



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**Comparación del número de células plasmáticas  $IgA^+$ ,  $IgM^+$ ,  
 $IgG^+$  en mucosa abomasal entre ovinos Blackbelly y  
Columbia inoculados con larvas 3 de *Haemonchus contortus*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**Sergio Antonio Hernández Rivera**

**ASESORES**

**Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán.**

**Dr. Fernando Alba Hurtado**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# Reconocimientos

A mis asesores Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán y Dr. Fernando Alba Hurtado, por darme la oportunidad, la confianza y permitirme colaborar, en está su investigación; por compartir conmigo su conocimiento y amistad.

El M. en C. M.V.Z. Alejandro Buendía, del Laboratorio UIMSA de la FES C-4 UNAM, por la solidaridad que mantuvo siempre conmigo en esta investigación.

Para el M. en C. M.V.Z. Gerardo Garrido, del Laboratorio de Histología de la FES C-4 UNAM, mi reconocimiento y mi gratitud por su apreciable ayuda en la tinción verde metil pironina de los cortes histológicos.

A mi maestro el Dr. Jorge Tortora Pérez del Laboratorio de Patología de la FES C-4 UNAM, por su colaboración en el la presente investigación.

Para Rómulo Domínguez Martínez mi aprecio y gratitud por la corroboración de su investigación que enriquece la presente, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos Cesar y Néstor Cuenca, Ángel y Leonor, por el inicio de los estudios de esta proyecto.

Mi aprecio especial para Jessica Páez, de la Biblioteca de la FES C-4, por su ayuda en la presente investigación.

Al Dr. Alejandro Martínez encargado del laboratorio UIMSA de la FES C-4 UNAM, por permitir la utilización de las instalaciones de esa unidad.

A Todos los demás Tesistas y empleados del laboratorio UIMSA de la FESC- 4 UNAM, por su apoyo incondicional.

A las autoridades del Gobierno del Distrito Federal de la Deleg. GAM, Así mismo, al STPC sección de Autores y Adaptadores de Cine.

A mi camarada Dr. Euclides moreno Castro por su apoyo y amistad incondicional.

## **Agradecimientos**

A Dios, mi guía

Al amor de mi vida Karla Ruth Ochoa Mayorga

A toda mi Familia

A mis amigos

A México, mi patria

A la UNAM, mi alma mater

A mis asesores

A todos mis demás profesores

Al reino animal

A los cuatro elementos de la vida; Agua, Tierra, Viento y Fuego

A todos los investigadores de todos los tiempos

A toda la tecnología que he tenido a mi alcance

A todos los libros que me enseñaron

A toda la humanidad de fe y buena voluntad

A la buena suerte que siempre busco

# **Dedicatoria**

## **A mi amor**

Karla Ruth Ochoa Mayorga

## **A mi madre**

Margarita Rivera,

## **A mi Padre**

Antonio Hernández,

## **A mi abuela**

Lucína Rivera

## **A mis hermanas**

Lidia, Gabriela, Claudia y Nancy.

## **A mis tíos**

Roberto R, Lucína R, Álvaro, Nazario R, Manuel R, Virginia R, Alejandra R,  
Cristina H, Maravilla H, Juan H, Rodolfo H, Xavier H, Alicia H.

## **A mis sobrinos**

Fernando, Laura, Karen y Regina, Ferny, Lidia, Claudia, Carlos, Jessica,  
Alexander, Jeancarló.

## **A mis Primos**

Oscar, Roberto, Magda, Carlos, Paty, Cristina, Mirella, Norma, Lupita, Roció,  
Araceli, Gina, Mari, Jonathan, Emmanuel, Javier, Fabiola, Jenny, Áscari, Priscila,  
Nataly, Martín Cristian, Claudia, Dulce.

### **A mis y amigos**

Izchel, Susana, Magali, Gissel, Lorena, Araceli, Maru, Roció, Mercedes, Johanna, Lirio, Pilar, Michel, Karla, Sandra, Vania, Paty, Jahel, Háglae, Daniel (Miller), Gabriel, Jorge, Agustín, Rómulo, Marcópolo (español), Luís, Mario, Samuel Santoyo, David, Rene, Rafael Cuevas,

### **A mis amigas y amigos**

Don José, Doña Enedina, Doña Viky, Señora Elena, Señora Fabiola, Señora Mari, Señora Eulalia, Don Manuel z1,

### **A mis Ahijadas y Ahijados**

Sandra, Gabriela, Fernando, Alejandro, Antonio, Jeancarló, Martín.

### **A mis compadres**

Guillermo, Ramón, Roberto, Manuel, Rafael, Lucrecia,

### **A mis asesores**

Dra. Virginia Citlali Hernández Valle  
M. C. Juan Pablo Martínez Labat  
Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán  
Dra. Cintia González Ruiz  
M. C. Alan Olazábal Fenocho

# ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas .....	1
Resumen .....	2
Introducción.....	4
Clasificación Taxonómica de <i>Haemonchus contortus</i> .....	5
Morfología de <i>Haemonchus contortus</i> .....	5
Ciclo biológico del <i>Haemonchus contortus</i> .....	6
Epidemiología.....	8
Patogenia del <i>Haemonchus contortus</i> .....	11
Cuadro Clínico.....	12
Lesiones a la Necropsia.....	13
Diagnóstico.....	13
Tratamiento.....	14
Respuesta inmunológica frente al <i>Haemonchus contortus</i> .....	15
Estimulación antigénica de células.....	15
Activación de linfocitos B a células plasmáticas.....	16
Procesamiento del antígeno.....	17
Interacciones celulares.....	18
Control y prevención .....	20
Raza Blackbelly.....	23
Raza Columbia.....	23
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos .....	27
Material y Métodos .....	28
Lugar de realización .....	28
Animales .....	28
Parásitos.....	28
Determinación de la carga parasitaria.....	29
Diseño experimental .....	29
Tinción verde metil pironina para determinación de plasmáticas totales .....	30
Determinación de células productoras de IgA, IgG e IgM .....	31
Diagrama de Flujo .....	33
Análisis estadístico .....	34
Resultados .....	34
Cuento de células plasmáticas en abomaso .....	34
Discusión.....	44
Conclusiones .....	51
Bibliografía.....	53



### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Extremo cefálico de <i>Haemonchus contortus</i>	Pág. 6
Figura 2	Hembra y macho de <i>Haemonchus contortus</i>	Pág. 6
Figura 3	Promedio más desviación estándar de la eliminación semanal de hgh de <i>Haemonchus contortus</i> en corderos Blackbelly y Columbia.	Pág. 37
Figura 4	Micrografía de un corte histológico abomasal de ovino infectado con <i>Haemonchus contortus</i> , célula verde metil pirónina positivo.	Pág. 38
Figura 5	Células plasmáticas (verde metil pironina positivas) por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa del las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	Pág. 43
Figura 6	Microfotografías de cortes histológicos de la mucosa abomasal de ovino (objetivo 40 x) procesados por inmunofluorescencia para el marcaje de las distintas Inmunoglobulinas positivas	Pág. 42
Figura 7	Células IgA+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa del las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de <i>Haemonchus contortus</i> .	Pág 44
Figura 8	Células IgG+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa del las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	Pág 45
Figura 9	Células IgM+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa del las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de <i>Haemonchus contortus</i> .	Pág 46

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Número de células plasmáticas en la mucosa de las regiones abomasaes	Pág. 39
Cuadro 2	Correlación de eliminación de huevos por gramo de heces (hgh) y célula plasmáticas de la región fúndica abomasal de corderos de alta y baja eliminación de hgh infectados experimentalmente con 6000 larvas de <i>H. contortus</i> .	Pág. 40
Cuadro 3	Correlación de eliminación de huevos por gramo de heces (hgh) y células plasmáticas de la región pilórica abomasal de cordero de alta y baja eliminación de hgh infectados experimentalment con 6000 larvas de <i>H. contortus</i> .	Pág. 41

## Abreviaturas

**CEL-Ig+** Células Inmunoglobulinas positivas

**CEL-IgA<sup>+</sup>** Células positivas a Inmunoglobulina A

**CEL-IgM<sup>+</sup>** Células positivas a Inmunoglobulina M

**CEL-IgG<sup>+</sup>** Células positivas a Inmunoglobulina G

**LB** Linfocitos B

**L<sub>1</sub>** Larva en primer estadio de *Haemonchus contortus*.

**L<sub>2</sub>** Larva en segundo estadio de *Haemonchus contortus*.

**L<sub>3</sub>** Larva en tercer estadio o larva infectante de *Haemonchus contortus*.

**L<sub>4</sub>** Larva en cuarto estadio de *Haemonchus contortus*.

***ad libitum*** a libre acceso

**° C** Grados Centígrados o grados Celsius

**μl** Microlitos

**PBS** Solución Buffer salino de fosfatos

**%** por ciento

**CD4<sup>+</sup>** Células CD4 positivas

**RNA** Acido Ribonucléico

**RER** Retículo endoplásmico Rugoso

**Bb** Blackbelly

**Cb** Columbia

**RPA** Región Pílorica Abomasal

**RFA** Región Fundica Abomasal

**p<** probabilidad menor a

**hgh** Huevos por gramo de heces

**RFA** Región Fúndica Abomasal

**RPA** Región Pílorica Abomasal

**FA** Fases adultas

**HCl** Acido Clorhídrico

## RESUMEN

Se emplearon treinta corderos machos, libres de nematodos gastroentéricos y con una edad de entre seis y ocho meses. De ellos, quince fueron de la raza Columbia (Cb) y quince Blackbelly (Bb). Los corderos de cada raza fueron divididos en dos grupos: diez animales fueron inoculados con larvas de *H. contortus* y formaron el grupo experimental y cinco corderos no fueron inoculados y formaron el grupo testigo. Los corderos de los grupos experimentales fueron inoculados semanalmente por seis semanas con 1000 L3 de *H. contortus*. Los corderos de los grupos testigo solo recibieron solución salina fisiológica. Durante las quince semanas que duró el experimento se tomaron semanalmente muestras de materia fecal y se contó el número de huevos por gramo de heces (hgh) por una técnica modificada de McMaster, todos los animales fueron sacrificados en la semana 15. Se tomaron 2 muestras de tejido de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica abomasal (RPA) de cada uno de los animales. Una muestra de cada región fue conservada en paraformaldehído al 4%, deshidratada, embebida en parafina y procesada para cortes histológicos teñidos con verde metil pironina (tinción específica para células plasmáticas). La otra parte de las muestras se incluyó en el criopreservador OCT (Tissue Tek) y se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser procesadas por inmunofluorescencia para detectar células plasmáticas productoras de IgG+, IgA+ e IgM+. Los corderos de la raza Cb inoculados eliminaron ( $p < 0.05$ ) mayor cantidad de (hgh) que los corderos de la raza Blackbelly inoculados. Los animales infectados de ambas razas mostraron cuentas de células plasmáticas por campo significativamente más elevadas ( $P < 0.005$ ) que sus respectivos grupos control en ambas regiones del abomaso. No se observaron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) en el número de células plasmáticas por campo entre los grupos de corderos Bb y Cb inoculados con larvas de *H. contortus*. En ambas regiones del abomaso de los animales de las dos razas se observaron mayores cantidades de células IgA+ por campo ( $p < 0.05$ ) con respecto a las células IgG+ y células IgM+.

en la región fúndica, los corderos Bb infectados mostraron cuentas de CEL-IgG+ por campo mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto a sus grupos testigo. En ninguna de las dos razas y en ninguna de las regiones abomasales se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el número de células IgM+ entre corderos infectados y no infectados. No se observó significancia estadística en ninguno de los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas. El aumento de las células que producen IgA es un efecto en respuesta a la presencia del parásito, pero no es un factor que esté ligado a la resistencia en los animales, puesto que no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los corderos infectados de las dos razas.

# INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los datos publicados por la FAO, el censo mundial de ovinos ascendió en 1997 a unos 1060 millones de cabezas y en el año 2002 a 1034 millones de cabezas, lo que marca una sostenida baja de la población ovina a nivel mundial en el curso de los últimos años, debido principalmente a la reducción dramática del mercado de la lana ante la aparición de las fibras sintéticas y al uso de la lana de otras especies animales como la alpaca y la vicuña. Sin embargo, en México la población de ovinos aumento de 5.9 a 6.7 millones de cabezas entre los años 2000-2001. La mayor población de ovinos en México se presenta en los estados de México, Hidalgo, San Luís Potosí, Oaxaca, Puebla y Veracruz. (SAGARPA 2002). En México las parasitosis gastrointestinales son uno de los factores que causan mayor mortalidad en ovinos, además reduce la producción y rentabilidad de las explotaciones ovinas (Monteo y col., 2004). Por lo anterior, es de suma importancia para el desarrollo económico de la ganadería el conocimiento de los problemas originados por las parasitosis gastrointestinales de los rumiantes, las cuales provocan trastornos digestivos e hipoproteinemia, lo referente a la nutrición y desarrollo normal del individuo, además de favorecer enfermedades secundarias y en consecuencia, cuantiosas pérdidas a la producción. (Cuellar 2003).

