesos inflamatorios o infecciosos, la LE podría aumentar la activación, infiltración y liberación de especies reactivas de oxígeno en el sistema genitourinario y modulan la cantidad y capacidad de citocinas proinflamatorias para reclutar linfocitos, IL-8 modulando la cantidad de ROS y un aumento de IL-6 durante la LE, aunque la IL-2 se mantiene en niveles normales (Covert, 2009; Henkel, 2011; Rajasekaran *et al.*, 1995; Swatowski, 2002, Skau *et al.*, 2003). Del mismo modo la presencia de leucocitos pueden provocar disminución de la fertilidad o estadios de subfertilidad por la producción y acumulación de peróxidos en el semen (Johanisson, 2000).

Los leucocitos se pueden encontrar en el tracto reproductor del macho y en el semen, endocítan espermatozoides anormales y con actividad de inmunovigilancia. Se ha propuesto que la LE podría ser benéfica, aunque la

inflamación de las glándulas accesorias del tracto promueve la aparición de leucocitos en el eyaculado, hasta el 80% de las muestras de semen con LE son negativas a bacterias (Gallegos-Avila *et al.*, 2010; Henkel, 2011).

La migración de monocitos a lo largo del tracto genitourinario promueve la inflamación y daño a las estructuras que conforman a los epitelios de recubrimiento y su sinergia con cantidades elevadas de cortisol, con efectos inmunosupresores, podría aumentar la susceptibilidad a las enfermedades infectocontagiosas (Ortíz de Montellano, 2004; Nothling *et al.*, 1997). La inflamación o infección activa la infiltración y liberación de especies reactivas de oxígeno en todos los órganos y tejidos del tracto genitourinario (Henkel, 2011).

Ortíz de Montellano (2004), demostró en machos cabríos, que el reagrupamiento social provoca estrés en los animales, lo que ocasiona el aumento de los niveles de cortisol, LE y en algunos casos modificaciones en la dinámica leucocitaria en sangre, los efectos fueron más severos particularmente en los grupos que enfrenta la perspectiva de subordinación.

La LE en carneros ha sido poco estudiada, aun cuando es un evento constante que se presenta durante periodos de estrés agudo en animales sin infección o daño, generado por el manejo de rutina (Pastrana, 2011).

La inflamación de uno de los componentes o de todo el sistema genitourinario, también provoca LE y en los primeros estadios de presentación de la lesión, puede ser considerado como un signo temprano del daño, que puede comprometer la viabilidad o calidad del semen, en estos estadios se pueda aislar el microorganismo causal de lesión en el semen (Nothling *et al.*, 1997).

La LE es el primer signo en animales con lesiones infecciosas y ha sido usado junto con anticuerpos contra espermatozoides, como indicador de infección y lesiones por autoinmunidad en el tracto genitourinario (Skau, 2003), por otro lado, aunque la LE no es específica para ningún microorganismo, se pueden observar neutrófilos en el semen de animales infectados con *B. ovis*, desde las dos semanas post infección y al menos por 6 semanas. (Burgess, 1982). La aparición de *B. ovis* en el semen inicia entre 5 y 7 semanas post infección y se pueden demostrar, mediante tinciones específicas, inmunotinción o cultivo, aunque la eliminación bacteriana en semen ocurre con intermitencia (Arsenault *et al.*, 2004; Bulgin, 1990b).

## **6. CÉLULAS EPITELIALES DEL TRACTO GENITOURINARIO.**

Las células de recubrimiento del sistema genitourinario son la primera barrera de defensa contra infecciones y daño mecánico, particularmente por su producción de mucopolisacáridos, ROS y endocitosis. En el sedimento urinario y en el eyaculado se pueden encontrar de forma natural 3 tipos de células epiteliales: renales, de transición y escamosas, las cuales pueden sugerir daño de diferente índole de acuerdo a su cantidad y tipo (Ringsrud, 2001).

La disminución de la cantidad de mucopolisacáridos puede aumentar la predisposición a infecciones incluso en testículo y epidídimo. Las secreciones glandulares alcalinas, pueden también generar daño caustico en los epitelios durante estasis prolongada o abstinencia. Las secreciones de mucopolisacáridos del tracto masculino y sus glándulas anexas protegen a las células germinales masculinas del medio ambiente agresivo del aparato reproductor femenino, también durante el trayecto en el tracto masculino, por lo que su disminución puede promover daño en los epitelios de recubrimiento y en la viabilidad de los espermatozoides (Evans, 1990; Leigh *et al.*, 2006). En el eyaculado la cantidad y tipo celular también puede evidenciar diferentes condiciones de inflamación y daño, las células epiteliales del tracto reproductor actúan como control mediante endocitosis de espermatozoides con diferentes grados de daño y restos de células de defensa (Gallegos-Ávila, 2010).

## **7. ANÁLISIS DE REDES SOCIALES.**

El análisis de las redes sociales (ARS), se ha empleado para entender las interacciones entre los individuos que conforman al rebaño (Wey *et al.*, 2008). Los métodos de análisis para la interacción entre animales, particularmente para jerarquizar la dominancia en un grupo y han demostrado que aunque las relaciones parecen aleatorias se pueden obtener resultados lineales (Appleby, 1983). Estos estudios han demostrado que las redes no son completamente regulares pero tampoco completamente aleatorias (Borgatti, 2006; Webb, 2005).

El análisis de la información que proporcionan las redes sociales, permite conocer relaciones directas, es decir entre individuos o factores que modifican a un solo individuo, pero también pueden generar información de un modelo global, en donde las interacciones de un grupo a través de su comportamiento, incluso el bienestar, pueden tener repercusiones sobre la población de una región, país o del mundo (Makagon *et al.*, 2012).

El ARS y la teoría de gráficas de la cual ha sido acompañada, permite organizar y analizar conjuntos de datos, desde pequeños grupos hasta poblaciones enteras, como herramienta permite sobreponerse a las limitaciones de los métodos estadísticos en donde la posición del individuo o del dato obtenido no afecta al resultado del análisis (Ortíz Peláez *et al.*, 2006). El ARS y las gráficas resultantes, permiten visualizar topográficamente las relaciones que se presentan entre una población de forma bi o tridimensional, en donde la definición de sus elementos vértices/nodos/actores y sus relaciones líneas/conexiones/arcos, dependen del investigador y de la pregunta que debe ser respondida (Ortíz Peláez *et al.*, 2006; Saile, *et al.*, 2012). El ARS presenta una limitante temporal, porque las redes reflejan solamente el estado de interacciones entre los individuos de un grupo en un solo momento, aun cuando los datos recolectados sean de un periodo de tiempo prolongado (Wey *et al.*, 2007). El ARS se ha empleado en ciencias biológicas de forma creciente por biólogos del comportamiento y primatólogos, para describir patrones y cualidades en la interacción entre individuos (Makagon *et al.*, 2012). Los estudios de epidemiología han explotado las características del ARS para explicar las relaciones entre los factores a diferentes niveles de la estructura jerárquica en poblaciones de animales y la presentación de enfermedades (Ortíz Peláez *et al.*, 2006), así como intentos para predecir y analizar la transmisión de enfermedades antes y durante un brote denominándole “redes de transmisión de enfermedades” (Bell *et al.*, 1999; Webb, 2005).

Las relaciones existentes entre la dominancia social y sus repercusiones sobre el acceso a satisfactores como agua alimento o hembras, han sido estudiadas de forma independiente o puntual para algunos animales (Appelby, 2080; Boyd *et al.*, 1983). Se ha estudiado la proximidad física espacial entre ponies (Robertts, 1998) y las relaciones entre actividad, sexo, edad y tamaño del rebaño en carneros (Michelena, 2008). Aunque estos trabajos han ayudado al entendimiento de las interacciones que existen entre individuos o con su medio ambiente, los algoritmos y gráficas que se generan son difíciles de entender y explicar (Freeman, 2012).

Las interacciones entre condiciones etológicas como la dominancia y los efectos de una condición fisiológica como la secreción de cortisol bajo situaciones de estrés controlado o experimental, no han sido analizadas con las herramientas del ARS y sus gráficas, esta aproximación permitiría observar en gráficas bidimensionales el movimiento de las variables en estudio, aprovechando las dos principales características del ARS, la medición y visualización (Freeman, 2012).

Este trabajo pretende ayudar a determinar el efecto que tiene el manejo controlado, sobre las relaciones de dominancia y si el estrés generado, puede provocar una predisposición cuantificable a la infección experimental con *B. ovis*.

## **8. JUSTIFICACIÓN.**

El estrés podría predisponer a lesiones de epididimitis por sus efectos inmunosupresores con incremento de cortisol y testosterona que se asocia a linfopenia en sangre (Ortíz de Montellano, 2004). La presencia de LE con alta incidencia de anomalías espermáticas secundarias, sugiere una fuerte relación entre esta respuesta adaptativa y posibles cambios funcionales y de la respuesta inmune local en el tracto reproductor masculino. El origen y las características de las células involucradas en la LE asociada al estrés no ha sido aclarado y las células presentes en el semen podrían ser el vehículo de la bacteria al tracto reproductor.

El mecanismo por el cual *B. ovis* se establece en el epidídimo del carnero y produce el cuadro de lesión que caracteriza a la enfermedad, no ha sido establecido. Tampoco se ha podido reproducir experimentalmente la enfermedad, únicamente mediante la inoculación directa de la bacteria en la cola del epidídimo, lo que implica no solo una estrategia poco relacionada con las vías naturales de la infección, sino que supone un daño traumático directo sobre la barrera hemato-testicular y el establecimiento de una lesión de base autoinmune.

En un trabajo reciente la LE ha sido asociada a la situación inmunosupresora del estrés, por lo que este puede ser un mecanismo que de alguna manera puede modificar o sensibilizar al tracto reproductor a distintas patologías, al mismo tiempo que podría explicar la llegada de células leucocitarias infectadas por *B. ovis* al tracto y la asociación de estas condiciones justificaría la lesión.

La condición de LE asociada al estrés no ha sido tampoco explicada y de lograrse reproducir el fenómeno se agregaría información también en este sentido, aportando elementos de interés a la escasa información existente sobre los mecanismos de respuesta inmune en el tracto reproductor del macho. A qué nivel, en qué condiciones y que tipo de células son las que transitan al semen.

Al evaluar el efecto del estrés en la calidad del semen, el establecimiento de la bacteria y los cambios en la respuesta inmune local, se espera aportar información que esclarezca la capacidad de interacción de *B. ovis* con el tracto reproductor.

La patogénesis que inicia con el establecimiento de la bacteria en el tracto, la inducción de lesión y su posterior transformación en reacción inflamatoria característica de brucelosis, debe estar sustentada por factores del hospedador, su respuesta inmune y de la bacteria, que necesitan ser aclarados.

## **9. HIPÓTESIS**

Si la inducción experimental de estrés en carneros, genera LE, producción de cortisol y modificación de las poblaciones de células de respuesta inmune, se promoverá el establecimiento de *B. ovis* y la lesión local en el tracto genital del carnero.

## **10. OBJETIVO GENERAL**

- Inducir la epididimitis por *B. ovis* en condiciones de estrés experimental y analizar sus efectos en el daño tisular y en los mecanismos de respuesta inmune local, procurando un modelo que ayude a explicar la patogenia de la enfermedad.

### **10.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Inducir LE por estrés en el carnero, definiendo las características de las células involucradas y su lugar de paso en la mucosa del tracto reproductor.
- Demostrar la asociación entre la presencia de células epiteliales exfoliadas del tracto genitourinario del carnero y la susceptibilidad al daño por la infección experimental con *B. ovis*.
- Establecer las consecuencias de la inducción experimental de estrés, sobre la producción de cortisol sanguíneo y sus efectos en la dinámica de las células de respuesta inmune del tracto reproductor de carneros clínicamente sanos e infectados experimentalmente con *B. ovis*.
- Caracterizar y cuantificar las células de respuesta inmune del tracto reproductor en carneros clínicamente sanos, estresados e infectados experimentalmente con *B. ovis*.
- Analizar las redes generadas por las interacciones entre un factor de comportamiento (tasa de dominancia) y respuestas fisiológicas (LE y secreción de cortisol).

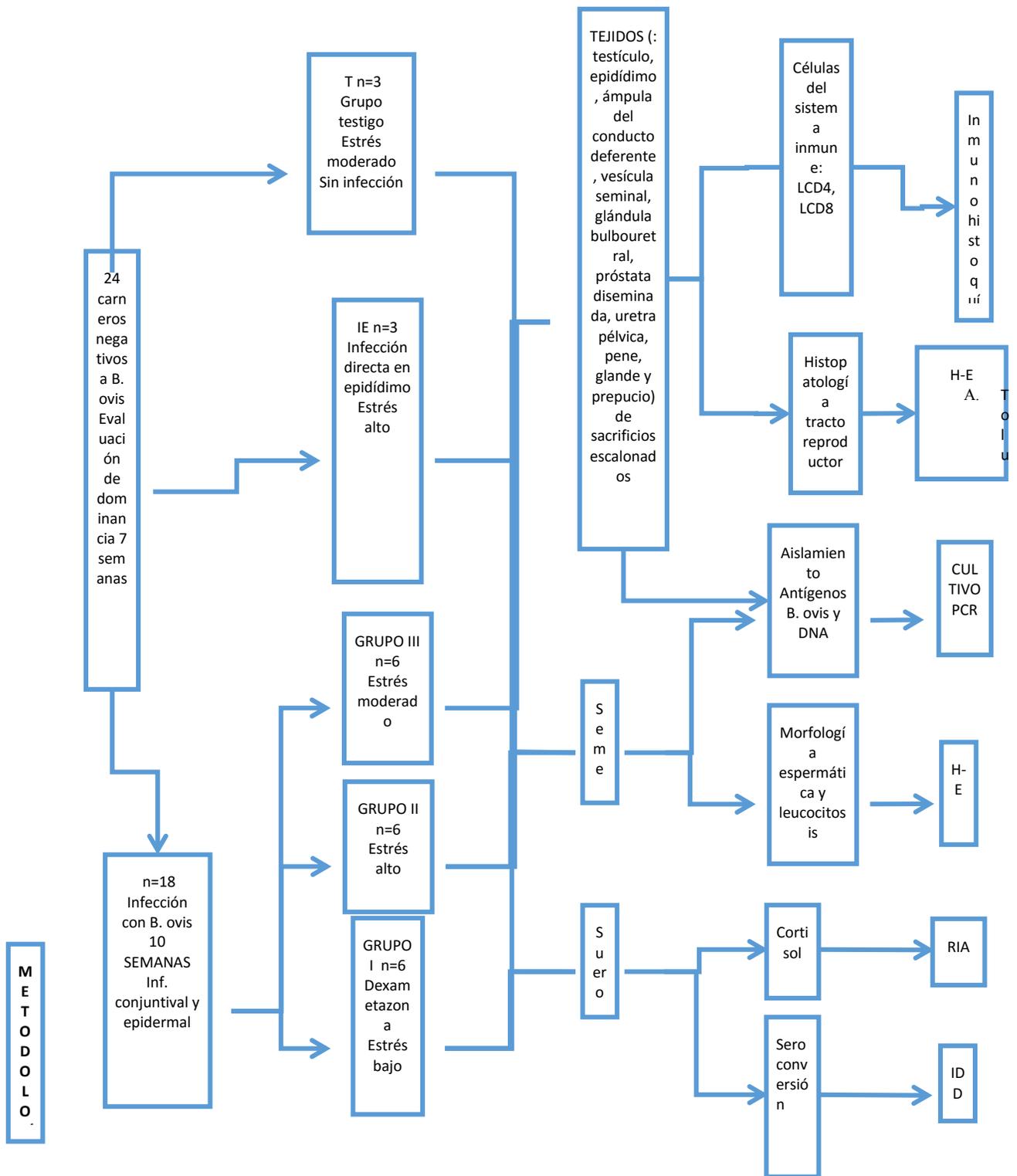
## **11. METODOLOGÍA**

### **11.1. CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN DE LOS CARNEROS**

Este proyecto fue aprobado por el SICUAE del Programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y salud animal, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), cumplió con las disposiciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM 062 ZOO 1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio SAGARPA 2001, la cual está en concordancia con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council 1996).

Se emplearon 24 carneros de diferente raza, sin antecedentes de epididimitis. Los animales fueron evaluados serológicamente para asegurar que fueran negativos a *B. ovis*, *Histophilus somni* y *Actinobacillus seminis*. Se alojaron en la unidad de aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del INIFAP, SAGARPA, de acuerdo a la necesidad de metros cuadrados para la especie, los corrales cuentan con sombra permanente y un área de asoleadero, las corraletas dentro de la instalación están separadas por un muro de 1.50 metros (m) de altura y con un pasillo de trabajo interno. Se manejaron con dieta consistente en paja de avena y concentrado comercial para mantenimiento, de acuerdo a su peso y agua *ad libitum* con bebedero automático.

Los carneros fueron sacrificados de acuerdo al calendario de toma de muestras, el sacrificio se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, en un matadero comercial, con insensibilización con pistolete de embolo oculto en cráneo y sacrificio por desangrado por corte de venas yugulares.



## **11.2. ETOLOGÍA**

### **11.2.1. Manejo del rebaño y agrupación**

El transporte desde los corrales de origen se realizó en una camioneta de 3.5 toneladas, acondicionada para transporte de ovinos, las instalaciones fueron dispuestas previamente. Inicialmente los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos (n=6), se mantuvieron en observación durante 5 días para monitorear posibles patologías y lesiones provocadas por el transporte.

Al 6° día se tomaron muestras de semen mediante electroeyaculador y de sangre por punción de la vena yugular, para diagnosticar LE y hacer el seguimiento serológico contra *B. ovis* mediante IDD.

### **11.2.2. Agrupación de los carneros.**

Con el fin de establecer la tasa de dominancia (TD) reproducible, a la llegada de los animales a las instalaciones, fueron agrupados de forma aleatoria, para conformar los 4 grupos iniciales (n=6), se observó y registró la conducta agonista durante la alimentación en dos eventos diarios, competencia por comida (Synnott, 1984; Ungerfeld, 2009). La jerarquía y categorías de dominancia fueron establecidas de acuerdo al modelo empleado por Ortiz de Montellano, 2004, a) Dominantes (D) con una TD de 0.5 o más (los machos de mayor rango social, b) Dominancia media (d) (los animales de dominancia intermedia con índices menores de 0.5 y mayores a 0.25) y c) Sumisos (s) (animales de menor rango social con índices menores a 0.25), Tabla 1. Una vez establecida la dominancia mediante la TD se formaron los 5 grupos Tabla 2.

### **11.2.3. Evaluación de la dominancia.**

Con el fin de evaluar y establecer el índice de dominancia los animales fueron observados para registrar todas sus interacciones agonísticas. Se hicieron observaciones continuas de todos los animales, durante 50 días. La observación conductual se realizó dos veces al día, durante la alimentación, primero la competencia por la paja de avena y luego por el concentrado con una diferencia de tiempo máxima de 10 minutos entre los dos eventos, los resultados se registraron para asignar la jerarquía dentro del rebaño.

CARNERO	TD	Jerarquía		CARNERO	TD	Jerarquía		CARNERO	TD	Jerarquía
1	0.954	D		9	0.5	d		17	0.045	s
2	0.163	s		10	0.863	D		18	0.5	d
3	0.5	d		11	0.363	d		19	0.863	D
4	0.09	s		12	0	s		20	0.181	s
5	0.227	d		13	0.363	s		21	0.909	D
6	0.863	D		14	0.5	d		22	0.727	d
7	0.5	d		15	0.772	D		23	0.227	s
8	0.772	D		16	0.409	D		24	0.045	s

Tabla 1. Jerarquía calculada para cada uno de los animales en experimentación, de acuerdo a la dominancia se les asigno una literal, D, d y s, que corresponden a los grupos Dominante, dominancia media y sumiso, respectivamente.

Las actividades registradas fueron:

- Golpes: cuando un individuo golpea, especialmente con la cabeza, a otro individuo. Esta agresión también puede incluir mordiscos.
- Éxito durante la alimentación, dividida en los eventos alimentación con paja y concentrado.
- Amenazas: cuando un individuo hace intenciones de golpear a otro individuo, la amenaza puede ocurrir con la cabeza o con el tronco del cuerpo, pero sin alcanzarlo o tocarlo.
- Empujar: Cuando un individuo empuja con su cuerpo a otro individuo, pero sin golpearlo, con el fin de desplazarlo de un lugar determinado.
- Huida: Cuando después de una amenaza, golpe o empuje, un individuo decide abandonar el lugar y huir de su contrincante.
- Evasión: Cuando un individuo, ante la amenaza de otro animal, decide abandonar el encuentro o la interacción.

El registro de las interacciones agonistas durante la alimentación se realizó diariamente, para conocer los eventos ganados por cada animal (tabla anexo).

A partir de las fórmulas propuestas por Mendl se calculó el índice de éxito:

$$ID = (EV - EP) / (EV + EP),$$

$IE = \frac{EV - (TE - EV)}{EV + (TE - EV)}$ , (Men

Reduciendo queda la razón para calcular la Tasa de Dominancia:

$TD = EV/TE$ ,

En donde: ID índice de Dominancia, IE índice de éxito, EV encuentro victorioso, EP encuentro perdido, TE total de eventos y TD tasa de dominancia. Esta fórmula fue estandarizada por Mendl (1992) para un rango entre 0 y 1.

Una vez establecida la TD se acomodaron los animales tomando en cuenta la TD y la LE obtenidas previamente durante el periodo de adaptación.

Intentando simular experimentalmente las condiciones de estrés agudo que se genera por el manejo rutinario durante el periodo de empadre, los carneros se acomodaron en la semana 7 tomando en cuenta la TD y la LE obtenidos previamente durante el periodo de adaptación (tabla 2).

Los grupos experimentales se conformaron con animales representativos de las 3 condiciones de dominancia y la cantidad de células inflamatorias presentes en el semen, los carneros fueron reorganizados en grupos que simulaban experimentalmente diferentes condiciones estresantes ocasionadas por el manejo rutinario (Jansen, 1983; Ortiz de Montellano, 2004),

#### **11.2.4. Evaluación de la LE mediante la obtención de semen bajo condiciones de manejo rutinario.**

Se obtuvieron muestras de semen semanalmente mediante electro eyaculación con un aparato de fabricación propia, el cual genera una corriente de 300 mili amperes (Acosta-Dibarrat, 2007; Médez-Narez, 1999; Paolicchi *et al.*, 2000). El carnero fue sometido y atado en posición decúbito lateral, se preparó limpiando el exterior del prepucio, luego de introducir el vástago cubierto con vaselina, se dio un masaje en la base de la cavidad y se pasó corriente a través de la mucosa del recto con los electrodos del vástago en pulsos de 5 a 10 segundos con descansos de 3 a 5 segundos la corriente del electrodo, el reflejo provocado en los primeros pulsos desenvaina el pene iniciando la eyaculación con secreciones glandulares, este líquido se colectó en tubos para centrífuga de 25 ml estériles y se continuó con la estimulación eléctrica hasta obtener el eyaculado completo. Las muestras se refrigeraron a 4° C hasta su procesamiento en el laboratorio. Posteriormente se realizaron extensiones y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Estrada, 1982), se evaluó mediante la revisión de la extensión completa, anomalías primarias y secundarias de los espermatozoides, cantidad y tipo de células inflamatorias y células

epiteliales exfoliadas. Se asignaron para la descripción los símbolos: (-) para cero células observadas, (+) para menos de 25, (++) menos de 50, (+++) menos de 100 y (+++++) más de 100, considerando que el frotis se realizó con 10 microlitros de material seminal. Finalmente las muestras fueron conservadas en tubos Eppendorf a 21° C bajo cero.

### **11.3. INFECCIÓN EXPERIMENTAL.**

Los grupos experimentales se distribuyeron procurando que todos tuvieran las 3 condiciones de jerarquía o dominancia y de cuentas de células inflamatorias presentes en el semen (tabla 2).

Durante la semana 7 después de su llegada, los carneros fueron reorganizados en grupos que simulaban experimentalmente condiciones estresantes ocasionadas por el manejo rutinario (Jansen, 1983, Ortiz de Montellano, 2004). A cada grupo se le asignó un número y nombre de acuerdo a la TD: grupo I, dominancia baja (infección por instilación conjuntival e intraepidermal), se le aplicó como control químico 21-Isonicotinato de dexametazona, “Alin Depot” Chinoin, 5 mg/1 ml por vía intramuscular profunda, con el fin de emular una condición de inmunosupresión aguda (n=6); grupo II infección experimental, dominancia alta (infección por instilación conjuntival e intraepidermal) (n=6); grupo III infección experimental, dominancia media (infección por instilación conjuntival e intraepidermal), (n=6); grupo IV infección experimental control positivo dominancia baja, (inoculación intraepididimal) (n=3); grupo V animales testigo, dominancia alta (sin infección) (n=3). En la semana 10 se realizó la infección experimental, con una cepa de *B. ovis* de referencia (REO 198) donada por el Laboratorio de microbiología del INIFAP, a una concentración de  $4.7 \times 10^9$ , UFC/ml. Se inocularon 0.5 ml del cultivo bacteriano en cada una de las 3 vías empleadas: instilación conjuntival (Biberstein, 1964), infiltración intraepidermal (Jiménez de Bagues, 1993) e inoculación intraepididimal (Robles, 1998).

Para los animales del grupo control se empleó agua inyectable estéril en la misma cantidad. Los grupos experimentales infectados permanecieron aislados del grupo testigo sin infección hasta el momento del sacrificio.

GRUPO I Dominancia baja Dexametazona				GRUPO II Dominancia alta			
Carnero	Dominancia	LE	Jerarquía	Carnero	Dominancia	LE	Jerarquía
24	0.04	4	s	19	0.86	4	D
13	0.36	4	s	1	0.95	3	D
5	0.22	4	d	8	0.77	4	D
23	0.22	2	s	3	0.50	4	d
17	0.04	2	s	7	0.50	1	d
16	0.40	2	D	9	0.50	2	d
GRUPO III Dominancia intermedia				GRUPO IV Dominancia baja, Infección intraepididimal			
Carnero	Dominancia	LE	Jerarquía	Carnero	Dominancia	LE	Jerarquía
14	0.50	4	d	11	0.36	4	d
22	0.72	1	d	12	0.0	4	s
20	0.18	3	s	4	0.09	4	s
2	0.16	1	s				
18	0.50	3	d				
21	0.90	3	D				
GRUPO V Dominancia alta Testigos							
Carnero	Dominancia	LE	Jerarquía				
15	0.77	3	D				
10	0.86	3	D				
6	0.86	1	D				

Tabla 2. Asignación de los carneros en los grupos experimentales de acuerdo a TD, LE y D.

#### **11.4. INMUNO DIFUSIÓN DOBLE EN GEL (IDD)**

A partir de la semana 12 y hasta la semana 19, el suero obtenido de las muestras del sangrado semanal, fueron empleadas para diagnosticar la seroconversión de los animales inoculados experimentalmente mediante la prueba de inmuno difusión doble en gel de agarosa con el antígeno proteínico para *B. ovis*.

La prueba se realizó mediante la técnica de Ochterlony empleando cajas de Petri de 10 cm de diámetro como base. El gel se preparó con agarosa al 1.1% es solución amortiguadora de borato a pH8.3, con 10% de cloruro de sodio. Se cortaron 6 pocillos con 3mm de diámetro para formar una roseta, con un pozo central entre ellos. En el pocillo central se colocó el antígeno de *B. ovis*, en un pozo periférico se colocó un suero positivo y en los demás sueros problema, en todos los pozos se sirvió una cantidad de 20 microlitros. Se incubo durante toda la noche a 4° C y se revisaron a las 48 y 72 horas. Los sueros problema se consideran positivos cuando se genera una línea de identidad entre ellos y el pozo del antígeno.

#### **11.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.**

Después de que los animales resultaron seropositivos mediante IDD para *B. ovis* en la semana 10, inició el sacrificio escalonado, durante el cual se obtuvieron muestras de: testículo, epidídimo, ámpula del conducto deferente, vesícula seminal, glándula bulbo uretral, próstata diseminada, uretra pélvica, pene, glande y prepucio. Los órganos y tejidos del aparato reproductor se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio y fijaron por inmersión en formalina amortiguada durante 24h a 4° C. Las muestras recuperadas se procesaron por el método de inclusión en parafina de rutina, se obtuvieron cortes de 4µm de espesor, y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina-eosina para evidenciar la morfología normal e histopatología de forma rutinaria (Bancroft *et al.*, 1990; Conn, 1943). Las células cebadas fueron identificadas por la metacromasia de sus gránulos (morado intenso) en cortes de tejido que se incluyeron en araldita y se tiñeron con azul de toluidina-bórax (Glauert; 1991; Joseph *et al* 2003, Sheenan, 1980). Las células plasmáticas se identificaron por la coloración electiva de la pironina por el RNA y su morfología, para diferenciarlas de otros leucocitos activados. (Castillo-Peña *et al.*, 2008) y se aplicó la técnica general de inmunohistoquímica para la demostración de antígenos específicos para células CD4+ y CD8+ (Cruz Sánchez, 2008).

