

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *Haemonchus  
contortus* EN RAZAS OVINAS DE ALTA Y BAJA SUSCEPTIBILIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN**

**TUTOR: Dr. FERNANDO ALBA HURTADO**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. SERGIO RODRÍGUEZ CAMARILLO**

**Dr. JORGE L. TÓRTORA PÉREZ**



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.

## **DEDICATORIAS**

Señor: Una vez más te agradezco  
la dicha de vivir y trabajar,  
la siembra es dura... pero la cosecha abundante.

A mi esposa Margarita,  
la ausencia fue necesaria pero exitosa,  
gracias mi amor por tu paciencia.

A mis hijos Julián y Brenda,  
los amo y espero que algún día puedan  
leer y comprender mi trabajo, mientras tanto,  
sigan siendo mis niños.

A mis padres Elizabeth y Rufo,  
sin su impulso inicial muchas cosas no serían posibles,  
entre otras, este nuevo logro que también es de ustedes.

A mi querida Universidad.

**Marzo de 2007**

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz por su valiosa y decisiva colaboración en la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Valdivia Anda por su apoyo y asesoría en la medición de los parámetros hematológicos en el presente estudio.

Al M. en C. Alejandro Buendía Jiménez por su apoyo técnico en la realización de los cortes histológicos.

Al Dr. Jorge Luís Tórtora Pérez y al Dr. Sergio Rodríguez Camarillo por su asesoría y buenos consejos como miembros del Comité Tutorial a lo largo de estos casi cuatro años de trabajo.

A los miembros del jurado evaluador, por el tiempo invertido en la revisión de este documento:

**Presidente** Dr. Francisco José Trigo Tavera

**Secretario** Dr. Jorge Luís Tórtora Pérez

**Primer vocal** Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

**Segundo vocal** Dr. Sergio Rodríguez Camarillo

**Tercer vocal** Dr. Marco Antonio Vega López

**Primer suplente** Dr. Froylán Ibarra Velarde

**Segundo suplente** Dr. Fernando Alba Hurtado

Al Dr. Alejandro Martínez Rodríguez por su apoyo incondicional y su buen compañerismo en el laboratorio.

Estimados muchachos, Leonor, José Ángel, Rómulo y Sergio les agradezco su ayuda, espero poder corresponderles a todos suficientemente.

Especialmente al Dr. Fernando Alba Hurtado, una vez más gracias por la confianza y el apoyo brindados en este y muchos otros proyectos.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	1
Generalidades de <i>Haemonchus contortus</i> .....	1
Ciclo biológico .....	2
Fisiopatología de la hemoncosis ovina.....	5
Control de la hemoncosis ovina.....	8
Resistencia y resiliencia a la hemoncosis ovina .....	14
Medición de la resistencia y resiliencia a la hemoncosis ovina .....	18
La respuesta inmunológica a <i>H. contortus</i> .....	19
a) Inducción de la respuesta inmune.....	20
b) Mecanismos inespecíficos de defensa.....	22
c) Respuesta específica humoral.....	26
d) Respuesta específica celular.....	28
Algunos aspectos relevantes de las razas ovinas utilizadas.....	31
El modelo de infección gradual controlada ( <i>trickle infection</i> ) en el estudio de la hemoncosis ovina.....	33
<b>Justificación</b> .....	35
<b>Hipótesis</b> .....	36
<b>Objetivos</b> .....	37
<b>Material y Métodos</b> .....	39
Lugar de realización .....	39
Animales.....	39
Obtención de larvas de tercer estadio de <i>H. contortus</i> .....	39
Experimento 1 .....	40
Experimento 2 .....	40
Determinación de la carga parasitaria .....	41
Determinación de eosinófilos sanguíneos .....	41
Determinación de proteínas totales, albúmina y globulinas séricas .....	42
Determinación de los niveles de pepsinógeno sérico .....	42
Obtención de extractos somáticos de L3 de <i>H. contortus</i> .....	42
Electroforesis de proteínas extraídas de la L3 de <i>H. contortus</i> .....	43
Transferencia de proteínas de <i>H. contortus</i> .....	43
Desarrollo del inmunoblot.....	44
ELISA para determinación de la IgG específica a <i>H. contortus</i> .....	44
Cuentas de eosinófilos, mastocitos y células plasmáticas tisulares en cortes en parafina.....	44
Inmunohistoquímica para la determinación de linfocitos CD4+, CD8+ y WC1+ (gama-delta) en mucosa y linfonodo abomasal .....	45
Inmunofluorescencia para la determinación de células IgM+, IgG+ e IgA+ (CEL-Ig+) en mucosa abomasal .....	45
Análisis estadístico de datos .....	46

<b>Resultados</b> .....	49
I.- EXPERIMENTO 1	
A).- Eliminación de HGH en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	49
B).- Niveles de eosinófilos sanguíneos en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	49
II.- EXPERIMENTO 2	
A).- Eliminación de HGH en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	52
B).- Conteo de fases adultas en el abomaso .....	52
C).- Niveles de pepsinógeno sérico en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	56
D).- Niveles de proteínas totales, albúmina y globulinas en ovinos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	56
E).- Niveles de anticuerpos IgG anti-L3 de <i>H. contortus</i> .....	59
F).- Reconocimiento de antígenos de L3 por corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	59
G).- Conteos de eosinófilos tisulares en abomaso y linfonodo abomasal en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	63
H).- Conteos de mastocitos tisulares en abomaso de corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	68
I).- Conteo de subpoblaciones linfocitarias tisulares en el abomaso y linfonodo abomasal de corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	68
J).- Células plasmáticas e inmunoglobulina-positivas (CEL-Ig+) en tejido abomasal y linfonodo regional en corderos Blackbelly y Columbia infectados con <i>H. contortus</i> .....	74
K).- Coeficientes de correlación de las variables estudiadas.....	78
<b>Discusión</b> .....	83
<b>Conclusiones</b> .....	100
<b>Láminas en color</b> .....	101
<b>Apéndice 1:</b> Muñoz-Guzmán, M.A., Cuéllar-Ordaz, J.A. Buendía-Jiménez, J.A., Valdivia-Anda, G., Alba-Hurtado, F. 2006. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. Can. J. Anim. Sci. 86, 363-371. ....	104
<b>Referencias</b> .....	109

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y LÁMINAS EN COLOR

FIGURA 1. Parte anterior de *Haemonchus contortus* adulto (Urquhart *et al.*, 2001), página 2.

FIGURA 2. Parte posterior de *Haemonchus contortus* macho adulto (Urquhart *et al.*, 2001), página 3.

FIGURA 3. Larva de tercer estadio (L3) de *Haemonchus contortus*, página 4.

FIGURA 4. Fases adultas de *Haemonchus contortus* en el abomaso, página 5.

FIGURA 5. Infección masiva de *Haemonchus contortus* en el abomaso, página 6.

FIGURA 6. Úlcera en la mucosa abomasal producido por infección crónica con *Haemonchus contortus*, página 7.

FIGURA 7. Edema submandibular (cuello de botella) producido por infección crónica con *Haemonchus contortus*, página 8.

FIGURA 8. Ejemplar macho Blackbelly, página 32.

FIGURA 9. Ejemplar macho Columbia, página 33.

FIGURA 10. Diseño del experimento 1, página 47.

FIGURA 11. Diseño del experimento 2, página 48.

FIGURA 12. Media semanal  $\pm$  error estándar ( $\pm$ EE) de los conteos de huevos por gramo de heces (HGH) en corderos Blackbelly y Columbia del experimento 1. Los corderos fueron infectados con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en forma gradual y controlada. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3. Los animales no infectados no eliminaron huevos del parásito en ninguna semana del experimento (datos no mostrados en la gráfica), página 50.

FIGURA 13. Media semanal ( $\pm$ EE) del conteo de eosinófilos sanguíneos en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y animales no infectados en el experimento 1. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito, página 51.

FIGURA 14. Correlación de eosinófilos sanguíneos y huevos por gramo de heces (HGH) en corderos con alta ( $n = 5$ ) y baja ( $n = 5$ ) eliminación de HGH infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en el experimento 1, página 53.

FIGURA 15. Media semanal  $\pm$  error estándar ( $\pm$ EE) de los conteos de huevos por gramo de heces (HGH) en corderos Blackbelly y Columbia del experimento 2. Los corderos fueron infectados con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en forma gradual y controlada. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito. Los animales no infectados no eliminaron huevos del parásito en ninguna semana del experimento (datos no mostrados en la gráfica), página 54.

CUADRO 1. Número de fases adultas de *Haemonchus contortus* recuperadas del abomaso de corderos Columbia y Blackbelly infectados experimentalmente con 6000 L3 del parásito, página 55.

FIGURA 16. Media semanal ( $\pm$ EE) de los niveles de pepsinógeno sérico en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados. las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito, página 57.