Entre estas enfermedades se encuentra la verminosis gastroentérica de los ovinos, que es producida por la presencia y acción de nematodos de los géneros: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Strongyloides*, *Bunostomum*, *Chabertia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Skrjabinema* y *Trichuris* (Quiroz, 2000).

*Haemonchus contortus* es el más importante de los nematodos en las ovejas (Meana y Rojo, 1999; Blood, y col 1986; Pugh, 2002). Este parásito esta ampliamente distribuido en México y esta presente todo el año en las pasturas (Liébano *et al.*, 1992). Es más frecuente durante la época de lluvias, ya que es cuando se dan las condiciones más

adecuadas para la formación de larvas infestantes, además que hay mayor cantidad de forraje, contaminado que consumirán los borregos (Cuellar y col., 1986). Este nematodo, se encuentra en el abomaso, causando anemia e hipoproteinemia (Blood, y col 1986).

### **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Haemonchus contortus* (Urquhart y col., 2001)**

Reino: Animalia

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Strongylida

Superfamilia: Trichostrongyloidea

Familia: Trichostrongylidae

Género: *Haemonchus*

Especie: *contortus*

### **Morfología de *Haemonchus contortus***

El Extremo cefálico es muy delgado, poseen una pequeña cápsula bucal, con un fino diente o lanceta que se origina en el lado dorsal de la base (figura 1). Tiene papilas cervicales prominentes, en forma de espina. La bolsa copulatriz del macho es grande, tiene grandes rayos laterales y un dorsal pequeño y asimétrico en forma de Y invertida. Las papilas son relativamente cortas, hay papilas prebursales y posee un gubernáculo. La vulva se encuentra en la parte ventral, cuando termina el segundo tercio del cuerpo y esta cubierta por un labio vulvar muy grande. El macho tiene un color rojizo uniforme mientras que en la hembra, los ovarios son blancos y están enrollados en espiral alrededor del intestino rojo lo que le da un aspecto rallado. Las espículas miden de 0.46 a 0.506 mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo posterior (Soulsby, 1988). Los machos miden

de 10 a 20 mm y las hembras de 18 a 30 mm (figura 2) (Lapage, 1976; Soulsby, 1988; Quiroz, 2003). Los huevos tienen una forma ovoide son incoloros miden de 70-80 por 41-48  $\mu\text{m}$ , presentan una doble capa y en el interior de 8 a 16 estructuras redondas llamadas blastómeros (Soulsby, 1988).



**Figura 1.** Extremo cefalico de *Haemonchus contortus* (J.A Van Wyk, 2006; fuente [www.wormboss.com.au/LivePage.aspx?pageId=437](http://www.wormboss.com.au/LivePage.aspx?pageId=437))



**Figura 2.** Parte superior hembra, parte inferior macho de *Haemonchus contortus* (Gisele.Alexandre, 2006; fuente, [www.antilles.inra.fr/.../2022/Haemonchus\\_w3.jpg](http://www.antilles.inra.fr/.../2022/Haemonchus_w3.jpg))

### **Ciclo biológico del *Haemonchus contortus***

El ciclo biológico es directo, en el abomaso del hospedero se localizan los adultos, la hembra produce de 5000 a 10000 huevos al día. (Lapage, 1976; Meana y Rojo, 1999). Los huevos son eliminados con la materia fecal, contaminando los pastizales en los cuales se desarrollan tres fases larvianas de vida libre (Lapage, 1976). Al ser eliminados los huevos se encuentran blastomerados y se requiere de humedad, temperatura adecuada y oxígeno para el desarrollo de la larva en primer estadio ( $L_1$ ) dentro del huevo (Quiroz, 2000).

Una vez eliminados los huevos con las heces, si las condiciones ambientales son adecuadas se desarrolla la larva 1 ( $L_1$ ) que eclosiona en la materia fecal de 1 a 2 días después de ser eliminada (Quiroz, 2003). Esta larva se alimenta de bacterias del medio donde se encuentra. Al completar su crecimiento muda de epidermis (primera ecdisis) y se transforma en larva 2 ( $L_2$ ) que también se alimenta de bacterias y crece hasta que madura, muda su epidermis (segunda ecdisis), pero esta no se desecha, permanece como una envoltura suelta

alrededor de la larva 3 (L<sub>3</sub>) que se ve separada por ella de su alrededor, por lo tanto no puede alimentarse. Está se mantiene de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1976).

La L<sub>3</sub>, es la Fase infectante de *Haemonchus contortus*, está no resiste la desecación ni las bajas temperaturas (Soulsby, 1988). En condiciones adecuadas el desarrollo de la L<sub>3</sub> se alcanza de 4 a 7 días después de haber sido eliminados los huevos (Lapage, 1976). La L<sub>3</sub> es muy activa y es capaz de desplazarse verticalmente sobre superficies húmedas de los vegetales presentado varios tropismos: hidrotropismo positivo, esto es que buscan las zonas húmedas, fototropismo negativo, que evitan la luz intensa, termotropismo positivo a la temperatura optima (15 a 30° C) y geotropismo negativo, se aleja del suelo buscando la parte alta de los pastos (Quiroz, 2003). La migración vertical les permite subir a las gotas de rocío que se encuentran en las puntas de los pastos en las mañanas o en los días nublados (Soulsby, 1988). La dispersión horizontal de las larvas se ve favorecida por diferentes factores entre estos se encuentran: la lluvia, la dispersión mecánica que ejerce el ganado al desplazar con sus patas la materia fecal, los insectos y los ácaros coprófagos, se ha mencionado que esporas de hongos del genero *Pilobolus* son capaces de lanzar a las larvas de 1 a 1.5 m de distancia del bolo fecal; esto es importante debido a que los animales no consumen el forraje que se encuentra cerca de la materia fecal (Lapage, 1976; Soulsby, 1988; Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

Los ovinos se infectan al ingerir la L<sub>3</sub> con las pasturas, unos 30 minutos posteriores a la ingestión de la L<sub>3</sub> ésta pierde la cutícula que conservó de la anterior muda debido a los diversos estímulos o factores del hospedador presentes en el rumen (amortiguadores, bicarbonato, gases). Estos factores activan a la L<sub>3</sub> que libera un fluido de muda que actúa sobre la cutícula provocando su ruptura, y la larva sale mediante sus movimientos (Lapage, 1976; Meana y Rojo, 1999). Ya liberadas las larvas pasan al abomaso,



éstas penetran la mucosa en las fosetas de las glándulas gástricas en lo que se denomina etapa histotrófica o tisular (Soulsby, 1988; Lapage, 1976). Se sabe que *Haemonchus contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica abomasal (Meana y Rojo, 1999). Ya en la mucosa se alimenta de sangre, crece y muda a L<sub>4</sub>, ésta también crece e ingiere sangre, posteriormente sale de la mucosa y muda a L<sub>5</sub> o preadulto (Meana y Rojo, 1999). La L<sub>5</sub> se desarrolla directamente sin muda hasta transformarse en adulto, hembra o macho (Lapage, 1976), y el ciclo se cierra después de la cópula cuando las hembras comienzan a producir huevos (Meana y Rojo, 1999).

### **Epidemiología.**

El hecho de que la mayoría de los pequeños rumiantes se encuentran en pastizales comunales, es decir en donde pastorean animales de diferentes dueños o en terrenos sobrepastoreados, en donde la contaminación es muy grave, hace que en México esta parasitosis sea muy común (Cuéllar, 1992).

Para que esta enfermedad se presente se tienen que conjugar factores ambientales, factores del hospedador y necesidades del parásito. Esta infección se da por la ingestión de forraje contaminado con L<sub>3</sub>. La enfermedad se presenta principalmente en sistemas de producción donde se practica el pastoreo, o sea, en aquellos denominados genéricamente extensivos o semintensivos. También es un problema sanitario frecuente en sistemas intensivos con praderas irrigadas por que en estas praderas las larvas infectantes encuentran un microambiente que les favorece, en cuanto a humedad y temperatura para su desarrollo. Los pastos contaminados con la L<sub>3</sub> son el vehículo para que las larvas puedan introducirse al hospedero. Las larvas en el ambiente son susceptibles a la desecación y la desecación las mata (Cuéllar, 1986; Cuéllar 1992).

Las larvas infecciosas soportan más que las preinfecciosas quienes son susceptibles a la desecación. Por esta razón las L<sub>3</sub> migran mejor en climas húmedos y cálidos. Unas larvas pueden encontrarse a 90 cm de los residuos de la materia fecal en 24 horas pero más del 90% se encuentra a 10 cm, el número disminuye logaritmicamente al aumentar la distancia (Blood y col., 1986).

La humedad representa el factor climático mas importante para el desarrollo y supervivencia de las larvas infectantes, por lo tanto, la época de lluvias es de alto riesgo para adquirir la parasitosis. La hora del día también es importante, las L<sub>3</sub> se encuentran en la punta del pasto durante la madrugada y temprano cuando hay rocío, por lo que pastorear a esta hora del día aumenta las probabilidades de contaminación. Los hábitos alimenticios de los ovinos son importantes para la infección, estos son altamente selectivos, consumen forraje fresco, tierno, que contiene mucha humedad y por lo tanto es probable que contenga un gran número de larvas infectantes que desencadenarán cuadros clínicos de la enfermedad. Es este uno de los motivos por los que los ovinos son la especie en que más frecuentemente se encuentra el *Haemonchus contortus* (Cuéllar, 1992).

En algunas circunstancias el desarrollo larvario se detiene dentro del hospedero en L<sub>4</sub> durante 4 o 5 meses, este fenómeno recibe el nombre de hipobiosis (Meana y Rojo, 1999). Algunos trabajos describen que este fenómeno se debe a factores genéticos, inmunológicos o ambientales, por ejemplo el fenómeno de hipobiosis coincide cuando las condiciones ambientales son adversas (inviernos fríos o veranos secos y calientes) y parece ser que la capacidad de inhibición es una característica heredable y se considera una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador, a factores ambientales adversos o ambos a la vez (Quiroz, 2003; Meana y Rojo, 1999). Cuando las condiciones ambientales son adecuadas para la supervivencia de las fases libres asociada probablemente con un estímulo estacional, simultáneamente se reanuda el desarrollo de las larvas. (Lapage, 1976). Desde el punto de

vista epidemiológico, esto es muy importante debido a que coinciden en el tiempo la madurez sexual de los adultos procedentes de las larvas hipobióticas que eliminan cantidades elevadas de huevos con una época del año favorable para el desarrollo de las L<sub>3</sub>, esto produce infestaciones en los potreros lo que aumenta el riesgo de infecciones, principalmente para los animales jóvenes (Meana y Rojo, 1999).

Aunque la presentación clínica de la enfermedad casi es exclusiva de corderos de entre seis y ocho meses de edad, también ocurre en animales adultos, no obstante, el factor racial es otro de los factores que determinan la severidad de la enfermedad. Los animales nativos o criollos, resisten más las infecciones parasitarias en relación a los animales de razas puras o seleccionadas en países con otros climas, esta situación se explica por la selección natural que ha ocurrido en los animales nativos, dando lugar a una progenie con las mismas características, o sea, resistentes a este nematodo. Además debe considerarse que los ovinos de razas puras son por lo regular criados y mantenidos bajo condiciones estabuladas que difícilmente tienen contacto con este parásito y al entrar en contacto con este muestran una gran susceptibilidad (Cuéllar, 1992).

En cuanto al estado nutricional de los animales tiene un papel muy importante en la susceptibilidad a la nematodiasis gastrointestinal. Los animales subnutridos regularmente presentan cargas parasitarias mayores en relación a aquellos que mantienen óptimas condiciones nutricionales, esto podría explicarse por los mecanismos inmunológicos que permiten o no la infección parasitaria, cuya base está en la cantidad y calidad de alimento consumido, en especial referente a las proteínas (Cuéllar, 1992). La suplementación de proteína en la dieta de los ovinos ha demostrado un mejor efecto en el control de la hemoncosis que un programa antihelmíntico estratégico (Lady, 2002).