## **11.6. CONTEO CELULAR**

Para cada técnica aplicada, fueron contadas células positivas en al menos 10 campos no confluentes con el lente objetivo de 40 X, en un microscopio Carl Zeiss Axio Lab.A1, con el programa para analizar imágenes Axio Vision Rel 4.8.2. (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, 2010, Göttingen Alemania). En los campos elegidos al azar, se contaron solo las células que no tocaban el perímetro del campo, considerando una superficie de 612.37 micrómetros cuadrados.

Se evaluaron las áreas del tejido conectivo de: túnica serosa, túnica muscular, septos glandulares, conectivo del parénquima glandular, túnica submucosa de conductos glandulares y túnica submucosa uretral. El número de células identificadas fueron agrupadas por animal, grupo, dominancia antes y después de la inoculación experimental.

## **11.7. RADIO INMUNO ENSAYO (RIA)**

Mediante la prueba de radio inmuno ensayo de competencia, se midió la cantidad de cortisol en el suero sanguíneo (Kilgour *et al.*, 1970; Luna-Muñoz, 1990; Greenwood *et al.*, 1992, Turner *et al.*, 2010). La extracción de cortisol se hizo a partir de 600 µl, la suspensión final se valoró en un contador de centelleo por duplicado. Cada corrida se formó con muestras individuales de animales representativos de cada grupo de dominancia o jerarquía social. En los ensayos se ajustaron las condiciones de la prueba para disminuir el error acumulado. La recuperación de la hormona marcada fue de 88 %, con una sensibilidad de 5.0 ng/ml.

## **11.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

Para la extracción del ADN a partir de las muestras obtenidas se empleó una prueba comercial (QIAamp® DNA Mini Kit. QIAGEN, Alemania). El ensayo se realizó bajo las indicaciones del fabricante, utilizando 100 µl de semen para la extracción, el DNA obtenido fue resuspendido en 50 µl de amortiguador AE provisto por el fabricante.

Para realizar la PCR múltiple se utilizó un kit comercial (Multiplex PCR Kit®) (QIAGEN, Alemania), los iniciadores (primers) para la amplificación de los fragmentos de DNA de cada bacteria fueron diseñados de acuerdo a las características descritas por Saunders *et al.* (2007). El volumen final para la reacción fue de 50 µl, con los siguientes elementos: 2x QIAGEN Multiplex PCR, Master Mix 1X (3mM de Mg<sup>2+</sup>), Iniciadores

(Primers) 0.1  $\mu$ M/iniciador, 5x Q-Solution 1X, Muestra de ADN  $\leq 1$   $\mu$ g de ADN/reacción, las condiciones para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96°C durante 10 minutos, 35 ciclos con etapas de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 57°C durante 60 segundos y extensión a 72°C durante 60 segundos; por último se realizó una extensión final a 72°C durante 6 minutos. Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa al 1% (Thermo scientific, EE.UU) teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). Para visualizar las bandas se utilizó un fotodocumentador (Kodak, Gel Logic200)

### **11.9. CULTIVO BACTERIANO.**

De animales positivos por IDD, se tomaron muestras de los órganos recuperados después del sacrificio .5 gm de tejido fue macerado en 10 ml de agua destilada estéril, centrifugado 5 minutos a 6000 x g, se retiró el sobrenadante, las mezclas obtenidas fueron sembradas en agar sangre. El cultivo se realizó en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37° C, durante 72 hrs. De las colonias con aparente morfología de *B. ovis* se hizo resiembra el medio especial agar sangre durante 72 horas más.

### **11.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados del conteo de CC, CE y CP, en las diferentes tunicas, tejidos y órganos del aparato reproductor, fueron promediados para conocer las diferencias entre animales, grupos experimentales, dominantes-medios-sumisos y antes y después de la inoculación experimental, se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de Fisher para diferencias mínimas significativas con el programa Statgraphics Plus 5.0 2000 para Windows, considerando una  $P < 0.05$ . Los resultados por RIA para cada grupo experimental se compararon mediante las pruebas de rangos múltiples y Kruskal-Wallis. Para conocer el coeficiente de correlación entre las variables se utilizó el programa Excel y posteriormente se evidenció la correlación lineal con el método t de Student (Daniel, 2011).

El análisis de redes y generación de gráficos de redes se realizó con el programa Cytoscape 2.8.3.

## 12. RESULTADOS.

### 12.1. ETOLOGÍA Y MANEJO DEL ESTRÉS.

Los resultados de la evaluación de la dominancia se presentan en la figura 1. Se observa que al evaluar el comportamiento con las tres fórmulas el resultado es similar. Para la fórmula  $ID = (EV-EP) / (EV+EP)$  los resultados son números negativos, para la fórmula  $IE = EV - (TE-EV) / EV + (TE-EV)$  los resultados son mayores a uno y para la fórmula  $TD = EV / TE$ , el rango es entre 0 y 1. Por lo que se decidió utilizar la fórmula para tasa de dominancia  $TD = EV / TE$ .

(ID índice de Dominancia, IE índice de éxito, EV encuentro victorioso, EP encuentro perdido, TE total de eventos y TD tasa de dominancia).

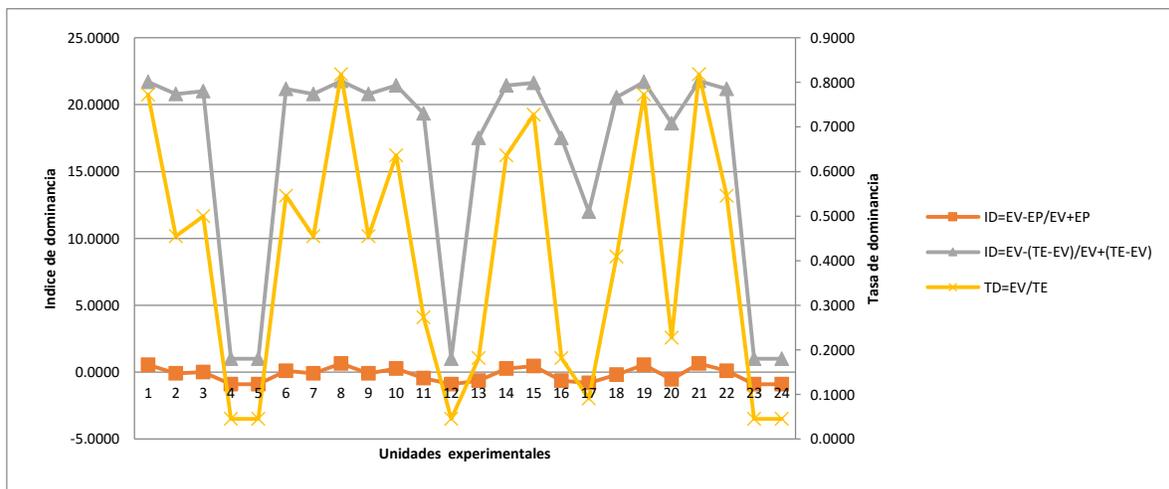


Figura 1. Comparación entre los métodos para calcular la jerarquía en el rebaño mediante los eventos agonistas. ID índice de dominancia, TD tasa de dominancia. ■ Índice de dominancia para la fórmula  $(EV-EP) / (EV+EP)$ ; ▲ Índice de dominancia para la fórmula  $EV - (TE-EV) / EV + (TE-EV)$ ; × Tasa de dominancia para la fórmula  $EV / TE$  (ID índice de Dominancia, IE índice de éxito, EV encuentro victorioso, EP encuentro perdido, TE total de eventos y TD tasa de dominancia). Tanto el índice de dominancia como la tasa de dominancia se expresan en grados de dominancia.

Con los resultados de TD y LE se definieron tres grupos, el primero con LE alta y TD alta, el intermedio con LE media y TD media y el tercer grupo con LE alta y TD baja, estas condiciones la LE y TD, se mantuvieron después del reacomodo del rebaño en la semana 7 hasta antes de la infección experimental en la semana 8. (Tablas 3 y 4).

CARNERO	LE (Células /mm <sup>2</sup> )	TD	Dominancia		CARNERO	LE (Células /mm <sup>2</sup> )	TD	Dominancia
1	94.67	0.954	D		13	71.00	0.363	s
2	35.50	0.163	s		14	94.67	0.5	d
3	142.00	0.5	d		15	118.33	0.772	D
4	71.00	0.09	s		16	47.33	0.409	D
5	142.00	0.227	d		17	71.00	0.045	s
6	23.67	0.863	D		18	47.33	0.5	d
7	11.83	0.5	d		19	71.00	0.863	D
8	118.33	0.772	D		20	106.50	0.181	s
9	71.00	0.5	d		21	59.17	0.909	D
10	82.83	0.863	D		22	35.50	0.727	d
11	130.17	0.363	d		23	47.33	0.227	s
12	118.33	0	s		24	35.50	0.045	s

Tabla 3. Resultados en la semana 7, promedio de LE (células/mm<sup>2</sup>), TD y grupo de dominancia de todos los animales del grupo de experimentación. D dominante; d dominancia media; s sumiso.

## 12.2. ORGANIZACIÓN DE LOS GRUPOS DE ACUERDO AL ÍNDICE DE DOMINANCIA (ID) Y LE (LE).

Los grupos finales previos a la infección se formaron tomando en cuenta el ID y LE del rebaño, de esta forma en todos los grupos se tuvieron animales representativos de las 3 condiciones de dominancia: D dominante, d dominancia media y s sumiso.

La TD se siguió calculando después del desafío experimental con *B. ovis*. La TD disminuyó en 16 animales, aumentó en 5 y se mantuvo igual en 3, (Tabla 4 y 5).

Carnero	TD pre inoculación	TD postinoculación	Desplazamiento de la TD		Carnero	TD pre inoculación	TD postinoculación	Desplazamiento de la TD
1	0.95	0.77	↓		13	0.36	0.18	↓
2	0.16	0.45	↑		14	0.50	0.64	↑
3	0.50	0.50	=		15	0.77	0.73	↓
4	0.09	0.05	↓		16	0.41	0.18	↓
5	0.23	0.00	↓		17	0.05	0.09	↑
6	0.86	0.55	↓		18	0.50	0.40	↓
7	0.50	0.45	↓		19	0.86	0.77	↓
8	0.77	0.82	↑		20	0.18	0.23	↑
9	0.50	0.45	↓		21	0.91	0.82	↓
10	0.86	0.64	↓		22	0.73	0.55	↓
11	0.36	0.27	↓		23	0.23	0.05	↓
12	0.00	0.00	=		24	0.05	0.05	=

Tabla 4. TD de los carneros antes (semana 7) y después (semana 14) de la inoculación experimental con *B. ovis*.

En la columna de desplazamiento de la TD se indica con: ↑ aumento, ↓ disminución, = sin movimiento.

<b>CARNERO</b>	<b>Células /mm<sup>2</sup></b>	<b>LE</b>	<b>Dominancia</b>		<b>CARNERO</b>	<b>Células/mm<sup>2</sup></b>	<b>LE</b>	<b>Dominancia</b>
1	71.00	0.53	D		13	53.25	0.42	s
2	100.58	0.09	s		14	142.00	0.48	d
3	88.75	0.27	d		15	82.83	0.75	D
4	142.00	0.5	s		16	71.00	0.36	D
5	142.00	0.34	d		17	94.67	0.56	s
6	49.70	0.53	D		18	53.25	0.46	d
7	63.90	0.25	d		19	63.90	0.5	D
8	71.00	0.5	D		20	88.75	0.25	s
9	88.75	0.07	d		21	65.08	0.27	D
10	41.42	0.25	D		22	41.42	0.56	d
11	124.25	0.7	d		23	76.92	0.46	s
12	118.33	0.25	s		24	130.17	0.076	s

Tabla 5. Resultados en la semana 14, promedio de LE (células/mm<sup>2</sup>), TD y grupo de dominancia de todos los animales del grupo de experimentación. D dominante; d dominancia media; s sumiso.

### 12.3. LEUCOCITOSPERMIA

En todos los animales se observó presencia de leucocitos en el eyaculado, 10 días después del traslado a las instalaciones de alojamiento experimental (Figura 2). La LE se caracterizó por la presencia de neutrófilos con distintos grados de madurez y células epiteliales (Imagen 1).

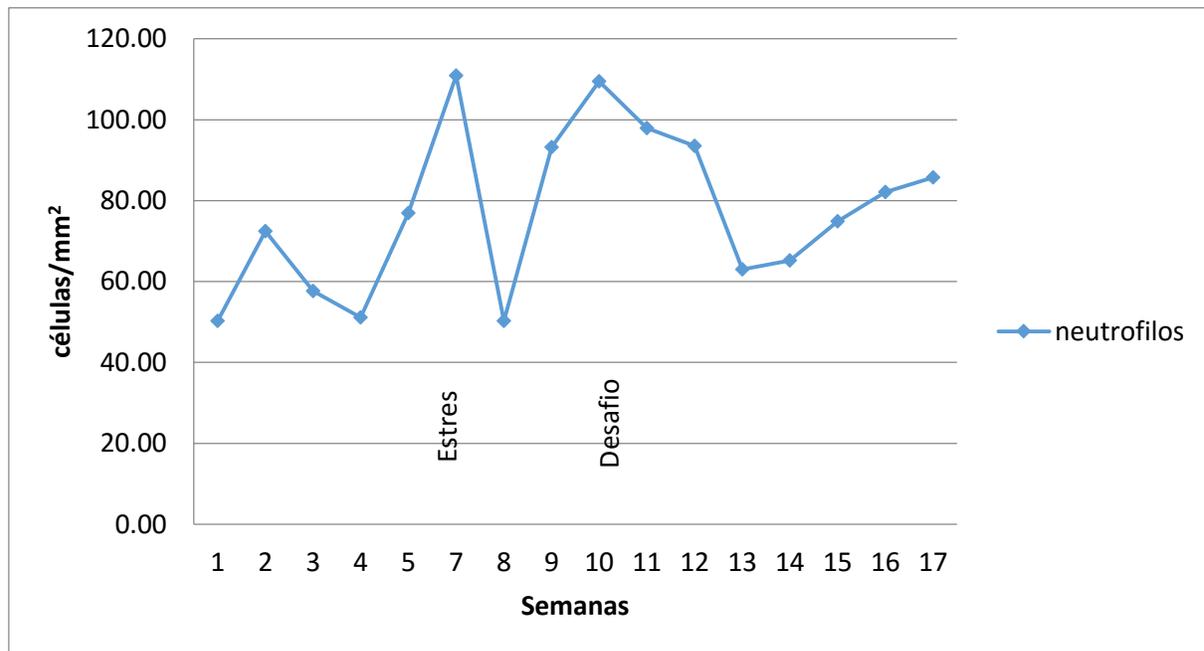


Figura 2. Leucocitospermia promedio en el hato entre las semanas 1 y 17. ♦ cantidad de neutrófilos por mm<sup>2</sup>.

En los 4 grupos que se conformaron inicialmente, en donde se realizó la observación de las conductas de interacción, para conocer la tasa de dominancia y evaluar la LE, se observó una disminución paulatina de la LE durante los siguientes 60 días, manteniendo una media menor, cercana a la que se presentó al inicio de la observación.

La LE aumentó después de la inoculación de *B. ovis*, disminuyendo durante las siguientes cinco semanas (Figura 3, Tabla 6).

LE promedio antes (semana 5) y después (semana 14) de la infección experimental							
LE				LE			
	Grupo	ANTES	DESPUÉS		Grupo/	ANTES	DESPUÉS
	/carnero				carnero		
I Dexametazona				III dominancia			
dominancia baja	I-24	4.00	3.67	media	III-14	2.67	4.00
	I-13	2.00	1.50		III-22	1.00	1.17
	I-5	4.00	4.00		III-20	3.00	2.50
	I-23	1.33	2.17		III-2	1.00	2.83
	I-17	2.00	2.67		III-18	1.33	1.50
	I-16	1.33	2.00		III-21	1.67	1.83
				IV intraepididimal			
II dominancia alta	II-19	2.00	1.80	dominancia baja	IV-11	3.67	3.50
	II-1	2.67	2.00		IV-12	3.33	3.33
	II-8	3.33	2.00		IV-4	2.00	4.00
	II-3	4.00	2.50				
				V testigo			
	II-7	0.33	1.80	dominancia alta	V-15	3.33	2.33
	II-9	2.00	2.50	Sin infección	V-10	2.33	1.17
					V-6	0.67	1.40

Tabla 6. Leucocitospermia en los grupos experimentales antes y después de la infección experimental.

A partir de la infección experimental la LE disminuyó y posteriormente aumentó gradualmente y se mantuvo hasta el momento del sacrificio (Figura 3).

La LE observada se confrontó contra la TD de los individuos del rebaño pero no se encontró correlación significativa entre ambas.

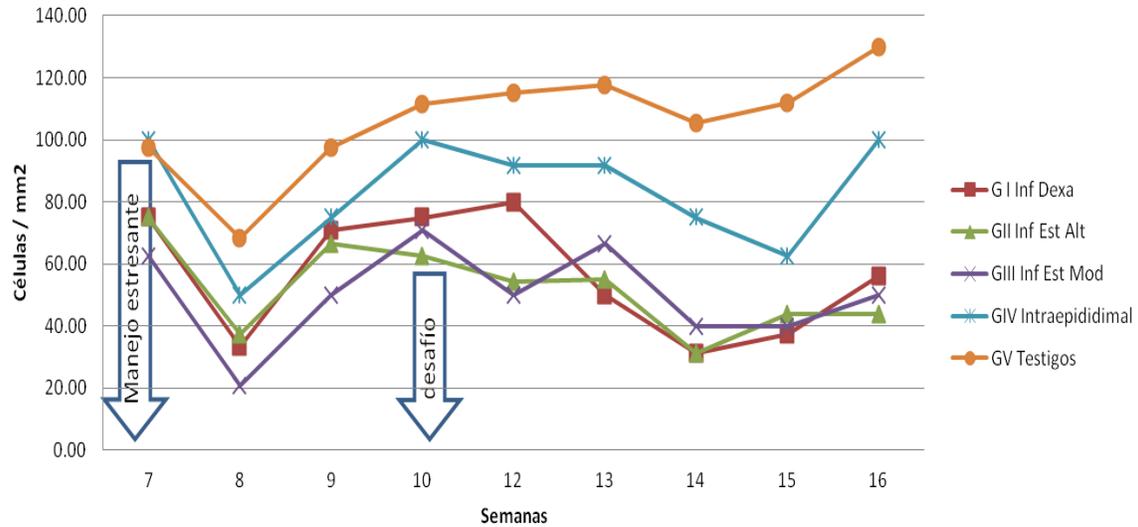


Figura 3. Lecocitospermia por grupo experimental entre las semanas 7 y 16 del experimento. ■ grupo I dominancia baja;

▲ grupo II infección experimental dominancia alta ; × grupo III infección experimental dominancia media; \* grupo IV infección experimental control positivo inoculación intraepididimal dominancia baja; ● grupo V animales testigo sin infección dominancia alta.

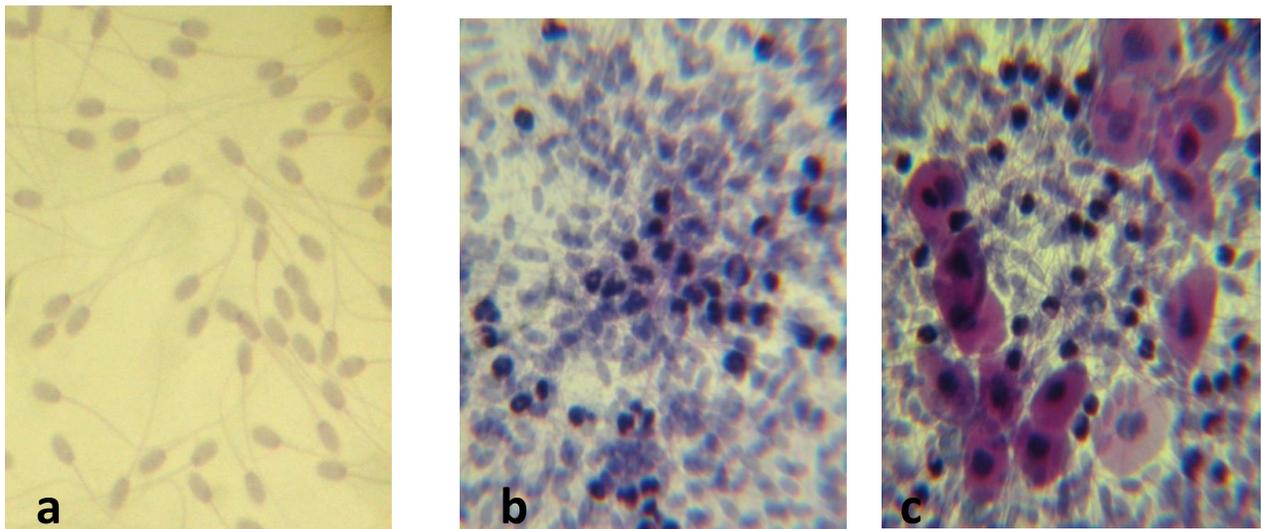


Imagen 1. Muestras de semen teñidas con hematoxilina-eosina. a. animal 10 grupo V testigo clínicamente sano; b. animal 1 grupo II LE moderada; c. animal 3 grupo II LE elevada y gran cantidad de células epiteliales. Tinción de hematoxilina eosina. Aumeto 40x.

#### 12.4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNO DIFUSIÓN DOBLE EN GEL DE AGAROSA.

Después de la infección experimental en la semana 10, la respuesta serológica a la infección de los animales fue monitoreada mediante IDD. A los 7 días post infección se detectaron los dos primeros carneros positivos, a los 28 días PI ocho animales resultaron positivos.

Se detectaron por IDD 13 animales positivos a lo largo del experimento, de los cuales 7 fueron positivos más de una vez. Se observaron 3 animales dominantes positivos en 4 ocasiones, 3 de dominancia media en 7 y 7 sumisos con 18. Los animales presentaron pruebas positivas intermitentes (Tabla 7).

Durante el experimento los 3 carneros testigos negativos nunca fueron positivos.

Carnero	Cantidad de IDD positivas	Dominancia
1	2/10	D
3	2/10	d
4	1/10	S
5	1/10	S
7	4/10	d
8	1/10	D
11	2/10	S
12	6/10	S
13	5/10	S
17	2/10	S
19	1/10	D
22	1/10	d
24	1/10	S

Tabla 7. Carneros desafiados experimentalmente con *B. ovis*, positivos por IDD y su dominancia. (D dominantes, d dominancia media y s sumisos).

### **12.5. EXPLORACIÓN CLÍNICA.**

Debido a las diferencias entre los individuos empleados, se presentó una gran variación en el diámetro escrotal, entre 27 y 42 cm con promedio de 34.8 +/- 4.44. Los animales inoculados con *B. ovis*, por vía intradérmica y conjuntival no presentaron signos clínicos.

Los 3 carneros inoculados intraepididimalmente presentaron lesiones palpables, a los 70 días postinoculación se observó inflamación moderada sin adherencias, pero con diferencia de volumen entre el epidídimo inoculado y el contralateral del mismo animal.

Los animales controles nunca presentaron lesiones a lo largo del experimento.

### **12.6. EVALUACIÓN DEL EYACULADO**

La calidad y cantidad de semen obtenido de los carneros del rebaño fue heterogénea, el promedio de volumen en la semana 2 varió entre 0.5 ml y 1.5ml (+/-0.25), entre las semanas 2 y 7 (antes del estímulo estresante), varió entre 0.5 y 2.1 con promedio de 1.29 ml (+/- 0.17), de la semana 8 a la 15 (después del estímulo estresante) el promedio fue de 1.1 ml (+/- .13) y de la semana 10 a la 15 (después de la inoculación) promedió 0.96 ml (+/- 0.098), se observó una disminución constante a lo largo del experimento.

## 12.7. PATOLOGÍA.

### 12.7.1. LESIONES MACROSCÓPICAS EN EL TRACTO REPRODUCTOR DE LOS CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *B. ovis*.

En los tres animales del grupo de infección intraepididimal, se encontraron lesiones granulomatosas, únicas y delimitadas, de aproximadamente 1.5 cm, características de epididimitis, con contenido blanco amarillento (Imágenes 2 y 3).

En los animales 11, 12, 4 (grupo 4) y 21 (grupo 3), con inoculación intradérmica y conjuntival, se encontraron lesiones granulomatosas en el epidídimo características de epididimitis, semejantes a los controles de infección intraepididimal con diámetro de entre 0.5 y 1.5 cm (Imagen 4).



Imagen 2. Apariencia normal del aparato genitourinario del carnero número 2, grupo control sin infección.

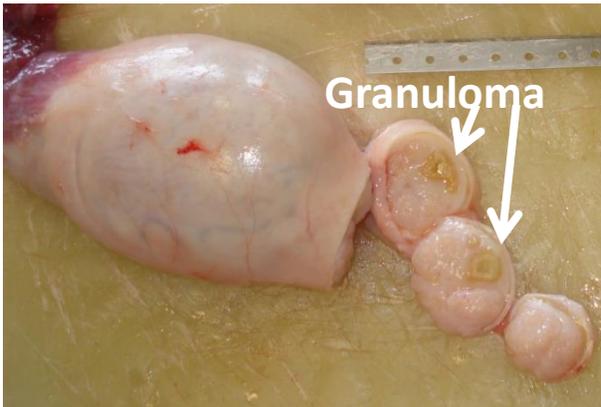
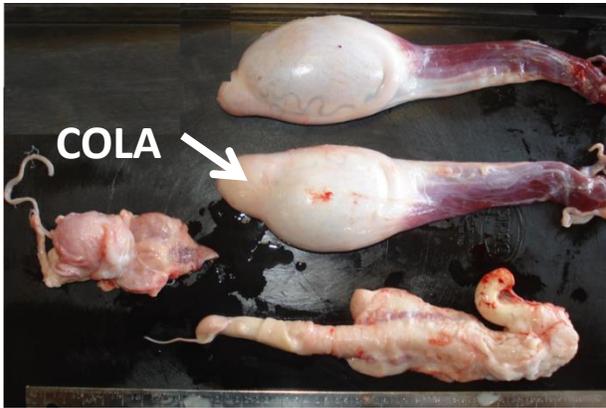


Imagen 3. Aparato genitourinario del Carnero 11, grupo IV infección intraepididimal, de dominancia baja. Presencia unilateral en la cola del epidídimo de un granuloma único, con contenido blanco amarillento.

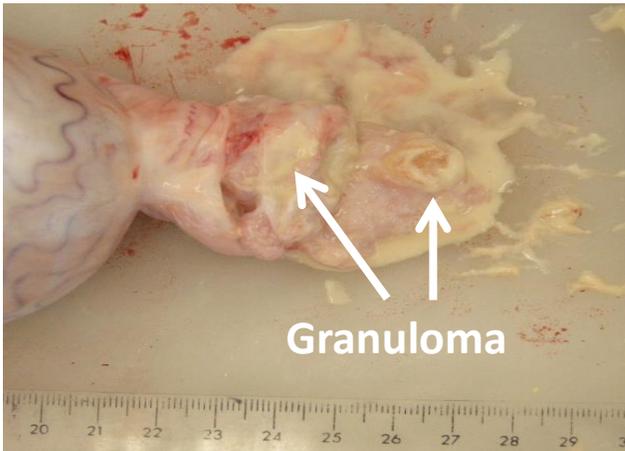


Imagen 4. Aparato genitourinario del carnero 12 grupo IV infección intraepididimal, de dominancia baja. Presencia unilateral en la cola del epidídimo de un granuloma único de 2 cm Ø, con contenido blanco amarillento.

## 12.7.2. LESIONES MICROSCÓPICAS EN CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR

### *B. ovis.*

Se encontraron lesiones características de la epididimitis granulomatosa del carnero en los animales del grupo IV con inoculación intraepididimal (Imágenes 5 a 8), consistentes en infiltrado de células polimorfo y mononucleares, hiperplasia y vacuolización del epitelio de los túbulos epididimarios y granulomas, vacuolización del epitelio en ámpulas del deferente, epidídimo y uretra.

Los animales con infiltración leve a moderada fueron: GI carneros 5 y 23; GII 3, 7, 9 19; GIII 2, 14, 18, 20, 21, 22; Grupo IV 4, 11, 12. En todos los animales con infiltración se observaron los siguientes órganos: uretra en sus diferentes niveles, uréter, epidídimo, principalmente cabeza, epitelio estratificado queratinizado de pene, glande y proceso uretral, vesícula seminal, ámpula, próstata, *rete testis* y saco ciego del prepucio. La infiltración mostró una progresión gradual en los tipos celulares involucrados, en los diferentes tiempos de sacrificio, iniciando con una infiltración de células polimorfo nucleares con características de neutrófilos en la semana 13 y células mononucleares con características de monocitos en la semana 15.

La infiltración de neutrófilos, se tornó más notoria e intensa en la semana 3 post inoculación, observándose en los epitelios de transición y estratificados queratinizados de la uretra, independientemente de la vía de desafío.

En la cantidad de infiltración en los tejidos de los estadios iniciales de la infección, se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tres grupos de dominancia, pesentando mayor cantidad los de dominancia alta, seguidos de lo animales de dominancia media y con menor cantidad los animales sumisos (Figura 4).