FIGURA 17. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de proteínas séricas totales en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito, página 58.

FIGURA 18. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de albúmina sérica en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito, página 60.

FIGURA 19. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de globulinas séricas en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito, página 61.

FIGURA 20. Media semanal ( $\pm$ EE) de los niveles de anticuerpos IgG contra L3 de *Haemonchus contortus* en corderos Blackbelly (Bb) y columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 y corderos no infectados. Se presenta la tendencia lineal de la raza Bb (—) y Cb (---), las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3, página 62.

FIGURA 21. Corrimiento electroforético en gel de SDS-poliacrilamida del extracto proteínico de larva 3 (L3) de *Haemonchus contortus*. Los pesos moleculares de las proteínas están mostrados en kilodaltones (kD), del lado izquierdo se muestran los marcadores estándar de peso molecular (MPM), página 64.

FIGURA 22. Antígenos de L3 de *Haemonchus contortus* reconocidos por el suero de corderos Blackbelly (1 y 2) y Columbia (3 y 4) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 del parásito, los pesos moleculares de los antígenos están mostrados en kilodaltones (kD). Del lado derecho se muestran marcadores estándar de peso molecular (MPM), página 65.



FIGURA 23. Análisis de las medias de frecuencia del reconocimiento de antígenos de L3 por el suero de corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados. Las líneas discontinuas representan los límites de confianza al 95% en cada grafica. La flecha (↓) señala la banda de 95 kd reconocida de manera significativa solo por los corderos Bb infectados, página 66.

FIGURA 24. Media (+EE) de eosinófilos en regiones fúndica abomasal (RFA), pilórica abomasal (RPA) y linfonodo abomasal (LNA) en corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 67.

FIGURA 25. Media (+EE) de mastocitos tisulares en regiones fúndica abomasal (RFA) y pilórica abomasal (RPA) en corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 69.

FIGURA 26. Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gama-delta) en la región fúndica abomasal (RFA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 70.

FIGURA 27. Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gama-delta) en la región pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 71.

FIGURA 28. Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gama-delta) en el linfonodo abomasal (LNA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 73.

FIGURA 29. Media (+EE) de células verde metil pironina positivas (VMP+) regiones fúndica abomasal (RFA) y pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con L3 6000 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 75.

FIGURA 30. Media (+EE) de células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) en la región fúndica abomasal (RFA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 76.

FIGURA 31. Media (+EE) de células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) en la región pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* y corderos no infectados, página 77.

CUADRO 2. Correlación de parámetros parasitológicos y hematológicos en corderos con alta (n = 5) y baja (n = 5) eliminación de HGH, infectados experimentalmente con 6000 L3 de *Haemonchus contortus*, página 79.

CUADRO 3. Correlación de parámetros parasitológicos y células de respuesta tisular (eosinófilos, subpoblaciones linfocitarias y células plasmáticas) de la región fúndica abomasal de corderos con alta (n = 5) y baja (n = 5) eliminación de HGH, infectados experimentalmente con 6000 L3 de *Haemonchus contortus*, página 80.

CUADRO 4. Correlación de parámetros parasitológicos y células de respuesta tisular (eosinófilos, subpoblaciones linfocitarias y células plasmáticas) de la región pilórica abomasal de corderos con alta (n = 5) y baja (n = 5) eliminación de HGH, infectados experimentalmente con 6000 L3 de *Haemonchus contortus*, página 81.

CUADRO 5. Correlación de parámetros parasitológicos y células de respuesta tisular (eosinófilos y subpoblaciones linfocitarias) del linfonodo abomasal de corderos con alta (n = 5) y baja (n = 5) eliminación de HGH, infectados experimentalmente con 6,000 L3 de *Haemonchus contortus*, página 82.

LÁMINA EN COLOR 1: Microfotografías de cortes en microtomo de mucosa y linfonodo abomasal de ovinos, procesados por distintas técnicas de tinción. a) Tinción con azul de toluidina (objetivo 40x), mastocitos en la lámina propia de la cripta abomasal; b) Tinción con azul de toluidina (objetivo 100x), acercamiento a un mastocito; c) Tinción con cromótopo 2R (objetivo 100x), eosinófilos en mucosa abomasal; d) Tinción con cromótopo 2R (objetivo 40x) eosinófilos en linfonodo abomasal; e) Tinción con H.E. (objetivo 40x) infiltración leucocitaria en mucosa abomasal de un animal infectado con *Haemonchus contortus*; f) Tinción con H.E. (objetivo 10x), sección transversal de un *H. contortus* adulto adherido a la mucosa abomasal, página 101.

LÁMINA EN COLOR 2: Microfotografías de cortes en criotomo de la mucosa abomasal de ovinos (objetivo 40x), procesados por inmunofluorescencia para el marcaje de las distintas células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) específicas para IgM, IgG e IgA. a) CEL-IgA+; b) CEL-IgG+; c) CEL-IgM+; d) control negativo; e) y f), mismo campo observado con microscopio de campo claro (izquierda) y microscopio de epifluorescencia (derecha) de un tejido procesado para marcaje de CEL-IgA+, página 102.

LÁMINA EN COLOR 3: Microfotografías de cortes en microtomo de mucosa abomasal de ovinos (objetivo 40x), procesados por inmunohistoquímica para el marcaje de las distintas subpoblaciones linfocitarias. a) linfocitos CD4+; b) linfocito CD8+; c) linfocitos WC1+ (gama-delta); d) control negativo, página 103.

## ABREVIATURAS

ALB	Albúmina sérica.
ASB	Albúmina sérica bovina.
Bb	Raza Blackbelly.
Cb	Raza Columbia.
CEL-Ig+	Células inmunoglobulina positivas.
CEL-IgA+	Células IgA positivas.
CEL-IgG+	Células IgG positivas.
CEL-IgM+	Células IgM positivas.
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad.
EE	Error estándar.
ES	Eosinófilos sanguíneos.
FA	Fases adultas en el abomaso.
FAMACHA®	(Faffa Malan Chart) Tarjeta comparativa para evaluar la coloración de la conjuntiva en los ovinos.
GL	(Globule leucocytes) Leucocitos globulosos.
GLOB	Globulinas séricas.
HGH	huevos por gramo de heces.
kD	Kilodaltones.
L1 a 5	Fase larvaria 1 a 5.
LNA	Linfonodo abomasal.
MDD	Millones de dólares.
NGE	Nematodos gastroentéricos.
OLA	Antígenos leucocitarios ovinos.
OPD	Ortho-phenilendiamine.
p.i.	Pos-infección.
PBS	Buffer fosfato salino.
PT	Proteínas totales séricas.
RFA	Región fúndica abomasal.
RPA	Región pilórica abomasal.
SDS-PAGE	Gel de SDS-poliacrilamida.

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *Haemonchus contortus* EN RAZAS OVINAS DE ALTA Y BAJA SUSCEPTIBILIDAD. Muñoz-Guzmán M. A. TESIS DOCTORAL (2007). FES-CUAUTITLÁN, UNAM.

R E S U M E N

Se compararon algunos parámetros parasitológicos e inmunológicos en corderos de una raza resistente Blackbelly (Bb) y corderos de una raza susceptible Columbia (Cb) a la hemoncosis experimental utilizando infección gradual controlada. Se realizaron dos experimentos, en ambos se inocularon semanalmente con 1000 larvas 3 de *Haemonchus contortus* durante seis semanas a corderos de las razas Bb y Cb. En el primero se determinó durante 15 semanas el número de huevos por gramo de heces (HGH) y de eosinófilos sanguíneos (ES). En el segundo se midió semanalmente: HGH, proteínas plasmáticas, pepsinógeno sérico, IgG sérica anti-L3 de *H. contortus* y por Western blot el reconocimiento sérico de los antígenos de la L3; a las 15 semanas los animales fueron sacrificados y autopsiados para evaluar el total de fases adultas (FA), eosinófilos, mastocitos, células plasmáticas totales, células productoras de inmunoglobulina específica (CEL-Ig+) y subpoblaciones linfocitarias (CD4+, CD8+ y gama-delta) en la región fúndica abomasal (RFA), la región pilórica abomasal (RPA) y el linfonodo abomasal (LNA).