### **Patogenia del *Haemonchus contortus***

La presencia de las larvas en las glándulas abomasales ocasionan cambios histopatológicos del tejido glandular como son la hiperplasia de la mucosa abomasal y la infiltración de células inflamatorias. La sustitución de células parietales secretoras de HCl por células jóvenes no secretoras, producen un aumento en el pH en la luz abomasal e impiden la transformación de pepsinógeno a pepsina incidiendo negativamente en la digestión de las proteínas. La unión intercelular de la glándula también se ve afectada, lo que favorece la pérdida de proteínas endógenas de la sangre por el lumen gástrico y la entrada de pepsinógeno a la misma (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

El mayor daño en la hemoncosis se debe a la acción expoliatriz de la L<sub>4</sub>, así como de la actividad hematófaga de las fases adultas (Duna, 1983; Quiroz, 2003; Blood y col., 1986; Soulsby, 1988; Martin y Aitken, 2000; Radostits y col, 2002). Al ingerir grandes cantidades de sangre del hospedador se producen pérdidas de los componentes sanguíneos, incluyendo eritrocitos y proteínas plasmáticas lo que ocasiona anemia e hipoproteinemia (Blood y col., 1986; Martin y Aitken, 2000; Radostits y col, 2002). Por cada gusano adulto o verme se pierden unos 0.05 mililitros de sangre completa al día, tanto por lo que ingiere el parásito como por lo que pierde al sangrar la herida (Urquhart, 2001; Quiroz, 2003; Soulsby, 1988; Radostits y col, 2002). Una lectura del hematocrito inferior al 15% siempre va acompañada de una debilidad extrema e insuficiencia respiratoria. La pérdida de proteína plasmática provoca anasarca, que externamente se manifiesta en forma de edema submandibular (Dwight, 2004) Los corderos se pueden infestar mientras permanecen con sus madres (Martín, 2000). La gravedad de los corderos depende de la edad y de la intensidad de la infección (Meana y Rojo, 1999).

## **CUADRO CLÍNICO**

Existen tres formas clínicas de la presentación de la hemoncosis:

a) Sobreaguda: Se desarrolla de 0 a 7 días aproximadamente, se debe a una súbita infección por gran número de larvas, se asocia al clima caluroso y húmedo, que facilita la presencia de gran cantidad de estas fases en los pastos, la morbilidad es baja, y en general se presenta en los animales más jóvenes, hay gastritis hemorrágica con anemia severa y a veces es fatal, las heces son de color oscuro y no hay diarrea (Dunn, 1993; Soulsby, 1988; Mc Clure y col., 2000; Balic y col., 2000; Quiroz, 2003).

b) Aguda: Se observa principalmente en animales jóvenes susceptibles con infecciones intensas (Soulsby, 1988). Con frecuencia afecta a pocos animales pero en brotes graves puede afectar un gran porcentaje del rebaño si no recibe tratamiento. El cuadro clínico incluye baja considerable de peso y/o retardo en el crecimiento. Hay diarrea intermitente de color café oscuro, emaciación, mucosas pálidas y presencia de edema submandibular. Los animales están débiles, dejan de comer y se retrasan al momento de pastorear, puede haber caída de lana o esta arrancada a mordidas por otros animales afectados. En muchos casos el animal muere como consecuencia de los severos trastornos digestivos y metabólicos que provocan los parásitos. Los animales recuperados suelen quedar subdesarrollados (Duun, 1993.; Blood, 1986; Cuéllar, 1986; Radostits, 2002; Citado por Cuenca 2005).

c) Crónica o subclínica: Es la más común, con relativa baja de carga de parásitos adultos, sin reinfestación. No depende del clima, sucede con pastos de pobre calidad. La morbilidad es muy alta. La gastritis que se presenta es crónica, con pérdida de sangre y disfunción abomasal, con progresiva pérdida de peso y retardo en el crecimiento, no hay anemia marcada ni edema, por lo que el diagnóstico se dificulta, hay decaimiento y anorexia, no hay diarrea (Newton, y col, 1995.; Hoste y col., 2000; Quiroz, 2003).

### **Lesiones a la Necropsia**

Debido a los trastornos generales como consecuencia de la hemoncosis los animales muertos presentan emaciación, deshidratación, anemia, diarrea, siendo estas lesiones inespecíficas, sin embargo existen lesiones mas específicas limitadas al tracto digestivo relacionadas con *Haemonchus contortus* (Meana y Rojo, 1999).

En al necropsia la canal se observa pálida edematosa, con pobre estado de carnes, ausencia de grasa y presencia de líquidos en cavidad peritoneal, torácica y pericárdica (Dunn, 1993; Cuéllar, 1986).

El contenido del abomaso suele tener un color parduzco por la sangre y la presencia de adultos de *Haemonchus contortus*, así como la pared esta hiperémica y con coágulos, hay pequeñas ulceraciones donde se fijaron los gusanos adultos (Dunn, 1993; Blood y col., 1986; Cuéllar, 1986; Meana y Rojo, 1999; Radostits y col., 2002)

### **Diagnóstico**

El diagnóstico debe de realizarse sobre la base de datos clínicos, historial epidemiológico, análisis de laboratorio. Aunque algunos signos son muy sugestivos (diarreas, baja peso, mucosas pálidas, edema submandibular y muertes ocasionales), se debe comprobarse enviando al laboratorio muestras de materia fecal colectadas directamente del recto de los animales, para detectar la presencia de huevos eliminados por los parásitos. En el laboratorio se realizan la Técnica de Mc Master para la detección de huevos. Los huevos son ovalados, con doble pared, miden de 70 a 85  $\mu\text{m}$  de largos por 41 a 44  $\mu\text{m}$  de ancho. Los huevos contienen de 8 a 16 estructuras redondas llamadas blastómeros. Los huevos de *H. contortus* son muy parecidos a los de otros nematodos, por lo que debe complementarse el diagnóstico con cultivo e identificación de larvas en tercer estadio (Alba, 2007).

Es de gran utilidad efectuar una biometría hemática para conocer el estado general del animal y evaluar el efecto parasitario (Cuéllar, 1986) El diagnóstico de la hemoncosis

crónica es mas difícil porque se puede confundir con una nutrición deficiente e incluso con una fasciolosis crónica (Urquhart, 2001)

### **Tratamiento**

Hay una gran variedad de productos utilizados, pero los mas conocidos de los grupos son los bencimidazoles (tiabendazol 44 mg/kg, albendazol 5 mg/kg, Febendazol 5 mg/kg, oxfendazol 5.0mg/ kg. todos vía oral); probencimidazoles (febantel 6mg/ Kg, tiofanato 50 mg/ kg, netobimin 7.5mg/ kg. todos vía oral); imidazotiazoles (levamisol 7.5mg/kg. por vía subcutánea); lactosas macrocíclicas (ivermectina 0.2mg/kg, moxidectina 0.2 mg/ kg, doramectina 0.2 mg/ kg. todas vía subcutánea) y Salicilanilidas (closantel 5mg/ kg. vía subcutánea).

### **Respuesta inmunológica frente al *Haemonchus contortus***

La respuesta inmunitaria adquirida tras el contacto con el parásito y la capacidad fisiológica innata de los animales para adaptarse a la infección, son los mecanismos de resistencia. Esta inmunidad frente a nematodos gastroentéricos depende directamente de la respuesta celular por linfocitos T, incluye importantes alteraciones inflamatorias en la mucosa y la producción de anticuerpos específicos contra los parásitos (Meana y Rojo, 1999).

El tipo de respuesta está condicionada por las variaciones antigénicas que presentan los nematodos, a consecuencia de distintas fases de desarrollo dentro del hospedador y al hecho claro de poseer dentro de cada fase distintos tipos de moléculas; las que se expresan en la superficie y que se desprenden del parásito (productos de secreción y excreción). Aunque se desconoce la función biológica de muchas de ellas, es innegable su papel como antígenos, alérgenos o moduladores de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria (Meana y Rojo, 1999).

Las respuestas inmunitarias eficaces tienen una serie de características según las distintas fases de desarrollo. Así, se observa que la respuesta frente a las larvas evita su asentamiento y da lugar a su eliminación a las pocas horas de ser ingeridas, esta relacionada con la presencia de elevadas cantidades de inmunoglobulinas (IgA e IgE), histamina y leucotrienos en el moco (Montaraz, 1997). Los tejidos linfoides de las mucosas se han adaptado de forma característica para producir cantidades elevadas de IgA (Abbas y Lichtman, 2004). En muchos casos, la inmunidad a las L<sub>4</sub> produce su eliminación o la detención de su desarrollo (hipobiosis) (Meana y Rojo, 1999).

### **Estimulación antigénica de células**

Se entiende por sistema inmunitario el conjunto de órganos linfoides y células que intervienen en la respuesta inmune. Los linfocitos son los protagonistas centrales de la respuesta inmune y se dividen en dos grupos: **T** y **B**. Ambos se originan a partir de células pluripotenciales de la medula ósea, morfológicamente ambos tipos de linfocitos son similares por lo que cuando interesa diferenciarlos, ya sea para controlarlos o separarlos, se recurre a diferencias genotípicas a nivel molecular expresadas en la membrana citoplasmática (Montaraz, 1997). Antes de la estimulación antigénica o policlonal, los Linfocitos pequeños están en fase de reposo, o en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. Si los linfocitos en reposo no se encuentran con el antígeno, probablemente mueren a los pocos días o semanas, y la población se mantiene estable por el desarrollo de nuevas células a partir de los precursores de la medula ósea.

La estimulación antigénica (policlonal) estimula los linfocitos pequeños en reposo para que entren en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Estos, aumentan de tamaño y se denominan linfocitos grandes, o Linfoblastos, estas células tienen un diámetro de 10 a 12 µm y presentan un anillo más ancho de citoplasma, más organelos y mayores cantidades de ácido



ribonucleico (ARN) citoplasmático comparados con los linfocitos pequeños no estimulados. Continúa la progresión a la fase S del ciclo celular, y el linfocito grande activado se divide. A esta secuencia se le llama transformación blástica. La división mitótica es la responsable de la proliferación de los clones de linfocitos sensibles al antígeno. Posterior o simultáneamente a la proliferación, los linfocitos estimulados se diferencian desde una fase de reconocimiento en que reconocen al antígeno a una efectora en la que actúan para eliminarlo (Abbas y Lichtman, 2004).

### **Activación de linfocitos B a células plasmáticas**

Los linfocitos B (LB) después de la estimulación antigénica se multiplican y transforman en células plasmáticas (Montaraz, 1997). Las células plasmáticas son células en la fase final de diferenciación con una capacidad nula o escasa de división mitótica, y son, en esencia, factorías para la síntesis y fabricación de anticuerpos. Se calcula que la mitad o más del ARN mensajero (ARNm) de las células plasmáticas codifica anticuerpos (Abbas y Lichtman, 2004). La función fisiológica de los anticuerpos es neutralizar y eliminar al antígeno que indujo su formación (Abbas y Lichtman, 2004). La activación de los LB es dependiente de dos señales activadoras; una la proporciona la interacción del antígeno con la inmunoglobulina en la membrana del LB; La otra la proporcionan una serie de citocinas secretadas por los LT cooperadores o  $CD4^+$ . (Montaraz, 1997). Tras la unión de un antígeno o un anticuerpo anti-Ig a la célula B, el complejo Ig-antígeno se interna en la célula mediante una endocitosis mediada por el receptor. Si el ligado es una proteína, será procesado como en otras células presentadoras de antígeno es decir, las células T reconocen y responden a antígenos peptídicos extraños solo cuando el antígeno está unido a la superficie de otra célula, mientras que las células B y los anticuerpos secretados se unen a antígenos solubles en los líquidos corporales o a antígenos de la superficie celular. Esto da lugar a la generación de

fragmentos peptídicos del antígeno que se volverán a expresar en la superficie de la célula unidos de forma no covalente a la molécula de Clase II del MHC. Estos complejos péptido-MHC pueden ser reconocidos posteriormente por LT cooperadores restringidos por el MHC específicos para el antígeno. Las células B son extremadamente eficaces en la presentación del antígeno que reconocen, por que las Ig de membrana actúan como receptores de alta afinidad que capacitan a las células al unirse, internalizar y presentar concentraciones muy bajas de antígenos.

### **Procesamiento del antígeno**

El procesamiento y la presentación del antígeno ocurren a las 1-6 horas de la unión del antígeno proteico a la célula *in vitro*. En las siguientes 8- 24 horas, se sintetizan nuevas moléculas de Ig de membrana que se vuelven a expresar, de forma que la célula B es capaz de unirse a más moléculas del antígeno. (Abbas y Lichtman, 2004). Las Células T cooperadoras que reconocen los antígenos presentados por los Linfocitos B producen dos tipos de estímulos que originan la proliferación y diferenciación de las células B. Estos estímulos son generados por el contacto físico entre los Linfocitos T y B y por las citocinas producidas por las células T cooperadoras. (Abbas y Lichtman, 2004 ).

Los LB expresan una molécula(s) de membrana que se une a un receptor complementario en las células T activadas, y esta interacción proporciona el estímulo que inicia las respuestas de la Célula B. La principal molécula implicada en la estimulación de la Célula B mediante el contacto con la célula T, se sabe ahora que es el CD40 de la célula B, y su ligando complementario de 39 kD (llamado gp39) en la células T cooperadoras activadas. El CD40 es una glucoproteína de 50kD que se expresa en la mayor parte de los linfocitos B maduros pero se pierde después que células B se diferencian a células secretoras de anticuerpos (Abbas y Lichtman, 2004).