La infiltración en los grupos experimentales no presento diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo I (infección epidérmal y conjuntival de animales sumisos) y el grupo III (infección epidérmal y conjuntival de animales de dominancia intermedia), con menor cantidad ( $p < 0.05$ ) que los dos anteriores están los animales del grupo II (infección epidérmal y conjuntival de animales de dominancia alta), presentaron mayor cantidad ( $p < 0.05$ ) que los grupos IV (infección intraepididimal animales sumisos) y el grupo V (testigos) (Figura 5).

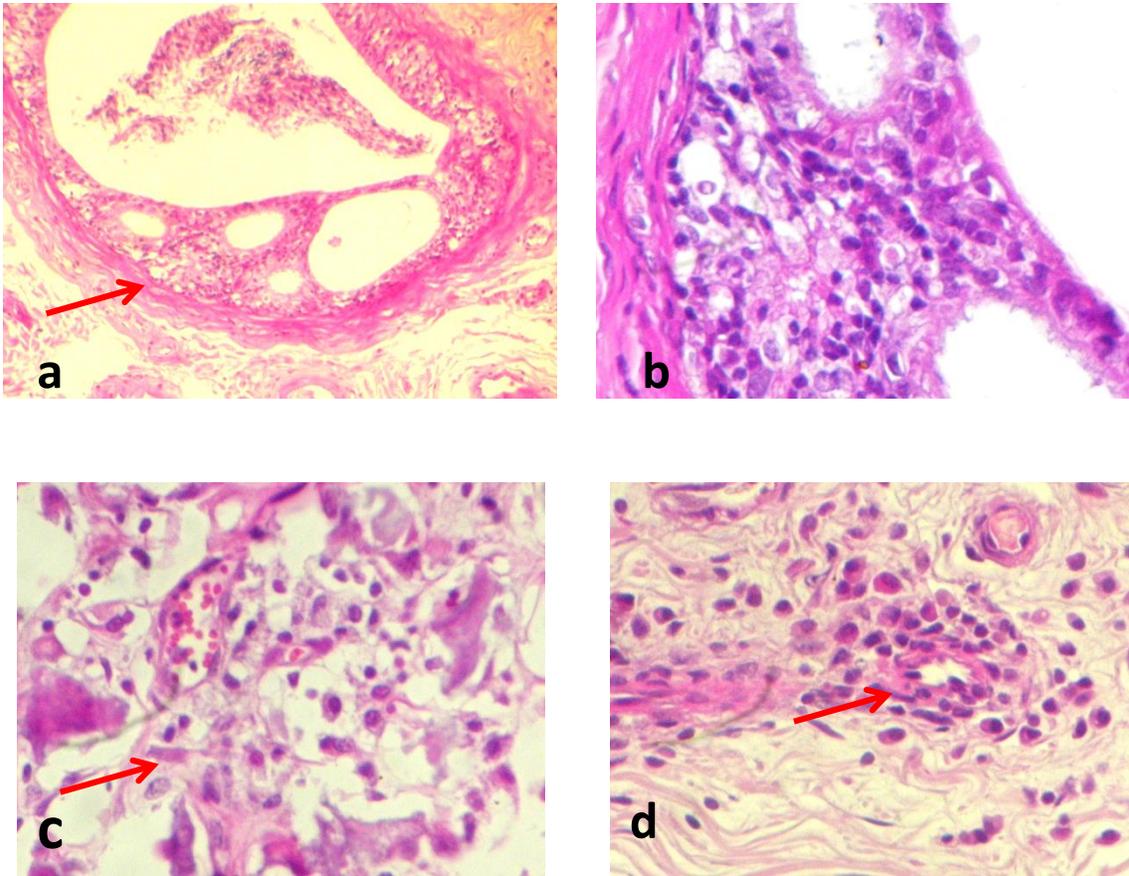
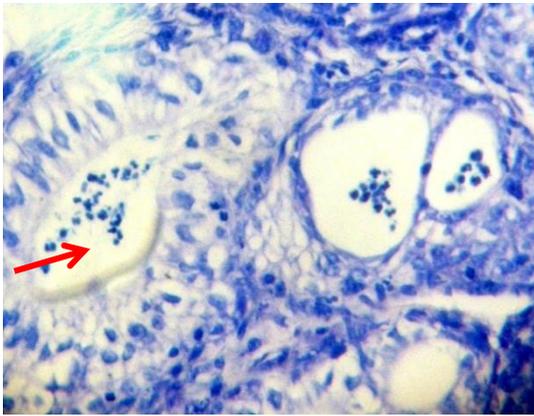
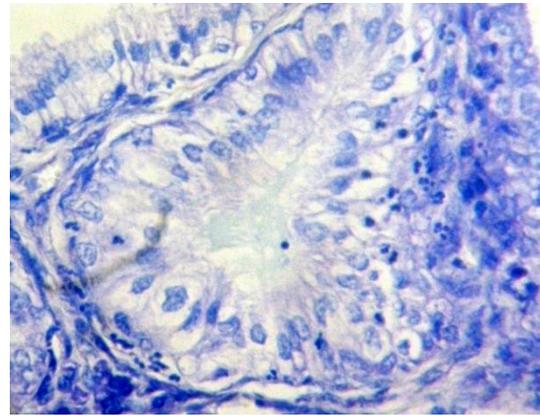


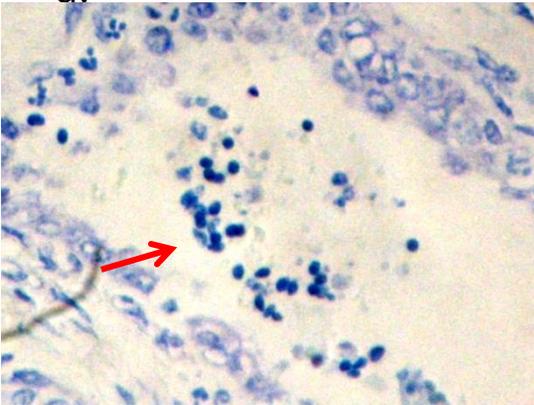
Imagen 5. Tejidos de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* por vía intraepididimal (semana 5 PI), tinción hematoxilina-eosina. a (carnero 11 dominancia media, grupo IV ámpula del conducto deferente) la flecha indica vesículas epiteliales y b (carnero 12 sumiso, grupo IV ámpula del conducto deferente), se observa hiperplasia del epitelio y el inicio de un micro absceso (aumentos de 10X y 40X, respectivamente). C (carnero 12 sumiso, grupo IV cola del epidídimo), la flecha indica la zona de infiltración característica compuesta de células plasmáticas, macrófagos y células mononucleares, (aumento de 40X). d. (carnero 11 dominancia media, grupo IV ámpula del conducto deferente) la flecha indica infiltrado de células mononucleares alrededor de los vasos sanguíneos, (aumento de 40X).



a.



b.



c.



d.

Imagen 6. Tejidos de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* (semana 5 PI). Se observa en glándula vesicular (a y c), epidídimo (b) (aumento de 40X) y ducto deferente (d) (aumento 10X), infiltración y células inflamatorias en la luz de los quistes intra epiteliales. Tinción de azul de toluidina. a. carnero 20 dominancia intermedia, grupo III glándula vesicular; b. carnero 20 dominancia intermedia cola del epidídimo; c. carnero 15 dominante, grupo V gl vesicular; d. carnero 12 sumiso, grupo IV ducto deferente. Las flechas indican células del infiltrado

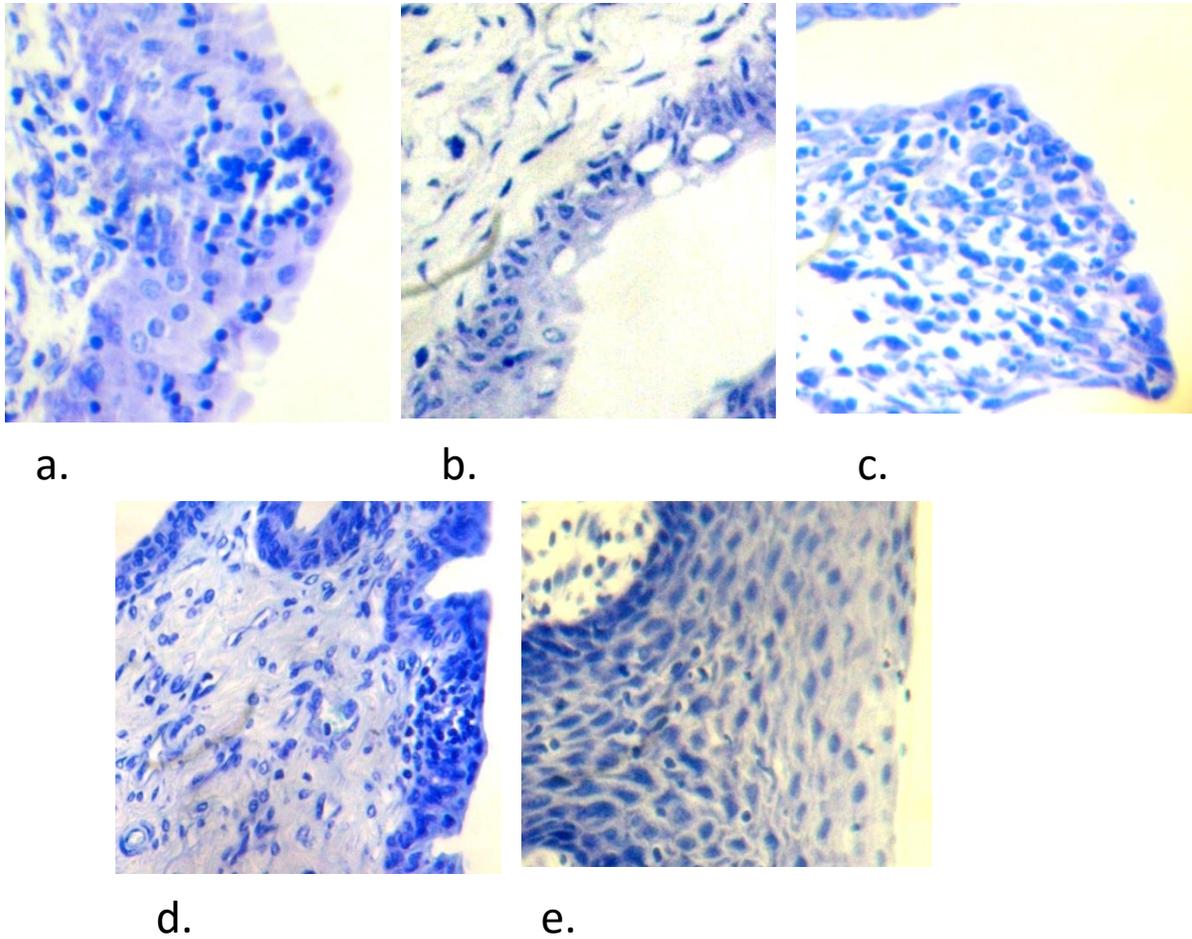


Imagen 7. Tejidos de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* (semana 3 PI). Se observa infiltración de los epitelios estratificados en vejiga urinaria (a); (b), uretra peneana proximal (c); uretra peneana distal (d); proceso uretral (e). Aumento 40X. Tinción de azul de toluidina. a. carnero 4 sumiso, grupo IV vejiga urinaria; b. carnero 15 dominante, grupo V uretra pélvica; c. carnero 4 sumiso, grupo IV uretra peneana proximal; d. carnero 2 dominancia intermedia, grupo III uretra peneana distal; e. carnero 18 sumiso, dominancia intermedia, grupo III proceso uretral.

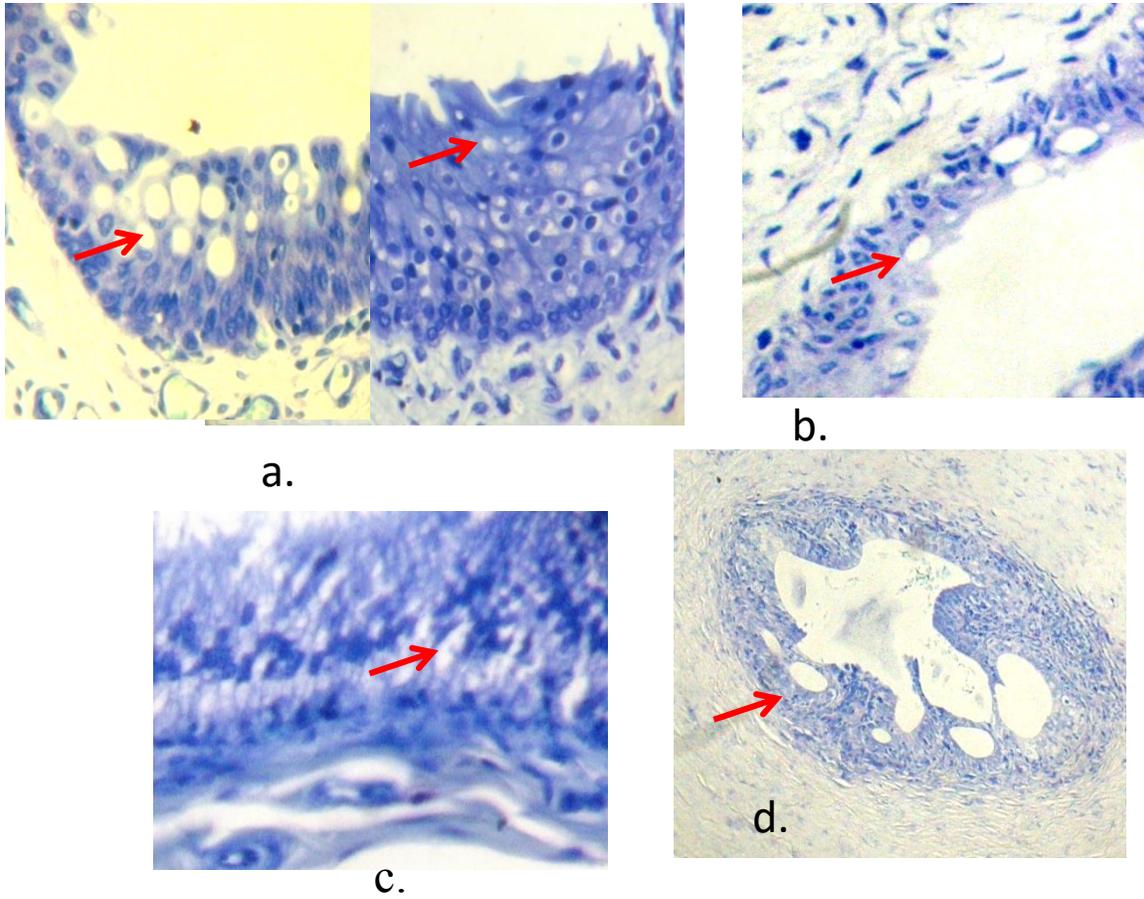


Imagen 8. Tejidos de carneros infectados experimentalmente (semana 3 PI). Las flechas indican microvesículas dentro de los epitelios estratificados de: vejiga urinaria (a); uretra pélvica (b), epidídimo (c); uretra peneana distal. Aumento de 40X. La flecha indica vesículas en el epitelio del ducto deferente (d), aumento de 10X . Tinción de azul de toluidina. a. carnero 19 dominante, grupo II vejiga urinaria; b. carnero 15 dominante V uretra pélvica; c. carnero 7 dominante, grupo II cola del epidídimo; d. carnero 12 sumiso, grupo IV ducto deferente.

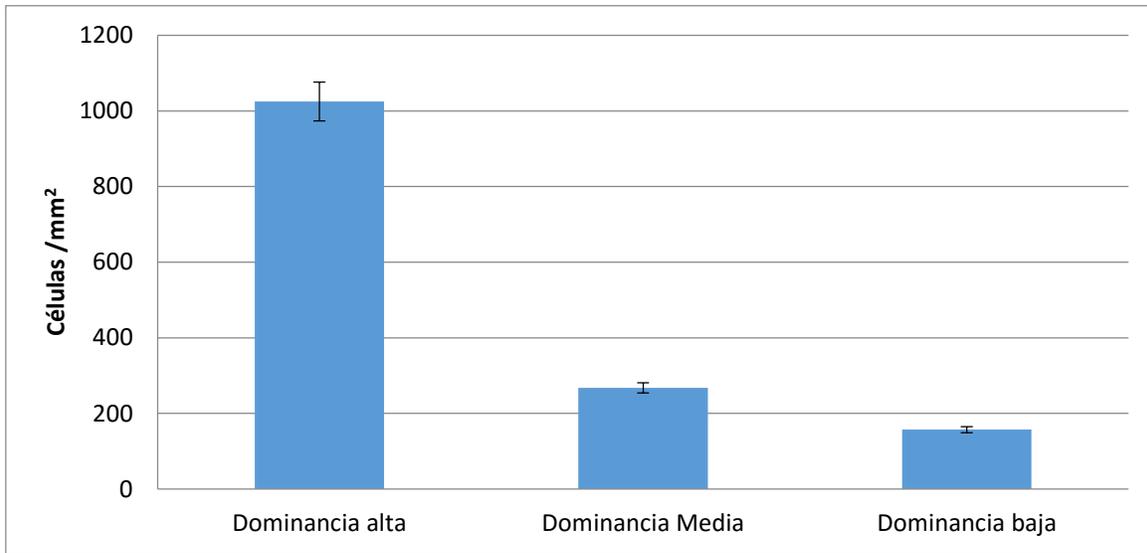


Figura 4. Promedios de la infiltración relacionada al daño en los órganos observados, por grupos de dominancia, en animales con infección experimental con *B. ovis*. La barra denota diferencia estadística significativa

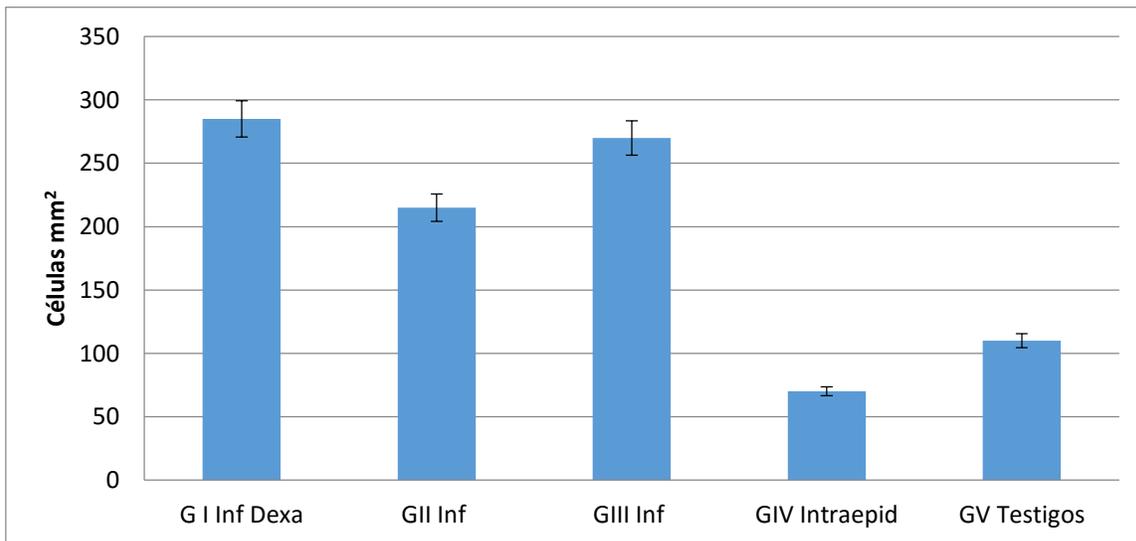


Figura 5. Promedios de la infiltración acumulada encontrada en los órganos del sistema genitourinario y glándulas anexas, por grupo en animales infectados experimentalmente con *B. ovis*. G I inf dexa, grupo I, dominancia baja, infección epidermal, conjuntival y dexametazona; GII inf, grupo II, dominancia alta, infección epidermal y conjuntival; GIII inf, grupo III dominancia intermedia, infección epidermal y conjuntival; GIV Intraepid, grupo IV dominancia baja infección intraepididimal control; GV Testigos, grupo V dominancia alta control sin infección. La barra denota diferencia estadística significativa.

## 12.8. CÉLULAS CEBADAS (CCs).

Se observó una mayor cantidad de CCs en septos glandulares, tunicas serosa y muscular y menor cantidad en submucosa uretral y de los conductos glandulares, con mayor cantidad de CCs ( $P=0.05$ ) en la túnica muscular de los animales infectados.

Se observó menor cantidad de CCs en el conectivo del parénquima glandular, alrededor de los conductos glandulares y la mucosa uretral que en los otros sitios evaluados. El conteo de CCs en la serosa y septos glandulares mostró mayor cantidad de CCs ( $p<0.05$ ), en relación con los otros sitios de observación.

Los animales con dominancia media presentaron una menor cantidad de CCs con diferencia significativa con los grupos de dominantes y de dominancia baja o sumisos (Figura 6).

Cuando los resultados se observan de acuerdo a los grupos experimentales, el grupo V Testigo presenta mayor número de CCs que el grupo II con infección intradérmica y conjuntival y que el grupo IV de infección intraepididimal, pero solo con diferencias significativas ( $p<0.05$ ), contra el grupo IV (Figura 7).

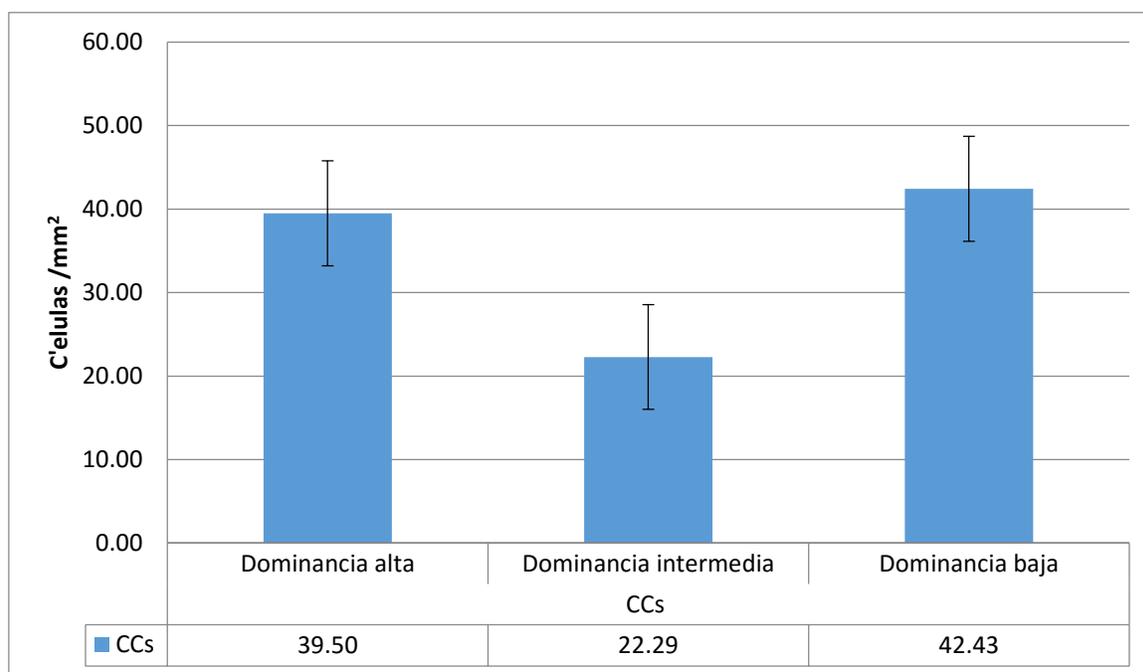


Figura 6. Promedios de la cantidad de células cebadas por  $\text{mm}^2$  en los carneros agrupados por dominancia. CCs, células cebadas La barra denota diferencia estadística significativa.

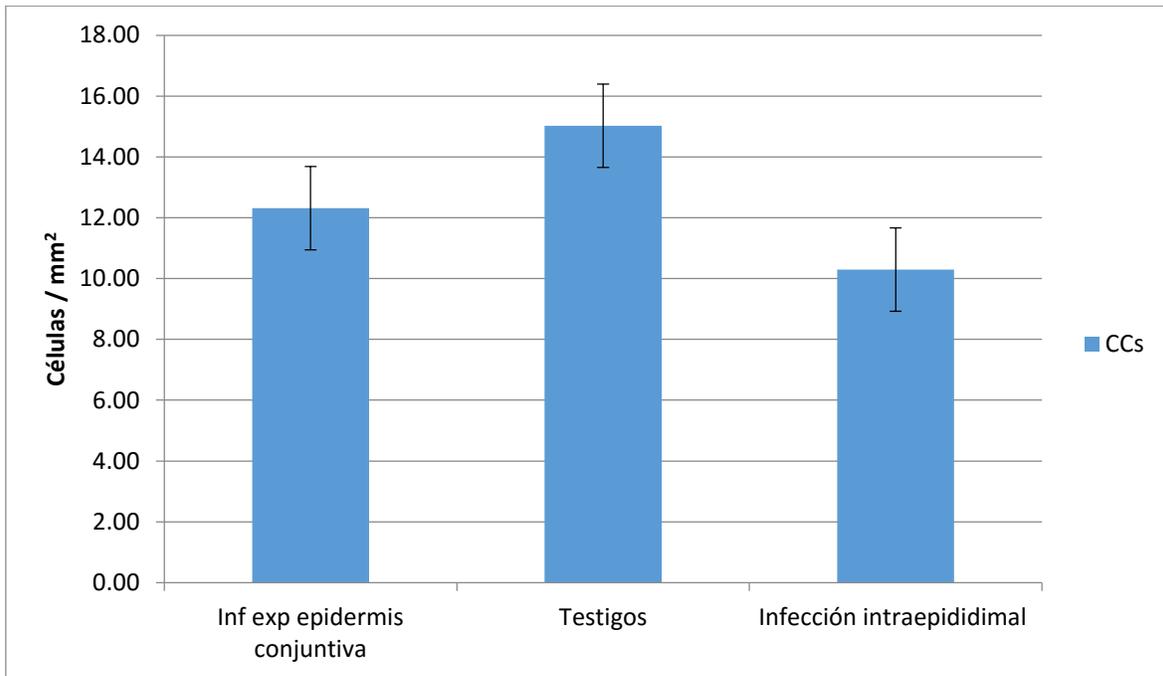
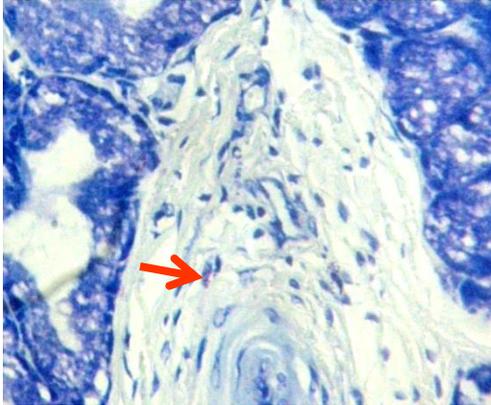
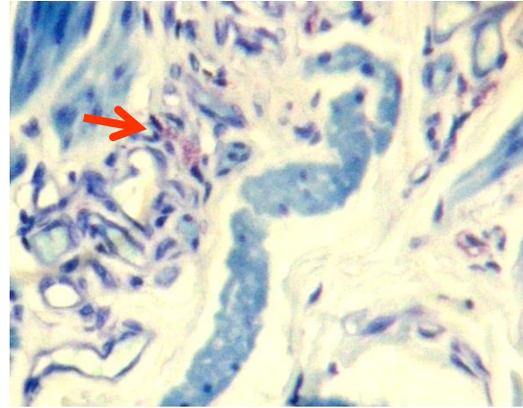


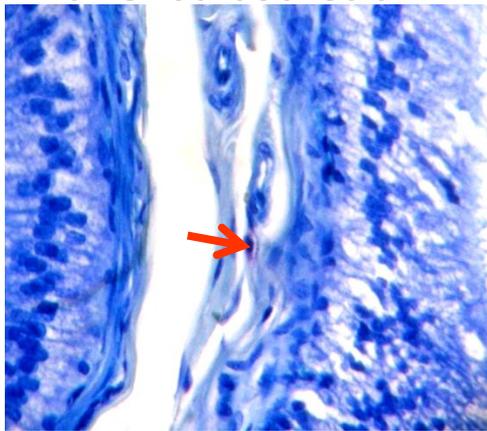
Figura 7. Promedios de la cantidad de células cebadas por mm<sup>2</sup> en tres grupos: infección experimental en epidermis y conjuntiva, testigos sin infección e infección intraepididimal. . La barra denota diferencia estadística significativa.



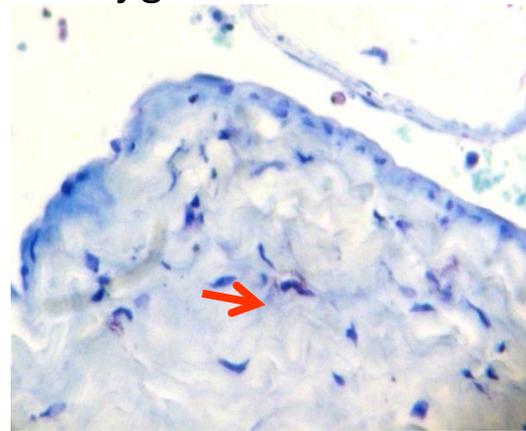
a. Gl bulbouretral



b. Vejiga



c. Epididimo



d. Rete testis

Imagen 9. Carneros infectados experimentalmente (semana 3 PI), se puede observar la presencia de células cebadas en el conectivo de glándula bulbouretral (a), vejiga urinaria (b), epidídimo (c), *rete testis* (d). Aumento de 40X. y ducto deferente (aumento 10X), infiltración y células inflamatorias en la luz de los quistes intraepiteliales. La tinción de azul de toluidina evidencia los gránulos contenidos en las CCs.

a. carnero 20 11 dominancia intermedia, grupo III glándula bulbouretral ; b. carnero 19 dominante, grupo II vejiga urinaria; c. carnero 7 dominante, grupo II cola del epidídimo; d. carnero 7 dominante, grupo II *rete testis*.