Los corderos Bb en el primer y segundo experimentos mostraron ser más resistentes a la hemoncosis. Los números de HGH en ambos experimentos fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en los corderos de la raza Cb que en los Bb, en el segundo experimento los corderos Cb mostraron también mayor cantidad de FA en el abomaso en comparación a los Bb. Los ES mostraron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en ambas razas desde la semana 5 hasta la 9, posteriormente, en los corderos Bb estos niveles se mantuvieron elevados mientras que en los corderos Cb se observó su disminución súbita. Los niveles de pepsinógeno sérico aumentaron en los dos grupos de corderos infectados pero fueron mayores y por más tiempo en los corderos Cb, además las proteínas plasmáticas estuvieron disminuidas por algunas semanas en esta raza lo que indica su mayor afección por el parásito. Se encontró correlación negativa significativa ( $p < 0.001$ ) entre los niveles de anti-L3 sérica y carga parasitaria (HGH y FA) lo que asocia a la IgG anti-L3 con la resistencia a la hemoncosis. Los corderos Bb mostraron mayor cantidad ( $p < 0.05$ ) de anticuerpos entre las semanas 9 y 15 del experimento que los Cb, los cuáles, en la semana 9 mostraron una disminución en sus niveles de anticuerpos. Por Western blot se detectaron 11 bandas de antígenos de L3 de *H. contortus*, de las que solo los corderos Bb infectados reconocieron en forma significativa una de 95kD. Los linfocitos CD4+ y gama-delta en la RPA tuvieron correlación significativa ( $p < 0.01$ ) y estuvieron en mayor número en los corderos Bb infectados en comparación a los Cb infectados, ambas subpoblaciones en esta región del abomaso tuvieron correlaciones negativas significativas ( $p < 0.01$ ) con la carga parasitaria y estuvieron asociadas a las resistencia a la hemoncosis. Así mismo, la cantidad de eosinófilos tisulares en RPA y en LNA fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los corderos de la raza Bb infectados con respecto a los Cb infectados. Con respecto a los mastocitos y CEL-Ig+, solo se observó un aumento de estas células por efecto de la infección en ambas razas estudiadas sin que estuvieran asociadas a la resistencia. En la RFA no se observaron las mismas correlaciones que en la RPA y en general la respuesta en esta región fue diferente.

En los animales resistentes el aumento y mantenimiento de anticuerpos séricos y de eosinófilos circulantes y locales así como de linfocitos CD4+ concuerda con el desarrollo y mantenimiento de una respuesta inmunológica tipo Th2. El aumento inicial y la posterior disminución de anticuerpos séricos, eosinófilos circulantes y locales en los corderos de la raza susceptibles sugieren una respuesta inicial tipo Th2 y un cambio posterior a una posible respuesta no protectora o inductora de tolerancia.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE BETWEEN HIGH AND LOW SUCEPTIBILITY SHEEP BREEDS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Haemonchus contortus*.

Muñoz-Guzmán M. A. DOCTORAL THESIS (2007). FES-CUAUTITLÁN, UNAM.

Abstract

Parasitological and immunological parameters were compared between Blackbelly (Bb) and Columbia (Cb) lambs experimentally infected with 6000 *Haemonchus contortus* larvae 3 (L3). Weekly fecal egg counts (FEC), blood eosinophils (BE), plasma proteins, serum pepsinogen, serum IgG anti-L3 and L3 antigens recognition were measurement during 15 weeks. Some animals were euthanized to evaluate the total parasite adult phase (AP) counts and tissue eosinophils (TE), mast cells, plasma cells and lymphocyte subpopulations from the fundic (FRA) and pyloric (PRA) abomasal regions and the abomasal lymph node (ALN). The FEC and AP results showed that Bb lambs were more resistant to haemonchosis than Cb lambs. BE had a significantly increase in both breeds, but Bb lambs maintained this high level longer. Increased levels of seric pepsinogen and lower levels of plasma proteins in Cb lambs were indicative of greater damage by the parasite infection on Cb lambs. An association of serum IgG anti-L3 with resistance to haemonchosis was found and a 95 KD antigen was significantly recognized only by IgG from the Bb infected lambs. The CD4+ and gamma-delta+ T subpopulations in the PRA had a negative correlation with parasite load, and were regarded as indicative of resistance to haemonchosis in Bb lambs. In addition, counts of TE in the PRA and LAN were significantly higher in infected Bb lambs than Cb ones. Mast cells and plasma cells counts only increased in infected animals from both breeds, and were not linked to resistance. Cellular reaction was different in FRA than PRA regions of the abomasum. Bb lambs showed sustained increase of serum IgG anti-L3, BE, TE, CD4+ and gamma-delta T lymphocytes, which could be regarded as a Th2 type immune response. The initial increase of seric IgG anti-L3, BE and TE in the Cb lambs suggested an initial Th2 immune response, possibly followed by a non-protective response or tolerance.

**VOLVER AL INDICE**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

La verminosis gastroentérica o gastrointestinal es producida por nematodos gastroentéricos (**NGE**) de varios géneros que interaccionan en el tracto digestivo de los rumiantes y traen como consecuencia importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Por su amplia distribución y sus repercusiones en la salud y la producción ovina en México y otros lugares del mundo *Haemonchus contortus* es considerado el NGE más importante de los ovinos debido a su amplia distribución y a su virulencia (Quiroz, 2000). La hemoncosis ovina es endémica en las regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (Mugambi *et al.*, 1997). El impacto negativo de esta parasitosis se refleja en la eficiencia biológica y económica de los rebaños ovinos, produciendo retraso en el crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, bajos índices de fertilidad y mortalidad en animales jóvenes (Soulsby, 1982; Quiroz, 2000). En algunos países ha sido posible estimar los costos anuales por los tratamientos a estas parasitosis, se calculan gastos cercanos a los 26 millones de dólares (MDD) en Kenya, 46 MDD en Sudáfrica y en 103 MDD en la India (Waller y Chandrawathani, 2005).

En México la hemoncosis ovina causa alta mortalidad en los rebaños y reduce la producción y la rentabilidad, el curso agudo de la enfermedad causa cuantiosas pérdidas por muertes sobre todo de animales jóvenes, el proceso crónico causa mermas en la producción principalmente por retraso en el crecimiento de los animales (Cuellar, 1986).

### **GENERALIDADES DE *Haemonchus contortus*.**

Algunos nombres con los que se conoce a este parásito son: Gusano grande del estómago, gusano contorneado, parásito del cuajar y gusano poste de barbería (Borchet, 1981). Se encuentra en abomaso de ovinos y caprinos principalmente, en algunas ocasiones se le encuentra en los bovinos y rumiantes silvestres. El parásito es hematófago, en estado fresco da un aspecto de palo de barbería, debido al color rojo del intestino con

sangre y al color blanco de el ovario enrollados en espiral. El macho mide de 10 a 20 mm de largo. La hembra mide de 18 a 30 mm de largo (Levine, 1978; Kassai, 1998).



Figura 1. Parte anterior de *Haemonchus contortus* adulto (Urquhart et al., 2001).

En el extremo anterior (figura 1) existe una boca en donde hay una lanceta dorsal con la que erosionan la mucosa gástrica. Posee dos papilas cervicales espinoides prominentes y laterales cerca de la unión del primer y segundo cuarto del esófago (Borchet, 1981; Cordero *et al.*, 1999). En el extremo posterior (figura 2), el macho posee una bolsa copultriz muy desarrollada, caracterizada por la asimetría del lóbulo dorsal. La hembra tiene una solapa o labio vulvar muy prominente (Bowman, 2004). Los huevos inmaduros son típicamente ovales, miden aproximadamente 70 X 46  $\mu\text{m}$  con 4 células blastoméricas al inicio y cuando están recién ovipositados poseen de 11 a 26 células, ésta es la forma que comúnmente se observa cuando salen con las heces al exterior (Nikolaou y Gasser, 2006). Los huevos son indiferenciables de los de otros NGE, tienen una típica forma ovoide, con un embrión blastomérico en el interior (Soulsby, 1987).

### **Ciclo biológico.**

El ciclo biológico es directo y fue descrito originalmente por Veglia en 1915 (Nikolaou y Gasser, 2006). Los animales parasitados albergan en el abomaso a las fases adultas, la excreción de huevos es variable y depende de la edad, estado fisiológico o inmunitario del hospedador y de la prolificidad del parásito. Las hembras de *H. contortus* son muy prolíficas, producen en promedio 4,500 huevos por día. La producción aumenta hasta que se alcanza una puesta máxima aproximadamente por el día 33 post-infección (Nikolaou y Gasser, 2006).

Una vez eliminados en la materia fecal, los huevos requieren de humedad temperatura y oxígeno para la embriogénesis. En las siguientes 10 horas el embrión crece tres veces la longitud del huevo y se enrolla en su interior, a las 17 horas aproximadamente emerge la primera fase larvaria o larva 1 (L1) del huevo (eclosión) y se alimenta de bacterias del medio donde se encuentra. Esta fase crece rápidamente y al completar su crecimiento, una cutícula que viene desde el interior, reemplaza a la vieja que queda separada del cuerpo (primera ecdisis), esta cutícula se elimina a medida que la larva se activa y se transforma en L2.