## **Interacciones celulares.**

Los anticuerpos contra el CD40 pueden reemplazar a las células T cooperadoras. La interacción del gp39 de las células T con el CD40 de las células B se produce independientemente del antígeno y de las moléculas del MHC. De este modo, la secuencia probable de acontecimientos en las interacciones célula T –célula B es como sigue. Las células B presentan repetidos antigénicos asociados al MHC a la célula T cooperadoras; las células T cooperadoras se activan y expresan el gp 39; éste se une entonces al CD40 de la célula B presentadora del antígeno; esta interacción inicia la proliferación de la célula B; y las citocinas producidas por las células T cooperadoras estimulan las posteriores respuestas de las células B. La naturaleza bioquímica de las señales generadas por la participación del CD40 y los mecanismos por los que estas señales inducen el crecimiento de las células B no se conoce todavía. (Abbas, 2004)

Los factores cooperadores más potentes para las células B son las citocinas producidas por las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>. No obstante, algunos macrófagos y otras células no T (productoras de IL-1, TNF y IL-6) pueden secretar algunas de las citocinas que estimulan el crecimiento y diferenciación de las células B. (Abbas, 1995) La producción de citocinas contribuye a la activación de células B espectadoras que no son específicas para el antígeno que inicia la respuesta, pero que están en la vecindad de las células estimuladas por ese antígeno. La infección por parásitos helmintos estimula el aumento de la IgE en el suero 100 o más veces, y solo una pequeña fracción de esta IgE (probablemente menos del 5%) es específica para el helminto en particular, sin embargo, incluso en tales respuestas, las células B específicas para el antígeno se estimulan de forma preferente comparadas con las células espectadoras (Abbas y Lichtman, 2004).

Se cree que las interacciones con las células presentes en los centros germinales, como los linfocitos T cooperadores o las células dendríticas foliculares, pueden estimular las mutaciones de las Ig, pero no se conoce ni el estímulo ni el mecanismo de la hipermutación. El resultado de la hipermutación somática es que las mutaciones de los genes variables se acumulan de forma secuencial en la progenie de los clones de células B que proliferan. A medida que estos procesos ocurren, los anticuerpos que se han secretado a la circulación se unen al antígeno residual y pueden activar al complemento. Estos complejos inmunitarios se concentran en las superficies de las células dendríticas foliculares mediante su unión a los receptores de Fc de los anticuerpos y la fracción C3b del complemento (Abbas y Lichtman, 2004).

Es propiedad universal de los LB la presencia de inmunoglobulina en su membrana. Cuando el LB no ha sido activado la inmunoglobulina es IgD, la reacción antígeno-anticuerpo proporciona al LB una de las señales requeridas para iniciar un proceso de replicación destinado a la generación de una colonia celular o clona en la que se distinguirán dos tipos de células: células plasmáticas responsables de la síntesis y secreción de inmunoglobulina IgM, IgG, IgA o IgE (con la misma especificidad que las presentes en la membrana del LB progenitor) y células de memoria responsables de iniciar una eventual respuesta secundaria contra el antígeno en cuestión. No se conoce cuáles son los estímulos que determinan el que una estirpe de linfocito B activado evolucione a célula efectora o célula de memoria (Montaraz, 1997; Abbas, 2004). Las células plasmáticas se encuentran solo en órganos linfoides y en los lugares de respuesta inmunitaria, y normalmente no circulan por la sangre o la linfa. Tienen una morfología característica con núcleo excéntrico, citoplasma abundante que contiene un RER denso, que es el lugar donde se sintetizan los anticuerpos (y otras proteínas secretadas y de membrana). Existe también un complejo de golgi grande, que se tiñe mal con pigmentos histológicos habituales y que es responsable del halo perinuclear; Los

anticuerpos adquieren su forma final y son agrupados para su secreción en esta organela (Abbas, 2004). Éstas inmunoglobulinas pueden ser identificadas mediante inmunofluorescencia, en la que se emplea un anticuerpo conjugado contra la gamaglobulina de la especie a estudiar combinado con un colorante fluorescente: Cuando una muestra de linfocitos se incubaba con este conjugado y se observa al microscopio con luz ultravioleta, los LB se verán rodeados de un halo brillante (usualmente Verde manzana que es el color producido por fluoresceína (Montaraz, 1997; Stites, 1983).

### **Control y Prevención**

Es imposible indicar una receta especial para una situación dada, sin embargo, se deberá buscar el costo beneficio lo cual es necesario además de las consideraciones epidemiológicas, inmunológicas, zootécnicas, llevar registro de ganancia de peso, producción de lana, leche, crías y relacionarlos con el calendario de desparasitación o programa (Quiroz, 2003). El uso de sistemas de rotación de potreros cuando sea posible puede ser utilizado en el control de nematodos (Cuellar, 2003), por ejemplo los animales que entren a pastos nuevos deben tener la menor carga de parásitos posible (Quiroz, 2003).

La separación por edades permite utilizar los potreros con mayor carga de larvas por Kg de pasto para los animales adultos debido al grado de inmunidad que tienen y a los animales jóvenes permitirles el acceso a pastos nuevos con menor carga de larvas (Quiroz, 2003).

El ensilaje o la henificación de las praderas permiten cortar el ciclo por medio de la muerte de las larvas. Esta condición ocurre durante la estación de sequía en zonas tropicales en donde los rayos solares materialmente esterilizan desde el punto de vista parasitológico a la pradera (Quiroz, 2003).

Hay buenos resultados realizando selección por resistencia al parásito, lo cual resulta en un menor impacto negativo en la producción, se requerirá menos desparasitaciones para el control y mantendrá mas limpias las praderas (Torres, 2000).

La función de los hongos nematófagos como *Arthrobotrys oligospora* y *Duddingtonia flagrans* en el control de las larvas infectantes, consiste en tratar de establecer en el pasto una gran población de hongos altamente depredadora que sea capaz de reducir el grado de infección por la L<sub>3</sub> de *Haemonchus contortus* en el pasto (Faedo y col., 1998; Torres, 2000).

Se han efectuado investigaciones respecto a la eficacia de la vacunación contra *Haemonchus contortus* con larvas irradiadas mediante rayos X , pero este método no ha tenido utilización práctica ( Blood y col, 1986). Otras investigaciones con fines de evaluar vacunas elaboradas con antígenos intestinales de *Haemonchus Contortus*, con la cual se ha observado una reducción en la eliminación de huevos, lo que permite disminuir la contaminación de las praderas (Kabagambe y col., 2002; Radostitis 2002).

Una buena nutrición aumenta la resistencia de los ovinos contra la infección por *H. contortus*.

La suplementación alimenticia con proteína estimula la capacidad de algunas razas más susceptibles a resistir los efectos patógenos de la infección (Van Wyk y Bath,1998). La concentración de cobalto en la dieta en ovinos es importante ya que animales sujetos a dietas suficientes en cobalto y molibdeno son más resistentes a la infección de *H. contortus* (Blood y col., 1986).

Actualmente el empleo del sistema FAMACHA disemado por Van Wyk. (1998). Es un sistema que tiene como objetivo identificar clínicamente el desarrollo de la anemia de los animales parasitados con nematodos gastroentéricos hematófagos. Este se basa en la coloración de la conjuntiva y es representado con letras (A,B,C,D,E) o números del 1 al 5 donde A y B, son animales con infecciones leves, mientras que animales clasificados con las letras C, d y E son animales con infecciones masivas. Este método puede ser complementado con otras técnicas como el % hematocrito y el conteo de huevos en heces.

En la actualidad la utilización masiva y reiterada de antihelmínticos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes a ellos, por lo que estos problemas han dado pauta para

desarrollar métodos de control de parásitos internos que sean menos dependientes de los antihelmínticos tales como la cría de ovinos genéticamente resistentes (Miller *et al.*, 1998).

Se han reportado variaciones importantes en la resistencia a nemátodos gastrointestinales entre diferentes razas ovinas; razas de pelo como la Red Massai (Preston y Allonby, 1979), Blackbelly (Yaswinski *et al.*, 1980). Romanov (Luffau *et al.* 1990). Florida, Saint Croix, Barbados y Navajo (Courtney *et al.*, 1985), Katahdin (Parker *et al.*, 1993). Castellana, Florida y sus cruzas (Gómez *et al.*, 1999). Son más resistentes a nematodos que las razas europeas. A continuación se mencionan algunas características de las razas ovinas Blackbelly y Columbia utilizadas para la realización de este trabajo.

### **Raza Blackbelly**

Es un ovino de pelo originario de la isla de Barbados en el caribe. Fueron comerciantes holandeses los que introdujeron a esa zona borregos de lana, mismos que cruzaron con ovinos africanos traídos a la isla. El resultado de esta combinación fue el cordero hoy conocido como Blackbelly, Barbados o Panza Negra. Actualmente se encuentra diseminado por todo el Caribe y por el norte, centro y sur de América. Ha sido seleccionado por más de 300 años buscando prolificidad, ganancia de peso y carne magra, así como por su resistencia a parásitos y enfermedades. En México esta difundido en todos los climas, desde el trópico hasta las áreas templadas (AMCO, 2000). Este ovino se caracteriza por ser un animal muy rústico, no estacional, con excelente habilidad materna y abundante producción de leche. Si cuentan con una adecuada alimentación, estas cualidades permiten a las hembras criar dos o tres corderos con facilidad (AMCO, 2000).

### **Raza Columbia**

Esta raza es el resultado de la cruce de corderos Lincoln con ovejas Rambouillet. El primer experimento fue realizado en 1912 en Laramine, Wyoming, y es la primera raza creada en EUA por el Departamento de Agricultura. Existe la Asociación de creadores de Columbia desde 1940. Su distribución se había restringido a EUA. Su presencia en México data desde hace mas de 20 años, y su influencia se expande a través de sementales en el altiplano central mexicano que va de Talxcala, Puebla, Veracruz, e Hidalgo y como raza paterna en cruzamientos para producción de corderos (De Lucas, 2001).

Esta raza se considera de doble propósito su característica es su gran tamaño y peso. Los machos alcanzan los 160 Kg y las hembras hasta 110 Kg. Las hembras de esta raza son consideradas como buenas madres y gregarias, su tasa reproductiva se considera buena, con fertilidades superiores al 90% y prolificidad moderada de 140%. Se reportan porcentajes de destetados en las ovejas cubiertas de 90% al 95%. Los corderos tienen buena velocidad de crecimiento, estos al destete tienen un peso promedio de 35Kg y canales aceptables. Presentan cara blanca, recubierta de pelo, son acornes y carecen de arrugas en la piel y el cuello. (De Lucas, 2001). Se ha demostrado que esta raza es muy susceptible a la hemoncosis experimental (Muñoz y col., 2006).



## Justificación

La hemoncosis ovina es una enfermedad de gran importancia, principalmente en aquellos lugares donde se practica el pastoreo ocasionando una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios del país, disminuyendo la producción de los animales y ocasionando bajas utilidades al productor. Por lo que es necesario buscar estrategias para el control de la hemoncosis utilizando razas más resistentes y con una alta capacidad de recuperación a la infección por *H. contortus*. Ya que se ha demostrado que la resistencia a nematodos gastroentéricos es una característica heredable y esta asociada a ciertos tipos raciales (Courtney *et al.*, 1985; Luffau y col. 1990 ; Preston y Allonby, 1979 ;Yaswinski y col, 1980).

Se ha sugerido que la respuesta inmunológica esta asociada a la resistencia (Schallig, 2000). En la respuesta inmune están involucrados tanto componentes específicos (respuesta celular y humoral), como inespecíficos (respuesta inflamatoria). La inmunidad frente a los nematodos gastroentéricos induce la producción de anticuerpos a nivel local, el papel de estos anticuerpos no esta claro (Cordero y col, 1999). Los estudios realizados hasta el momento, sobre la respuesta inmune local son el resultado de infecciones aisladas, no existen reportes que comparen la cantidad de células productoras de anticuerpos en razas con diferentes grados de resistencia a la hemoncosis experimental.

Por lo anterior, en el presente trabajo se comparó el número de células productoras de anticuerpos, presentes en las regiones fúndica y pilórica abomasal de las razas Bb identificada como resistente y de la raza Cb identificada como susceptible (Cuéllar *et al.*, 2003) infectados de manera experimental con *H. contortus*.

## **HIPOTESIS**

Existen diferencias a nivel abomasal de la cantidad y tipo de células productoras de inmunoglobulinas entre ovinos susceptible y resistente a la hemoncosis experimental ovina.

## **OBJETIVOS**

GENERAL:

Contribuir al estudio de la respuesta inmune en la mucosa abomasal en ovinos Blackbelly y Columbia inoculados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

PARTICULARES:

- Cuantificar el número de células plasmáticas totales en la mucosa abomasal de ovinos de las razas Blackbelly y Columbia inoculados experimentalmente con *Haemonchus contortus*, mediante la tinción Verde Metil Pironina.
  