## 12.9. CORELACIÓN ENTRE TASA DE DOMINANCIA, LEUCOCITOSPERMIA, CORTISOL, INFILTRACIÓN Y CÉLULAS EPITELIALES, EN CARNEROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *B. ovis*.

Las variables que presentaron una correlación positiva fueron: TD-cortisol, TD- infiltración, LE-células epiteliales, Cortisol-infiltración, cortisol-células epiteliales, infiltración-células epiteliales. Las variables sin correlación, fueron: TD-LE, TD-CE, LE-cortisol, LE-infiltración (Tabla 8).

<b>ÍNDICE DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS</b>					
	<b>TD</b>	<b>LE</b>	<b>CORT</b>	<b>INF</b>	<b>CE</b>
<b>TD</b>		<b>-0.605</b>	<b>0.16</b>	<b>0.1855</b>	<b>-0.23</b>
<b>LE</b>	<b>-0.605</b>		<b>-0.075</b>	<b>-0.34</b>	<b>0.083</b>
<b>CORT</b>	<b>0.16</b>	<b>-0.075</b>		<b>0.898</b>	<b>0.15</b>
<b>INF</b>	<b>0.1855</b>	<b>-0.34</b>	<b>0.898</b>		<b>0.396</b>
<b>CE</b>	<b>-0.23</b>	<b>0.083</b>	<b>0.15</b>	<b>0.396</b>	

Tabla 8. Correlación entre las variables estudiadas en los animales con infección experimental. TD, tasa de dominancia; LE, leucocitospermia; CORT, cortisol; INF, infiltración; CE, células epiteliales.

## 12.10. CÉLULAS EPITELIALES.

Se observaron en el semen células epiteliales de diferente morfología y origen: epiteliales de transición de la vejiga y uretra con forma cuboide u oval; células escamosas basales (redondas con núcleo central), intermedias o parabasales (citoplasma poligonal y núcleo pequeño) y células escamosas superficiales (citoplasma extenso con núcleo picnótico). Los grupos III y IV presentaron mayor número de CE que los grupos I, II y V ( $P<0.05$ ) (figura 8) y se observaron diferencias significativas ( $P=0.05$ ) entre algunos grupos: GIII y GII, GIII y GV, GII y GIV, GIV y GV, (Tabla 9).

Antes y después de la inoculación se observó diferencia significativa ( $P<0.05$ ) en los grupos I y V (figura 9).

El conteo total de células epiteliales (CE) en los frotis de semen, demostró una aparente ciclicidad, observándose cuatro estadios: (-) para cero células observadas, (+) para menos de 25, (++) menos de 50, (+++) menos de 100 y (++++) más de 100 (Imagen 10, Figura10).

Grupos con diferencia significativa	
GIII- GII	0.54125
GIII- GV Control	0.68375
GII - GIV Intraepididimal	-0.81625
GIV Intraepididimal - GV control	0.95875

Tabla 9. Prueba de rangos múltiples a partir de ANOVA, se muestran solo los grupos con diferencias significativas en la cantidad de CE.

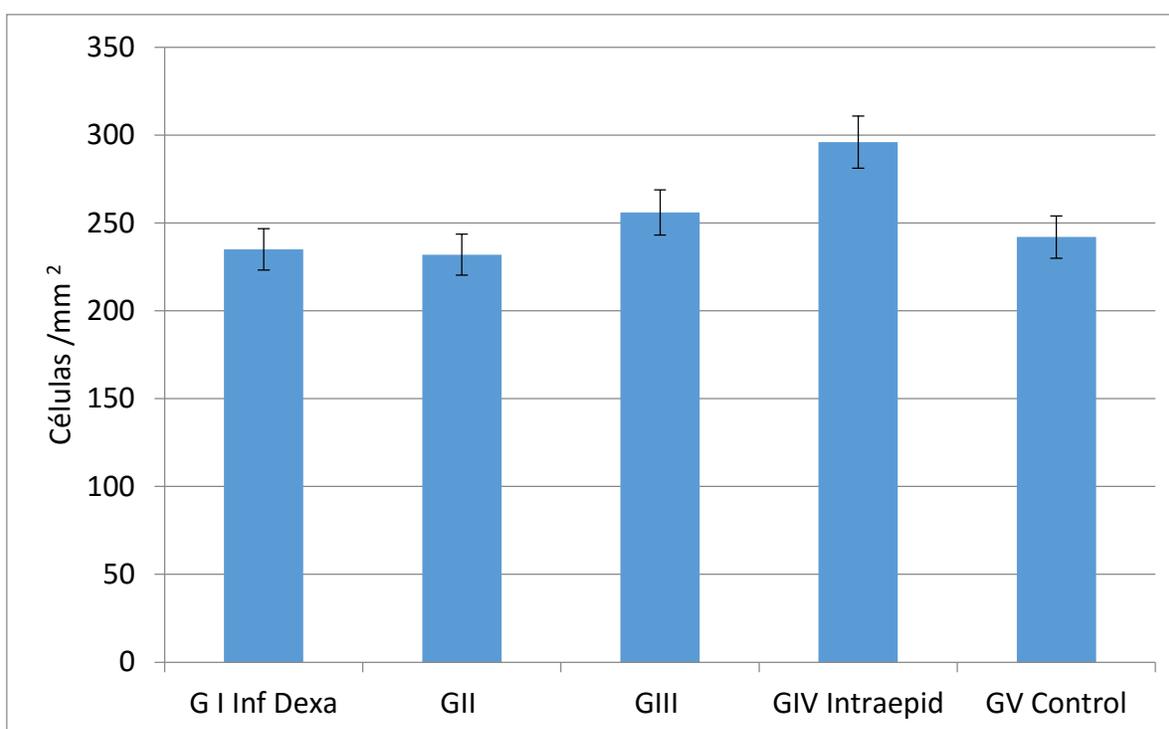


Figura 8. Cantidad total de CE promedio encontrada en las extensiones de semen, por grupo en animales infectados experimentalmente con *B. ovis*. G I inf dexa, grupo I, dominancia baja, infección epidermal, conjuntival y dexametazona; GII inf, grupo II, dominancia alta, infección epidermal y conjuntival; GIII inf, grupo III dominancia intermedia, infección epidermal y conjuntival; GIV Intraepid, grupo IV dominancia baja infección intraepididimal control; GV Testigos, grupo V dominancia alta control sin infección. La barra denota diferencia estadística significativa

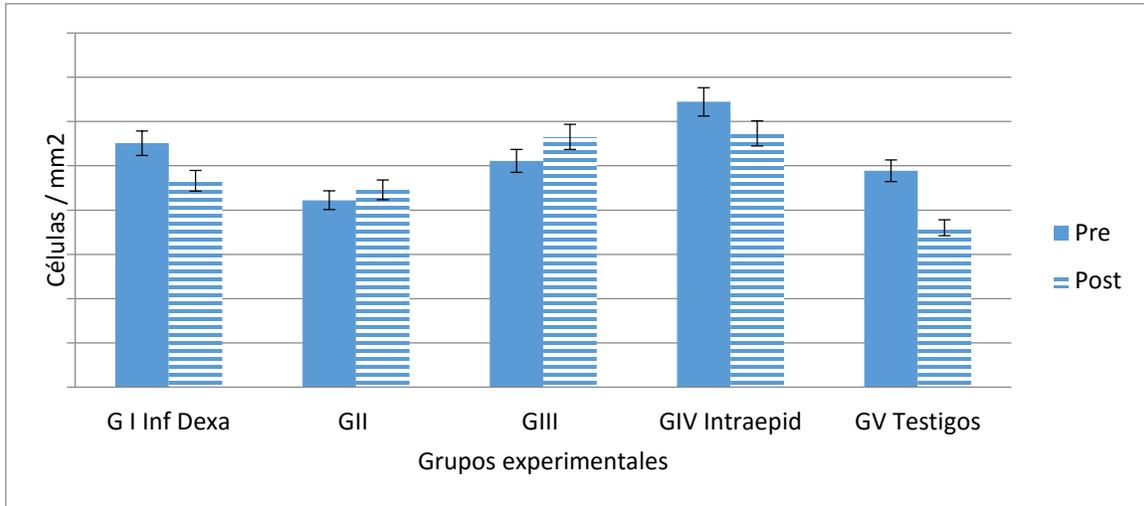


Figura 9. Promedios de CE antes (semana 5) y después (semana 13) de la infección experimental con *B. ovis*, por grupo. G I inf dexa, grupo I, dominancia baja, infección epidermal, conjuntival y dexametazona; GII inf, grupo II, dominancia alta, infección epidermal y conjuntival; GIII inf, grupo III dominancia intermedia, infección epidermal y conjuntival; GIV Intraepid, grupo IV dominancia baja infección intraepididimal control; GV Testigos, grupo V dominancia alta control sin infección. La barra denota diferencia estadística significativa.

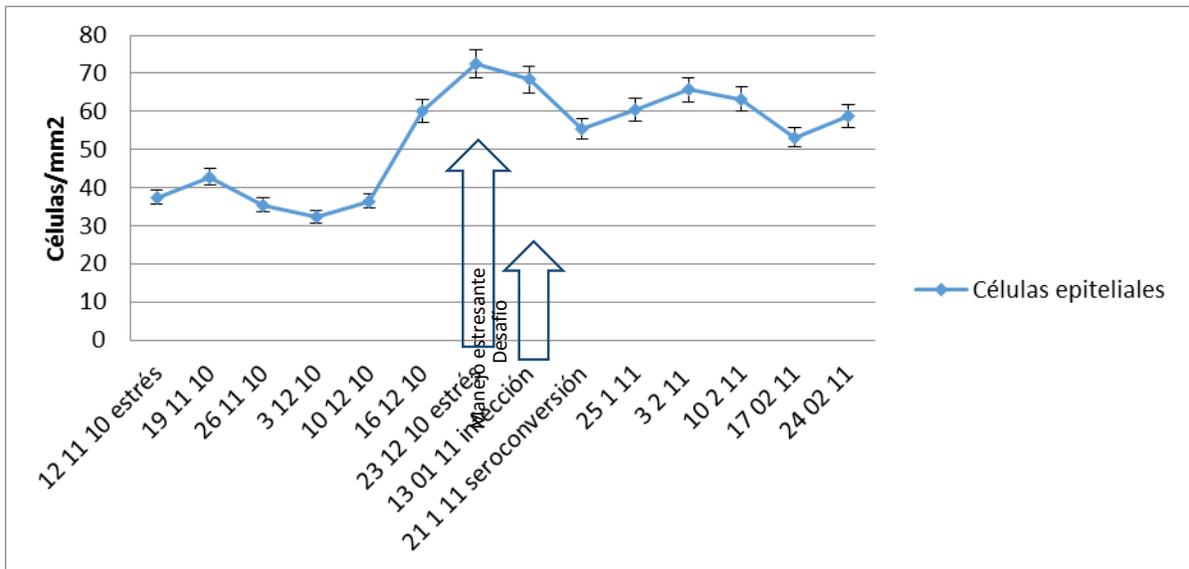


Figura 10. Cantidad promedio de CE entre las semanas 1 y 16 del experimento, se observa un aumento en la cantidad de CE antes del estímulo estresante, disminución hasta la seroconversión y el aparente inicio de un nuevo ciclo. La barra denota diferencia estadística significativa.

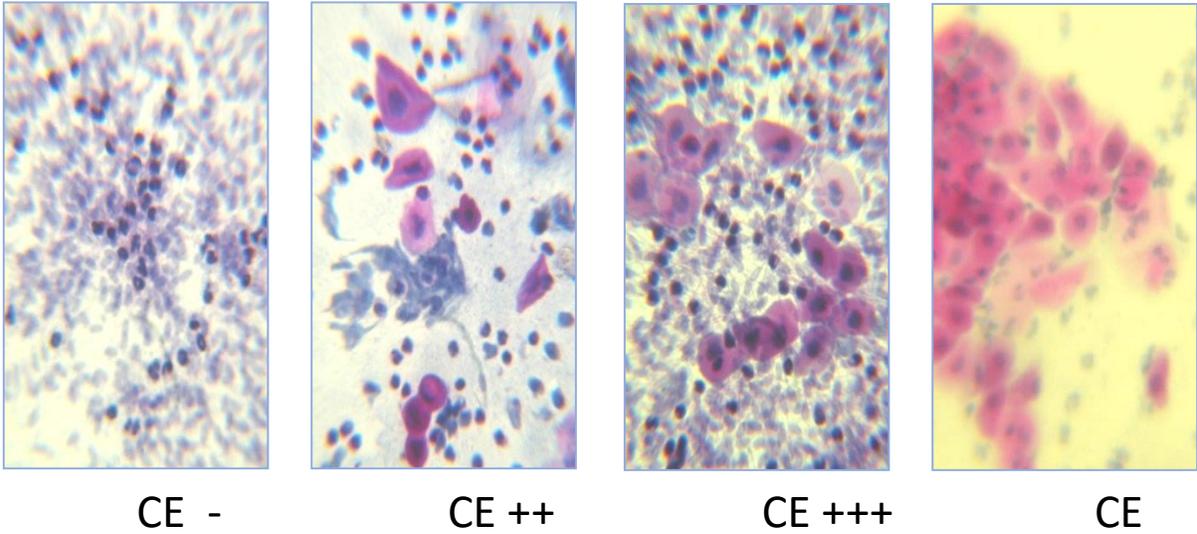


Imagen 10. Células epiteliales en carneros infectados experimentalmente con grado ascendente de infiltración y presencia de células epiteliales, en donde se observan los cuatro estadios considerados para calificar la presencia de CE: (-) para cero células observadas, (+) para menos de 25, (++) menos de 50, (+++) menos de 100 y (++++) más de 100.

### 12.11. CONTEO DE CÉLULAS CD4+ y CD8+.

El grupo con mayor cantidad de células CD4+ y CD8+ fue el grupo IV con infección intraepididimal. En CD4+ se observó mayor cantidad en el grupo II con respecto a los grupos, I, III y control (Figura 11). Para CD8+, los grupos experimentales presentaron mayor cantidad de células que el control, con diferencias entre ellos, el grupo I presentó la mayor cantidad y el II la menor cantidad ( $p < 0.05$ ) (Figura 12).

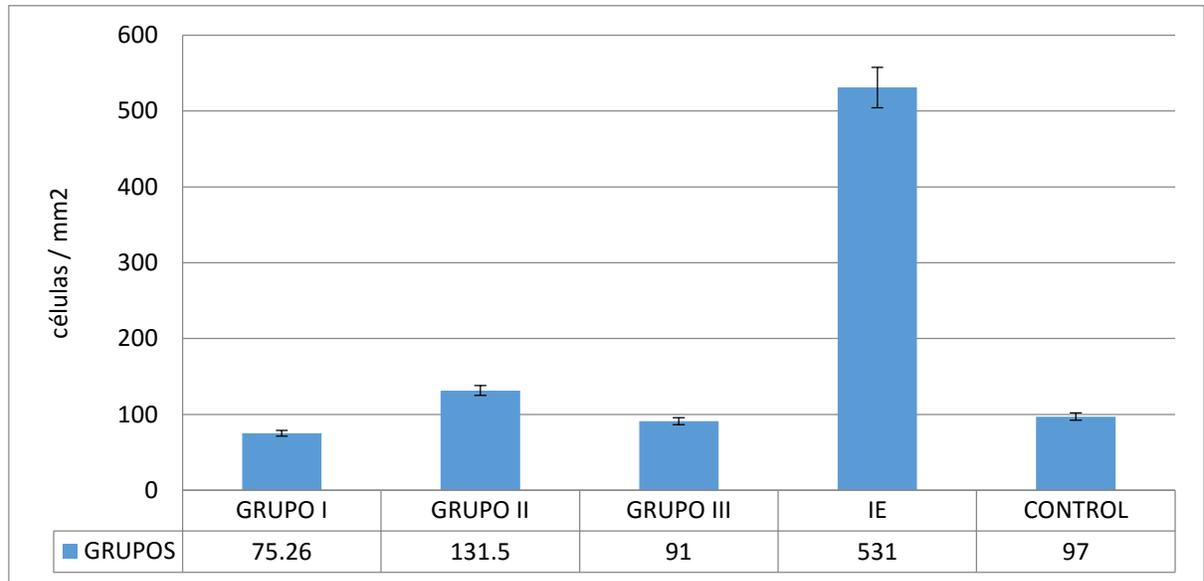


Figura 11. Promedio de Células CD4+ por mm<sup>2</sup>, presentes en los órganos revisados por grupo experimental. Grupo I, dominancia baja, infección epidermal, conjuntival y dexametazona; Grupo II, dominancia alta, infección epidermal y conjuntival; Grupo III dominancia intermedia, infección epidermal y conjuntival; IE, grupo IV dominancia baja infección intraepididimal control; Control, grupo V dominancia alta control sin infección. La barra denota diferencia estadística significativa.

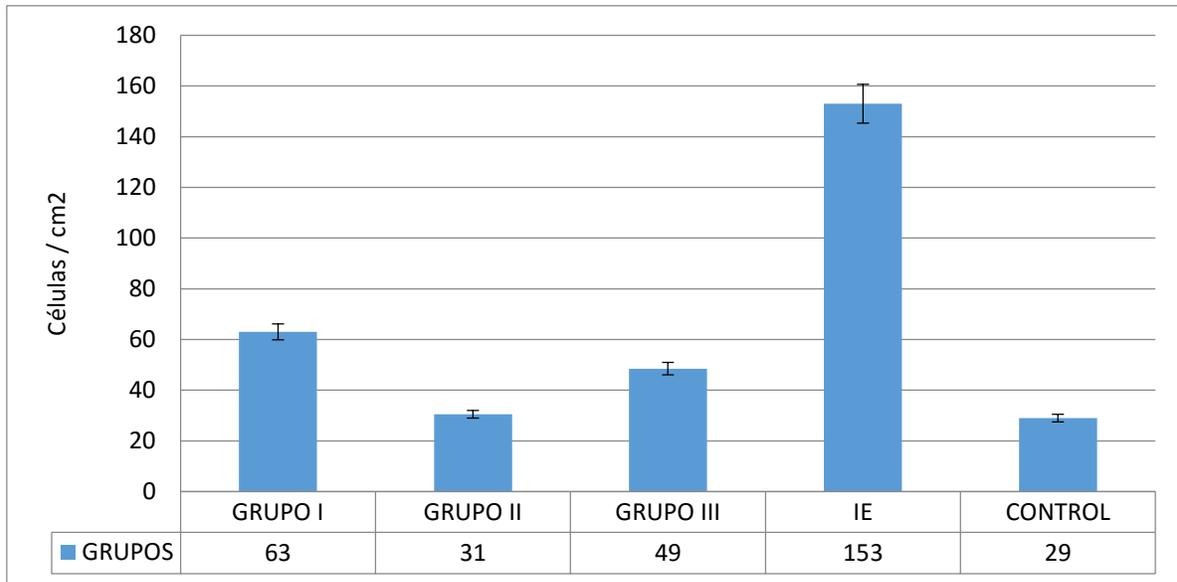


Figura 12. Promedio de Células CD8+ por mm<sup>2</sup>, presentes en los órganos revisados por grupo experimental. Grupo I, dominancia baja, infección epidermal, conjuntival y dexametazona; Grupo II, dominancia alta, infección epidermal y conjuntival; Grupo III dominancia intermedia, infección epidermal y conjuntival; IE, grupo IV dominancia baja infección intraepididimal control; Control, grupo V dominancia alta control sin infección. La barra denota diferencia estadística significativa.

En la distribución de CD4+ y CD8+, por órganos del sistema genitourinario y glándulas anexas, se observó la mayor cantidad de CD4+ en uretra, seguida del epidídimo, vejiga; ámpula, vesícula seminal, próstata y bulbo uretral, con diferencias entre grupos ( $P < 0.05$ ). El grupo IV de infección intraepididimal, mostró los mayores conteos en los dos tipos linfocitarios CD4+ y CD8+. En testículo no se observaron linfocitos marcados. Se observó la mayor cantidad de células CD8+, en uretra, epidídimo y vejiga con diferencias entre los órganos, seguidos de ámpula y vesícula seminal, sin diferencia entre ellas ( $p < 0.05$ ) (Figura 13).

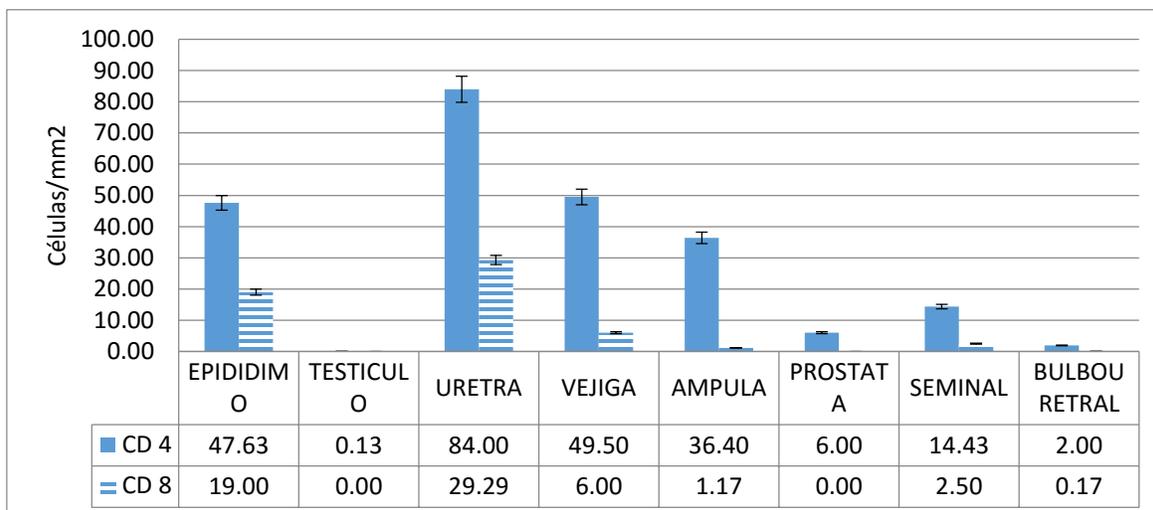


Figura 13. Cantidad promedio de células CD4+ yCD8+ por mm<sup>2</sup> en los órganos observados, de los animales con infección experimental con *B. ovis*. La barra denota diferencia estadística significativa.

Los animales de jerarquía media presentaron mayor cantidad de CD4+ y CD 8+, que los grupos de dominancia alta y sumisos que no resultaron con diferencia entre ellos ( $P < 0.05$ ). Se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cantidades de linfocitos CD8+ del grupo de dominancia media contra dominantes y sumisos, entre los animales dominantes y sumisos no ocurrió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).

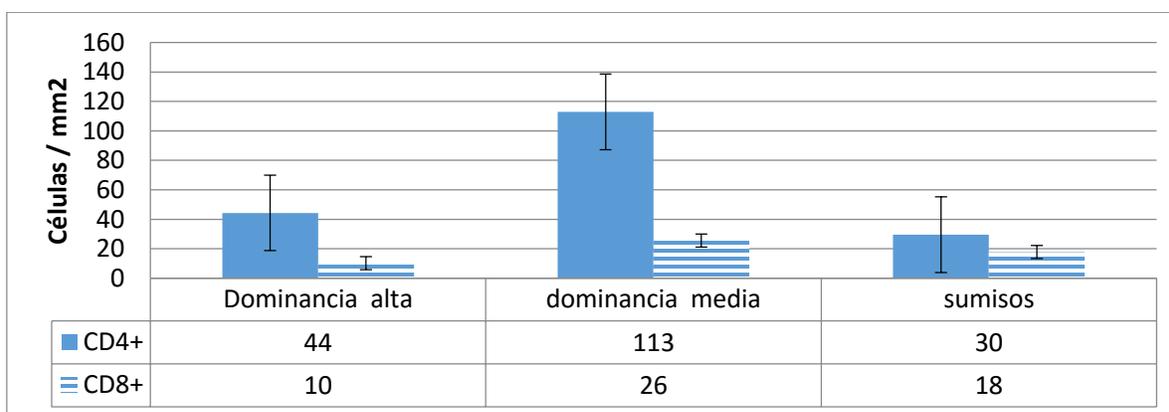


Figura 14. Cantidad promedio de células CD4+ yCD8+ por mm<sup>2</sup> en los órganos observados, de los animales con infección experimental con *B. ovis*, después del desafío, de acuerdo a los tres grupos de dominancia en el rebaño. La barra denota diferencia estadística significativa.

## 12.12. CORTISOL CIRCULANTE MEDIDO POR RADIO INMUNO ENSAYO.

En el suero de cada animal obtenido durante 12 semanas, se realizó la medición de cortisol a partir de 600  $\mu$ l, de la suspensión final, se valoraron en un contador de centelleo por duplicado, en tres ensayos, en donde cada grupo se formó con animales representativos de cada grupo de jerarquía.

La hormona se pudo detectar hasta 5.0 ng/ml con una sensibilidad del 88% en los 3 ensayos. La concentración circulante de cortisol varió entre 31.7 y 9516 ng/ml, con un promedio total de 667.8 ng/ml. Se observó diferencia ( $P < 0.05$ ) entre cantidades de cortisol al comparar grupos, dominantes 725.3 ng/ml y sumisos 759 ng/ml contra el grupo de dominancia media 630.2 ng/ml (Figura 15).

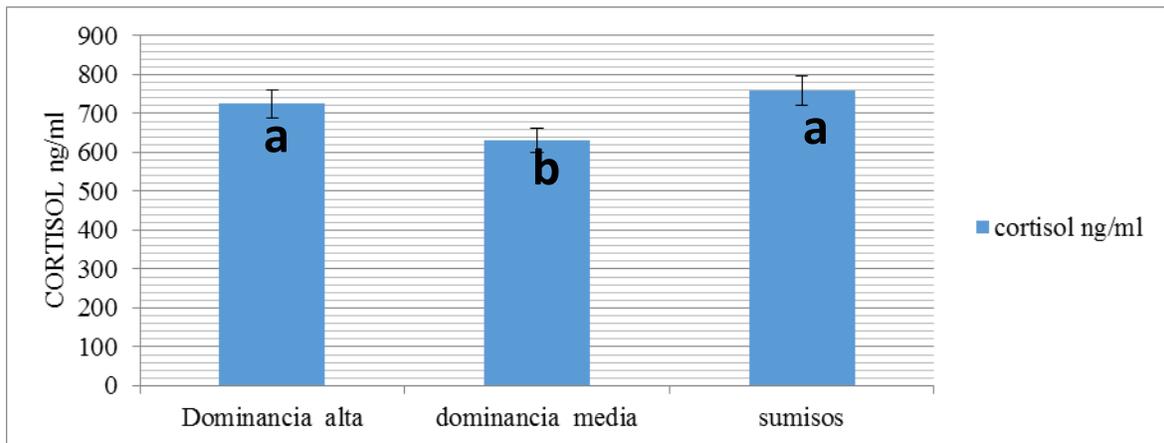


Figura 15. Promedios totales de cortisol en los grupos por dominancia, la literal denota diferencia significativa.

La cantidad promedio de las 12 semanas de obtención de cortisol presente en los grupos, resultó diferente entre el grupo III con los demás y de los grupos I y II con los grupos IV y V y diferencia entre los grupos IV y V (figura 16).

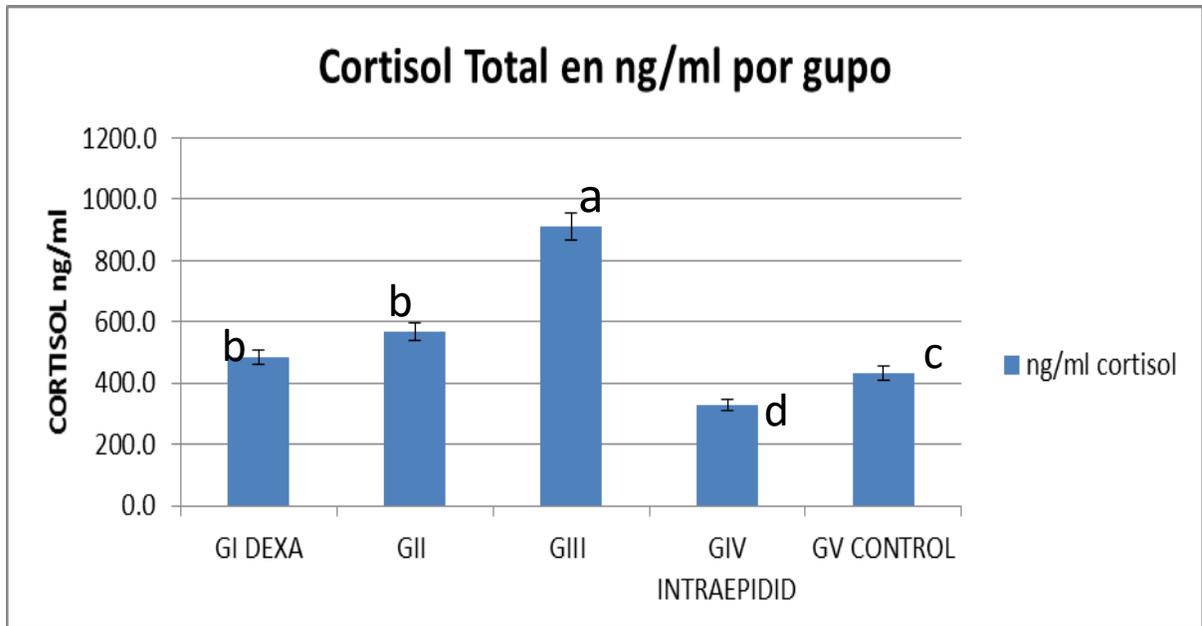


Figura 16. Cantidad de cortisol promedio en los grupos experimentales. La literal denota diferencia significativa.