En esta etapa es más activa y nada con facilidad en el agua, también se alimenta de bacterias hasta que el crecimiento se detiene con la iniciación de la segunda ecdisis. La larva queda quieta durante pocas horas, muda su epidermis en uno a dos días, pero ésta no se elimina y si bien sirve como

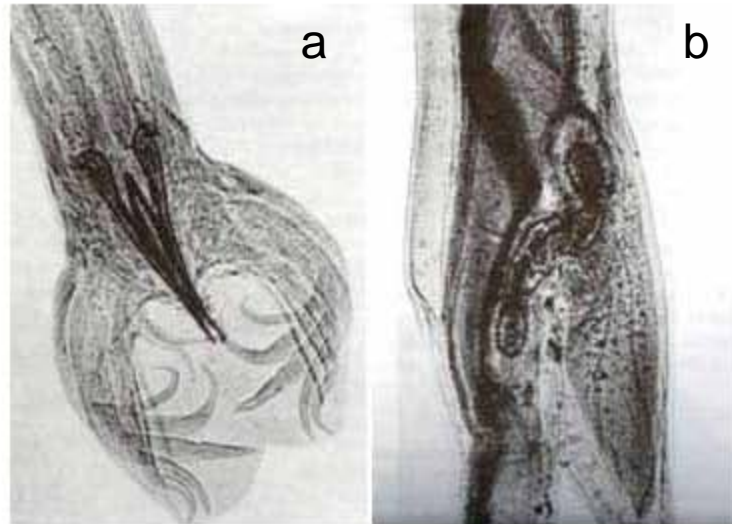


Figura 2. Parte posterior de *Haemonchus contortus* adulto. a) Hembra, b) Macho (Urquhart et al., 2001).

una vaina protectora, también impide que la larva se alimente. Después de esta nueva muda, al cabo de 4-6 días se forma la L3 (figura 3). Ésta es la fase infectante para los hospedadores definitivos, se mantienen de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células intestinales y los lípidos almacenados en su cuerpo como fuente de energía, pudiendo vivir sin alimentarse alrededor de seis meses (Lapage, 1984).

La L3 es muy activa y es capaz de desplazarse verticalmente sobre superficies húmedas de los vegetales, presenta hidrotropismo y termotropismo positivos, fototropismo y geotropismo negativos lo que las lleva a buscar la parte alta de los pastos cuando estos están húmedos y con poca luz solar (pasto fresco y húmedo en las primeras horas de la mañana) esta situación favorece la ingestión de las larvas por parte del ganado (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz, 2000).



La L3 no resiste la desecación ni las bajas temperaturas (Soulsby, 1987). En circunstancias óptimas, el desarrollo de la L3 se alcanza de 4 a 7 días. La dispersión horizontal de estas larvas se ve favorecida por diferentes factores entre los que se encuentran el viento y la lluvia que favorecen la desintegración fecal, así como la dispersión mecánica por efecto del ganado al desplazar con sus patas la materia fecal, los insectos, ácaros coprófagos y las lombrices de tierra. Algunos hongos del género *Pilobolus* son capaces de lanzar con sus esporas a las larvas hasta un metro y medio de distancia del bolo fecal, esto es importante de considerar debido a que los animales no consumen el forraje que se encuentra cerca de la materia fecal (Lapage, 1984; Cordero *et al.*, 1999).

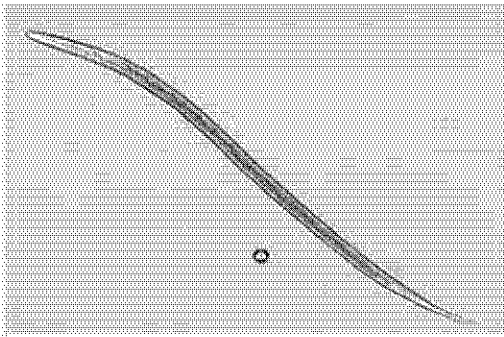


Figura 3. Larva de tercer estadio (L3) de *Haemonchus contortus*.

La infección de los animales se realiza por la ingestión de la L3 con el pasto. En los 30 minutos posteriores a la ingestión, la larva pierde la vaina en el aparato digestivo del animal por efecto de diversos estímulos del hospedador (amortiguador  $\text{HCO}_3\text{-CO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  gaseoso). El  $\text{CO}_2$  hace que la larva secrete un fluido de muda que actúa sobre la cutícula

provocando su ruptura, con lo que la larva ayudada por sus movimientos puede salir. El líquido de muda contiene una aminopeptidasa-leucínica que actúa sobre la cutícula de la larva en un área de aproximadamente  $20\mu\text{m}$  a partir del extremo anterior (Lapage, 1984; Cordero *et al.*, 1999).

En el hospedero, las L3 de *H. contortus* se desplazan al abomaso después de haber eliminado la vaina en el rumen, penetran a las glándulas gástricas de la mucosa en lo que se denomina “etapa histotrófica o tisular” (Soulsby, 1987), teniendo afinidad por la mucosa de la región fúndica (Cordero *et al.*, 1999). En la mucosa se alimenta de sangre, crece y muda a L4 en el interior de las glándulas o profundamente en los espacios entre las criptas. A diferencia de *Teladorsagia circumcincta*, este parásito no permanece mucho tiempo en la mucosa por lo que los cambios histológicos en la región glandular no llegan a ser tan grandes y no forma nodulaciones en la mucosa. Después se transforma en L5 o fase juvenil

que madura sexualmente y pasa a estado adulto (figura 4). Tras la cópula las hembras empiezan a producir huevos aproximadamente a los 21 días post-infección con un máximo de eliminación hacia el día 26, cerrándose así el ciclo (Jacobs *et al.*, 1995).



Figura 4. Fases adultas de *Haemonchus contortus* en el abomaso.

El desarrollo larvario puede detenerse en el hospedador por 4 o 5 meses, inmediatamente después de formada la L4. Aunque la naturaleza exacta del estímulo no esta perfectamente aclarada, el fenómeno llamado **hipobiosis** o inhibición larvaria, tiene lugar cuando las condiciones ambientales son adversas durante los meses fríos o secos (Blitz y Gibbs, 1971). Al parecer la capacidad de inhibición del desarrollo es un carácter heredable y se considera una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador, a factores ambientales adversos o a ambos a la vez (Cordero *et al.*, 1999; Nikolaou y Gasser, 2006). La tasa de larvas que entran al estado de hipobiosis se incrementa durante el otoño e invierno, esto permite que la cuarta larva se conserve en la pared abomasal durante la estación invernal en la que las condiciones climáticas y ambientales no son favorables para el desarrollo de los estados evolutivos fuera del huésped, permitiendo que el parásito no envejezca cuando las condiciones se vuelvan favorables y los huevos que salen tengan más probabilidades de sobrevivir y de llegar a otro huésped y establecer el ciclo (Quiroz, 2000).

La reactivación del desarrollo de las larvas hipobióticas a la fase adulta, parece estar ligada a factores hormonales e inmunológicos de los animales parasitados. En las ovejas gestantes se ha propuesto que la inmunosupresión y las hormonas producidas alrededor del parto, principalmente la prolactina, actúan como estímulos para la reactivación larvaria (Blitz y Gibbs, 1971).

## FISIOPATOLOGÍA DE LA HEMONCOSIS OVINA.

El daño que ejerce *H. contortus* en el hospedador varía influido por distintos factores como el estado evolutivo del parásito, su estado metabólico y la carga parasitaria (figura 5). El parásito puede estar como L4 tisular en desarrollo, L4 en hipobiosis y adulto en la luz del abomaso (Radostits *et al.*, 2002).

Las larvas ejercen acción traumática al penetrar en las glándulas de las criptas abomasales de la mucosa, ocasionando la formación de pequeños coágulos, dentro de los cuales la larva se alimenta. Paralelamente a esto la larva ejerce acción mecánica por compresión y obstrucción de glándulas fúndicas. Durante este periodo, también se ejerce acción antigénica debido a que los estadios de tercera y cuarta larva se desarrollan en la mucosa. El líquido de muda junto con proteínas de secreción y excreción de la larva, promueven necrosis inmunomediada (figura 6) del tejido circunvecino y respuesta inmune local y humoral (Quiroz, 2000).

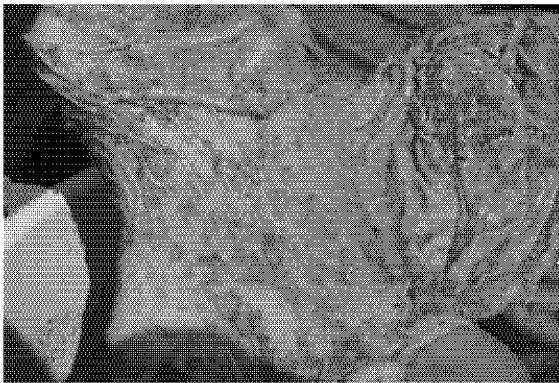


Figura 5. Infección masiva de *Haemonchus contortus* en el abomaso.