- Cuantificar el número de células plasmáticas productoras de IgA, IgM e IgG en mucosa abomasal en ovinos de las razas Blackbelly y Columbia inoculados experimentalmente con larvas de *Haemonchus contortus* mediante la técnica de inmunofluorescencia
  
- Correlacionar la presencia de células plasmáticas con el grado de susceptibilidad-resistencia a la hemoncosis entre estas razas ovinas.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## LUGAR DE REALIZACIÓN

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuatitlán Izcalli Edo. de México. Los corderos se mantuvieron en el área de posgrado del centro de producción agropecuaria de la misma Facultad.

## ANIMALES

Se emplearon para este trabajo 30 corderos machos, libres de nematodos gastroentéricos de entre 6 y 8 meses de edad, con una condición corporal muy similar para ambas razas, con un peso promedio de 38 kg, 15 corderos fueron de la raza Blakbelly y 15 de la raza Columbia. Estos corderos procedieron de explotaciones ovinas orientadas hacia la producción de pie de cría lo que garantizó su pureza racial. Todos los corderos se mantuvieron en estabulación total (cinco corderos por corral 3 X 4 metros, la mitad del corral techado y la otra mitad sin techar) y en condiciones libres de nematodos. Todos los corderos fueron alimentados con una mezcla 50% de alimento comercial para ovinos (14% de proteína) y 50% de alfalfa achicalada molida, en porciones calculadas al 4% de su peso corporal por día. El agua se ofreció *ad libitum*.

## Parásitos

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica de *H. contortus*, aislada a partir de un rebaño ovino comercial de Jilotepec, Estado de México, la cual fue mantenida por pases sucesivos en corderos criados bajo condiciones de estabulación total y con alimentación basada en forraje henificado y con un alimento balanceado comercial. A partir de la materia fecal de los corderos receptores de la cepa de *H. contortus*, se realizaron cultivos larvarios por

la técnica de Corticely-Lai (Alba, 2007) y se incubaron por 7 días a 28-30 °C. Las larvas 3 (L3) obtenidas fueron colectadas, contabilizadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

### **Determinación de la carga parasitaria**

La cantidad de huevos por gramo de heces se cuantificó mediante una técnica modificada de McMaster (Alba, 2007) y se expresó en huevos por gramo de heces (hgh). El número de gusanos adultos se cuantificó en el momento del sacrificio. El abomaso fue ligado y removido, el contenido abomasal fue diluido en agua hasta completar 4 litros, se tomó una muestra del 10% de la solución y se contó el número de fases adultas (FA), el resultado se multiplicó por 10 y se expresó en número de FA por animal.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Antes de ingresar a los corrales a cada corderos se les realizó un examen clínico y coproparasitoscópico para constatar que estuvieran clínicamente sanos y libres de parásitos gastroentéricos. Los corderos tuvieron un periodo de adaptación de dos semanas en los corrales antes de empezar el experimento.

Los quince corderos de cada raza fueron divididos en dos grupos: Diez animales fueron inoculados con larvas de *H. contortus* y formaron el grupo experimental y cinco corderos no fueron inoculados y formaron el grupo testigo. Los corderos de los grupos experimentales fueron inoculados por sondeo esofágico con seis inoculaciones semanales de 1000 L3 de *H. contortus*. Los corderos de los grupos testigo solo recibieron solución salina fisiológica.

Semanalmente se tomaron muestras de heces y se contó el número de huevos de *H. contortus* por una técnica modificada de McMaster (Esta parte del proyecto fue realizada por Cuenca y Cuenca y presentada como tesis de licenciatura en 2005).

En la semana 15 todos los animales se les aplicó la eutanasia (sacrificio humanitario) utilizando una pistola de embolo oculto, se extrajo el abomaso y se contó el número de fases adultas. Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se tomaron 2 muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica abomasal (RPA) de cada uno de los animales. Una muestra de cada región fue conservada en paraformaldehído al 4%, deshidratada, embebida en parafina y procesada para cortes histológicos teñidos con verde metil pironina (tinción específica para células plasmáticas). La otra parte de las muestras se incluyó en el criopreservador OCT (Tissue Tek) y se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser procesadas por inmunofluorescencia para detectar células IgG<sup>+</sup>, IgA<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> (probablemente productoras de anticuerpos).

Para los conteos celulares se procesaron los tejidos de los cinco corderos que eliminaron mayor cantidad de huevos (todos fueron de la raza Cb), los cinco corderos que eliminaron menor cantidad de huevos (todos fueron de la raza y Bb) y los corderos de los grupos testigos. Las correlaciones estadísticas, los conteos de subpoblaciones linfocitarias y de células plasmáticas fueron realizados a partir de estos animales.

### **Tinción verde metil pironina para determinación de plasmáticas totales**

Los tejidos fijados en paraformaldehído se deshidrataron con etanol en grado ascendente 60°, 70°, 80°, 90°, 96° y finalmente con etanol absoluto. Los tejidos se embebieron en parafina, a los bloques obtenidos se les realizaron cortes de 5 µm con un criotomo. Los cortes obtenidos fueron desparafinados, rehidratados y posteriormente fueron sumergidos en colorante verde Metil Pironina por 5 minutos. Los cortes teñidos se lavaron en agua destilada y se destiñeron con acetona por 30 segundos, posteriormente se deshidrataron con alcoholes en grados ascendente y se sumergieron en xileno. Los cortes obtenidos se

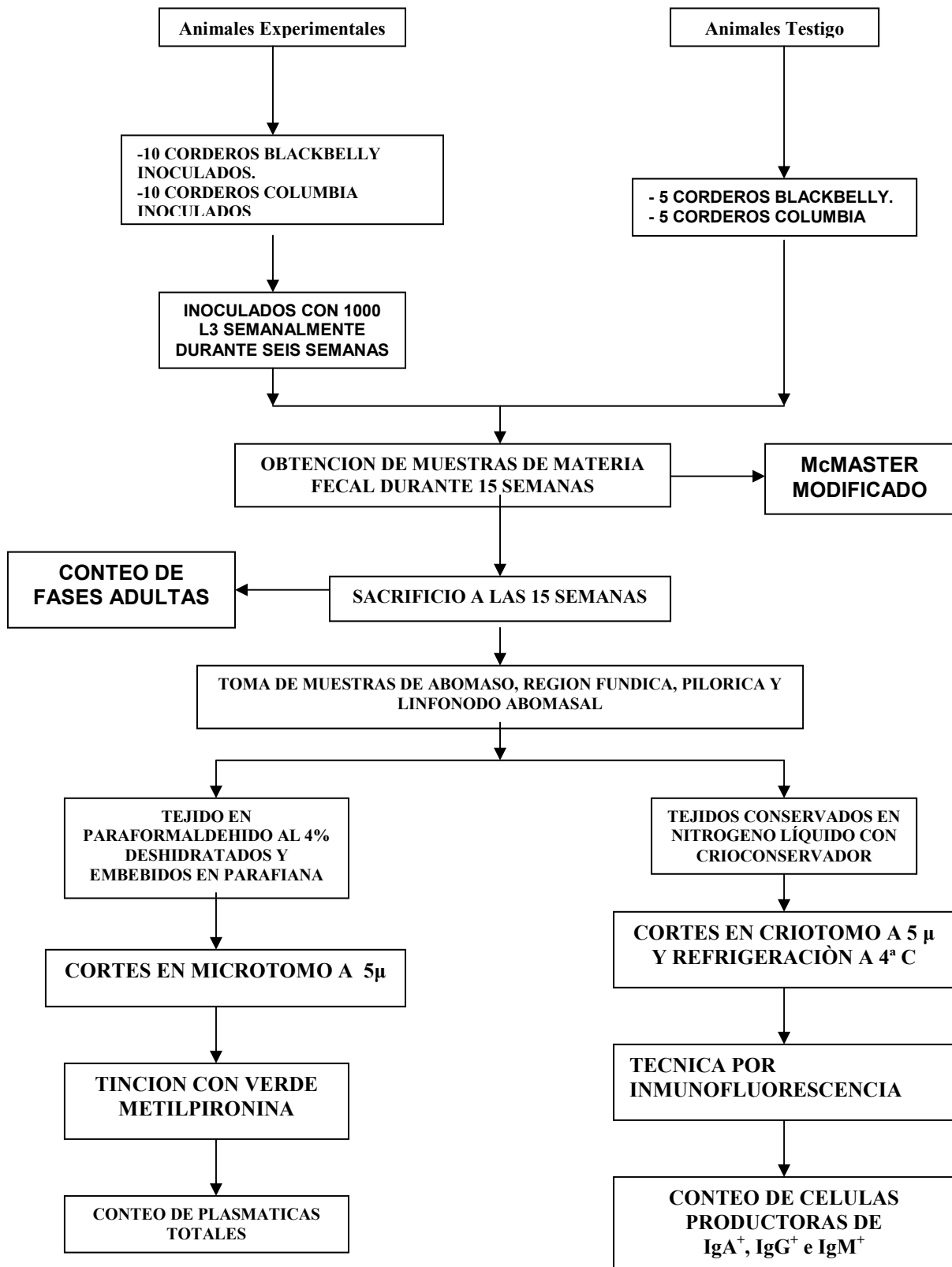
montaron con resina para su conservación. El conteo de las células plasmáticas se efectuó en base a su reacción metacromática y su morfología (Estrada, 1982).

### **Determinación de células productoras de IgA, IgG e IgM.**

Con un criotomo se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de cada una de las muestras conservadas en nitrógeno líquido. Los cortes obtenidos fueron adheridos a portaobjetos con poli-L-lisina (SIGMA LABS) para evitar el desprendimiento del tejido. Posteriormente, fueron fijados en acetona durante 3 minutos y adheridos a portaobjetos (laminillas), los cuales se conservaron en refrigeración a 4°C. hasta su procesamiento para la técnica de inmunofluorescencia.

Posteriormente, las laminillas se sumergieron por 24 horas en PBS a 4° C. Al término se bloquearon con Albúmina Sérica Bovina 1% (ABS) más suero de cabra al 10% durante 90 minutos. Posteriormente, recibieron 3 lavados con PBS, cada lavado de 5 minutos. Inmediatamente después, se incubaron a 37 °C con 40  $\mu\text{l}$  de anticuerpos de conejo anti IgA ( A 130-108 A-2), Anti IgG ( A 130-101 A-5 ) o Anti IgM ( A130-109 A-3 ) ovinas en PBS-ABS 2% durante 90 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron por 90 minutos a 37 °C con 30  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo fluoresceínado 1:25 en PBS con suero de cabra al 10%. Por último, transcurrido dicho tiempo se realizaron 3 lavados cada 5 minutos con PBS y se montaron en glicerol al 90% (Olwyn y Westerwood, 2002). Concluido el proceso, se contó el número de células marcadas con fluorescencia en la mucosa con un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS Inc.) y las cuentas fueron expresadas como número de células por campo.

## DIAGRAMA DE FLUJO





## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de los conteos celulares se analizaron por una prueba de ANOVA factorial utilizando el Software Statistica for Windows. Se utilizó una correlación de Pearson para todas las variables de cada raza.

## RESULTADOS

Los resultados semanales de la eliminación de hgh por los animales experimentales se ilustran en la figura 3 (El conteo de hgh y de fases adultas al sacrificio fue realizado y presentado como parte de la tesis de licenciatura de Cuenca y Cuenca en 2005). En la tercera semana del experimento los animales de ambas razas comenzaron a eliminar huevos de *Haemonchus contortus* en la materia fecal. A partir de la semana 4 y hasta el final del experimento, los animales inoculados de la raza Cb eliminaron mayores cantidades de hgh ( $p < 0.05$ ) que los animales de la Bb siendo los promedios finales de 2402 y 124.3 respectivamente. Los animales no infectados no eliminaron huevos durante el experimento. El número de fases adultas en el abomaso fue significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) en los animales de la raza Cb con respecto a los Bb siendo de 2368 (+/- 780) y 57 (+/- 20.8) respectivamente.

### Conteo de células plasmáticas en abomaso

La tinción de los cortes con verde metil pironina, empleada para la tinción de las células plasmáticas mostró una clara reacción metacromática y dió un contraste bien definido con el resto de las células presentes en cada uno de los campos (figura 4), por lo que se pudo cuantificar en base a la reacción positiva y la morfología a las células plasmáticas presentes en la mucosa abomasal de la región fundica y pilórica respectivamente. En la mayoría de los cortes histológicos se apreció un menor número de células plasmáticas en la zona muscular

en relación a la submucosa abomasal que presentó la mayoría de las células registradas. Los animales infectados de ambas razas mostraron cuentas de células plasmáticas por campo significativamente más elevados ( $P < 0.005$ ) que sus respectivos grupos control en ambas regiones del abomaso. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de corderos Bb y Cb infectados en ninguna de las regiones estudiadas (figura 5, Cuadro1).