Cuando se comparó la cantidad de cortisol en los grupos I, II y III, durante el tiempo de obtención, se observó que el grupo I con dexametazona, un pico más pronunciado y tardío que los otros dos grupos y luego cayó por debajo de ellos, manteniendo esta tendencia a lo largo del experimento. Los grupos II (dominancia mayor) y III (dominancia moderada) presentan un pico inicial casi idéntico, pero el grupo III mantiene una tendencia alta con respecto a los otros dos grupos ( $P < 0.05$ ) (Figura 17).

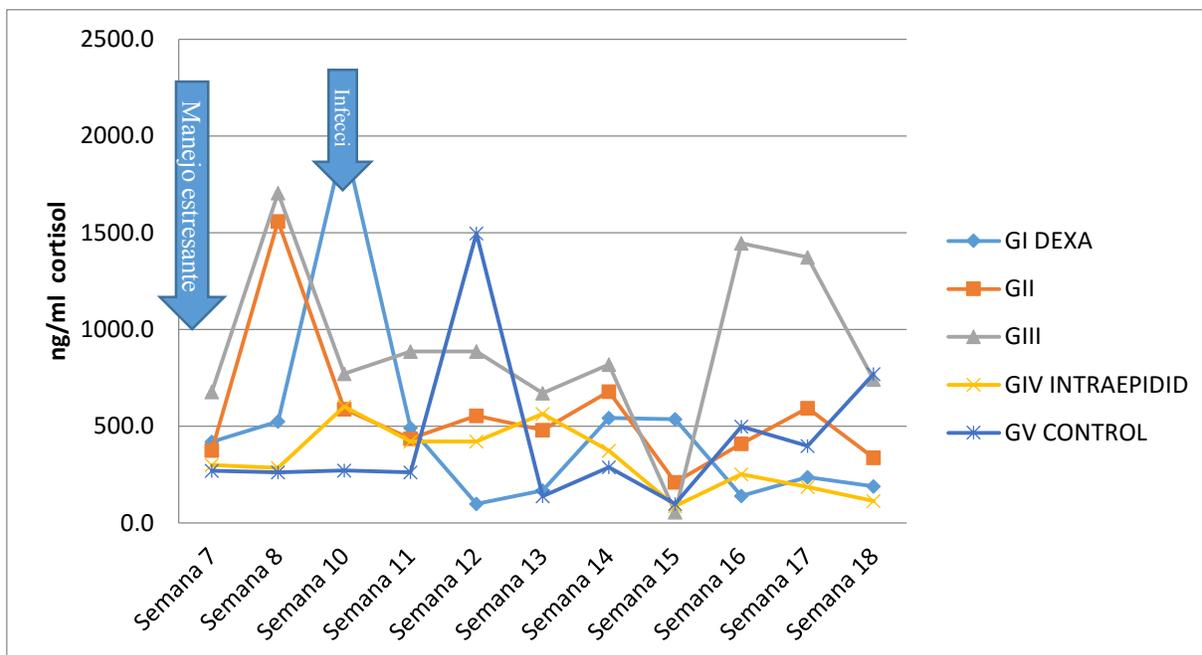


Figura 17. Comparación de la cantidad de cortisol sanguíneo promedio en los grupos, entre las semanas 7 y 18 del experimento. ♦ Grupo I infección experimental epidermis y conjuntival y dexametazona, dominancia baja; ■ grupo II infección experimental epidermis y conjuntival dominancia alta; ▲ grupo III infección experimental epidermis y conjuntival dominancia intermedia; × grupo IV infección experimental control positivo inoculación intraepididimal dominancia baja grupo III infección experimental dominancia media; \*grupo V animales testigo sin infección dominancia alta.

La cantidad de cortisol presentó una tendencia inversa a la observada en la leucocitospermia y células epiteliales (figura 18).

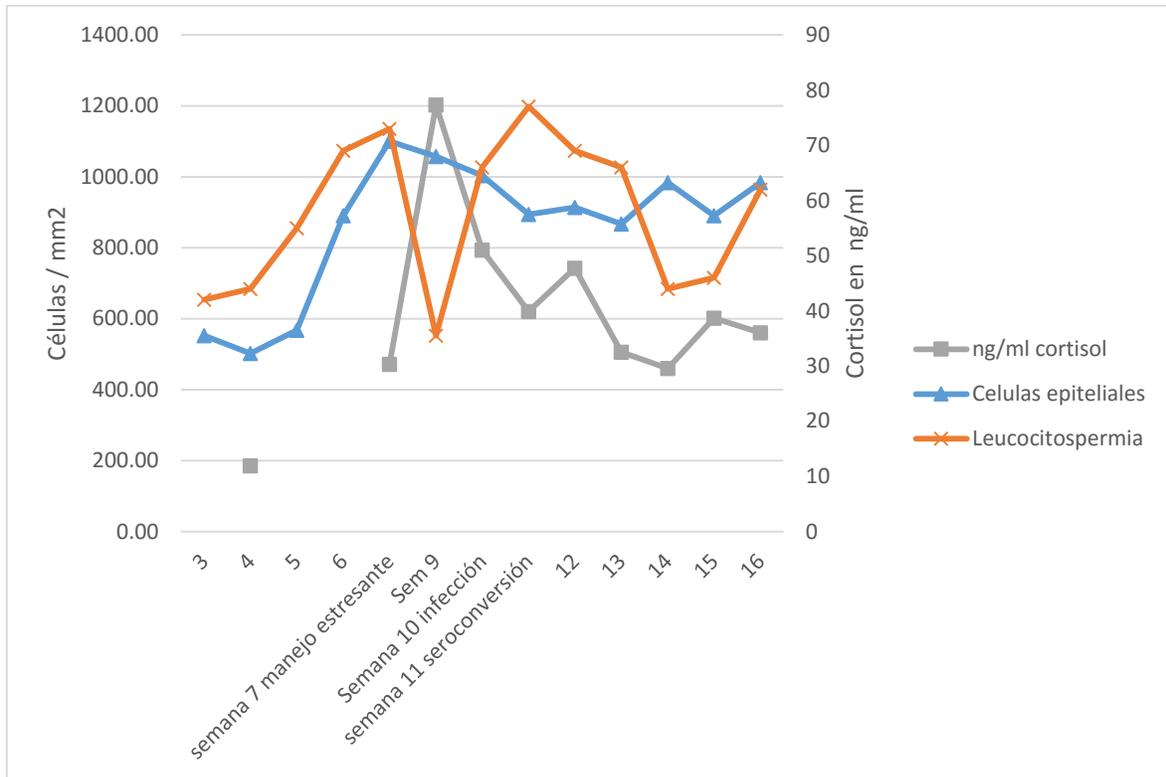


Figura 18 Comparación entre los promedios de: cortisol, células epiteliales y leucocitospermia entre las semanas 3 y 16 del experimento, en animales con infección experimental con *B. ovis*. ♦ Carneros con infección experimental; ■ cortisol en ng/ml; ▲ células epiteliales /mm<sup>2</sup>; × leucocitospermia /mm<sup>2</sup>.

### 12.13. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *B. ovis*, EN EL SEMEN DE ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

Del semen de 13 carneros que fueron serológicamente positivos al menos una vez mediante IDD, se extrajo el DNA con el protocolo para purificación de DNA total, propuesto para la obtención a partir de sangre animal o células de cultivo (Protocolo en columna de centrifugado). Con el kit DNeasy 96 Blood & Tissue, catalogo 69581, de Quiagen. De las muestras seleccionadas, mediante la técnica de PCR múltiple se demostraron productos con la banda de 690 pb correspondientes a *B. ovis*. Se observaron bandas en 5 animales: 2 de jerarquía media y 3 de baja. Todos los animales fueron negativos a *A. seminis* (Imagen 11).

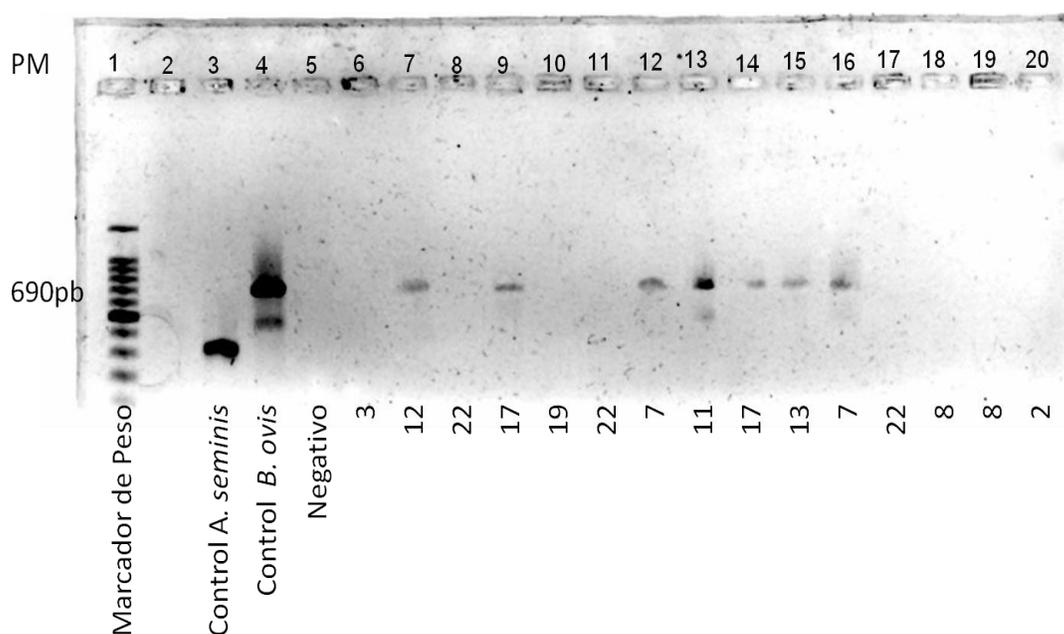


Imagen 11. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en el que se observan los productos de la PCR múltiple de los animales positivos por la prueba de IDD a la infección experimental y un animal del grupo control negativo. En los carriles 7,9, 12, 13, 14, 15, 16, se pueden observar en la banda de 690 pb los productos para *B. ovis*. En los carriles 6, 8, 10, 11, 17, 18 y 19 no se observan productos para *B. ovis* o *A. seminis*. El carril 20 corresponde al carnero del grupo control. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 3 control para *Actinobacillus seminis*; Carril 4 control para *Brucella ovis*; Carril 5 mezcla de corrida sin primers control negativo de la prueba. Carril 6 Carnero 3, Carril 7 Carnero 12, Carril 8 Carnero 22, Carril 9 Carnero 17, Carril 10 Carnero 19, Carril 11 Carnero 22, Carril 12 Carnero 7, Carril 13 Carnero 11, Carril 14 Carnero 17, Carril 15 Carnero 13, Carril 16 Carnero 7, Carril 17 Carnero 22, Carril 18 Carnero 8, Carril 19 Carnero 8, Carril 20 Carnero 2 negativo por IDD.

## 12.14. BACTERIOLOGÍA

De las muestras obtenidas al sacrificio de animales con lesiones visibles, no se obtuvo crecimiento bacteriano.

## 12.15. ANÁLISIS DE REDES Y GENERACIÓN DE GRÁFICAS BIDIMENSIONALES.

Al comparar la LE y la TD antes y después del estímulo estresante, se observó que tienen una tendencia inversa (Figuras 19 y 20).

Cuando se generó una gráfica con datos teóricos para simular homogeneidad se obtiene una grafica con tendencia uniforme y una grafica bidimensional en donde se puede observar una dispersión homogénea tanto de animales como de constantes evaluadas (Figura 21). Al comparar las gráficas bidimensionales obtenidas a partir de los datos experimentales por separado de TD y LE, contra la gráfica teórica se observó el desplazamiento de los individuos y sus variables TD y LE directamente proporcional a las diferencias entre ellas (Figuras 22, 23 y 24). Cuando se integran en una gráfica bidimensional TD y LE, se puede observar que la correlación entre la variable genera desplazamientos con una tendencia hacia la izquierda antes del estímulo estresante y hacia abajo y a la derecha después del estímulo estresante (Figuras 25 y 26).

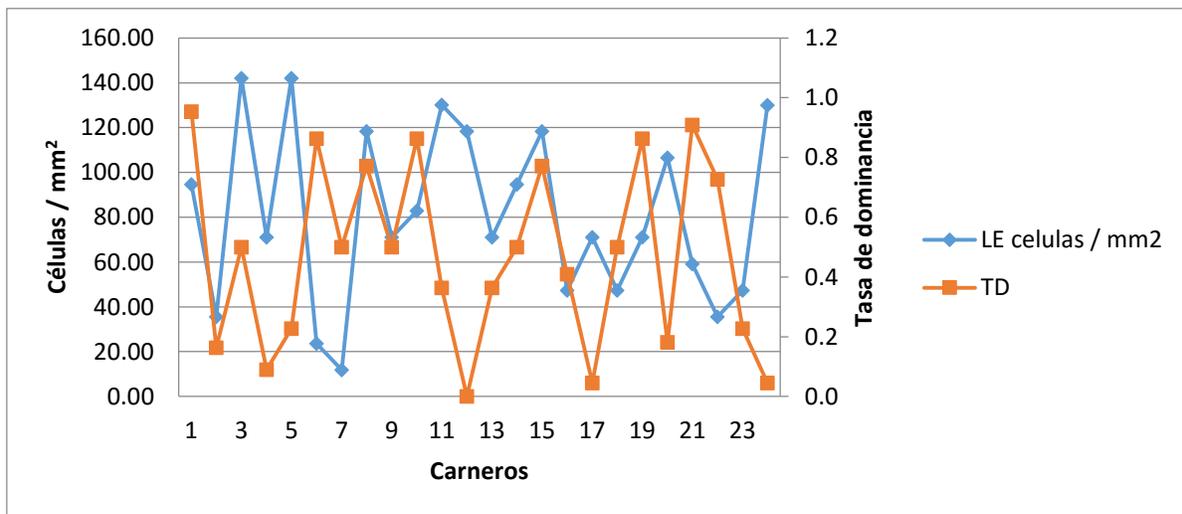


Figura 19. Relación entre LE y TD donde se puede observar la cantidad de células por mm<sup>2</sup> presentes en el eyaculado contra la tasa de dominancia, antes del estímulo estresante.

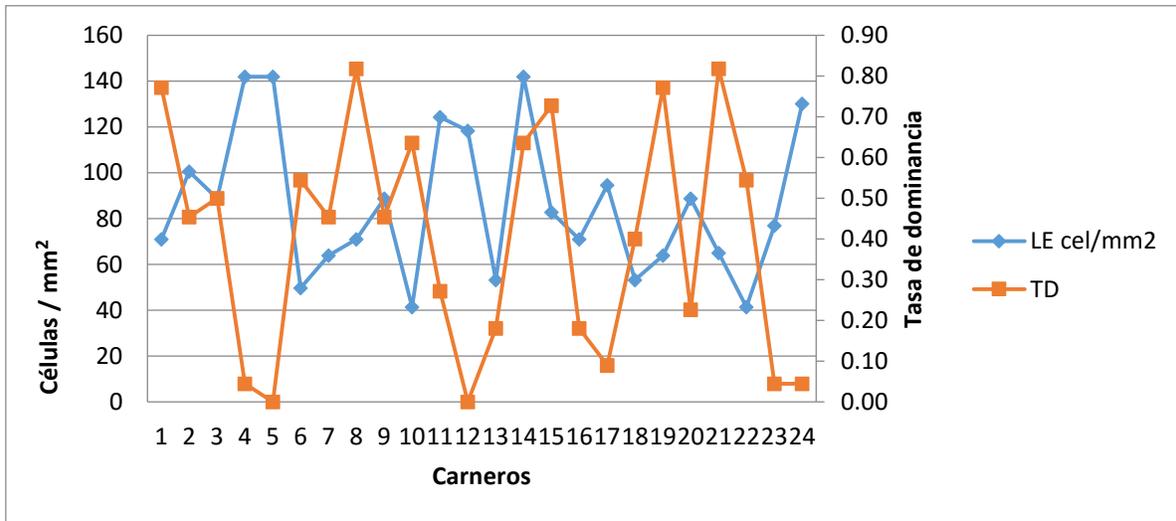


Figura 20. Relación entre LE y TD donde se puede observar la cantidad de células por mm<sup>2</sup> presentes en el eyaculado contra la tasa de dominancia, después del estímulo estresante.

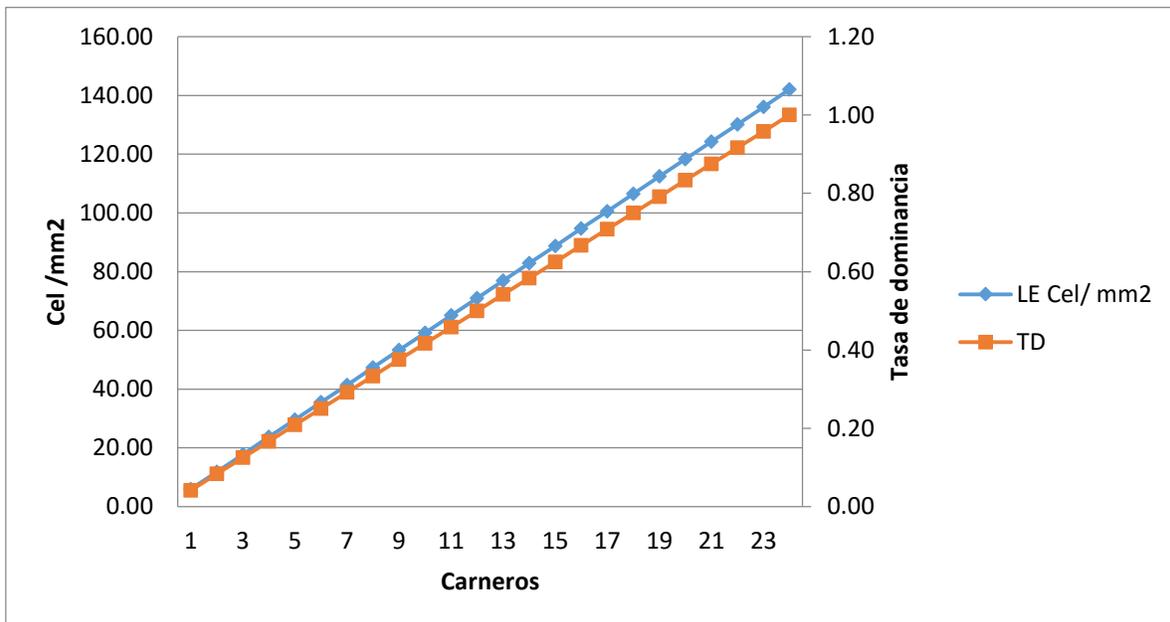


Figura 21. En esta gráfica se evidencian las características de una gráfica generada con los datos de una distribución teórica homogénea para generar una distribución perfecta.

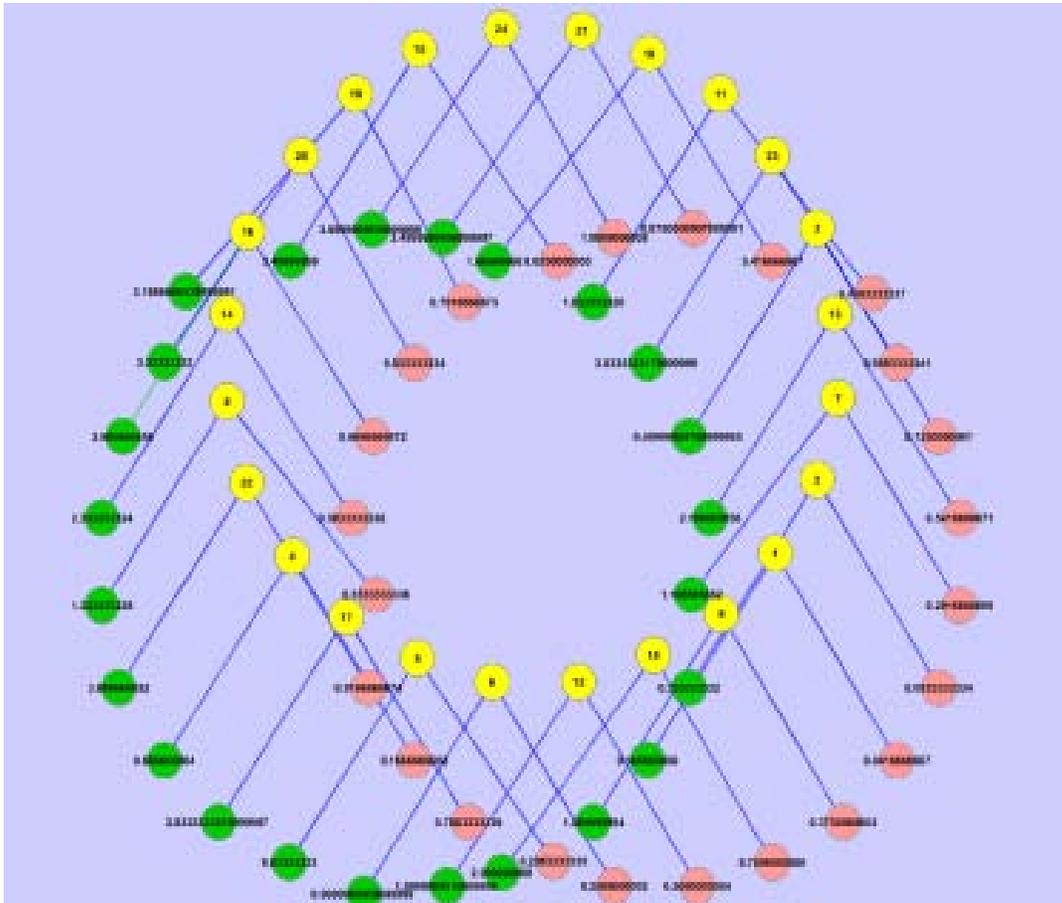


Figura 22. Gráfica bidimensional con datos teóricos para obtener homogeneidad, se puede observar la correlación que se obtiene con una distribución de datos homogénea en la población, con las variables, LE y TD. Indicadores amarillos carneros, verdes LE y rosas TD.

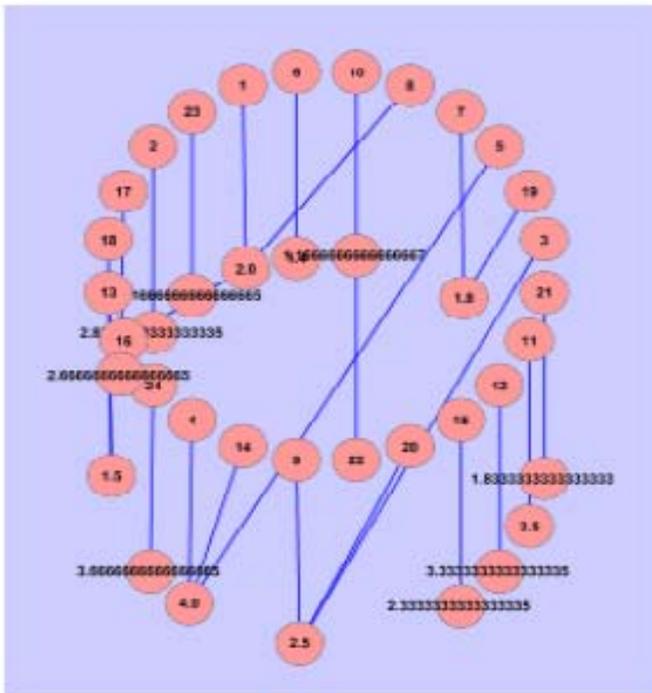
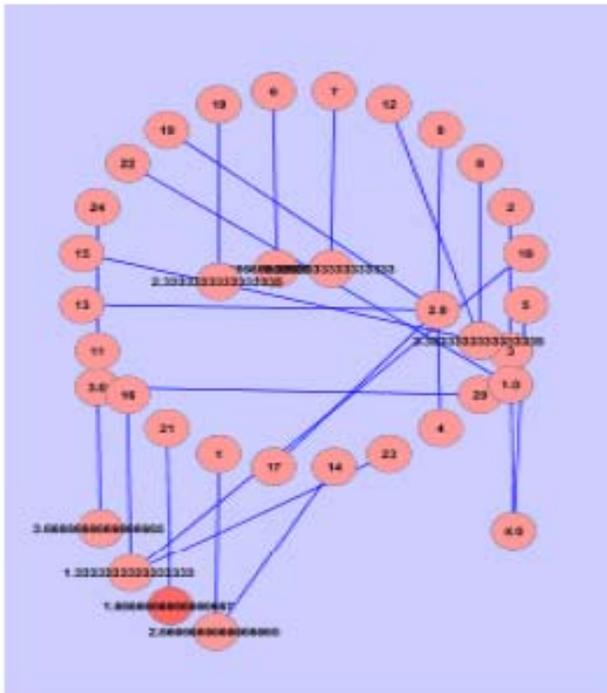


Figura 23. Gráfica bidimensional para los datos de Leucocitospermia antes y después del estímulo estresante controlado, en donde se han integrado todos los carneros del rebaño.