La presencia de la larva en las criptas del abomaso trae otras alteraciones histológicas del tejido glandular como son la hiperplasia de la mucosa abomasal, la infiltración de células inflamatorias y la sustitución de las células parietales secretoras de HCl por células jóvenes no secretoras que producen el aumento del pH en la luz abomasal. Esto repercute negativamente en la digestión proteica, disminuye la conversión de pepsinógeno en pepsina y además se pierde el efecto bacteriostático del pH ácido aumentando el número de bacterias en el abomaso.

La menor conversión de pepsinógeno a pepsina en el abomaso trae consigo el aumento de aquel en el torrente sanguíneo, los mecanismos que explican la hiperpepsinogenemia están relacionados con el aumento del pH abomasal, la acumulación

de pepsinógeno no activado en el abomaso y el aumento de la permeabilidad de la mucosa (Fox, 1997). Por otro lado, también se propone que hay una hipersecreción de pepsinógeno por parte de las células secretoras en dirección retrógrada, directamente al torrente circulatorio. Además existen estudios “*in vitro*” en donde se observa la liberación de pepsinógeno por parte de las células parietales estimulada por antígenos de excreción-secreción del parásito (Scott *et al.*, 1999). Las consecuencias fisiológicas de la pepsinogenemia hasta el momento no han sido evaluadas, sin embargo, es probable que contribuyan a la disminución del apetito en los animales afectados.



Figura 6. Úlcera en la mucosa abomasal producida por infección crónica con *Haemonchus contortus*.

La presencia de las larvas también produce aumento de la secreción de gastrina y por consecuencia de sus niveles en sangre, la gastrina tiene efecto directo sobre el aumento de la contractibilidad del abomaso y del peristaltismo intestinal (Fox, 1997). Además es un importante inhibidor del apetito en los animales afectados, por lo que el consumo de alimento se ve disminuido, así

como la ganancia de peso promedio. En suma, el proceso digestivo y la producción se alteran considerablemente (Kassai, 1998).

Además de la hiperplasia de la mucosa hay infiltración abundante de mastocitos y eosinófilos en la mucosa, la desgranulación de mastocitos libera péptidos vasoactivos como la histamina y la serotonina que promueven el aumento de la permeabilidad y el inicio de la inflamación.

La hematófagia es la principal acción patógena de la fase adulta, se calcula que la pérdida diaria de sangre es de 0.05 ml por gusano/día (Urquhart *et al.*, 2001). La acción mecánica es de poca importancia dado el tamaño en relación con la luz gástrica. La acción tóxica está generada por medio de sustancias anticoagulantes que infiltran los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasionan para succionar sangre. Al cambiar del sitio de

alimentación, la úlcera continua sangrando, lo que favorece la pérdida de sangre (Quiroz, 2000). Simpson *et al.* (1997) demostraron que la transferencia quirúrgica de 9,000 fases adultas de *H. contortus* produce elevación del pH abomasal, así como el aumento de los niveles de gastrina y pepsinógeno séricos en corderos libres de NGE, estos autores proponen que los antígenos de excreción-secreción del parásito adulto, aun más que los de las fases larvarias, son los responsables de la alteración fisiológica del abomaso.

Las manifestaciones clínicas dependen de la edad, estado nutricional del hospedero, tiempo de infección y carga parasitaria, pudiendo categorizarse en tres síndromes: sobreagudo, agudo y crónico (Levine, 1978). La forma sobreaguda es de morbilidad baja, dura de 0 a 7 días y se debe a una infección súbita con una gran cantidad de larvas, hay gastritis hemorrágica con anemia severa y fatal. La muerte se presenta en los ovinos con anemia marcada y heces de color oscuro generalmente sin diarrea (Radostits *et al.*, 2002; Urquhart *et al.*, 2001).

La forma aguda es común en corderos de 1 a 6 semanas de edad, se presenta con cargas parasitarias altas y con reinfección continua, también se ven afectadas ovejas jóvenes. La morbilidad es media o alta, con manifestaciones de gastritis, anemia e hipoproteïnemia. Las mucosas se tornan pálidas, hay edema submandibular (figura 7), el estado corporal es pobre, hay letargo, la



Figura 7. Edema submandibular (cuello de botella) producido por infección crónica con *Haemonchus contortus*.

La forma aguda es común en corderos de 1 a 6 semanas de edad, se presenta con cargas parasitarias altas y con reinfección continua, también se ven afectadas ovejas jóvenes. La morbilidad es media o alta, con manifestaciones de gastritis, anemia e hipoproteïnemia. Las mucosas se tornan pálidas, hay edema submandibular (figura 7), el estado corporal es pobre, hay letargo, la lana se cae fácilmente y las heces se tornan de color café oscuro sin diarrea. La agalactia precede a la muerte de corderos y la baja condición de las ovejas a veces es fatal. La autocuración puede ocasionar una mejoría de la infestación en cualquier periodo, los animales recuperados suelen quedar subdesarrollados (Bowman, 2004).

La forma crónica se presenta en corderos de 2 a 6 meses, siendo mas frecuente en los adultos donde la morbilidad es muy alta, se debe a una carga relativamente baja de

parásitos adultos con reinfección muy baja. Hay gastritis crónica con pérdida continua de sangre, disfunción abomasal, con pérdida progresiva del apetito lo que conlleva a pérdida de peso y retardo en el crecimiento hasta llegar a una atrofia de la musculatura esquelética. No hay anemia marcada ni edemas por lo que el diagnóstico se dificulta; hay decaimiento y anorexia sin la presencia de diarrea. La producción de los animales con hemoncosis crónica es baja en buenos pastos y mala en pastos pobres (Quiroz, 2000).

## **CONTROL DE LA HEMONCOSIS OVINA.**

En la actualidad el control de la hemoncosis en México, como en otros países, se basa principalmente en la administración de antihelmínticos (Torres-Acosta *et al.*, 2003). Sin embargo, a nivel mundial se ha generado la aparición de cepas resistentes por el uso indiscriminado de estos fármacos, situación que es un problema de grandes dimensiones. (Chartier *et al.*, 1998; Van Wyk *et al.*, 1999). La resistencia a los antihelmínticos ha constituido un serio problema en diversos países como Sudafrica (Schnyder *et al.*, 2005), Nueva Zelanda, Australia, Europa del este (datos citados por Waller *et al.*, 1996) y Reino Unido (Hong *et al.*, 1996). Se ha reportado resistencia en 37% de los rebaños de Paraguay, 40% en Argentina, 86% en Uruguay y 90% en Brasil (datos citados por Torres-Acosta *et al.*, 2003). En México, los primeros casos de cepas de *H. contortus* con resistencia al albendazol se encontraron en explotaciones ovinas en Puebla (Campos *et al.*, 1990). Posteriormente fueron encontrados casos de resistencia a fenbendazol, oxfendazol y febantel en Yucatán (Campos *et al.*, 1992). En el estudio más reciente a este respecto, Torres-Acosta *et al.* (2003) reportan resistencia al albendazol en el 15.8% de 38 rebaños estudiados en Yucatán y categoriza como sospechosas de resistencia a otro 23 % de los mismos. La pobre existencia de estudios que proporcionen datos confiables es un problema que prevalece en toda América latina, lo cual dificulta la toma de decisiones y la planeación de estrategias de control de estas parasitosis (Waller *et al.*, 1996).

Aunado al problema de resistencia a los antihelmínticos, existen otros problemas que dificultan el manejo adecuado de los programas de desparasitación de los rebaños, por un lado la aparición de productos genéricos de mala calidad o fraudulentos ha contribuido

al problema al exponer a las cepas de *H. contortus* a dosis bajas e inadecuadas para su eliminación total, pero suficientes para seleccionar a los más resistentes, el mismo problema se observa con la submedicación o la utilización de un solo grupo de antihelmínticos por mucho tiempo (Waller *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha incrementado la exigencia del mercado internacional para reducir los residuos de medicamentos en los alimentos para consumo humano, lo que obliga a que se generen otras estrategias de control antiparasitario que no dependan del empleo de sustancias químicas.

Las alternativas en el control de la hemoncosis que en la actualidad se investigan van encaminadas en cinco líneas: 1) el desarrollo de vacunas, 2) la suplementación alimenticia y el manejo de praderas o pastizales, 3) el control biológico del parásito mediante depredadores naturales 4) métodos de desparasitación selectiva utilizando el FAMACHA® y 5) la selección de animales resistentes y/o resilientes a la infección por NGE.