La inmunofluorescencia con anticuerpos de conejo específicos para IgA, IgG e IgM, sirvió para identificar y contar células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. El marcaje de las CEL-Ig+ con anticuerpos específicos conjugados con fluoresceína fue principalmente en el citoplasma de las células (figura 6). La mayor parte de las CEL-Ig+ se encontraron en la mucosa abomasal y lámina propia.

El ANOVA factorial de la RFA, mostró un efectos isotipo ( $p < 0.05$ ) y un efecto infección ( $p < 0.001$ ) estadísticamente significativos sobre el número de células CEL-Ig+ por campo. En ambas razas se observaron mayores cantidades de CEL- IgA+ por campo ( $p < 0.05$ ) con respecto a las CEL-IgG+ y CEL-IgM+.

En la región fúndica, los corderos Bb infectados mostraron cuentas de CEL-IgG+ ( $1.86 \pm 0.80$ ) y CEL-IgA+ ( $248 \pm 0.45$ ) por campo mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupos testigo ( $0.13 \pm 0.08$  y  $0.60 \pm 0.14$  respectivamente). En la misma región los corderos de la raza Cb solo mostraron mayor numero de cuentas de CEL-IgA+ ( $2.86 \pm 0.47$ ) por campo ( $p < 0.05$ ) que los corderos testigo ( $1.27 \pm 0.87$ ), figura 7 y figura 8. En ninguna de las dos razas se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el número de células IgM+ entre corderos infectados y no infectados (figura 9). No se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los grupos Bb y Cb infectados con ningún tipo de células inmunoglobulinas positivas.

El ANOVA factorial de la RPA mostró de igual forma que en la RFA los efectos significativos por el isotipo ( $p < 0.05$ ) y la infección ( $p < 0.05$ ) sobre el número de CEL-Ig+ por

campo. Ambas razas mostraron cuentas más altas de CEL-IgA+ en forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las CEL-IgG+ y CEL-IgM+. Los corderos Bb y Cb infectados mostraron cuentas de CEL-IgA+ ( $3.48 \pm 0.80$  y  $4.65 \pm 1.72$  respectivamente) significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) que sus grupos testigo ( $1.10 \pm 0.67$  y  $0.91 \pm 0.81$  respectivamente), no se presentaron diferencias significativas entre los grupos experimental y testigo con respecto a las CEL-IgG+ y CEL-IgM+ figuras 7, 8 y 9). No se establecieron diferencias entre los grupos Bb y Cb infectados con ningún tipo de células con inmunoglobulinas.

No se observó significancia estadística ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas (cuadros 2 y 3).

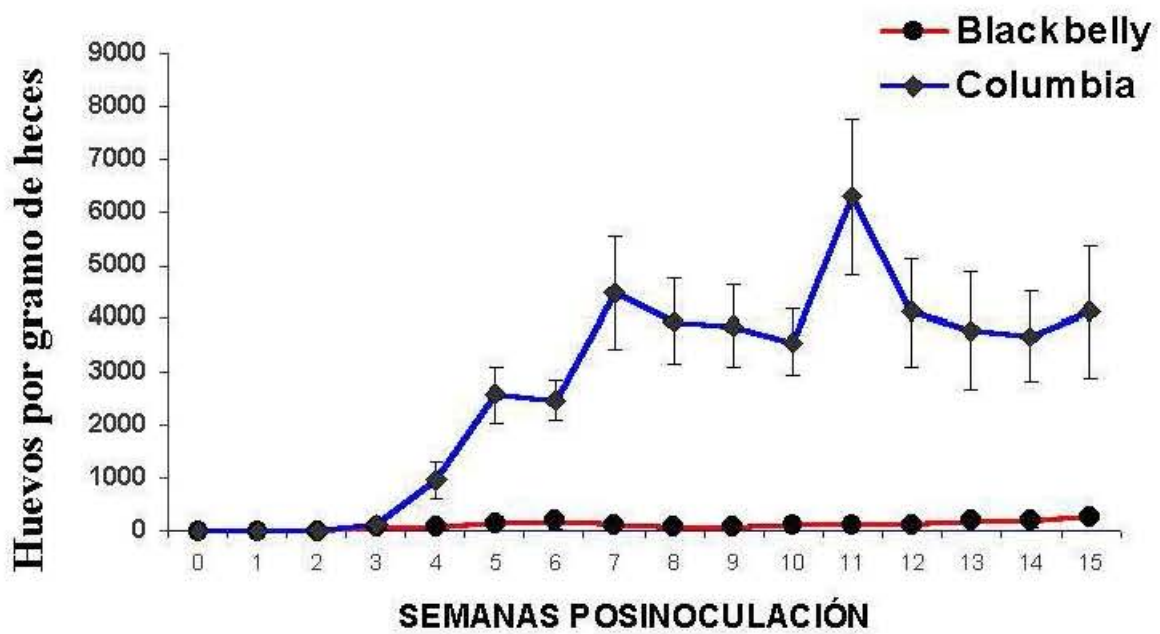


Figura 3. Promedio + desviación estándar de la eliminación semanal de hgh de *Haemonchus contortus* en corderos Blackbelly y Columbia inoculados experimentalmente, la gráfica muestra la tendencia a partir de la semana número tres y se aprecia el comportamiento de eliminación entre los ovinos Blackbelly y Columbia. (Gráfica presentada como parte de la tesis de Cuenca y Cuenca, 2005)



**Figura 4.-** Microfotografía de un corte histológico de la mucosa abomasal de un ovino infectado con 6000 larvas de *H. contortus* (objetivo 40x) teñido con verde metil pirónina. Las flechas indican la célula verde metil pirónina positivas que fueron consideradas como células plasmáticas.

## Número de células plasmáticas en la mucosa de las regiones abomasales

RAZA	CÉLULA/SUB POBLACION	RFA TESTIGO	RFA INOCULADOS	RPA TESTIGO	RPA INOCULADOS
Blackbelly	Plasmaticas (VMP)	0.16±0.16	1.13±0.67	0.38±0.20	1.39±0.24
	IgG+	0.13±0.14	1.86±1.80	0.19±0.26	0.70±0.67
	IgA+	0.60±0.25	2.48±1.01	1.10±1.17	5.34±1.31
	IgM+	0.14±0.08	0.56 ±0.21	0.06±0.03	0.91±0.66
Columbia	Plasmaticas (VMP)	0.09±0.49	1.52±0.18	0.09±0.03	1.36±0.43
	IgG+	0.63±1.01	1.36± 0.92	0.25±0.28	1.81±1.86
	IgA+	1.27±1.52	2.86± 1.06	0.91±1.41	6.04±3.99
	IgM+	0.70±0.9	1.35±0.66	1.07±1.37	1.04±0.62

Cuadro 1.- Número de células plasmáticas (verde metil pironina positivas), células IgG+, IgA+ e IgM+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con larvas de *Haemonchus contortus*.

Cuadro 2.- Correlación de eliminación de huevos por gramo de heces (hgh) y células plasmáticas de la región fúndica abomasal de corderos de alta y baja eliminación de hgh infectados experimentalmente con 6000 larvas de *H. contortus*.

	Hgh	CEL-VMP+	CEL-IgG+	CEL-IgM+	CEL-IgA+
Hgh	1.0				
CEL-VMP+	0.39	1.0			
CEL-IgG+	-0.17	-0.02	1.0		
CEL-IgM+	0.61	0.31	0.21	1.0	
CEL-IgA+	0.42	0.44	0.01	-0.02	1.0

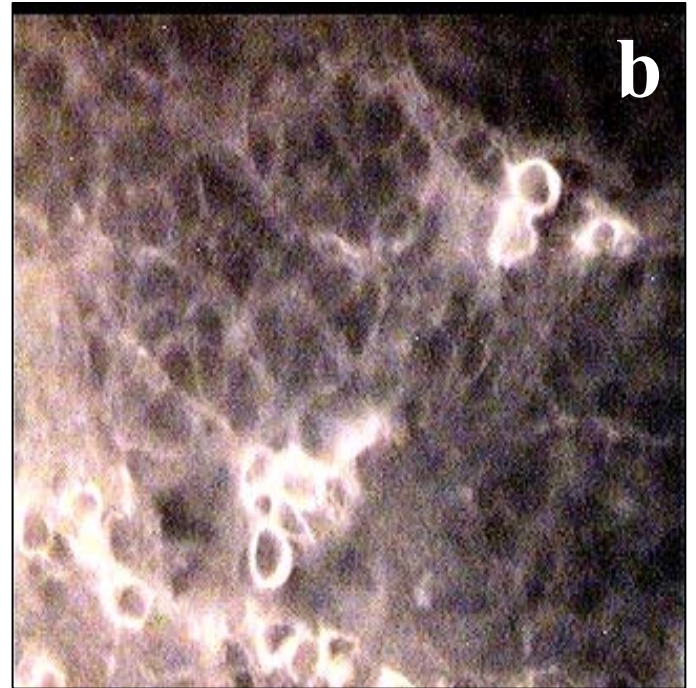
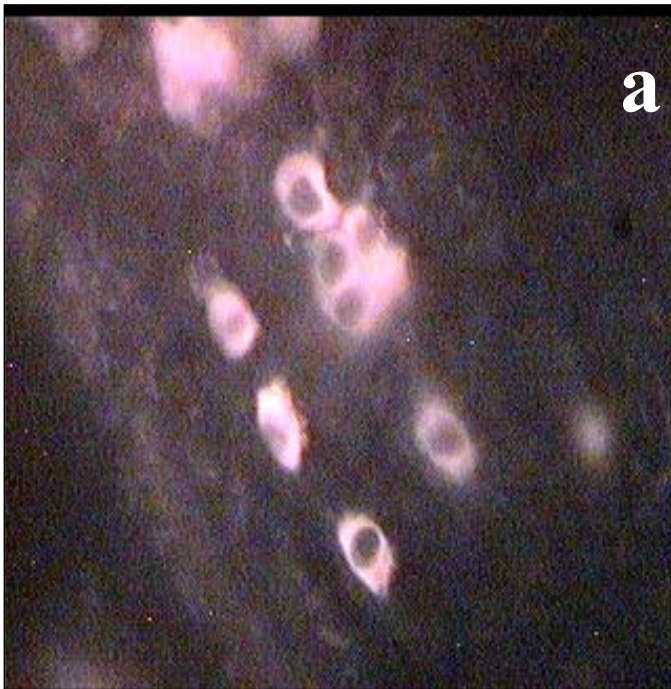
Hgh, huevos por gramo de heces; CEL-VMP+, Células Verde metil pironina positivas; CEL-IgG+, Células Plasmáticas IgG positivas; CEL-IgM+, Células Plasmáticas IgM positivas; CEL-IgA+, Células IgA positivas.

Cuadro 3.- Correlación de eliminación de huevos por gramo de heces (hgh) y células plasmáticas de la región pilórica abomasal de corderos de alta y baja eliminación de hgh infectados experimentalmente con 6000 larvas de *H. contortus*.

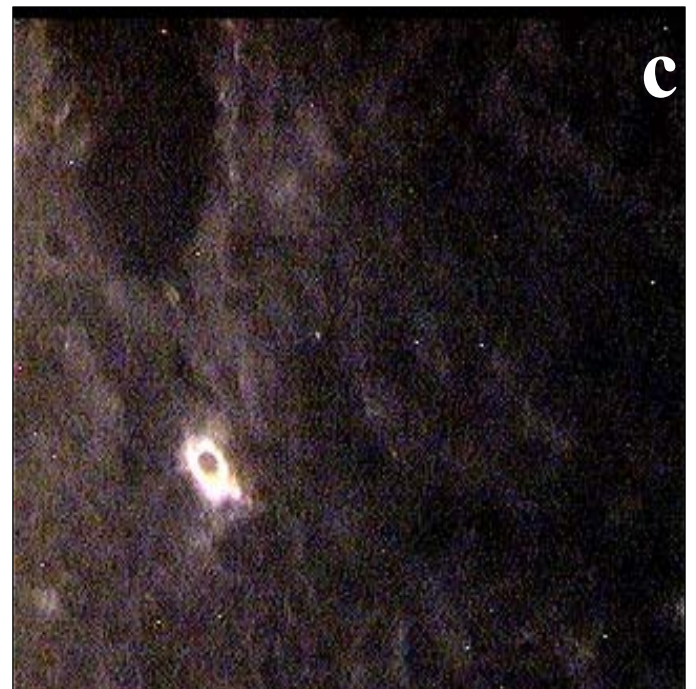
	Hgh	CEL-VMP+	CEL-IgG+	CEL-IgM+	CEL-IgA+
Hgh	1.0				
CEL-VMP+	0.14	1.0			
CEL-IgG+	0.50	0.46	1.0		
CEL-IgM+	0.05	0.40	0.53	1.0	
CEL-IgA+	0.03	0.43	0.064	0.60	1.0

Hgh, huevos por gramo de heces; CEL-VMP+, Células Verde metil pironina positivas; CEL-IgG+, Células Plasmáticas IgG positivas; CEL-IgM+, Células Plasmáticas IgM positivas; CEL-IgA+, Células IgA positivas.