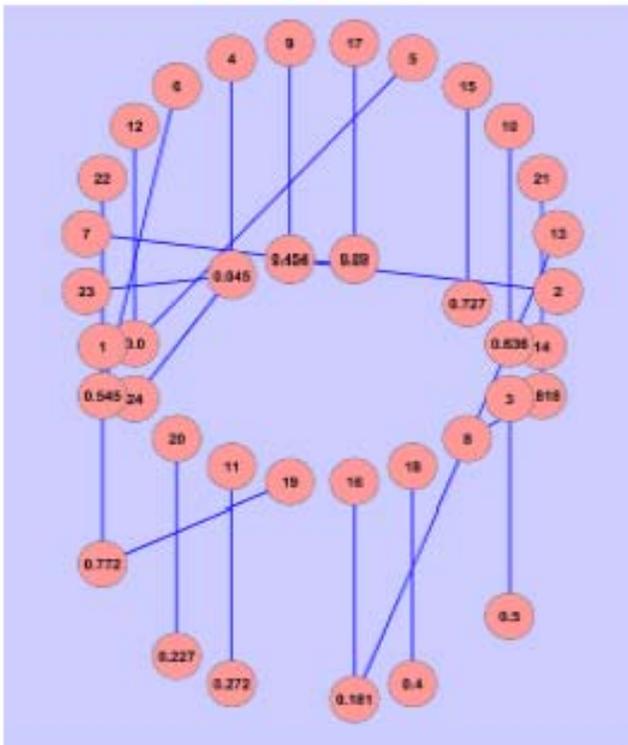
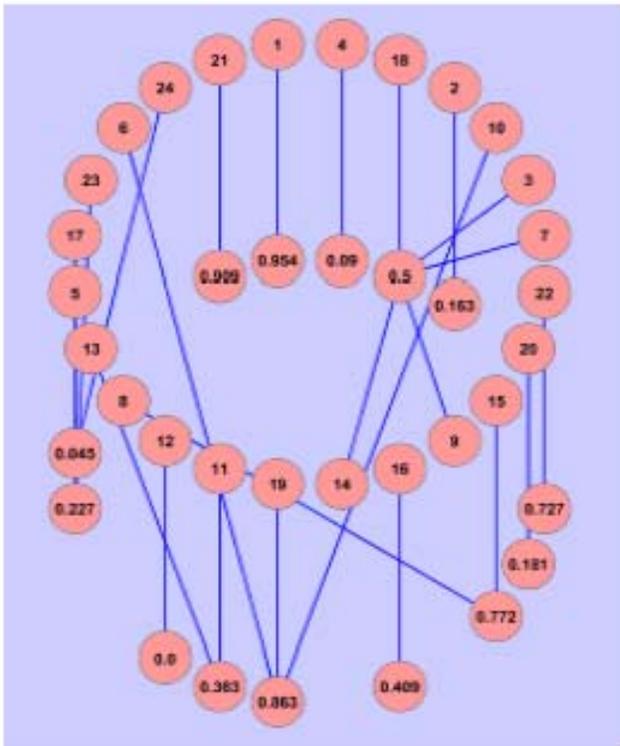
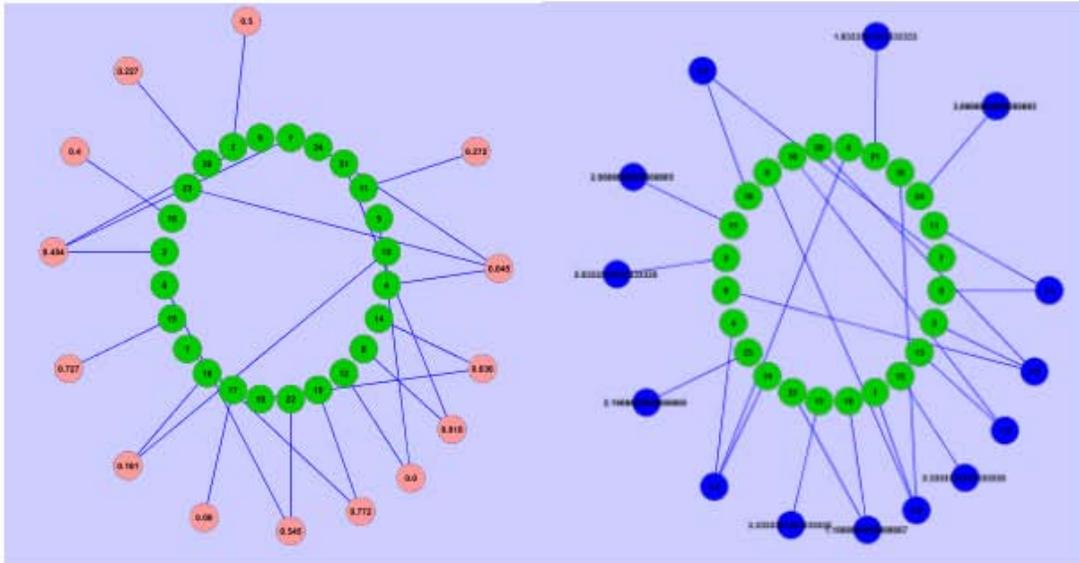


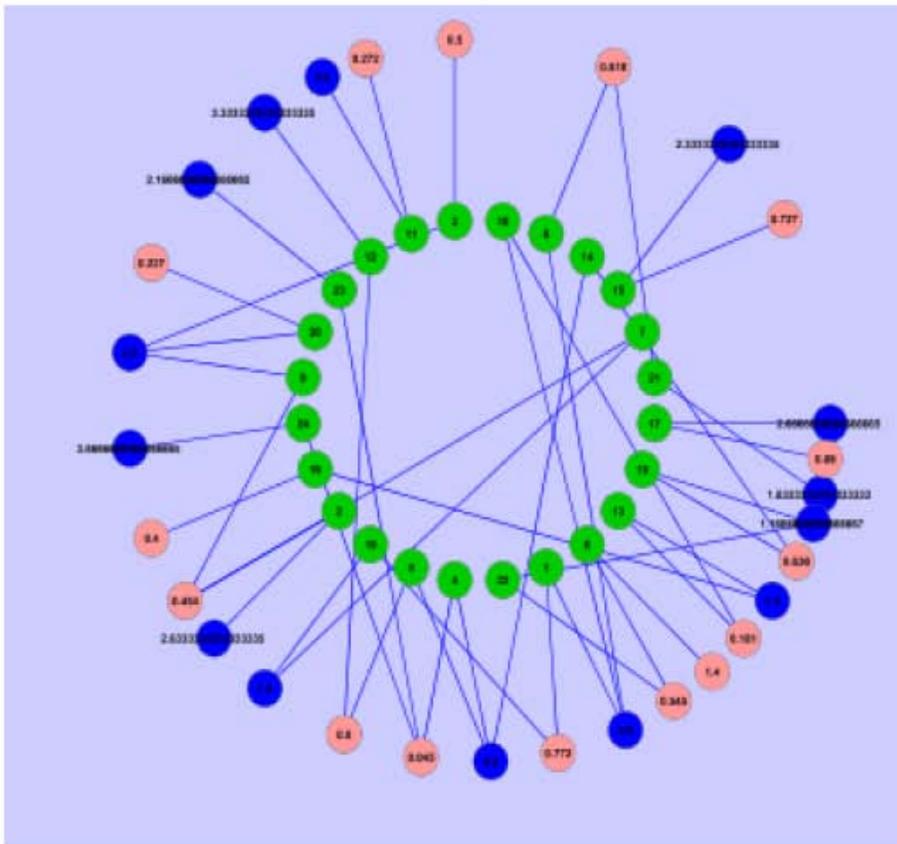
Figura 24. . Gráfica bidimensional para los datos de la Tasa de dominancia, antes y después del estímulo estresante controlado, en donde se han integrado todos los carneros del rebaño.





a.

b.



c.

Figura 26. Gráficas bidimensionales para correlacionar los datos entre LE y TD después del estímulo estresante, datos de todos los carneros del rebaño. Gráfica a. correlación entre carneros y LE; b. correlación entre carneros y TD; c. correlación integrada de LE y TD. Indicadores verdes carneros, rosas LE y azules TD.

### 13. DISCUSIÓN.

En este trabajo se relacionó la posible susceptibilidad a la infección experimental con *B. ovis*, en carneros sanos y libres de infecciones genitourinarias estresados por condiciones de alojamiento y agrupación.

Se han realizado trabajos en los que se ha tratado de relacionar el comportamiento y estrés con la inmunodepresión, pero las aproximaciones: etológica, fisiológica e infecciosa, solo se han empleado para demostrar algún efecto sobre el animal, no se han conjuntado (Adams 2004; Stefanski, 2001; Audet, 2010; Gan *et al.*, 1990).

Se han realizado trabajos relacionados con el efecto que tiene el estrés sobre los parámetros reproductivos (Álvarez, 2008), afectando la homeostasia del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Rivier *et al.*, 1991), así como cambios en la producción de testosterona (Stefanski, 2001) y cortisol. Se han documentado los efectos del medio ambiente sobre la modulación del estrés (Marai *et al.*, 2008), y modificaciones en la producción de cortisol provocadas por la castración entre dos diferentes razas de bovinos (Chase 1995), y diferencias en la producción de cortisol entre machos y hembras en ovinos (Turner, 2010). El estrés psicosocial en ovinos inhibe la actividad neuroendócrina en hipotálamo y pituitaria (Wagenmaker *et al.*, 2009), pero no existen trabajos que relacionen estrés y producción hormonal con jerarquía social y efectos sobre la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Los trabajos que evidencian que el estrés es un factor que puede predisponer a la enfermedad por sus efectos inmunosupresores (Skau *et al.*, 2003; Álvarez, 2008, Apfle *et al.*, 1993; Webb, 1980; Turner *et al.*, 2010), en general no consideran el efecto de la jerarquía social y el manejo de rutina.

La etología de los rumiantes y en particular el comportamiento individual y de rebaño de los ovinos, permitió evaluar su respuesta al estrés, cuando se integran modificaciones fisiológicas como el cortisol generado por estímulos controlados y la actividad inmunitaria con la presencia de células linfocitarias en el eyaculado y tracto genitourinario, permitiendo una evaluación sistémica para hacer frente a una infección experimental controlada con *B. ovis*.

Ortiz de Montellano, 2004 con tres grupos de caprinos divididos de acuerdo a su dominancia, propone la asignación de una escala numérica proporcional entre el índice de estrés y los cambios hormonales encontrados

en sangre de animales estresados, demostrando correlación entre los niveles de cortisol y los cambios endócrinos y seminales.

El estrés por manejo en caprinos y ovinos ha sido asociado con la secreción de cortisol principalmente durante el transporte, presencia de animales extraños al rebaño, cambios de temperatura o aislamiento (Kilgour, 1970; Parrott *et al.*, 1998; Sartorelli, 2003; Wagenmaker *et al.*, 2008), por lo que las concentraciones modificadas de cortisol de forma aguda o crónica, tienen efectos cuantificables sobre órganos, tejidos y sistemas (Riviere, 1991; Gómez-González, 2002).

El comportamiento de los carneros del rebaño fue de acuerdo a lo reportado para grupos de rumiantes antes del periodo de empadre, en donde se distinguen tres jerarquías definidas e interacciones afiliativas descritas para este tipo de hatos de machos reproductores (Álvarez, 2008; Boyd, 1983; Gill, 1990; Ortiz de Montellano, 2004; Pavón, 2004; Synnott, 1984; Turner, 2010; Ungerfeld, 2010).

Se pudo calcular la TD individual y por corraleta, con la modificación a la fórmula propuesta por Mendl (1992), aunque existen algoritmos más complejos, la aproximación matemática mediante las dos fórmulas empleadas (Figura 1), arrojó resultados equivalentes. Se observó que la disminución en la diferencia de la TD registradas a lo largo del experimento, se puede explicar por el comportamiento de los carneros, que tiende hacia la tolerancia mediante acciones afiliativas, las cuales promovieron mayor respuesta al estresor empleado en los animales subordinados (tabla 4). En el grupo la jerarquía que se observó y calculó individualmente, se mantuvo en los animales de mayor TD mientras que en los animales de los grupos de dominancia media y sumisos se encontraron variaciones relacionadas con su ubicación final en las corraletas, después del reacomodo estresante previo a la infección experimental.

Las características etológicas de los ovinos, los predisponen a los efectos estresantes medioambientales, de manejo y reproductivos (Gonyu 1984;jensen), en condiciones controladas los rebaños pueden hacer frente a las consecuencias del estrés agudo o crónico (Greenberg, 2002). Algunos autores han propuesto que 4 es el número mínimo para que un grupo de ovinos mantenga condiciones de bienestar animal, pero también se ha propuesto que el estrés de carneros empleados como reproductores disminuye cuando conviven tres animales de dominancia descendente (Gill, 1990; Banks, 1977), ya que la dominancia se diluye mediante las actitudes afiliativas teniendo como amortiguador al individuo de dominancia media. En la medición de la TD se encontró que no se presentaron diferencias entre los grupos integrados con seis y tres individuos, y la relación de TD

siempre se mantuvo equilibrada en tercios: animales dominantes, de dominancia media y sumisos. Los efectos de una producción aguda de glucocorticoides con efecto de corto plazo, puede modular la intensidad de las reacciones del comportamiento (Haller, 1998), en este trabajo se indujo una condición estresante moderada, que presentó inicialmente picos altos de cortisol sanguíneo, que posteriormente disminuyeron, lo que podría explicar la modificación del comportamiento, desde interacciones de agresión hasta la capacidad de los animales para generar interacciones afiliativas, en donde las actividades afiliativas de los animales dominantes, podrían promover mayor estrés en los animales sumisos, esto explicaría la mayor cantidad de cortisol a lo largo del experimento en estos dos grupos (Figura 15). Las condiciones de poco estrés y su representación en la cantidad de cortisol secretado en algunos animales, pueden estar asociadas a la experiencia individual (Okeudo, 2005), ya que la expresión de patrones de conducta son sensibles al estrés (Greenberg, 2002).

La Organización Mundial para la Salud, ha determinado que la presencia excesiva de leucocitos en el semen se asocia con reducción de la fertilidad (Skau, 2002), concentraciones mayores a  $10^6$  leucocitos/ml indican LE y una posible infección genital, sin embargo existen trabajos que demuestran que no existe correlación entre el cultivo bacteriológico del semen y la LE en humanos (Henke, 2003), en ovinos se ha señalado igualmente la relación de LE con infección en el tracto, en particular con epididimitis (Acosta-Dibarrat 2006), en los carneros empleados se pudo generar leucocitospermia severa sin tener antecedentes de enfermedad genitourinaria y antes del desafío experimental con *B. ovis*. Se ha demostrado que condiciones de estrés que modifiquen los niveles de cortisol de manera crónica, inhiben la regulación de las células de Leydig en el testículo, provocando un aumento en el reclutamiento de macrófagos y CCs (Gaytan, 1990). En carneros el primer efecto que provocó el estresor sobre el sistema urogenital fue la generación de LE, inicialmente en los carneros que fueron sometidos a transporte de rutina. Se ha documentado que un estímulo estresor agudo, puede modificar las constantes fisiológicas del tracto genitourinario (Stefansky, 2000; Riviere, 1991; Wagenmaker, 2009), pero sin que se alcance el umbral necesario para modificar otros sistemas (Kumar, 2009), provocando LE incluso sin que exista de por medio inflamación o infección (Sandoval, 2013).

En este trabajo la LE fue cuantificada después del estímulo estresor controlado y se revirtió en todos los animales sin presentar una correlación positiva con su rango social o jerarquía dentro del grupo, estos datos pueden sustentar la aparente ciclicidad del aparato genitourinario del macho, a partir de la producción de

espermatozoides y la descamación de células epiteliales de los epitelios estratificados y de transición, modulado por las hormonas generadas durante el periodo de empadre.

Los animales sometidos a un estresor relacionado con la modificación de los grupos sociales y la modificación de la jerarquía dentro de los grupos, tuvieron LE inversamente relacionada con las cantidades de cortisol circulantes encontradas en el suero (Figura 19).

Los carneros del grupo I sumisos con dexametazona, presentaron mayor cantidad de células en el eyaculado que el grupo control y el grupo III de animales de dominancia media, pero no presentaron diferencia significativa contra el grupo II de carneros dominantes. Este efecto lo menciona Minton *et al* 1991, en donde tratamientos de 14 días con dexametazona, sin tratamiento estresor, provocaron una ligera disminución de IL-2, pero no se afectó la respuesta blastogénica linfocitaria.

Las características individuales de cada carnero, las fluctuaciones normales en los niveles de cortisol y la variabilidad en la respuesta hacia los efectos farmacológicos de la dexametazona, ayudan a entender el rango tan amplio en las respuestas individuales. El uso de dexametazona se pudo sumar a la actividad fisiológica del cortisol y podría explicar su caída posterior al inhibir el eje HHA, bloqueando la liberación de la hormona, determinando que los niveles de cortisol en este grupo bajaron en forma más dramática que en el resto de los grupos.

En los machos de algunas especies se ha tratado de explicar mecanismos de protección o daño que pueden estar relacionados con los mecanismos de protección en las hembras, receptores para microorganismos que disparan cascadas de defensa, endocitosis de células dañadas, quimiotaxia leucocitaria y respuesta a hormonas sexuales tanto masculinas como femeninas sobre la homeostasia y supervivencia de células de Leydig y Sertoli (Álvarez, 2008; Gaytan, 1999), estas similitudes permiten suponer que los epitelios del aparato reproductor masculino y sus glándulas anexas, también pueden estar supeditados a ciclos concretos que les permite renovarse y prepararse para enfrentar daños mecánicos o infecciones.

En hembras de diferentes especies se conoce la capacidad de respuesta física e inmune de los epitelios de recubrimiento del tracto reproductor, la ciclicidad regulada por las hormonas sexuales, la capacidad amortiguadora para la capacitación y supervivencia espermática durante la monta. Se ha señalado la capacidad de respuesta de las células epiteliales mediante la generación de citocinas, endocitosis y promoción de apoptosis

en hembras de rata (Sato, 1997), particularmente durante los estadios reproductivos que mantienen picos de hormonas sexuales y de estrés.

Aunque las hormonas pueden regular la producción enzimática en el tracto genitourinario, algunas enzimas como la ornitina descarboxilasa, tienen control específico inhibiendo o promoviendo respuestas de hipertrofia e hiperplasia (Shipper, 2002), la p63 es esencial para el desarrollo de los epitelios escamosos y ya que es un homólogo del gen supresor tumoral p53, se ha propuesto que puede influir en el desarrollo y mantenimiento, tanto de los epitelios de recubrimiento como de los epitelios glandulares del tracto reproductor (Kurita, 2004). Al agregar los promedios de la cantidad de cortisol y los índices de LE y CE, se puede observar una tendencia inversa entre el aumento de cortisol y la disminución, moderada de las CE y pronunciada de la LE, eventualmente, los índices de CE y LE aumentan gradualmente, mientras el cortisol disminuye. Finalmente se observa una tendencia a la estabilidad y disminución a lo largo del experimento de los tres factores, pero manteniendo la tendencia inversa entre la cantidad de cortisol y CE-LE (figura 20). En cuanto a la LE Ortiz de Montellano 2004, encontró resultados semejantes en caprinos, sometidos a un manejo experimental semejante al de este trabajo, ya que utilizando caprinos también se demostró que se generan cambios asociados a los niveles de testosterona. El incremento en cortisol en testosterona o en ambos, modifica la expresión de adhesinas y la migración de neutrófilos en los epitelios del tracto, tal como ocurre en el momento del éstro (Álvarez, 2008; Gaytan, 1999).

La infección experimental de los carneros por vía conjuntival (Biberstein, 1964) e intraepidermal (Jiménez de Bagues, 1993), provocaron la aparición de bacterias en el semen, lo cual podría contribuir con las evidencias del transporte bacteriano mediante células especializadas como los neutrófilos.

A los 7 días PI se identificaron mediante IDD 13 animales positivos, dos carneros presentaron dos periodos de positividad y solamente uno se mantuvo como positivo hasta su sacrificio. Aunque la mayoría de los carneros (13) fueron positivos por IDD al menos una vez a lo largo del experimento, la vía de inoculación y el contacto con diferentes microorganismos a lo largo de su vida reproductiva, pudieron provocar animales no detectados por IDD pero si por PCR, sin embargo todos los animales positivos por PCR, fueron positivos por IDD al menos una vez y algunos más de una vez.

Solamente los tres animales con infección intraepididimal desarrollaron lesión palpable, lo que está por debajo del 50% de animales infectados que no desarrollan epididimitis palpable. La infección por las otras vías de

desafío, igual que se señala para la infección natural, aumenta los tiempos para observar lesiones clínicas y su ocurrencia es variable (Kott *et al.*, 1988).

En los 13 carneros seropositivos en la IDD, se observaron lesiones características que correspondieron a las descritas en la primera semana de exposición a la bacteria, microscópicamente se observó mayor cantidad de células infiltradas en los animales del grupo I, II y III, el grupo I con dexametazona e infección y el III conformado por animales de dominancia media no tienen diferencia significativa, pero en el grupo II de animales con estrés alto la cantidad de células infiltradas fue menor contra los dos anteriores ( $P < 0.05\%$ ). Se ha documentado que tratamientos prolongados con dexametazona no provocan disminución en la respuesta linfocitaria en ovinos (Minton *et al.*, 1991), lo que podría explicar la capacidad de respuesta en los animales sumisos tratados con dexametazona e infectados experimentalmente, los animales de dominancia media, al tener solamente un pico en la producción de cortisol después del estímulo estresante, recuperaron su capacidad de reacción frente a la infección, presentando menor daño en los órganos y tejidos del sistema genitourinario y los animales dominantes con una cantidad estadísticamente significativa mayor de cortisol, presentan una disminución en la actividad inmunogénica, en este caso con una disminución en la infiltración total en el sistema genitourinario, haciendo a este grupo de animales más susceptible a lesiones graves durante el curso de la enfermedad. Los neutrófilos infiltrados en la LE PI pudieron vehiculizar *B. ovis* al tracto, que adicionalmente por los niveles de cortisol pudo tener menos capacidad de respuesta inmune

En condiciones de normalidad las poblaciones de CCs son constantes en los tejidos conectivos en situaciones de normalidad y sin estímulo, pero bajo condiciones de estrés podrían aumentar (Baldwin, 2003; Theoharides, 2004), lo que puede provocar un aumento de su reactividad y sobre modular la respuesta de poblaciones de células de defensa, esto podría hacer al individuo más susceptible a daño agudo inflamatorio (Hedger, 1997) y que las lesiones macroscópicas observadas por infecciones del tracto, sean el resultado de la sobre estimulación de las CC y CD8+ que podrían desencadenar en conjunto procesos inmunopatológicos y secuelas producidas durante la infección por enfermedades del tracto reproductor (Murthy, 2011), esto puede explicar también las lesiones presentes en la epididimis granulomatosa aguda provocada por *B. ovis*.

En este trabajo se observó mayor cantidad de CC en animales con infección experimental. En los animales con infección experimental la cantidad de CCs es menor ya que mediante la metacromasia de sus gránulos solo se pueden cuantificar las células que los contienen y en condiciones de una infección aguda la mayoría ha vaciado

su contenido para reclutar células a la zona involucrada, en los animales empleados para el experimento, la respuesta humoral esperada puede ser mayor, ya que la cantidad de clonas presentes y su respuesta es mayor que en animales jóvenes con un sistema inmunitario menos expuesto y desafiado por el medio ambiente. Se ha reportado que la cantidad de CC en órganos como epidídimo y testículo es muy pequeña, (Paolicchi, 2000), en nuestros animales experimentales, con cualquier vía de infección no se presentó aumento significativo ( $p < 0.05$ ) después de la inoculación, debido a que no se generó la respuesta antigénica necesaria y por la poca cantidad de antígeno espermático liberado por las lesiones incipientes y de poca extensión. También se deben considerar los factores de inhibición producidos por células de Leydig (Gaytan, 1999) que en estadios iniciales de la infección, podrían ser suficientes para inhibir una respuesta local cuantificable.

Las fluctuaciones observadas en las poblaciones celulares, tanto las relacionadas con la respuesta inmune, como de las pertenecientes al tracto reproductor, pueden depender de las correlaciones positivas del cortisol con TD y con la infiltración en órganos dañados, las cuales pueden estar mediadas por las mismas citocinas generadas por el estímulo estresor.

El cortisol puede tener consecuencias como: provocar inmunosupresión en animales con estrés crónico, pero también protección en animales con estrés agudo no sostenido, estas dos condiciones están propuestos dentro de la teoría del Síndrome general de adaptación (SGA) (Greenberg, 2002). Esto coincide con la menor cantidad de cortisol generado por los animales de dominancia intermedia, que aunque fueron estresados y desafiados de la misma forma la infiltración en los tejidos de tracto fue menor que en lo dominantes y la cantidad de CD4+ fue mucho mayor que en los grupos de dominantes y sumisos, por lo que podría pensarse en el efecto de protección mencionado.

Se ha postulado que la concentración de neutrófilos en semen puede tener un efecto dual, a bajas concentraciones promover la capacitación y motilidad mejorando la fertilidad, mientras que a concentraciones altas, se presenten efectos adversos, quimiotaxia de leucocitos y el aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que disminuye la fertilidad (Baumber, 2003; Gallegos-Avila, 2010; Lakner, 2010).

En machos la ciclicidad celular puede estar relacionada con los ciclos metabólicos-hormonales, y estos con ciclos circadianos estacionales, por lo que pueden ser más amplios que en las hembras y bajo condiciones de estrés en que se promueve la secreción de cortisol en la época de empareamiento y reproducción, no debe ser predisponente a daño e infección, ya que la homeostasia se recupera considerablemente rápido, incluso tomando

en cuenta variaciones entre individuos. Cuando el estímulo estresante supera la capacidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales-testículo para recuperarse se puede esperar daño, generado por la sinergia de factores como quimiotaxia leucocitaria representada en forma de LE, inmunodepresión de los leucocitos en la luz del tracto relacionada con aumento y mantenimiento de la secreción de cortisol, secreción constante de catecolaminas, una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas por neutrófilos y macrófagos, por lo que la predisposición a una enfermedad como la epididimitis infecciosa del carnero, aumentaría debido a los factores que confluyen durante una época de la actividad productiva de un hato.

Gómez-Ortiz (2000) señala que se podría considerar erróneamente como inmunodepresión a un evento que solamente compromete al sistema inmunitario y lo estimula para provocar su activación, en un intento de protección en contra de modificaciones de la homeostasia.

La morfología de las lesiones encontradas en los animales con infección experimental, edema peri vascular e infiltración celular, hiperplasia y vacuolización del epitelio de los túbulos epididimarios y granulomas en los animales con infección intraepididimal, concuerdan con lo descrito en la bibliografía y con lo encontrado en los animales de rastro con infección natural y crónica (Acosta-Dibarrat, 2007; Al-Katib, 2005; Díaz-Aparicio, 2001; Paolicchi, 1992; Burges, 1982).

Se observaron diferencias significativas en la presencia de infiltración ( $P < 0.05$ ) entre grupos. Antes y después de la inoculación existe diferencia significativa en los grupos I y V en los promedios obtenidos. En el grupo III también se observa la mayor concentración de cortisol e infiltración. Estos resultados pueden confirmar la hipótesis de que el manejo inadecuado genera estrés y niveles altos de cortisol, lo que puede promover mayor exfoliación y hacer más susceptible al tracto genitourinario a enfermedades infecciosas, así como de la importancia de las CE del tracto genitourinario y su aparente comportamiento cíclico en el tracto genitourinario del macho.

Al ser la *Brucella* un patógeno intracelular, el organismo depende principalmente de la activación de la inmunidad mediada por células, particularmente linfocitos T CD4+ de Th1, al estimular la secreción de interferón gama, estimulan la actividad bactericida de macrófagos como la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+, para poder destruir células infectadas con *Brucella* (Rivers, 2006). Se ha reportado que en animales con infección crónica del sistema genitourinario, la cantidad de linfocitos CD4+ y CD8+ no tiene diferencia (Acosta-Dibarrat, 2007), sin embargo en animales con infección aguda se ha reportado una mayor cantidad de

células CD8+, la mayoría de los trabajos emplean animales jóvenes, de alrededor de un año. En este trabajo todos los animales fueron animales mayores de dos años con actividad reproductiva y aunque al ser seleccionados del hato de origen, fueron negativos por inmunodifusión a las tres enfermedades que producen epididimitis en los carneros y al ser animales reproductores, la flora con la que tuvieron contacto a lo largo de su vida es mayor, por lo que pueden presentar una respuesta más eficiente a cualquier infección.

En este trabajo se observó que las células CD4+ sobrepasan a las CD8+, este efecto se puede relacionar con memoria presente en los animales empleados y la cantidad de células cebadas maduras. En el grupo II de animales con estrés alto se presentó mayor cantidad de CD4+, menor cantidad de CD 8+ y menor cantidad de cortisol sanguíneo comparado con los animales de estrés moderado del grupo II, cuando se analiza la cantidad de células CD+, agrupando a los animales por tasa de dominancia, se puede observar que las CD4+ están presentes en mayor cantidad en los tres grupos de dominancia, y en el grupo de estrés medio el número de las células CD4+ se presenta cuatro veces más alto que las CD8+.

La exposición prolongada a *Brucella* modifica la respuesta inmune adaptativa y explica porque la respuesta inmune celular se puede ver disminuida (Rivers, 2006) provocando infección crónica. En los animales experimentales con estrés moderado o dominancia intermedia, la mayor cantidad de CD4+ podría generar una sobreproducción de Interferón  $\gamma$ , estimulando a una gran cantidad de CD8+ para destruir a los macrófagos infectados y controlar de forma inicial la infección aguda, pero en los animales dominantes con estrés alto y sumisos con estrés alto, que no presentan una diferencia tan pronunciada en estas células, la reacción inmediata en contra de la infección se pudo ver afectada por la mayor cantidad de cortisol y la liberación de una gran cantidad de bacterias, que siendo nuevamente endocitadas por neutrófilos y macrófagos o alojándose en tejidos de las glándulas anexas, tendrían la capacidad de generar una reinfección aguda y la cantidad disminuida de infiltración observada al sacrificio.

Se han documentado diferencias en el cortisol o ACTH producidos entre tratamientos con diferente estrés producido, incluso en estudios con tratamientos similares, los tratamientos estresantes producen efectos muy diferentes y las variaciones en la producción de cortisol, se pueden ver modificadas por los factores del medioambiente y la respuesta individual en rumiantes (Mormede, 2007), los animales con mayor experiencia y edad producen menor cantidad de cortisol en situaciones estresantes y también se ha demostrado que si todos los factores permanecen constantes los niveles de cortisol se incrementan conforme aumenta la edad del animal

(Okeudo 2005). Lo que posiblemente ocurrió en este estudio ya que los animales utilizados tenían más de dos años de edad y los niveles de cortisol fluctuaron a lo largo del experimento de forma muy parecida a lo reportado en caprinos (Ortíz de Montallano, 2004)

En el diagnóstico de la brucelosis, ninguna técnica tiene 100% de sensibilidad, sin embargo combinando 2 o 3 técnicas se puede llegar al 100%, al utilizar PCR y ELISA 99.2% (Aguirre-Arsola, 2008). Sin embargo muestras negativas por cualquier método pueden ser positivas en cultivo bacteriano (Saunders, 2007).

De las muestras de semen de los 13 animales que fueron positivos por IDD, solo se diagnosticaron por PCR 5 muestras de carneros con inoculación experimental, los cuales fueron positivos a lo largo del experimento en varias ocasiones.

La presencia de la bacteria en semen puede relacionarse con la cantidad inoculada y la vía empleada, todos los carneros recibieron la misma cantidad de UFC de *B. ovis*, por lo que la vía tiene una importancia primordial, como era de esperar dos animales del grupo de infección intraepididimal fueron positivos por PCR. La capacidad disminuida de respuesta frente a la infección provocada por un corticosteroide podría permitir el paso de la bacteria.

Esto es evidencia de que bajo condiciones de manejo experimental la infección con *B. ovis* está supeditada a una gran cantidad de factores, los inherentes al individuo como de su medio ambiente.