Varios grupos de investigación en el mundo se han dedicado al desarrollo de vacunas específicas contra NGE. Algunos autores como Domínguez *et al.* (2000), han utilizado fracciones de antígenos somáticos como inmunógenos, en otros trabajos, se han obtenido buenos resultados en la protección de animales adultos empleado larvas irradiadas pero no en animales jóvenes (Newton y Munn, 1999). Particularmente en el caso de los nematodos hematófagos, se ha seguido la hipótesis de que hay protección cuando el hospedador monta una respuesta inmunológica contra los antígenos intestinales del parásito (Jasmer y McGuire, 1991; Hohenhaus *et al.*, 1995; Jasmer *et al.*, 1996) que además son antígenos ocultos que no han tenido demasiada presión evolutiva por parte del sistema inmunológico del hospedero (Newton y Munn, 1999). Debido a la acción directa que tendrían los anticuerpos sobre la digestión del parásito, cuando se ingieren con la sangre, se ha seguido la estrategia utilizada en las vacunas contra garrapatas. Jasmer *et al.* (1991), lograron inmunizar cabritos de dos edades diferentes con antígenos obtenidos del intestino de *H. contortus*, los resultados logrados fueron variables, mostrando porcentajes de reducción en la eliminación de huevos en heces del 87 al 95% y de adultos en el abomaso del 65 al 89%, se lograron caracterizar un total de 10 antígenos diferentes en los extractos

intestinales del parásito. Por otro lado, Schallig *et al.* (1997), consiguieron protección en corderos con dos antígenos intestinales purificados de 15 y 24 kD, posteriormente este mismo autor logró clonar y expresar en bacterias estos antígenos, logrando el reconocimiento de los mismos por corderos hiperinmunizados con *H. contortus*.

Por otra parte Jacobs *et al.* (1999), reportaron una reducción significativa en la eliminación de huevos en heces en corderos inmunizados con un antígeno de superficie de la L3 de *H. contortus*, combinada con hidróxido de aluminio y toxina pertusis en comparación con animales que recibieron solo el antígeno o solo la toxina.

Bakker *et al.* (2004), utilizando un antígeno de excreción-secreción de *H. contortus* como inmunógeno, lograron niveles de reducción del 52% en la eliminación de huevos en heces de animales inmunizados en comparación con animales no inmunizados, además reportaron un incremento en los niveles de anticuerpos de las clases IgG, IgA e IgE específicos para los antígenos de excreción y secreción utilizados.

Existen muchos trabajos que demuestran el efecto negativo de los NGE en la conversión alimenticia, la capacidad de digestión y la utilización de energía metabolizable en los rumiantes, (Haile *et al.*, 2004). La interacción entre los niveles de nutrición y la habilidad de los animales para resistir a la infección parasitaria ha sido ampliamente documentada.

La suplementación proteínica mejora la resistencia y resiliencia de los animales a infecciones únicas o mixtas de NGE (Fox, 1997; Wallace *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1999; Haile *et al.*, 2002). Bricarello *et al.* (2005), evaluaron el efecto de la alimentación con dieta moderada y alta en proteína metabolizable en dos distintas razas ovinas infectadas con *H. contortus*, la suplementación con altas cantidades de proteína metabolizable produjo en ambas razas un incremento significativo en la ganancia de peso de los animales, el hematocrito y la habilidad para evitar los efectos fisiopatológicos del parásito en el abomaso, en comparación con animales infectados y con dieta moderada, sin embargo, solo se redujo la carga parasitaria en una sola de las razas en forma significativa.



También se ha visto una disminución en la severidad de la parasitosis por *H. contortus* cuando se emplean forrajes con altas cantidades de taninos (Rojas *et al.*, 2006) o cuando se suplementa la dieta con nitrógeno no proteico como la urea (Knox y Steel, 1999), o con algunos elementos traza como el cobre (Bang *et al.*, 1990; Knox, 2002). Sin embargo, un inconveniente importante a esto es la alta hepatotoxicidad del cobre cuando se excede la dosis (Burke y Miller, 2006). Bang *et al.* (1990), lograron la reducción de la carga parasitaria del 96% para *H. contortus* y del 56% para *T. circumcincta*, en animales previamente infectados y tratados con cinco gramos de óxido de cobre, en comparación con animales infectados no tratados con cobre. Sin embargo, varios autores han cuestionado la toxicidad del cobre y el estrecho rango de los niveles sanguíneos de éste para producir beneficio o hepatotoxicidad. Knox (2002), utilizó óxido de cobre microparticulado en dosis total por animal de 2.5g, logrando reducción significativa de la carga parasitaria. Otros autores también han buscado alternativas de dosificación como Adogwa *et al.* (2005), que probaron dosis de 0.5 y 1 gramo de óxido de cobre, con resultados positivos en la reducción de la carga parasitaria. Burke *et al.* (2006), determinaron que el efecto de dosis múltiples de óxido de cobre microparticulado, es similar a una dosis efectiva de levamisol, reduciendo al mínimo el riesgo de hepatotoxicidad en los animales de experimentación. Los resultados obtenidos con el cobre han sido hasta ahora prometedores para el control de este parásito.

El manejo de pastizales va encaminado a evitar al máximo el contacto de los animales con las larvas infectantes, a través de la obtención de praderas de buena calidad nutricional e infestadas con pequeñas poblaciones de estadios de vida libre de NGE, lo cual permite que los animales desarrollen inmunidad y adquieran resistencia (Vazquez *et al.*, 2006). El pastoreo rotacional ha mostrado ser una opción útil para el control de los NGE, la rotación de los animales en distintas praderas con períodos de ocupación del 3.5 días en los que se regresa a la misma a los 35 días, disminuye por si solo a la mitad las tasas de eliminación de huevos en heces, debido a que se incrementa la mortalidad de las larvas en el suelo antes de ser ingeridas. La rotación de potreros con períodos de descanso de más de dos meses ha logrado mucho mayor éxito (Hoste *et al.*, 2002). Sin embargo, existen

estudios controversiales como el presentado por Vázquez *et al.* (2006), en donde compararon el pastoreo rotacional contra el pastoreo continuo en el control de la hemoncosis ovina, ellos reportaron menores índices de eliminación de huevos en heces en el sistema continuo que en el rotacional, sin embargo, también reportan mayores índices de hematocrito, condición corporal y coloración de la mucosa en el sistema rotacional que en el continuo. La razón de que aparentemente los animales más parasitados tuvieran mejores resultados en los parámetros observados, fue que evaluaron animales de diferentes edades y en distintos momentos productivos. Amarante *et al.* (1997), evaluaron la especificidad de los NGE que afectan a bovinos y ovinos utilizando, el pastoreo mixto y alternado novillos con ovinos, estos autores reportaron infecciones muy específicas para cada especie por lo que proponen la rotación alternada como una forma de control sobre los NGE optimizando las praderas. En este sistema se busca que las larvas infectivas sean consumidas por segundos hospedadores poco propicios para su desarrollo.

El uso de depredadores naturales de las larvas de nematodos todavía no es un procedimiento bien establecido. Han sido empleados exitosamente distintos tipos de hongos apatógenos para el hospedador pero nocivos para las larvas de nematodos parásitos (Mendoza *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 1999). Sin embargo, trabajos como el de Eysker *et al.* (2006), los cuales dosificaron dos lotes ovinos diariamente con 500 mil clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* y encuentran un pobre o nulo efecto sobre el control parasitario, no resultan alentadores. También han realizado ensayos con algunas bacterias como *Bacillus thuringiensis* que han mostrado efecto larvicida a través de una toxina (Kotze *et al.*, 2005).

El sistema FAMACHA (**F**affa **M**alan **C**hart), basado en la idea del Dr. Faffa Malan, es un sistema que tiene como objetivo la identificación clínica del grado de anemia de los animales con NGE de tipo hematófago y en función de esta, establecer el tratamiento con antihelmínticos. Este sistema está basado en la comparación visual de la coloración de la conjuntiva ocular con una tarjeta o carta de referencia con cinco niveles de coloración: 1 y 2 indican anemia leve, 3 anemia moderada, 4 y 5 anemia grave (Van Wyk *et al.*, 1997). Los animales con anemia moderada y grave son desparasitados mientras que los animales

con anemia leve no reciben tratamiento, esto tiene un doble propósito: por un lado se reducen los costos por tratamientos no necesarios en animales que no están gravemente afectados, como para limitar su estado productivo, por otro lado, se reduce la presión selectiva hacia las cepas de helmintos con resistencia a los antihelmínticos, se supone que los animales que no están gravemente afectados no tienen infección masiva, al no ser desparasitados eliminan pocas cantidades de huevos en la materia fecal, que producen infecciones leves en otros animales con cepas no expuestas previamente a los desparasitantes (Van Wyk y Bath, 2002). Inicialmente el sistema FAMACHA fue desarrollado en Sudáfrica y en la actualidad está siendo utilizado en Australia y Nueva Zelanda, recientemente Kaplan *et al.* (2004) validaron este método en los EE.UU.