**Figura 6.-** Microfotografías de cortes histológicos de la mucosa abomasal de ovino (objetivo 40 x) procesados por inmunofluorescencia para el marcaje de las distintas Inmunoglobulinas positivas. a) IgA+, b) IgG+ y c) IgM+



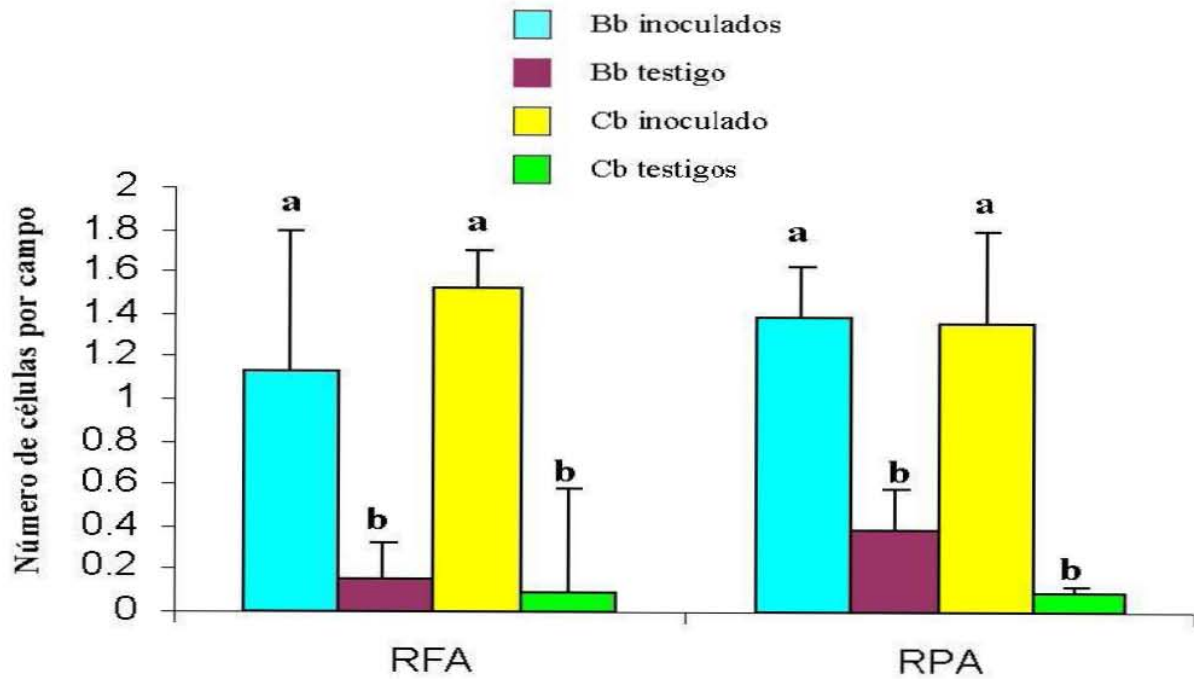


Figura 5.- Células plasmáticas (verde metil pironina positivas) por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de *Haemonchus contortus*.

Letras iguales= no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).  
 Letras diferentes = Hay diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ )

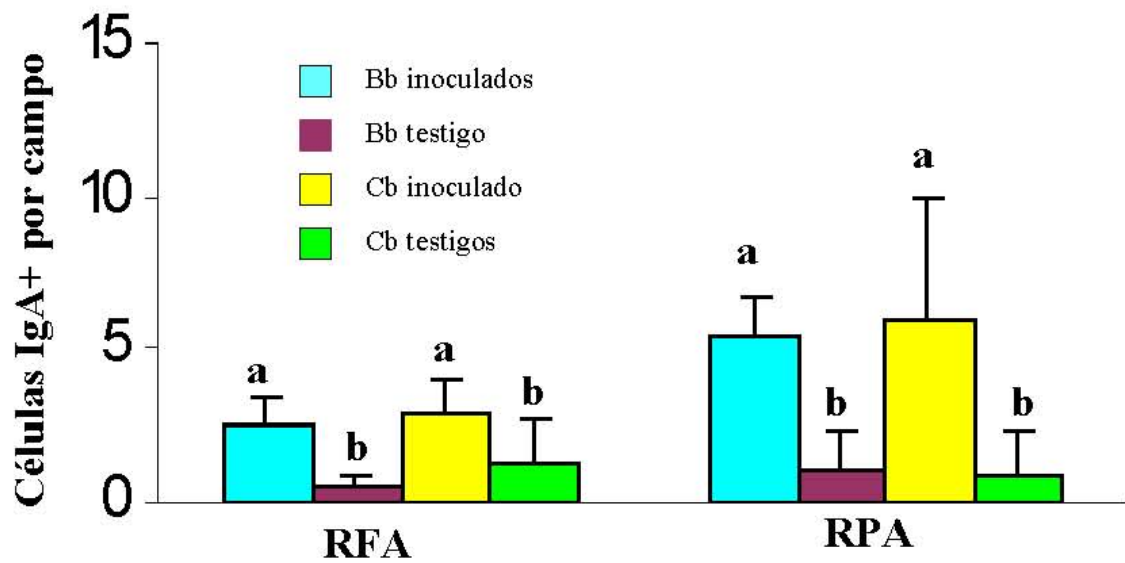


Figura 7.- Células IgA+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de *Haemonchus contortus*.

Letras iguales= no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).

Letras diferentes = Hay diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ )

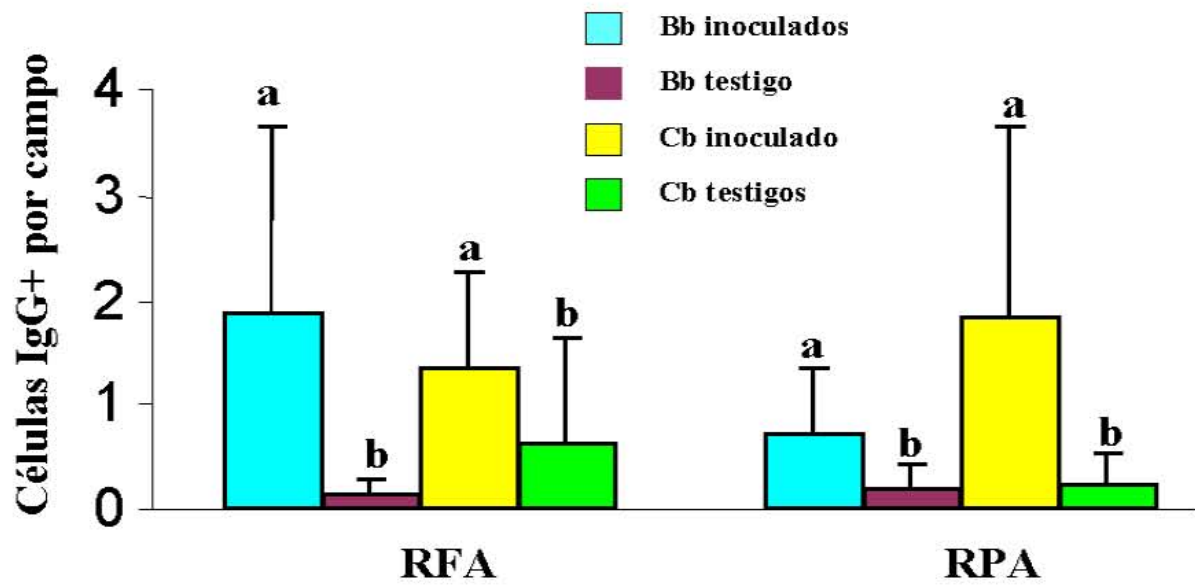


Figura 8.- Células IgG+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de *Haemonchus contortus*.

Letras iguales= no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).

Letras diferentes = Hay diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ )

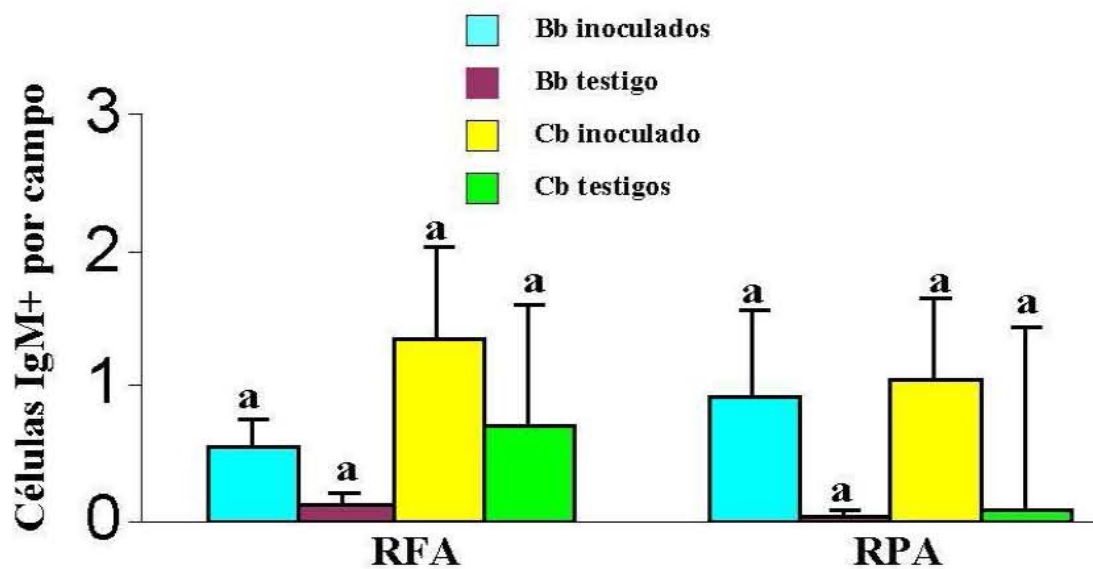


Figura 9.- Células IgM+ por campo presentes en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con 6000 larvas de *Haemonchus contortus*.  
 Letras iguales= no hay diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).  
 Letras diferentes = Hay diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ )

## DISCUSION

La hemoncosis es una de las enfermedades económicamente más importantes de los ovinos de México y de otras partes del mundo. Produce retraso en el crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, bajos índices de fertilidad y ocasionalmente muertes en animales jóvenes (Soulsby, 1988). El control de esta enfermedad usualmente se ha realizado por medio de antihelmínticos como las lactonas macrocíclicas, los benzimidazoles y los Imidazoles (Quiroz, 2000). Sin embargo, la aparición de cepas de gusanos resistentes a estos fármacos a obligado a recurrir a nuevas opciones de control, como el uso de hongos nematófagos, vacunas, rotación de potreros y uso de razas de baja susceptibilidad a la hemoncosis. Existen diferencias de susceptibilidad entre las razas de ovinos. Se han encontrado razas de alta y baja susceptibilidad a la hemoncosis, sin embargo no se han determinado las razones de esta diferencia y si estas repercuten en el comportamiento fisiológico del hospedero.

La resistencia a la hemoncosis se define como la habilidad de los animales para prevenir el establecimiento de las fases larvarias y/o promover la eliminación espontánea de las fases adultas, lo cual se refleja directamente en la carga parasitaria de los animales (Bricarello y col., 2004). En este trabajo, el conteo de huevos mostró diferencias en la resistencia a la infección por *H. contortus* en las dos razas estudiadas, los corderos de la raza Bb eliminaron menor cantidad de HGH que los animales de la raza Cb. Los datos anteriores, aunque son una medición indirecta de carga parasitaria han sido utilizados por varios autores como un parámetro de resistencia (Duch y col., 1996; Gauly y col., 2002). Los resultados de este trabajo concuerdan con los encontrados por Muñoz y col. en 2006, en donde encontraron que los borregos de la raza Bb son menos susceptibles que los borregos Cb a la infección por larvas de *H. contortus*.

La infección experimental con *H. contortus* induce la producción de anticuerpos específicos a nivel sistémico. Gill y col. (1993) determinaron la cinética de producción de

anticuerpos a nivel sérico y de extractos de materia fecal de animales genéticamente resistentes y los compararon con la cinética de un grupo no resistente. Ellos detectaron niveles significativamente mayores de IgG1 e IgA en el suero de los resistentes en comparación con los no resistentes entre los días 10 y 31 pi. Si bien la presencia de anticuerpos específicos a nivel sérico es un indicador de infección, los anticuerpos locales probablemente son más importantes en la protección. Por lo anterior, en esta investigación se trató de contribuir a explicar cómo la inmunidad local tiene que ver con la susceptibilidad y resistencia a la hemoncosis entre las razas Blackbelly y Columbia. Para ello, se cuantificó el número de células plasmáticas en el lugar donde se encuentran los parásitos dentro del hospedero. Por tal motivo, se tomaron muestras del abomaso de las regiones fúndicas (lugar donde se implantan la mayoría de los gusanos adultos) y pilóricas para ser procesadas y luego estudiadas.