Desde que se empezaron a representar los datos de grupos en forma de redes en 1932 por Moreno, el objetivo principal ha sido evidenciar de forma gráfica los patrones de la estructura y comportamiento social de un grupo, las relaciones entre los integrantes o su posición en el conjunto (Freeman, 2012; Makagon *et al* 2012). Los programas de computación para analizar datos en redes permite métodos matemáticos estandarizados para calcular la métrica de la organización social en diferentes niveles: población, grupos e individuales (Makagon *et al* 2012) y aunque los datos comparados no presenten una correlación matemática positiva, se puede observar el desplazamiento de los nodos de acuerdo a las variaciones de las variables estudiadas.

Así como el ARS permite evaluar los efectos de la estructura social sobre, cohesión, movimiento y el uso de los recursos durante la alimentación (Michelena *et al* 2008) y el bienestar animal, (Makagon *et al* 2012), analizar en una población animal los conocimientos específicos para la potencial distribución de enfermedades (Webb, 2005), también ayuda a visualizar las relaciones entre los datos obtenidos de las interacciones sociales como el índice y tasa de dominancia, con datos obtenidos a partir de alteraciones normales o provocadas

experimentalmente en alguna o varias constantes fisiológicas, concentración de hormonas y la cantidad de células reclutadas durante la respuesta inmune.

Las gráficas de dos dimensiones obtenidas de la TD y LE, antes y después del estímulo estresante, permiten observar que aunque existen variaciones en los animales en la cantidad de células contadas en el eyaculado, presentan una tendencia a la homeostasia, observándose en la ubicación más homogénea de los círculos generados por carneros y LE (Figura 26). La grafica bidimensional que representa la TD, confirma los datos obtenidos en cuanto a que las relaciones afiliativas tienden a homogenizarse (Figura 23).

Las gráficas de la integración de TD y LE, corroboran que no existe correlación matemática entre estas dos variables, mientras que la correlación entre: la infiltración encontrada en tejidos y la cantidad de cortisol; infiltración y TD; cortisol y TD, son positivas, lo que puede señalar que la LE es un evento relacionado con periodos de baja actividad dentro del ciclo andrológico del carnero, con el delicado balance y gran reactividad de los epitelios del aparato genitourinario.

Las relaciones entre características y las relaciones sociales, como proximidad se deben describir cuidadosamente, así como la similitud entre dos animales puede o no predecir similitudes de patrones o interacciones con otros, los resultados podrían explicar otro evento después de tomar en cuenta las características demográficas y que la determinación de patrones de una relación podría no ser la misma que las determinantes de los patrones de otra (Roberts *et al.*, 1998).

#### 14. CONCLUSIONES.

La LE en carneros se presenta naturalmente en individuos de cualquier situación fisiológica y se puede provocar bajo condiciones estresantes experimentales controladas en carneros clínicamente sanos, sin antecedentes de inflamación o infección.

El manejo estresante moderado provocó variaciones en las variables estudiadas, teniendo correlación positiva entre: cortisol-TD, cortisol-infiltración, TD-infiltración, esto puede evidenciar la relación entre el estrés y el comportamiento. Las CE presentaron una correlación positiva con: LE, cortisol e infiltración, esto puede evidenciar una posible influencia en los procesos del tracto genitourinario por la gran reactividad de su epitelio.

Cuando se agrupa a los carneros por jerarquía, la producción de cortisol asociada al estrés es menor en los animales de dominancia media. En los animales de dominancia alta solo se presenta un pico en la producción de cortisol, inmediatamente después del estresor, presentando una tendencia a disminuir a lo largo del tiempo.

La producción de cortisol puede estar relacionada con condiciones de manejo moderado, individual y de rebaño, haciendo a los animales que no pueden hacer frente a un estímulo estresante, más susceptibles a la inflamación del tracto genitourinario e infecciones provocadas por microorganismos patógenos o incluso los pertenecientes a la flora.

Las vías de infección experimental, conjuntival e intraepidermal, provocaron infección con daño característico en el aparato genitourinario y la presencia de DNA de *B. ovis* en el semen.

En los animales sometidos a mayor estrés y con mayores cantidades de cortisol, se observa mayor daño en los epitelios del epidídimo y ampulla del ducto deferente durante las etapas iniciales de la infección con *B. ovis*.

Cuando se conoce en un rebaño la tasa de dominancia de sus integrantes y son agrupados considerando una relación en tercios para las tres jerarquías, las situaciones estresantes medioambientales y de manejo a las que

se pueden enfrentar los carneros, no tendrán impacto sobre la homeostasia individual o del rebaño. Pero cuando son agrupados animales con una dominancia media les resulta muy difícil organizar la jerarquía del grupo, presentando niveles elevados de cortisol y una respuesta celular disminuida, representada por menor LE, más infiltración en los órganos del aparato reproductor y sus glándulas anexas, mayor cantidad de CC y una relación CD4/CD8 de 4 a 1. Estas condiciones desfavorables, aparentemente evitaron una infección aguda en los animales con dominancia media ya que solo un animal del grupo experimental fue positivo mediante IDD y ninguno por PCR o cultivo.

Aunque existen controversias en cuanto a que situaciones de estrés generan inmunodepresión y no se puede relacionar solamente un efecto fisiológico con inmunodepresión, si se puede asegurar que estresores moderados, pueden provocar cambios, modificando las condiciones de respuesta inmunitaria que le permiten al individuo una recuperación más rápida o evitar la infección.

## 15. BIBLIOGRAFÍA.

“La literatura es un cuento continuo no una sucesión de hechos”

Carlos Fuentes

1. Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and Immunity. *Infection and immunity*, Minireview, 1997; 65(9): 3501-3508.
2. Acosta-Dibarrat JP, Patología y respuesta inmune en el aparato reproductor del carnero en la infección experimental con *Actinobacillus seminis* (tesis de doctorado). Cuautitlán (Edo. de Mex.) UNAM, 2007.
3. Acosta-Dibarrat JP, Díaz-Aparicio E, Arellano RB, Tórtora PJL, Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*. Estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Técnica pecuaria México* 2006; 44(2):257-267.
4. Adams MS, Hertig V. Stress, stress response, and health. *Nurs Clin N Am* 2004; 39 1-17.
5. Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine MHR: Basic science of reprod. Medicine* 2009; 16 (1):3-13.
6. Alessandro FT, Amarante R, Rocha A, Bricarello PA. Relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep. *Pesq Vet Bras* 2007; 27(1):43-48.
7. Al-Katib WA, Dennis S M. Experimental transmission of *Actinobacillus seminis* infection to rams. *The Veterinary Record* 2005; 157:143-147.
8. AL-Sabbagh T. Development of stress score due to transportation and handling in imported sheep to kuwait: determining the stress score system. *EJEAFChe* 2009; 8 (7):519-525.
9. Álvarez L. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch Zootec* 2008; 57:39-59.
10. Alvarez-Martinez M, Marius C, Baron C. Production of the tipe IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5 and VirB8 specific antisera. *Infect immun* 2003; 71(3):1075-1082.
11. Amarante AFT, Rocha RA, Bricarello PA. Relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2006; 26(1):43-48.

12. Anton F, Morales C, Aguilar R, Bellido C, Aguilar E, Gaytán F. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1998; 45:209-218. doi:10.1111/j.1439-0442.1998.tb00819.x
13. Aoyama M, Negishi A, Maejima Y, Sugita S. Sex differences in stress responses to transportation in goats: Effects of gonadal hormones. *Animal Science Journal* 2003; 74: 511-519.
14. Apa SDD, Çayan A P, Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. 2002, *Arch Androl*.Vol. 48, No. 5, Pages 337-344 (doi:10.1080/01485010290099183)
15. Apple J K, Minton J E, Parsons KM, Unruh J A. Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *J Anim Sci* 1993; 71:71-77.
16. Appleby M C. Social rank and food access in red deer stags. *Behaviour* 1980; 74 (3): 294-309.
17. Appleby M C. The probability of linearity in hierarchies. *Animal Behaviour* 1983; 31: 600-608.
18. Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Bélanger D, Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec Canada. *Vet J* 2004; 45:312-313.
19. Audet M C, Mangano E N, Anisman H. Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2010; 4, Article 156.
20. Baldwin NR, Buffington CAT. Stress Boosts Feline Urinary Tract Signs; *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17:446.
21. Bancroft JD, Stevens A, Turner D, Theory and practice of histological techniques.2nd ed. Gran Bretaña: Churchill Livingstone, 1990. 726 pp.
22. Bansal A K, Bilaspuri G S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International* 2011; Article ID 686137, 7 pages.
23. Barun K. De, L Stauffer, M S Koylass, SE Sharp, JE Gee, LO Helsel; et al., Novel *Brucella* Strain (BO1) Associated with a Prosthetic Breast Implant Infection; *Journal Of Clinical Microbiology* 2008: 46(1):43-49.
24. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA, Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology* 2003; 24 (4).
25. Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball B A. generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002; 57:1025-1033.
26. Bell DC, Atkinson JS, Carlson JW, Centrality measures for disease transmission networks. *Social Networks* 1999; 21:1-21.
27. Biberstein EL, McGowan B, Olander H, Kennedy P., Epididymitis in ram. *Studies on pathogenesis. The Cornell Vet* 1964; 54 (1): 27-41.
28. Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Oppermann R, Berry M, Spruijt E, *et al*, Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior* 2007; 92:375-397.
29. Borgatti SP, Carley K, Krackhardt D. Robustness of centrality measures under conditions of imperfect data. *Social Networks* 2006; 28:124-136.

30. Boyd R, Silk JB. A method for assigning cardinal dominance ranks. *Anim Behav* 1983; 31:45-58.
31. Broom DV, Animal welfare: concepts and measurement. *J Anim Sci* 1991; 69:4167-4175.
32. Bulgin MS. Epididymitis in rams and lambs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1990; 6:683-690.
33. Bulgin MS. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *JAVMA* 1990; 196:313-315.
34. Burgess GW, Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol* 1982; 7:551-575.
35. Campos MA, Gracia MS, Rosinha IC, Almeida XS, Salgueiro BW, Jarvis GA, Splitter NQ, et al. Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and Immunity* 2004; 72 (1):176-186.
36. Carranza Juan, editor, Etología. Introducción a la ciencia del comportamiento; Universidad de Extremadura; Cáceres, España. 1994.
37. Cascales E, Peter JC, The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* 2003; (Nov) 137-149. doi:10.1038/nrmicro753.
38. Castillo-Peña GA, Mireles Torres MP, Martínez Robles SS, Garrido-Fariña GI, García Tovar CG, Cruz Sánchez TA. Plasma cell distribution in the respiratory system of pigs. *J Anim Vet Adv* 2008; 7(6):752-758.
39. CFSPH, The center for food security & public health. Ovine epididymitis: *Brucella ovis*. Iowa State University July 2007.
40. CFSPH-1, The center for food security & public health, Brucellosis in marine mammals Iowa State University. June 2007.
41. Chase CC, Lament RE, Randel RD, Hammond AC, Adams EL. Plasma cortisol and white blood cell responses in different breeds of bulls: a comparison of two methods of castration. *J ANIM SCI* 1995; 73:975-980.
42. Cho HJ, Niilo L. Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *brucella ovis* infection in rams. *Can J Vet Res* 1987; 51: 99-103.
43. Clifton V, Husband AJ, Kay DJ. Local immunity in the male reproductive tract, *Immunology and Cell Biology* 1992; 70: 301-307.
44. Conn HJ, Darow MA, compilers and editors. Staining procedures used by the Biological Stain Commission; Geneva NY: Biotech Publications 1943-1944.
45. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. Genus *Brucella*. In Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams and Wilkins, vol. 1, 1984: 377-388.
46. Covert J, Mathison AJ, Eskra L, Banai M, Splitter G. *Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses. *Exp Biol Med* 2009; 234(12):1450-1467. doi:10.3181/0904-RM-124.
47. Cruz Sánchez TA, Martínez Robles SS, Garrido Fariña GI, Tórtora Pérez JL; Mendoza ES; Ciprián Carrasco A; et al. In situ análisis of CD4, CD8 and mast cells in lung of *Mycoplama hyopneumoniae* experimentally infected pigs; *Journal of animal and veterinary advances* 2008; 7 (6):752-758.
48. Daniel WW. *Bioestadística*. 4ª Ed. México DF: Limusa-Wiley, 2011.

49. Dawkins MS. The Science of Animal Suffering. *Ethology* 2008; 114 (10):937-945.
50. De Miguel Z, Vegasa O, Garmendiaa L, Arregia A, Beitia G, Azpiroz A. Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice. *Behavioural Brain Research* 2011; 225:554-561.
51. Díaz-Aparicio E, Arellano RB. Mecanismos de patogenicidad de *Brucella*. CENID Microbiología INIFAP. Mex. DF. 2001.
52. Díaz-Aparicio E, Arellano RB, Herrera L, Hernández C, Palomares R, Suarez G. Problemática de la vacunación incorrecta contra la brucelosis bovina. 2002.
53. Díez Vega J. Todo lo que usted siempre quiso saber sobre la vacuna rb51 y nunca se atrevió a preguntar. Sindicato de Veterinarios de León. Febrero de 2002.
54. DiGiovanni C, Domestic terrorism with chemical or biological agents: psychiatric aspects; *Am J Psychiatry* 1999; 156:1500-1505.
55. Dimitrov R, Vodenicharov G, Kostadinov, Hristov H. Morphological investigations on mast cells in feline pelvic urethra. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2007; 10 (1): 59-62.
56. Duncan IJH. Welfare is to do with what animals feel. *J Agric Environ Ethics* 1993; 6:8-14.
57. Estrada FE, Peralta ZL, Rivas MP. Manual de Técnicas Histológicas. México: A.G.T., 1982. 140 pp.
58. Evans GS, Gibson DF, Roberts SA, Hind TM, Potten CS. Proliferative changes in the genital tissue of female mice during the oestrous cycle. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23(6):619-35.
59. Fernández DM, Benson R, Baldwin CL. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infection and Immunity* 1995; Vol. 63, p. 4029-4033.
60. Ficapal A, Jordana J, Blasco JM, Moriyón I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rumin Res* 1998; 29:13-19.
61. Fraser AF, Broom DM. *Farm Animal Behaviour and Welfare*. New York Saunders, 1990.
62. Freeman LC. Visualizing Social Networks JoSS Article: Volume 1; University of California, Irvine <http://www.cmu.edu/joss/content/articles/volume1/Freeman.html>; 09 mayo 2012.
63. Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Ortega-Martínez M, Jaramillo-Rangel G. Infection and phagocytosis: analysis in semen with transmission electron microscopy *Microscopy. Science, Technology, Applications and Education* 2010; ©FORMATEX.
64. Gan JC, Morrow-Tesch JL, Beller ID, Levy EM, Black PH. Immunosuppression in mice *bet ald* water stress. *Brain, behavior, and immunity* 1990; 4: 278-291.
65. Garrido-Fariña, G. I; Castillo G.; Martínez DI, Gutiérrez JL, Tortora J L. ALEPRyCS Perú 2011. Distribución de células cebadas en tracto reproductor y glándulas anexas de carneros sanos e infectados con *B. Ovis*.
66. Gaytan FC, Carrera I, Aguilar P, Bellidot C. Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *Journal of Andrology* 1989; 10(5).
67. Gill W. Applied sheep behavior; Professor Animal Science Department, agricultural extension service; The University of Tennessee, en [www.grandin.com](http://www.grandin.com). 2011. <http://animalscience.ag.utk.edu/sheep/pdf/AppliedSheepBehavior-WWG-2-04.pdf>

68. Glauert AM. Editor. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens.; Practical methods in electron microscopy. 8th reprint; Amsterdam Hol: North-Holland Pub. Co. 1991.
69. Gomes Cardoso CP, Gilson CM, Vasco A, Costa Oliveira S. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 2006; 5:13. Doi:10.1186/1475-2859.5-13.
70. Gómez González B, Escobar A. Neuroanatomía del estrés. *Rev Mex Neuroci* 2002; 3(5):273-282.
71. Gonyou HW. The role of behavior in sheep production: a review of research. *Appl Anim Ethol* 1984; 11: 341-358.
72. Gorvel JP, Moreno E, *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* 2002; 90 (1-4):281-297.
73. Graham AD, Christopherson RJ, Thompson JR. Endocrine and metabolic changes in sheep associated with acclimation to constant or intermittent cold exposure. *Can J Anim Sci* 1981; 61: 81-90.
74. Grandin T. Comportamiento y manejo animal. *Journal of Animal Science* 1993; 71:1065-1070.
75. Greenberg N, Carr JA, Summers CH. Causes and consequences of stress. *Integ And Comp Biol* 2002; 42(3):508-516.
76. Greenwood P, Shutt D. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Australian Veterinary Journal*. 1992; 69:161–163. doi:10.1111/j.1751-0813.1992.tb07501.
77. Greiveldinger L, Veissier I, Boissy A. Behavioural and physiological responses of lambs to controllable vs. uncontrollable aversive events. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 805-814.
78. Haller J, Halasz J, Makara GB, Kruk MR. Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological Perspectives. *Neuroscience and Biobehavioral* 1998; 23:337–344.
79. Hargreaves AL, Hutson GD. The stress response in sheep during routine handling procedures. *Applied animal behavior science* 1990; 26 (1): 83-90.
80. Hargreaves AL, Hutson GD. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl Anim Ethol* 1989; 22 (3): 283-294.
81. . Gonyou HW, Animal Welfare Issues: sheep and goats. en *Animal Welfare Issues Compendium* 1997, Reynnells Richard D. Eastwood Basil R. A, Editores, Collection of 14 Discussion Papers, US Department of Agriculture Cooperative State Research, Education and Extension Service, Plant and Animal Production, Protection and Processing September 1997.
82. He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, Ding X, Lathigra R, Craig JC, *et al.* *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infection and Immunity* 2006; 74 (9):5035-5046.
83. Hedger MP. Testicular leukocytes: what are they doing? *Reviews of Reproduction* 1997; 2: 38-47.
84. Henke R, Maab G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, Villegas J, *et al.* Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia* 2003; 35:309-313.
85. Henkel RR, Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology* 2011; 13: 43-52. doi:10.1038/aja.2010.76.

86. Herrera-Díaz, Muñoz LM, Romero RCM. Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. *Vet. Mex* 1993; 24(3): .
87. Hulet CV, Bond J. Some observations on the role of behavior in sheep production and future research needs; *Applied Animal Ethology* 1983/84; 11:407-411.
88. Jansen BC. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1983; 50: 275-282.
89. Jensen P, Toates FM. Who needs “behavioural needs”? Motivational aspects of the needs of animals. *Appl Anim Behav Sci* 1993; 37:161-181.
90. Jiménez De Bagüés MP, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* 1993; 11: 61-63.
91. Jiménez de Bagüés MP, Gross A, Terraza A, Dornand J. Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinases by *Brucella* spp. Expressing a Smooth and Rough Phenotype: Relationship to Pathogen Invasiveness Infection and Immunity 2005; 73 (5): 3178-3183 a.
92. Jiménez de Bagüés MP, Dudal S, Dormand J, Gross A. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasión and proliferation. *Clinical Immunology* 2005; 114: 227-238 b.
93. Johannison E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Comparison of “round cells” in semen annalysis: a comparative study. *Human reproduction update* 2000; 6 (4):404-412.
94. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1992; 16: 115-130.
95. Joseph S, Das S, Chand R, Roopa R, Thomas IM. Comparasion of toluidine blue vs thionin for mast cells in rat mesentery using Carnoy’s fixative. *J Anat. Soc India* 2003; 52:166-167.
96. Kaur BA, Bilaspuri GS. Impacts in oxidative stress and oxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011; Volume2011:1-7 pages., Article ID 686137,
97. Keil NM. The introduction of individual goats into small established groups has serious negative effects on the introduced goat but not on resident goats. *Applied Animal Behaviour Science* 2012; 138:47-59.
98. Kilgour R, De Langen H. Stress in sheep resulting from management practices. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 1970; 30:65-76.
99. Kott RW. et al. Relationship between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology* 1998; 29:961-970.
100. Krohne HW. *Stress and Coping Theories*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz Germany 2002; Available online.
101. Kumar, S.; Kumari, A.; Murarka, S.; Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health; *Indian Journal of experimental biology* 2009; vol. 47, Pp 615-624.
102. Kurita, T., Medina, R. T., Alea A. Mills and Gerald R. Cunha; Role of p63 and basal cells in the prostate; *Development*, 2004:131, 4955-4964

103. Lackner J, Agarwal A, Mahfous R S, du Plessis S, Schatzl G. The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent. *Rep Biol and endocrinology* 2010; 8:12.
104. Leigh RC, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Pudney J, Anderson D, Gipson IK. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Human Reproduction* 2006; 21 (11): 2783-2793. 2006 doi:10.1093/humrep/del164.
105. Levine SJ, Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airways epithelium. *J Invest Med* 1995; 43(3):241-249.
106. Lopez-Merino A, Migranas-Ortiz R, Perez-Miravete A, Magos C, Salvatierra Izaba B, Tapia-Coyner R, *et al.* Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública Méx* 1992; 34(2):230-240.
107. Loubser PG, van Niekerk CH. Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. Semen volume, mortality and freezability. *S Afric J Anim Sc* 1983; 13:3.
108. Luna-Muñoz M, Romero RCM, Valverde RC. Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. *Vet Mex* 1990; 21.
109. Makagon MM, McCowana B, Mench JA. How can social network analysis contribute to social behavior research in applied ethology? Special Issue: Living In Large Groups. *Applied Animal Behaviour Science* 2012; 138 (3-4):152-161.
110. Manterola L, Tejero-Garcés A, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marin CM, López-Goñi I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol* 2003; 20, (1-2):65-72.
111. Marai IFM, Darawany AA, Fadiel EA, Abdel-Hafez MAM. Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2008; 8 (3):209-234.
112. McGlone JJ. What is animal welfare? *J Agric Envir Ethics* 1993; 6 (Suppl 2): 26-36.
113. Mejía-Sánchez, Díaz A, Salas TE, Tenorio GV. Identificación de las proteínas de 35 y 38 KDA específicas de *Bucella ovis*. *Técnica Pecuaria en México* 2004; 42 (2):227-285.
114. Mendez-Narez G. Epididimitis ovina: estudio bacteriológico y serológico. *Vet Mex* 1999; 30(4).
115. Mendl M, Zanella AJ, Broom DM. Physiological and reproductive correlates of behavioral strategies in female domestic pigs. *Anim Behav* 1992; 44: 1107-1121.
116. Michaloudi HC, Papadopoulos GC. Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. *J Anat* 1999; 195:577-586.
117. Michelena P, Gautrais J, Gearard JF, Bon R, Deneubourg JL. Social cohesion in groups of sheep: Effect of activity level, sex composition and group size. *Applied Animal Behaviour Science* 2008; 112:81-93.
118. Minton JE, Blecha F. Cell-mediated immune function in lambs chronically treated with dexamethasone. *J Anim Sci* 1991; 69:3225-3229.
119. Moolchandani A, Sareen M, Vaishnav J. Influence of restraint and isolation stress on plasma cortisol in male karakul sheep. *Veterinarski Arhiv* 2008; 78 (4): 357-362.

120. Moreno E, Moriyón I. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. PNAS 2002;99(1):1-3
121. Morita S, Oshio K, Osana Y, Funabashi Y, Oka K, Kawamura K. Geometrical structure of the neuronal network of *Caenorhabditis elegans*; Physica 2001; A 298: 553-561.
122. Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, *et al.* Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Review. Physiology and Behavior 2007; 92:317-339.
123. Moskovtsev SI, Willis J, White MB. Leukocytospermia: relationship to sperm DNA integrity. Fertility and sterility 2005; 84.
124. Nielsen K, Smith P, Yu WL. Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by direct enzyme immunoassay. J of immunoassay and immunochemistry 2007; 28:243-250.
125. Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. Acta Anatomica 1984; 119:155-160. (DOI: 10.1159/000145878).
126. NORMA Oficial Mexicana Nom-022-SSA2-1994, Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención.
127. NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
128. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
129. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
130. Núñez Torres ED, Díaz Aparicio E, Velázquez Quezada F, Trigo Tavera FJ, Suarez Guemes F, Presence of antibodies against different *Brucella* species in young rams. Veterinaria Mexico 1997; 28(3): 241-245.
131. Ohanian, Calos. Sobre la presencia y distribución de los mastocitos en los testículos de los mamíferos. Anal anat 1977; 14(1):71-76.
132. Okeudo NJ, Moss BW. Serum cortisol concentration in different sex-types and slaughter weights, and its relationship with meat quality and intramuscular fatty acid profile. Pakistan Journal of Nutrition 2005; 4 (2): 64-68.
133. Ortiz de Montellano NAM. Evaluación de las interacciones sociales en el macho cabrío y su efecto sobre la secreción hormonal y la calidad espermática (tesis de doctorado). Yucatan México: Fac. de MVZ, UAY, 2004.
134. Ortiz-Pelaez A, Pfeiffer DU, Soares-Magalhaes RJ, Guitian FJ. Use of social network analysis to characterize the pattern of animal movements in the initial phases of the 2001 foot and mouth disease (FMD); epidemic in the UK. Preventive Veterinary Medicine 2006; 76:40-55.
135. Paolicchi F, Casaro PA, Gimeno EJ, Kortebani LG, Mazzolli AB. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Ruminant Research 2000; 36 (1):7-15.

136. Paolicchi F.; Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática; Trabajo presentado en la 1ra. RAPAVE, Esperanza, Santa Fé. Argentina 2000.
137. Paolicchi FA, Bartolomé J, Patitucci A, Solanet C, Campero C.M. Seguimiento clínico, serológico y bacteriológico en carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis*. Rev Med Vet 1992; 73:46-52.
138. Parraguez VH, Vergara V, Riquelme R, Arriman R, Llanos AJ, Serón-Ferré M. Ontogeny of the circadian rhythm of cortisol in sheep. Biol Reprod 1989; 40: 1137-1143.
139. Parrott RF, Houpt KA, Misson BH. Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. Applied animal behavior science 1988; 19 (3):331-338.
140. Pastrana E. Castillo G. Martínez DI. Gutiérrez JL, Terrazas AM, Garrido-Fariña GI, Tortora JL. Presencia de leucospermia y su relación con el índice de dominancia bajo condiciones de estrés en carneros. XVI congreso nacional de producción ovina y VIII seminario internacional de producción de ovinos en el trópico. 2012.
141. Pavón, R. L.; Hernández, M. E.; Loria, S. F.; Sandoval L. G. Interacciones neuroendocrino-inmunológicas; Salud mental, Vol. 27 No 3, junio 2004.
142. Pier GB, Lyczak J.B, Wetzler LM, Ruebush MJ. Immunology, Infection and Immunity. ASM Press, Washington, DC. 2004.
143. Poindron P, Soto R, Romeyer A. Decrease of response to social separation in preparturient ewes. Behavioural Processes 1997; 40:45-51.
144. Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, Sikka SC. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. Fertil Steril 1995 Jul; 64(1):166-71.
145. Ratushna VG, Sturgill DM, Ramamoorthy S, Reichow SA, He Y, Lathigra R, *et al.* Molecular targets for rapid identification of *Brucella spp.* BMC Microbiology 2006; 6:13. Doi: 10.1186/1471-2180-6-13.
146. Ringsrud KM. Cells in the urine sediment. ce update [chemistry | hematology], Laboratory medicine 2001; 32(3).
147. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos Arch. Med. Vet. 2006; 38, N° 1,
148. Rivier C, Rivest S. effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis; peripheral and central mechanisms. Biology of reproduction 1991; 45:523-532.
149. Roberts Jr. JM, Browning BA. Proximity and threats in highland ponies. Social Networks 1998; 20:227-238.
150. Robles C A. Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*; INTA 2008; Bariloche, Argentina.
151. Robles C A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*, microbiología y enfermedades infecciosas. Revisión bibliográfica. Revista de Medicina Veterinaria 1998; 79 (1).
152. Rollin B E 1993 Animal welfare, science, and value. Journal of Agricultural and Environmental Ethics 6. Supplement 2: 44-50

153. Saile K, McCulloh I. Social networks and spatial configuration, How office layouts drive social interaction; *Social Networks* 2012; 34:47-58.
154. Salas-Téllez E, Núñez del Arco A, Tenorio V, Díaz-Aparicio E, Garza M, Suárez-Güemes F. Sub cellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon- $\gamma$  in mice. *Journal of Veterinary Research* 2005; 69 (1):53-5.
155. Sandoval JS, Muasher S, Raburn D. Leukocytospermia: Overview of diagnosis, implications, and management of a controversial finding; *Middle East Fertility Society Journal* 2013; 18: 129-134.
156. Sapolsky R, Romero ML, Munck AU.; How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions; *Endocrine Reviews* 2000; 21(1):55-89.
157. Sartorelli P, Panelli S, Comazzi S, Paltrinieri S. isolation stress in sheep: effects on neutrophil gene expression of CD18, IL8 and C5a receptors; *Veterinary Research Communications* 2003; 27 Suppl 1:351-353.
158. Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T; Ohta Y. apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The Anatomical Record* 1997; 248:76-83.
159. Saunders VF, Reddacliff LA, Berg T, Hornitzky M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust Vet J* 2007; 85 (1-2):72-7.
160. Scholz Holger C.,1 Zdenek Hubalek,2 Ivo Sedla'c'ek,3 Gilles Vergnaud, Herbert Tomaso,1 Sascha Al Dahouk,13 Falk Melzer,6 Peter Ka'mpfer,Heinrich Neubauer,6 Axel Cloeckert,8 Marianne Maquart,8 Michel S. Zygmunt,8 Adrian M. Whatmore,9 Enevold Falsen,10 Peter Bahn,11 Cornelia Go'llner,11 Martin Pfeffer,1 Birgit Huber,12 Hans-Ju'rgen Busse and Karsten No'ckler11 *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2008), 58, 375–382 DOI 10.1099/ijs.0.65356-0.
161. Scott JL, Natkunam K, Phillip M S. Leucocyte population changes in the reproductive tract of the ewe in response to insemination. *Reproduction, Fertility and Development* 2006; 18(6): 627-634. doi:10.1071/RD05165.
162. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Domestication Applied Animal Behaviour Science* 1999; 65:245-271.
163. Selye, H. *The Stress of Life*; 1956 New York: McGraw-Hill. rev. edn. 1976.
164. Senar JC, Camerino M, Metcalfe NB. Agonistic interactions in siskin flocks: Why are dominants sometimes subordinate? *Behav Ecol Sociobiol* 1989; 25:141-145.
165. Sheehan DC, Hrapchack BR. *Theory and practice of histotechnology*. 2nd Ed. CV Mosby, St Louis (USA), 1980. pp: 149.
166. Shipper RG, Verhofstad AAJ. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(9):1143-1160.
167. Skau PA, Folstad I. Do bacterial infections cause reduced ejaculate quality? A meta-analysis of antibiotic treatment of male infertility. *Behav Ecol* 2003. 14:40–47.