## **RESISTENCIA Y RESILIENCIA A LA HEMONCOSIS OVINA.**

Desde el punto de vista parasitológico **la resistencia a la hemoncosis** es definida por Woolaston y Baker (1996), como la capacidad que muestran algunos ovinos de disminuir el establecimiento o la supervivencia del parásito en el abomaso. Bricarello *et al.* (2004), la definen como la habilidad de los animales para prevenir el establecimiento de las fases larvianas y/o de promover la eliminación espontánea de las fases adultas, lo cual se refleja directamente en la disminución de la carga parasitaria de los animales. Desde esta perspectiva, la causa de la resistencia es multifactorial e involucra factores tales como el comportamiento del animal al pastar, las barreras naturales de defensa del hospedero y los mecanismos de respuesta inmune. Sin embargo, aún los animales que muestran mayor resistencia a la infección, no son completamente refractarios y consistentemente albergan menos parásitos por lo que eliminan menos huevos en heces que los animales más susceptibles. De esta manera, la forma más común de medir la resistencia a la hemoncosis en los animales parasitados, es a través de la cuantificación de la carga parasitaria.

Por otro lado, la resistencia según Miller *et al.* (2005), puede ser lograda evitando o disminuyendo la entrada en el sitio primario de infección, promoviendo la expulsión del parásito rápidamente una vez que hay infección y permaneciendo mucho más tiempo inmune a la enfermedad. Estos conceptos involucran necesariamente tanto la participación

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

Es necesario aclarar que la resistencia a la hemoncosis no debe ser confundida con la resistencia natural vista desde el punto de vista inmunológico. Algunos autores definen a la **resistencia natural** solamente como el conjunto de mecanismos inespecíficos de defensa innatos (Montaño, 2005), sin embargo, no son pocos los autores que identifican a estos mismos mecanismos como respuesta no adaptativa o incluso con el término de inmunidad natural o innata (Roitt, 1994; Janeway, 1997; Abbas, 1999; Rojas-Espinoza, 2001). Vale la pena considerar, si la palabra resistencia define la causa o el efecto de estos mecanismos inespecíficos de defensa; en este sentido, la resistencia puede ser en realidad, la expresión conjunta de diversos mecanismos inespecíficos en un inicio, pero que continúan de manera natural al desarrollo de mecanismos específicos de defensa, los cuales en su conjunto, impiden el establecimiento eficiente del parásito.

**La resiliencia** es la capacidad que tiene el animal de compensar los efectos negativos de la parasitosis, lo cual se refleja en el mantenimiento de los parámetros productivos (Paolini *et al.*, 2005), los ovinos generalmente presentan en forma simultánea alta resistencia y resiliencia a la hemoncosis, aunque algunas razas muestran moderada o baja resistencia con relativa alta resiliencia, lo cual les permite comportarse productivamente a la par de los que son naturalmente resistentes.

Se ha demostrado que ciertas razas ovinas son más resistentes que otras a los NGE por ejemplo: Mugambi *et al.* (2005), reporta la resistencia de las cruas  $\frac{3}{4}$  de la raza Red Maasai en comparación de las cruas de la raza Dorper. Anteriormente estos mismos autores (Mugambi *et al.*, 1996), habían encontrado niveles de eliminación de huevos en materia fecal más bajos, así como hematocrito y eosinofilia más elevados en ovejas de raza pura Red Maasai en comparación a la raza Dorper, tras la infestación artificial con *H.*

*contortus*. Hielscher *et al.* (2006), realizaron un análisis heterólogo de cruzamientos entre ovinos Merino Land y Rhoen, ellos establecen que la cruce Rhoen X Merino conserva la resistencia a la hemoncosis y los parámetros productivos adecuados para ser considerada como opción productiva.

Algunas razas ovinas en las que se ha demostrado resistencia natural son: Blackbelly (Yazwinski *et al.*, 1980), Florida (Amarante *et al.*, 1999), Saint Croix (Burke y Miller, 2004), Katahdin (Burke y Miller, 2004), Red Maasai (Mugambi *et al.*, 1996), Nali (Singh *et al.*, 1997), Polaca de lana larga (Bouix *et al.*, 1998), Nativa de Louisiana (Miller *et al.*, 1998) y Castellana (Gómez-Muñoz *et al.*, 1999). Por otro lado, se han realizado evaluaciones dentro de raza, encontrando que existe una variabilidad individual en la resistencia. En algunos trabajos como los de Simpson *et al.* (1997) y Scott *et al.* (2000), se denomina a los animales en los que no se modifica la variable estudiada, en relación a la infección con *H. contortus* como animales no respondedores. La selección de animales resistentes se realiza con base en la menor carga parasitaria relacionada con el aumento de la eosinofilia principalmente, así como la eliminación de los animales no respondedores (Hooda *et al.*, 1999).

Existen algunos marcadores genéticos e inmunológicos que han sido propuestos como indicadores de resistencia a NGE. Ciertos antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I en ovinos (*ovine leucocyte antigens* OLA) han sido relacionados con la resistencia a *Trichostrongylus colubriformis* como los tipos SY y SY1b, por el contrario se han encontrado alotipos del CPH clase II como los DRB, DQB y DQA; relacionados con la susceptibilidad al mismo parásito (Hohenhaus y Outteridge, 1995).

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

Está bien establecido que la respuesta a helmintos en mamíferos, incluyendo los ovinos, está caracterizada por eosinofilia tisular y sistémica (Wildblood *et al.*, 2005). En diversos modelos experimentales se ha demostrado que la magnitud de la respuesta eosinofílica está controlada por genes específicos en el hospedador (Vadas, 1982), desde hace muchos años este parámetro se ha considerado como un indicador de infección parasitaria. La eosinofilia ha sido asociada al incremento de la resistencia a la hemoncosis en ovinos de las razas Merino y Romney, seleccionados para resistencia con base en el número de huevos por gramo de heces (**HGH**), generalmente el número de huevos en la materia fecal está correlacionado negativamente con los índices de eosinófilos en sangre, sin embargo esto no es necesariamente cierto para los eosinófilos tisulares (Hohenhaus y Outteridge, 1995).

Gill *et al.* (1991), encontraron niveles significativamente elevados de anticuerpos en ovejas genéticamente resistentes, en comparación a un grupo aleatorio, los anticuerpos anti-larvas y anti-adultos correlacionaron negativamente con la carga parasitaria. Gómez-Muñoz *et al.* (1999), encontraron relación entre los niveles de IgG, IgM e IgA séricas, con el estado de resistencia de los ovinos de raza Castellana infestados con *H. contortus*. Pernthaner *et al.* (2005), determinaron niveles de IgE contra *Trichostrongylus colubriformis* significativamente más elevados en animales resistentes que en animales susceptibles a la infección. Por otro lado Gill *et al.* (1994), reportaron relación entre algunos genotipos ovinos resistentes a *H. contortus* y el número de células productoras de anticuerpos (IgA e IgG) presentes en la mucosa del abomaso de estos animales. La heredabilidad de la respuesta por anticuerpos se ha estimado en rangos de  $h^2 = 0.37$  a  $0.56$ , por lo que concluyen que los niveles de anticuerpos pueden ser utilizados como indicadores genéticos de resistencia a NGE (Hohenhaus y Outteridge, 1995).

El grado de resistencia también puede estar relacionado con la edad, el estado fisiológico de los animales o sus exposiciones previas a otros parásitos. Los corderos jóvenes en general son menos resistentes al establecimiento del parásito en el abomaso que los animales adultos, tienen respuestas pobres por anticuerpos a vacunas y no presentan

buena memoria inmunológica cuando son desafiados nuevamente con el mismo parásito (Emery *et al.*, 2000).

En ovinos se conoce ampliamente el fenómeno denominado “alza posparto o alza de primavera” (*spring rise*), que consiste en un incremento en la cuenta de huevos de nematodos gastrointestinales en las ovejas gestantes alrededor del parto. Aunque se ha propuesto el término “aumento periparto”, debido a que el incremento se inicia desde cuatro semanas antes del parto, alcanza sus cuentas más elevadas entre la sexta y la octava semanas posparto y finalmente declina súbitamente al momento del destete de los corderos (Vázquez *et al.*, 2006). Durante este periodo es bien sabido que las ovejas presentan una disminución de su resistencia a los NGE, las causas de esta disminución al parecer tienen que ver con dos factores importantes: Una inmunosupresión inducida por el sistema endocrino de la oveja periparturienta y el déficit relativo de proteína metabolizable inducida por el aumento de los requerimientos para la producción láctea (Kahn *et al.*, 2003). También interviene la fisiología del parásito, así como factores ambientales (climáticos) sobre las larvas en hipobiosis antes de la infección, se observa una sincronización entre el ciclo del parásito y las condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Blitz y Gibbs, 1971).