La presencia de linfocitos B activados y de células plasmáticas ha sido estudiada por diversos autores a través de marcadores como el CD45R (Pernthaner y col., 1996), CMH-II e inmunoglobulinas (Balic y col., 2000), o solo por la presencia de inmunoglobulinas en el citoplasma (Gill y col., 1993). En el presente estudio, se consideró como célula plasmática aquella presente en cualquiera de las dos regiones de la mucosa abomasal que tuviera metacromacia positiva a la tinción con verde metil pironina y que correspondiera a la morfología típica de una célula plasmática (Estrada, 1982). La infección produjo un aumento de las células verde metil pironina positivas en la mucosa abomasal de los corderos de ambas razas (efecto infección significativo  $p < 0.001$ ) y en ambas regiones del abomaso, no se observaron diferencias significativas entre los corderos infectados de ambas razas. Sin embargo, se observaron bajas correlaciones entre las células verde metil pironina con las CEL-Ig+ medidas por inmunofluorescencia. Estos resultados hacen pensar en la baja especificidad de este método para la detección de células plasmáticas, puesto que la tinción de

verde metil pironina tiñe células con gran cantidad de RNA en el citoplasma y por lo tanto con una alta síntesis de proteínas que no necesariamente son inmunoglobulinas.

Por otra parte, se realizaron marcajes con anticuerpos fluorescentes anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA para determinar y contar a las células positivas a cada inmunoglobulina (CEL-Ig+) así como su asociación con la presencia o ausencia de *H. contortus*. Los resultados mostraron la presencia principalmente de CEL-IgA+ en ambas regiones del abomaso asociada a la infección (efecto isotipo y efecto infección significativos  $p < 0.05$ ). Los corderos Bb infectados mostraron mayores cuentas de CEL-IgG+ y CEL-IgA+ en la RFA así como de CEL-IgA+ en la RPA con respecto a los Bb no infectados, por otra parte los corderos Cb infectados solo presentaron diferencias significativas en las cuentas de CEL-IgA+ en la RPA con respecto a los Cb no infectados, si embargo, no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el número o tipo de estas células entre los grupos infectados de las razas evaluadas.

El aumento de células IgA+ en la mucosa abomasal es la responsable de que aumenten los niveles de IgA en suero y a nivel local como ha sido reportado por otros autores como, Amarante y col. (2005) que reportaron un aumento en la cantidad de IgA a nivel abomasal en corderos de tres diferentes razas (Suffolk, Ile de Fance y Santa Ines) que fueron infectados con *H. contortus*. En forma similar a lo encontrado en este trabajo no se observaron diferencias entre razas, pese a que una de ellas (Santa Ines) es de baja susceptibilidad a la infección.

Los datos anteriores sugieren que la mayor presencia de CEL-Ig+, principalmente las que producen IgA probablemente constituye un efecto en respuesta a la presencia del parásito, pero no es un factor que esté ligado a la resistencia en los animales, puesto que no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los animales infectados de las dos razas.

Por lo tanto, la resistencia probablemente este asociada a otros factores como la respuesta inmune celular por linfocitos T. En un estudio realizado y presentado como tesis de



licenciatura, Domínguez (2007) utilizando los mismo corderos que en este experimento, encontró que los corderos de la raza Bb infectados con *H. contortus* presentaron mayor números de linfocitos CD4+ ( $P < .001$ ) que los corderos de la raza Cb infectados y que de los corderos testigos de ambas razas. Lo anterior indica que la respuesta inmune de tipo celular es más importante en la protección. Futuros estudios utilizando otro tipo de técnicas como la de hibridación *in situ* probablemente determinen a nivel molecular el tipo de respuesta que es responsable de la resistencia a la hemoncosis en algunas razas de ovinos.

## CONCLUSIONES

- ❖ Los animales infectados de ambas razas mostraron cuentas de células plasmáticas (verde metil pironina positivas) por campo significativamente más elevados ( $P < 0.005$ ) que sus respectivos grupos control en ambas regiones del abomaso.
- ❖ No se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) en el número de células plasmáticas por campo entre los grupos de corderos Bb y Cb inoculados con larvas de *H. contortus*.
- ❖ En ambas razas se observaron mayores cantidades de CEL- IgA+ por campo ( $p < 0.05$ ) con respecto a las CEL-IgG+ y CEL-IgM+.
- ❖ En la región fúndica, los corderos Bb infectados mostraron cuentas de CEL-IgG+ y CEL-IgA+ por campo mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupos testigo.
- ❖ En la región fúndica los corderos de la raza Cb solo mostraron mayor número de cuentas de CEL-IgA+ ( $p < 0.05$ ) que los corderos testigo.
- ❖ En ninguna de las dos razas y en ninguna de las regiones abomasales se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el número de células IgM+ entre corderos infectados y no infectados.
- ❖ En la región pilórica ambas razas mostraron cuentas más altas de CEL-IgA+ en forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las CEL-IgG+ y CEL-IgM+.

- ❖ Entre los grupos experimental y testigo con respecto a las CEL-IgG+ y CELIgM+, no hubo diferencias significativas
  
- ❖ No se observó significancia estadística en ninguno de los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas.
  
- ❖ No se observaron diferencias ( $p>0.05$ ) entre los grupos Bb y Cb infectados con ningún tipo de células inmunoglobulinas positivas.
  
- ❖ El aumento de las células que producen IgA es un efecto en respuesta a la presencia del parásito, pero no es un factor que esté ligado a la resistencia en los animales, puesto que no se observó diferencia significativa ( $p> 0.05$ ) entre los corderos infectados de las dos razas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. K., Lichtman, A. H., 2004. Inmunología celular y molecular. Elsevier Science, and Elsevier imprint, Madrid España.
- Alba. H. F. 2007. Parasitología Veterinaria (Manual de laboratorio). Editorial UNAM. México.
- Amarante, A. F. T. C., Craig, T. m. Ramsey, W.S., Davis, S.K., Bazer, F. W 1999. Nematode Burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. Vet. Parasitol. 80: 311-324.
- AMCO. 2000. Rustico y prolífico, el Blackbelly. La revista del Borrego. 5. Editorial Elipse.
- Balic, A., Veron, M. B., Els, N. T. M. 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematod infection in ruminantes. Adv. Parasitol. 45. 182 – 227.
- Blood, D.C., Radostis, O. M., Henderson, J.A., Arrundel, J.H., Gay, C.C., 1986. Medicina veterinaria 7ª Ed. Interamericana México.
- Bricarello P., Gennari T., Olivero-Squeira T., Vas C., Goncalves I., Echeverria F., Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small Rum Res. 2004, 51, 75-83.
- Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martinez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernandez, R.S., Navarrete, L.C.I., Diez, B.P., Quiroz, R.H., Carvalho.V.H. 2000. Parasitología Veterinaria. Mac Graw Hill Interamericana. Madrid España.
- Courtney,C.H., C.F. Parker, K.E. McClure, and R.P. Herd. 1985. Rersistence of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. Int. J.Parasitology 15: 101-109.
- Cuéllar O.J.A. 1986 P.Pijoan J. Tórtora Principales enfermedades de los ovinos y caprinos (Parasitosis del Aparato Digestivo) Ed. P.PIOJAN., J. TORTORA Coordinación de posgrado FESC México.
- Cuéllar, O.J.A. 1992. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo en ovinos y caprinos. Mem. Curso: principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Cuéllar O. J. A. 2003. Agentes etiológicos de la nematodiasis gastrointestinal en los diversos ecosistemas de México. Laboratorio de Parasitología . Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Cuenca, V., C., Cuenca, V. N.. Comparación de la cantidad, tamaño y proliferación de fases adultas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Black belly. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2005.

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

Domínguez M. R.. Correlacion de Mastocitos Abomasales y Subpoblaciones Linfocitarias en ovinos Blackbelly y Columbia inoculados Experimentalmente con *Haemonchus contortus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2007.

Douch, P. G. C., Green, R. S., Morris C. A., Macewan J. C., Windon R. G. Phenotypic markers for selection of nematode resistant sheep. Int. J. Parasitol. 1996; 26 (8-9): 899 - 911.

Duun, A. M. 1993. Hemintología. Editorial el Manual Moderno. México.

Dwight D., Bowman M, S., Georgis. Parasitología para Veterinarios El Sevier España S.A., 2004.

Estrada, F., Z. P., y Rivas M. Manual de Tecnicas de Histología AGT Editor S.A., Mexico 1982.

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

Gaully, M., Kraus, M., Vervelde, L., Van Leeuwen, M. A. W., Erhardt, G. Estimating genetic differences in natural resistance in Rhon and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 2002; 106: 55 - 67.

Gill H.S., Watson D.L., Brandon M.R., 1993. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemochus contortus* in sheep. Immunology 78: 43-49.

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

Hoste y col., 2000; 23-. Hoste, H. Clinical findings, Patophysiology and pathogenesis of parasitic nematode infections in goats. 1er. Curso internacional de nuevas perspectivas en el Diagnóstico y Control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes, Yucatán, México, 2000.

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

Lady S.J., Woolaston R.R., Barger I.A. Comparación de las estrategias genéticas y no genéticas para el control de nematodos gastrointestinales de ovejas. Industrias del ganado CSIRO, Laboratorio de F. D. Mc Master, Chiswick, bolso bloqueado 1, Armidale NSW 2350, Australia 4 de marzo de 81 2003 11-23.

Lapage, 1976; 26-. Lapage, G. 1976. Parasitología veterinaria Editorial Continental. México 121-127.

Liébano H E., Vázquez P V y Cid R A, determinación de larvas infestantes de nemátodos gastroentéricos en pasto durante dos periodos del año en un clima tropical húmedo Aw; Técnica pecuaria en México.1992: 30(1) 31-36

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

Martín W B. DVSM pH D. ID Artken. Enfermedades de la oveja Segunda edición Acribia S.A. Zaragoza España. 2000.

McClure, S. Sheep immunity to gastrointestinal nematode parasites review 2000. C SIRO Livestock Industries, F.D. McMaster Laboratory, Locked Bangli Armidale NSW 2350 (Australia).

Maena M. A., Rojo, V.F.A. Tricostongilosis y otras nematodosis en parasitología veterinaria Edt. Por Cordero, C.M y RojoV.F.A. Ed. Mc Grw-Hill Interamericana México. 1999.

Miller, J.E., M. Bahirathan, S.L. Lemarie, F. G. Hembry, M. T. Kearney, and S.R. Barias 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in suffolk and Gulf Coast Native Sheep With special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitology 74: 55-74.

Montaraz J.A. Introducción a la inmunología Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Impreso y hecho en México. 1997.

Morteo-Gómez Rubén González G.R., Torres H.G., Nuncio O.G., Becerril P.C., Gallegos S.J. y Aranda I.E. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales Agrociencia Vol. 38 p 4.

Muñoz-Guzman, M:A., Cuellar-Ordaz, A., Valdivia-Anda, G., Bundia-Jimenez, J.A. and Alba-Hurtado, F. (2006) Correlations of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. Can. J. Anim. Sci. 86: 363-371.

Newton S. E. Progress on Vaccination against *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 1995; 25 (11): 128 - 129.

Olwyn H, Frank M. R. Westerwood Practical immunology Edition Fourth Edit 2002.

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

Preston, J.M., and E. W. Allonby. 1979. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* in Kenya. *Res.Vet. Sci.* 26: 134- 139

Pugh D. G, *Sheep y Goat Medicine*, W. B. Saunders Company, Printed in USA 2002.

Quiroz R. H., *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*, 9ª ed. Limusa México, 2000

Quiroz Romero. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*, 10ª ed. Limusa México, 2003.

Radostits O.M., C.C. Gay, D.C. Blood. KW Hinchcliff . *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, y equino* Vol. II Novena Ed. Mc.Graw Hill. Interamericana. 2002.

SAGARPA <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/> Noviembre, 2002

Shallig H.D.F.H. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus* *Parasitology*. Cambridge University Press. 2000. 120, S63-S72

Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* 7ª edición Interamericana México. 1988.

Stites P. D., Stobo J. D. *Inmunología Básica y Clínica*, El Manual Moderno editorial. México 1983.p 14,

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

Urquhart G M., Armour J, J.L. Duncan. *Parasitología Veterinaria* Acriba S:A. Zaragoza España. 2001.

Van Wyk J.A., Bath G.F., 1998. The need for alternative methods to control nematode parasites of ruminant livestock in South Africa. Department of Veterinary Tropical Diseases; Pretoria South Africa

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