168. Somolinos M, Aulesa C, Cabrera M, Caragol I, Planells I, Zahonero E. Estudio de la presencia de leucocitos en muestras de semen posvasectomía. *Rev Int Androl* 2007; 5(3):229-32.
169. Splitter GA. The immune response to *Brucella*. Department of Animal Health and Biomedical Sciences. University of Wisconsin-Madison, 1655 Linden Drive, Madison, WI 53706-1581, USA. 1997.
170. Stefanski V. Effects of psychosocial stress or food restriction on body mass and blood cellular immunity in laboratory rats. *Stress and Health* 2001; 17:133-140. DOI: 10.1002/smi.894.
171. Synnott AL, Fulkerson WJ. Influence of social interaction between rams on their serving capacity. *Appl Anim Ethol* 1984; 11:283–289.
172. Theoharides TC, Cochrane D E. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol* 2004; 146 (1-2):1-12.
173. TrigoTavera F. Patología sistémica veterinaria. 3a Ed. McGraw-Hill Interamericana; México 1998.
174. Tryphonams L H and Collins DB. Reversal by testosterone of atrophy of accessory genital glands of castrated male sheep a histologic and morphometric study. *Vet Pathol* 1979; 16:710-721.
175. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79:1-71; 0031-9333/99.
176. Turner AI, Rivalland ETA, Clarke IJ, Tilbrook AJ. Isolation/Restraint stress in gonadectomized male and female sheep activity: cortisol responses to exercise, endotoxin, wetting, and stressor specificity of sex differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis; *Endocrinology* 2010; 151:4324-4331.
177. Turner JC. Diurnal periodicity of plasma Cortisol and corticosterone in desert bighorn sheep demonstrated by radioimmunoassay. *Canadian Journal of Zoology* 1984; 62:(12) 2659-2665.
178. Ungerfeld R, González-Pensado SP. Social dominance and courtship and mating behaviour in rams in non-competitive and competitive pen tests. *Reprod Domest Anim* 2009; 44(1):44-47.
179. Ungerfeld R, Lacuesta L. Social rank during pre-pubertal development and reproductive performance of adult rams. *Anim Reprod Sci* 2010; 121(1-2):101-5.
180. Vandenhede MM, Bouissou F, Picard M. Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science* 1998; 58:293-310.
181. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infection and immunity* 2002; Vol. 70, No. 3. p. 1033–1041.
182. Veissier I, Boissy A. Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view Review; *Physiology and Behavior* 2007; 92:429-433.
183. Velazquez- Monroy OJ. Situación actual de la Brucelosis en México. SUAVE, Resumen anual 2000.
184. Wagenmaker ER, Breen KM, Oakley AE, Tilbrook AJ, Karsch FJ. Psychosocial stress inhibits amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses independent of cortisol action on the type II glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 2009; 150(2): 762-769.
185. Webb CR. Farm animal networks: unraveling the contact structure of the British sheep population. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; 68:3-17.

186. Wey T, Blumstein DT, Weiwei S, Ferenc J. Social network analysis of animal behaviour: a promising tool for the study of sociality. *Animal Behaviour* 2008; 75:333-344.
187. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995; 63(6):1143-57.
188. Worthington RW, Stevenson BJ, de Lisle GW, Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N Z Vet J* 1985; 33(6):84-86.
189. WSPA, Universal Declaration on Animal Welfare, UDAW. 2011, UN Member states. <http://www.wspa.org.au/wspaswork/udaw/>.
190. Xu LR, Carr MM, Bland AP, Hall GA. Histochemistry and morphology of porcine mast cells. *Histochemical Journal* 1993; 25:516-522.

## ANEXO I

### TÉCNICAS DE TINCIÓN GENERAL E INMUNOHISTOQUÍCA.

#### **Hematoxilina-Eosina.**

Tejidos cortados a 4 micrómetros de grosor y montados en portaobjetos de vidrio.

1. Desparafinar en xileno puro dos veces            5 min cada uno
2. Rehidratar en etanol absoluto dos veces        5 min cada uno
3. Rehidratar en etanol de 96% dos veces        5 min cada uno
4. Rehidratar en etanol al 80%                    5 min
5. Rehidratar en etanol al 70 %                   5 min
6. Lavar en agua destilada
7. Colorear con hematoxilina de Harris            5 a 10 min
8. Lavar en agua corriente                         2 min
9. Diferenciar en alcohol ácido (sol alcoholoca al 70% con 1 % de ácido clorhídrico), inmersión rápida  
5-30 seg
10. Lavar en agua corriente                         2 min
11. Estabilizar la tinción en solución acuosa de carbonato de litio 1%        1 min.
12. Lavar en agua corriente, hasta que el tejido se observe de color azul intenso.
13. Lavar en agua destilada.
14. Colorear con eosina acuosa                    15 min
15. Lavar en agua corriente
16. Deshidratar en alcohol 96% 1                5 min
17. Deshidratar en alcohol 96% 2                5 min
18. Deshidratar en alcohol absoluto            5 min
19. Deshidratar en alcohol absoluto            5 min
20. Aclarar en xileno puro                         5 min
21. Mantener en xileno limpio por lo menos 5 minutos antes de hacer la preparación permanente con resina.

### **Azul de toluidina-ácido bórico.**

Tejidos cortados a 3 micrómetros de grosor y montados en portaobjetos de vidrio.

1. Desparafinar en xileno puro dos veces            5 min cada uno
2. Rehidratar en etanol absoluto dos veces        5 min cada uno
3. Rehidratar en etanol de 96% dos veces        5 min cada uno
4. Rehidratar en etanol al 80%                    5 min
5. Rehidratar en etanol al 70 %                   5 min
6. Lavar en agua destilada
7. Colorear con la solución acuosa de Azul de toluidina 1% -bórax al 1%, 5 min
8. Lavar en agua corriente hasta quitar el exceso de colorante y el tejido se observe de color azul intenso.
9. Lavar en agua destilada
10. Deshidratar en alcohol 96% 1            5 min
11. Deshidratar en alcohol 96% 2            5 min
12. Decolorar en alcohol absoluto 1        5 min
13. Deshidratar en alcohol absoluto 2        5 min
14. Aclarar en xileno                    5 min
15. Mantener en xileno limpio por lo menos 5 minutos antes de hacer la preparación permanente con resina.

**Coloración electiva del RNA con pironina, contrastado por el verde rápido.**

Tejidos cortados entre 3 y 4 micrómetros de grosor y montados en portaobjetos de vidrio.

1. Desparafinar en xileno puro dos veces            5 min cada uno
2. Rehidratar en etanol absoluto dos veces        5 min cada uno
3. Rehidratar en etanol de 96% dos veces        5 min cada uno
4. Rehidratar en etanol al 80%                    5 min
5. Rehidratar en etanol al 70 %                    5 min
6. Lavar en agua destilada
7. Colorear con la mezcla de verde rápido-pironina 15 min.
9. Lavar en agua destilada hasta quitar el exceso de colorante            2 min
10. Diferenciar con acetona                    1 min
11. Deshidratar en alcohol 96% 1            5 min
12. Deshidratar en alcohol 96% 2            5 min
13. Deshidratar en alcohol absoluto            5 min
14. Deshidratar en alcohol absoluto            5 min
15. Aclarar en xileno                    5 min
16. Mantener en xileno limpio por lo menos 5 minutos antes de hacer la preparación permanente con resina.

### Técnica general para detección inmunohistoquímica de células CD4+ y CD8+.

1. Cortes de 4  $\mu$ m, montados en portaobjetos de vidrio limpios y cubiertos con poli-L-lisina.
2. Desparafinar en xileno puro dos veces 5 min cada uno
3. Rehidratar en etanol absoluto dos veces 5 min cada uno
4. Rehidratar en etanol de 96% dos veces 5 min cada uno
5. Rehidratar en etanol al 80% 5 min
6. Rehidratar en etanol al 70 % 5 min
7. Lavar en agua destilada
8. Lavado con amortiguador de fosfatos (PBS) 5 min.
9. Permeabilización con Tween 0.1% en PBS 10 min.
10. Lavado con PBS-Tween 0.1% 5min.
11. Inactivación de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3 % en alcohol 70 %. 3:7
12. Lavado con PBS-Tween 0.1% 5min.
13. Bloqueo con leche descremada al 1% en PBS .. 15 min
14. Lavado con PBS-Tween 0.1% 5 min.
15. Tritón X-100, 0.1% en PBS 15 min
16. Lavado con PBS Tween 0.1% 5 min.
17. Lavado PBS 10 min.
18. Incubación con anticuerpos primario vs CD4+ o CD8+. 1:131, toda la noche (18 horas) a 4° C, en cámara húmeda.
19. Enjuagar rápidamente con PBS 10 min.
20. Incubar con anticuerpo secundario a. 20° C en cámara húmeda 60 min
21. Lavado enérgico con PBS 5 minutos.
22. Complejo avidina-peroxidasa 20 min.
23. Revelado con diaminobencidina en solución al 0.5 % con 0.01% de peroxido de hidrógeno.
24. Lavado con PBS.
25. Contrastar con hematoxilina de Harris 30 seg.

- |   |       |
|---|-------|
| 26. Lavado con agua corriente   | 5 min |
| 27. Lavado con agua destilada   | 5 min |
| 28. Deshidratar en alcohol 96% 1  | 5 min |
| 29. Deshidratar en alcohol 96% 2  | 5 min |
| 30. Deshidratar en alcohol absoluto   | 5 min |
| 31. Deshidratar en alcohol absoluto   | 5 min |
| 32. Aclarar en xileno   | 5 min |
| 33. Mantener en xileno limpio por lo menos 5 minutos antes de hacer la preparación permanente con resina. |       |

## EXTRACCIÓN DE DNA PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMESASA (PCR) MULTIPLE.

A partir de 100  $\mu$ l de eyaculado, se obtuvo el DNA con el Kit Multiplex de Quiagen. Australia.

El protocolo para purificación de DNA total, fue el propuesto para la obtención a partir de sangre animal o células de cultivo (Protocolo en columna de centrifugado). DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, catalogo 69581 Quiagen.

1. A 100  $\mu$ l de eyaculado se agregaron 20  $\mu$ l de proteinasa K y 200  $\mu$ l de amortiguador ATL (amortiguador de lisis) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se mezcló en vortex hasta homogenizar y se incubo 60 min a 56°C.
2. Se agregaron 200  $\mu$ l de amortiguador AL, se mezcló en vortex y se incubo a 56°C por 20 min más.
3. Se agregaron 200  $\mu$ l de etanol (96%) y se mezclaron con vortex hasta homogenizar.
4. La mezcla obtenida se transfirió a una columna de elusión, DNeasy Mini spin column Quiagen, se centrifugaron a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. El fluido y el tubo colector se desecharon.
5. En un tubo de colección nuevo se coloco la columna y se agregó 500  $\mu$ l de amortiguador AW1 (amortiguador de lavado 1), centrifugar 1 min a 6000 x g (8000 rpm). El fluido y el tubo de colector se desecharon.
6. En un tubo de colección nuevo se coloco la columna con 500  $\mu$ l de amortiguador AW2 (amortiguador de lavado 2), centrifugar 3 min a 20 000 x g (14000 rpm), para secar la membrana de la columna. El fluido y el tubo colector se desecharon.
7. Se colocó la membrana en tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 100 $\mu$ l de amortiguador AE (amortiguador de elusión) directamente sobre la membrana.
8. Se incubó a temperatura ambiente 1 min, fue centrifugado 1 min a 6000 x g (8000 rpm) para la elusión del DNA.
9. La muestra de ADN obtenida se dejó reposar a 4°C una noche para continuar con el protocolo de PCR múltiple.

El kit para PCR multiple de Quiagen contiene: H2O grado PCR, mezcla PCR y Solución “Q”. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se sirvió la mezcla final para PCR Multiplex:

Mix PCR	25 µl
Solución Q	5 µl
Primers	0.5 µl por cada uno
H2O para PCR	16 µl
Muestra de DNA problema	1 µl
Volumen final	50 µl

Cantidades para la mezcla final de la PCR Multiplex.

Características de los primers empleados para la PCR Multiplex.

HS765-R	HS 453-F
279.81 µg/µM	9.246 µg/µM
9.62 OD	8.38 OD
46.07 nM	34.45 nM
ACT CGA GCG TCA GTA TCT TC	GAA GGG GAT TAG TTT AAG AG
ISP 1 R	ISP 1 F
219.54 µg	239.43 µg
6.133 µg/µM	6.231 µg/µM
7.91 OD	9.29 OD
35.83 nM	38.46 nM
GAC GAT AGC GTT TCA ACT TG	GGT TGT TAA AGG AGA ACA GC
SRJASS 1 R	SRJASS 1 F
267.73 µg	288.85 µg
6.843 µg/ µM	6.612 µg/nM
11.4 OD	9.62 OD
39.09 nM	43.68 nM
AAG AAA AAG ACG AAG ACA T	CTT ATC TTT CTT AAG CCC TGA C

**LE antes de la inoculación experimental de *B. ovis* en los carneros del rebaño.**

<b>LE pre inoculación</b>				
<b>CARNERO</b>	<b>Semana 7</b>	<b>Semana 8</b>	<b>Semana 10</b>	<b>promedio</b>
1	3	2	3	2.67
2	1	0	2	1.00
3	4	4	4	4.00
4	4	0	2	2.00
5	4	4	4	4.00
6	1	0	1	0.67
7	1	0	0	0.33
8	4	3	3	3.33
9	2	0	4	2.00
10	3	2	2	2.33
11	4	3	4	3.67
12	4	3	3	3.33
13	4	0	2	2.00
14	4	2	2	2.67
15	3	4	3	3.33
16	2	0	2	1.33
17	2	0	4	2.00
18	3	0	1	1.33
19	4	0	2	2.00
20	3	3	3	3.00
21	3	0	2	1.67
22	1	0	2	1.00
23	2	0	2	1.33
24	4	4	3	3.67

**LE posterior a la inoculación experimental de *B. ovis* en los carneros del rebaño.**

LE posterior a la inoculación							POST
CARNERO	19-21 1 11	25 01 11	3 02 11	10 02 11	17 02 11	24 02 11	Promedio
1	3	1	2	Sacrificio	-	-	2.00
2	4	2	4	3	1	3	2.83
3	4	3	2	2	3	1	2.50
4	4	4	4	Sacrificio	-	-	4.00
5	5	4	3	Sacrificio	-	-	4.00
6	2	3	1	0/1	0	1	1.40
7	1	1	2	0/1	2	3	1.80
8	3	2	3	1	1	2	2.00
9	2	3	Sacrificio	-	-	-	2.50
10	2	1	1	1	1	1	1.17
11	4	3	3	4	3	4	3.50
12	4	4	4	2	2	4	3.33
13	2	3	2	1	0	1	1.50
14	4	4	4	Sacrificio	-	-	4.00
15	1	4	2	Sacrificio	-	-	2.33
16	1	2	1	3	2	3	2.00
17	4	4	2	0	3	3	2.67
18	1	1	3	1	1	2	1.50
19	2	3	2	0/1	1	1	1.80
20	4	2	2	2	2	3	2.50
21	3	1	2	1	3	1	1.83
22	1	2	1	1	1	1	1.17
23	4	3	2	1	1	2	2.17
24	Sacrificio	-	-	-	-	-	

**Cantidad de IDD positivas de los carneros del rebaño y seroconversión postinoculación de *B. ovis*.**

FECHA	DÍAS PI	IDD POSITIVOS
23 12 10	-	0
30 12 10	-	0
INFECCIÓN 13 01 11	0	0
19 01 11	7	2
25 01 11	13	5
03 02 11	21	5
10 02 11	28	8
17 02 11	35	3
24 02 11	41	2
03 03 11	51	2
10 03 11	58	2

**Seguimiento de IDD positivos y fecha de sacrificio en los animales de los grupos experimentales y control.**

IDD											Les	Les	
ID.	OCTU	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	IDD.	ión	ión	
MA	BRE	20/01/2	25/01/20	03/02/20	10/02/2	17/02/2	24/02/2	03/03/2	10/03/2	17/03/2	mac	mic	
CHO	2010	011	11.	11.	011.	011.	011.	011.	011.	011.	ro	ro	
											SACRI		
											FICIO		
1	NEGA TIVO	POSITI VO	POSITI VO	NEGATI VO	04/02/2 011.								
											SACRI		
											FICIO		
2	NEGA TIVO	NEGA TIVO	NEGATI VO	NEGATI VO	NEGAT IVO	NEGA TIVO	NEGA TIVO	25/02/2 011.					X
											SACRI		
											FICIO		
3	NEGA TIVO	NEGA TIVO	NEGATI VO	POSITI VO	POSITI VO	NEGA TIVO	NEGA TIVO	25/02/2 011.					
											SACRI		
											FICIO		
4	NEGA TIVO	NEGA TIVO	POSITI VO	NEGATI VO	04/02/2 011.							x	X
											SACRI		
											FICIO		
5	NEGA TIVO	NEGA TIVO	POSITI VO	NEGATI VO	04/02/2 011.								
											SACRI		
											FICIO		
6	NEGA TIVO	NEGA TIVO	NEGATI VO	NEGATI VO	NEGAT IVO	NEGA TIVO	NEGA TIVO	NEGAT IVO	NEGAT IVO	NEGAT IVO	18/03/2 011.		
											SACRI		
											FICIO		
7	NEGA TIVO	NEGA TIVO	POSITI VO	POSITI VO	POSITI VO	POSITI VO	NEGA TIVO	NEGAT IVO	NEGAT IVO	11/03/2 011.		X	

(CONTINUACIÓN)

	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	POSITI	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	NEGAT	SACRI		
8	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	IVO	FICIO		
				INCINE									
				RADO									
	NEGA	NEGA	NEGATI	27/01/20									
9	TIVO	TIVO	VO	11.									
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	25/02/2					
10	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	011.					
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	POSITI	NEGA	POSITI	25/02/2					
11	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	TIVO	VO	011.				x	X
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	NEGATI	POSITI	POSITI	POSITI	POSITI	POSITI	POSITI	11/03/2			
12	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	VO	VO	VO	VO	011.		x	X
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	POSITI	NEGATI	POSITI	POSITI	NEGA	POSITI	POSITI	11/03/2			
13	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	VO	TIVO	VO	VO	011.			
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	04/02/2								
14	TIVO	TIVO	VO	VO	011.								
										SACRI			
										FICIO			
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	04/02/2								
15	TIVO	TIVO	VO	VO	011.								
										NECRO			
										PSIA			
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	07/03/2				
16	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	011.				

(CONTINUACIÓN)

								SACRI					
								FICIO					
	NEGA	NEGA	NEGATI	POSITI	POSITI	NEGA	NEGA	25/02/2					
17	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	TIVO	TIVO	011.					
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	NEGAT	SACRI		
18	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	IVO	FICIO		X
												SACRI	
												FICIO	
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	POSITI	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	NEGAT	18/03/2		
19	TIVO	TIVO	VO	VO	VO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	IVO	011.		X
												SACRI	
												FICIO	
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	11/03/2			
20	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	011.			X
												SACRI	
												FICIO	
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	11/03/2			
21	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	011.			
												SACRI	
												FICIO	
	NEGA	NEGA	NEGATI	POSITI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	NEGAT	18/03/2		
22	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	IVO	011.		
	NEGA	NEGA	NEGATI	NEGATI	NEGAT	NEGA	NEGA	NEGAT	NEGAT	NEGAT	SACRI		
23	TIVO	TIVO	VO	VO	IVO	TIVO	TIVO	IVO	IVO	IVO	FICIO		
												INCINE	
												RADO	
	NEGA	POSITI	24/01/20										
24	TIVO	VO	11.										



**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
de la Producción y de la Salud Animal**  
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Instituto de Investigaciones Biomédicas*

SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES  
EXPERIMENTALES

Protocolo Número: DC-2011/1-1

**Título del Proyecto:** "Patogenia e inmunidad de la epididimitis infecciosa del carnero producida por *Brucella ovis*"

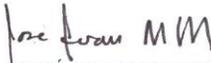
**Investigador Responsable:** Jorge Luis Tórtora Pérez

**Tesista:** Germán Isauro Garrido Fariña

Después de haber revisado el proyecto de investigación, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria D.F. a 17 agosto del 2015

**EL COORDINADOR**

  
**DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA**

- 
- Unidad de Posgrado. Edificio B Primer piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria. Del Coyoacán, México, D.F., CP 04510. Tels 01 (55) 56237005 y 01 (55) 56230222 ext #80023, #80005, #80024.
  - Edificio 4 Posgrado. Planta alta. Fac de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria., Del Coyoacán, D.F, CP 04510. Tels 01 (55) 5622 5854 al 57. Fax: 01 (55) 5616-7197 y 56162342
  - Secretaría Técnica de Producción y Salud Animal, FES-Cuautitlán: Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4. Km 2.5 Carretera Cuautitlán Teoloyucan Col. San Sebastián Xhala. Cuautitlán Izcalli. Estado de México, C:P: 54714 tel. 56231939 ext 39405





## Stress-induced leukocytospermia in rams with healthy reproductive tract



German Isauro Garrido-Fariña<sup>a,\*</sup>, Gabriela Castillo-Hernández<sup>a</sup>,  
Jose Luis Gutiérrez-Hernández<sup>a</sup>, Diana Isabel Martínez Pérez<sup>a</sup>,  
Carlos M. Romero Ramírez<sup>b</sup>, Angelica Terrazas García<sup>a</sup>, Jorge Luis Tortora Pérez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 25 carretera Cuautitlán-Toluca, CP 54712 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

<sup>b</sup> Depto de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Calle La Purísima 186, CP 09310 Iztapalapa, Ciudad de México, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 February 2016

Received in revised form 25 February 2016

Accepted 27 February 2016

Available online 2 March 2016

#### Keywords:

Stress-induced  
Leukocytospermia  
Rams  
Cortisol  
Reproduction

### ABSTRACT

Cytological alterations were inspected in the semen of 24 clinically healthy rams when subjected to social rearrangement as a stress-inducing treatment. Rams were lodged in four stalls with six animals each, and their hierarchical behavior were observed during feeding. The dominance rates (DR) were established, and rams were classified into dominant (D), intermediate (Dm) and submissive (S). Blood samples were collected weekly, and serum cortisol levels determined by radioimmunoassay. Weekly semen samples were obtained by electroejaculation; cells different from sperm were counted and sperm anomalies were examined. On week 8, S rams presented high cortisol levels, D rams showed intermediate levels, and Dm rams revealed the lowest levels ( $p < 0.05$ ). The 24 rams showed an increase in sperm neutrophil count after stress treatment, which reached its highest levels 13 days after the regrouping; initial values were recovered on day 24. Exfoliated epithelial cell (EEC) count only showed significant variations ( $p < 0.05$ ) in the Dm group, before and after the stress treatment. Leukocytospermia (LS) and EECs showed inverse evolution along the experiment. When cortisol levels rose, sperm anomalies increased significantly ( $p < 0.05$ ) reaching values between 8 and 18%. Present results indicate that the presence of neutrophils in ram sperm should be reconsidered in association with stressful events, and not only as indicative of inflammatory or infectious processes of the ram reproductive tract.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Sheep, a gregarious domestic species, are greatly reactive to even moderate stressing stimuli related to routine handling such as transportation, segregation from the flock, incorporation into a new flock, combination of individuals of different hierarchies, overcrowding, competition for food, inadequate facilities, fastening, transfer to a different environment within a productive unit, reduction in food intake (Álvarez, 2008; Moolchandani et al., 2008; Turner et al., 2010) or cold exposure (Ekpe and Christopherson, 2000). Their homeostasis and immunity are affected when under stress conditions (Caroprese et al., 2010) and the reproductive system does not escape this effect (Kumar et al., 2009).

It is common practice to separate rams from the flock for controlled parenting, this handling procedure acts as a stressing

stimulus, and in male goats it induces changes in the cortisol and testosterone secretion profiles, temporarily altering semen quality, which presents leukocytospermia (LS) and is characterized by a substantial increase in neutrophils (Ortiz de Montellano, 2004). Variations in cortisol production have been used to corroborate stress conditions in animals subjected to environmental changes (De Jong et al., 2000; Turner et al., 2010), and its increase causes leukocyte count changes in peripheral blood, which are also considered indicative of stress conditions (Davis et al., 2008).

In sheep (Jansen, 1983; Mbai et al., 1996; Acosta-Dibarrat and Tortora, 2005), horses (Baumber et al., 2003) and humans (Aitken and De Iulius, 2009), LS has been associated to inflammatory and infectious processes of the genitourinary tract (Gallegos-Avila et al., 2010). The effects of neutrophils and ORS on male and female fertility are still being discussed (Baumber et al., 2003; Bansal and Bilaspuri, 2011; Henkel, 2011). In humans, sexual abstinence and stress could induce LS (Davis et al., 2008; Kumar et al., 2009), as has also been described in goats (Ortiz de Montellano, 2004). Information in this area is scarce for all species, and in rams no reports are

\* Corresponding author.

E-mail address: [isarrigo26@yahoo.com.mx](mailto:isarrigo26@yahoo.com.mx) (G.I. Garrido-Fariña).

***Empleo de redes sociales para el análisis de las relaciones entre dominancia y leucocitospermia en carneros con estrés experimental***

German I. Garrido Fariña-Laboratorio de apoyo a Histología y Biología (UNAM)<sup>1</sup>

Gabriela Castillo Hernández-Sección de Ciencias Morfológicas (UNAM)

José Luis Gutiérrez Hernández-CENID-Microbiología. INIFAP SAGARPA

José Francisco Morales Álvarez-CENID-Microbiología. INIFAP SAGARPA

Efrén Díaz-Aparicio-CENID-Microbiología. INIFAP SAGARPA

Carlos Manuel Romero Ramírez- Dpto. de Biología de la Reproducción (UAM)

José Luis Tortora Pérez-Sección de Patología y Análisis Clínicos (UNAM)

**Resumen**

El análisis de datos para generar redes ha sido empleado en epidemiología y medicina preventiva, para conocer las relaciones e interacciones entre los integrantes de un núcleo social, evidenciando los factores que modifican al individuo, su rebaño o a la población completa. No hay aplicación del análisis de redes sobre las relaciones que se generan entre los datos obtenidos mediante estudios de etología y fisiología. El presente trabajo evalúa la relación entre la tasa de dominancia y la leucocitospermia, para observar la variación de las constantes y su injerencia sobre las otras, antes y después de un estímulo estresante en carneros adultos clínicamente sanos y libres de enfermedades genitourinarias. Mientras que la estadística descriptiva permite conocer las diferencias y correlaciones entre los datos obtenidos, el análisis de redes permite observar en una gráfica en dos dimensiones las relaciones entre las variables y su efecto sobre otras. El análisis de redes se podrá aplicar al estudio de constantes que afectan el comportamiento y las condiciones clínico-fisiológicas de un rebaño, permitiendo la prevención a partir de la observación de las tendencias representadas en las gráficas asociadas a la variación de las constantes de los individuos.

**Palabras clave:** Análisis de redes sociales – etología – jerarquía social – leucocitospermia – carneros

**Abstract**

Data analysis to generate networks has been used in epidemiology and preventive medicine for the relationships and interactions between members of a social nucleus, highlighting the factors that modify the individual, his flock or the entire population. No application of network analysis on the relations between the generated data in studies of ethology and physiology. This paper evaluate the relationships between

---

<sup>1</sup> Enviar correspondencia a: German I. Garrido Fariña, correo-e: [isaurogafa@yahoo.com.mx](mailto:isaurogafa@yahoo.com.mx)