Existen evidencias que demuestran efectos sinérgicos o antagónicos entre dos a más parásitos cuando coexisten en el hospedador, está demostrado que los corderos que están infectados al mismo tiempo con *Oestrus ovis* y *Haemonchus contortus* son más resistentes a la implantación de *H. contortus* en el abomaso, debido probablemente a una mayor respuesta en la mucosa abomasal debido a la reacción cruzada de algunos antígenos (Terefe *et al.*, 2005).

### **Medición de la resistencia y resiliencia a la hemoncosis ovina.**

Las formas más directas de conocer el estado de susceptibilidad o resistencia a la hemoncosis ovina, son aquellas que reflejan directamente la carga parasitaria. Las más

utilizadas son las mediciones cuantitativas, ya sea en forma indirecta a través del número de HGH o directamente a través del conteo de las fases adultas en el abomaso (**FA**) (Todd *et al.*, 1978). El conteo HGH se ha empleado para la selección de animales resistentes en Australia (Woolaston, 1993; Eady *et al.*, 1996) y Nueva Zelanda (Stear y Murray, 1994; Pernthaner *et al.*, 1995a y 1995b). En múltiples trabajos se ha visto la relación directa que tiene el conteo de HGH con la carga parasitaria real, sin embargo, este parámetro puede ser afectado por algunos factores como son la prolificidad y la fecundidad de las hembras en el abomaso. La forma más común de determinar las cuentas de HGH es a través de la técnica de McMaster.

La forma más confiable para medir el grado de resistencia es conocer en forma directa la cantidad de parásitos presentes en el abomaso de los animales evaluados (Gray *et al.*, 1992; Gill, 1994; Pfeffer *et al.*, 1996; Hooda *et al.*, 1999), sin embargo para llevar a cabo esta medición es necesario el sacrificio de los animales y la obtención del abomaso completo para el conteo, esto representa fuertes limitantes para la selección genética por lo que su utilización se restringe a trabajos de investigación.

Otros factores que se han asociado a la resistencia son: aumento de eosinófilos sanguíneos (**ES**) y eosinófilos tisulares presentes en la mucosa abomasal (Douch y Morum, 1993; Pernthaner *et al.*, 1995a) y la presencia de mastocitos y leucocitos globulosos (*Globule Leucocytes* **GL**) en la mucosa abomasal (Bricarello *et al.*, 2004). Todos estos son considerados efectores de la respuesta innata o inespecífica y serán abordados más ampliamente en el siguiente capítulo.

Existen diversas vías para evaluar la resiliencia a la hemoncosis ovina, entre las más utilizadas están aquellas que miden la condición corporal o fisiológica del animal a través de un indicador como la ganancia de peso, la conversión alimenticia, el hematocrito, el índice FAMACHA o las proteínas plasmáticas (Van Wik, 1999; Bricarello *et al.*, 2004). Así mismo, hay indicadores del impacto negativo del parásito como son los niveles de pepsinógeno sérico (Simpson *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999) o los niveles de fosfatos inorgánicos (Paolini *et al.*, 2005), ambos parámetros indican el grado de daño tisular a nivel



abomasal ejercido directamente por la presencia del parásito (Scott *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2000).

## **LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A *Haemonchus contortus*.**

La infección primaria con *H. contortus* en animales jóvenes, con poca resistencia, resulta en una infección con una elevada carga parasitaria que puede persistir por meses sin que se de la expulsión de los gusanos. Sin embargo, cuando hay una exposición previa a las fases adultas, se registra una reducción importante de las cargas parasitarias en los animales (Balic *et al.*, 2000b). No son claros los mecanismo inmunológicos a través de los cuales los animales tienen o adquieren resistencia a la hemoncosis, son muchos los estudios que existen al respecto, sin embargo, también son muchas las dudas que persisten. Lo que si parece ser un hecho, es que la respuesta difiere dependiendo de la edad, la raza, el estadio del desarrollo parasitario y las exposiciones previas (infección y reinfección).

A la fecha no está todavía establecida en los rumiantes la existencia de una polarización de respuestas Th1-Th2 como en roedores o humanos (Gill *et al.*, 2000), sin embargo los resultados en la mayoría de los trabajos apuntan a que esto es muy posible. Tampoco está claro el papel exacto de algunos elementos efectores de la respuesta innata y no se sabe a ciencia cierta si su presencia en la infección por *H. contortus* es causa o efecto en el estado de resistencia/inmunidad. También es claro que en la resistencia/inmunidad a la hemoncosis, participan tanto elementos inespecíficos como elementos específicos de defensa del hospedero, la forma en la que se interrelacionan es lo que falta por aclarar, aunque pueden plantearse algunas hipótesis basadas en los modelos experimentales conocidos.

a).- Inducción de la respuesta inmune.

El establecimiento de la larva de *H. contortus* en el hospedador necesariamente involucra la entrada del parásito a un nicho apropiado dentro de aquél, que le proporcione

los requerimientos adecuados para su desarrollo y crecimiento, al mismo tiempo que le brinda protección contra las barreras mecánicas (peristaltismo) y químicas (moco abomasal) del hospedador. Esto depende en un inicio exclusivamente de la capacidad de movimiento de la larva y de la intensidad de la carga parasitaria. Sin embargo, el hospedador después de la sensibilización a través de contactos previos con el parásito puede modificar las condiciones microambientales del nicho y promover la expulsión (Miller, 1996). El proceso de expulsión del nematodo por los animales inmunizados es la culminación de varios eventos que incluyen el reconocimiento de moléculas del parásito (antígenos y otras), la inducción del tipo de respuesta adecuada y la activación de las vías efectoras que tienen la capacidad de neutralizar y matar al parásito (Meeusen *et al.*, 2005).

En muchos estudios se ha comprobado la capacidad de los helmintos para activar el complemento por la vía alterna y fijar algunas moléculas en su superficie (Doligalska *et al.*, 1999; Meeusen y Balic, 2000), esta constituye la primera señal de activación de la respuesta inespecífica a la infección por *H. contortus*. A través de los péptidos vasoactivos y quimiotácticos que se generan (C3a y C5a), se movilizan principalmente eosinófilos a la zona de infección de manera totalmente independiente de mecanismos específicos (*e.g.* CD4+/IL-5). Por esta razón se le denomina eosinofilia tisular timo-independiente y es considerada como parte de la respuesta innata. La activación del complemento puede mediar la citotoxicidad dirigida de los eosinófilos a las larvas en etapas tempranas de la infección, en ausencia de anticuerpos específicos. Recientemente Suchitra y Joshi (2005), caracterizaron en *H. contortus* la presencia de una calreticulina que en *Trypanozoma cruzi* y otros parásitos, ha sido asociada a una actividad de inhibición de la activación del complemento por interferencia directa con la proteína C1q.

Aunque en modelos experimentales se ha observado que las placas de Peyer son un sitio inductivo de inmunoglobulinas a través de células dendríticas, no existe información en la literatura científica que pruebe claramente la capacidad de estas células para presentar antígenos parasitarios en el intestino de los rumiantes. Sin embargo, es muy posible que el primer contacto de las moléculas del nematodo con el hospedador sea a través de estas células (Miller, 1996). En un estudio realizado por van den Broek *et al.* (2005), observaron

un incremento importante en el número de células dendríticas de la piel en ovinos infectados con *Psoroptes ovis*, este incremento estuvo correlacionado con una respuesta de linfocitos CD4+ y gama-delta, que hace suponer que los antígenos pudieron inducir su proliferación a través de la estimulación de células presentadoras de antígeno.

La L3 de *H. contortus* penetra a la mucosa abomasal y en un término de uno a dos días muda al siguiente estado larvario (L4) el cuál, si no entra en estado de hipobiosis, continúa su desarrollo a L5 después de dos a tres días. Cada uno de estos estadios presenta diferencias en cuanto a sus moléculas de superficie, estos cambios rápidos en los antígenos dificulta la respuesta del hospedero en las etapas iniciales de la infección y hace que sea muy difícil encontrar anticuerpos estadio-específicos en los animales infectados (Meeusen *et al.*, 2005). Bowles *et al.* (1995), utilizando la técnica de sondeo de células secretoras de anticuerpo (ver más adelante *ASC probes*) lograron identificar antígenos estadio-específicos de L3, que están expresados únicamente en la superficie de esta fase larvaria. Posteriormente Balic *et al.* (2003), identificaron otro grupo de antígenos estadio-específicos de L4 en *H. contortus* y *T. circumcincta*, ninguno de estos antígenos encontrados en las fases larvarias, estuvo presente en la fase adulta del parásito, lo que comprueba que cada estadio del desarrollo es un organismo antigénico distinto en el contexto de la respuesta inmune (Meeusen *et al.*, 2005) y por lo tanto, el reconocimiento se dificulta, debido a que la respuesta por anticuerpos que inducen los antígenos de los estadios larvarios no reconocen a la fase adulta.

b).- Mecanismos inespecíficos de respuesta.

Cuando se infectan roedores con helmintos o se emplean otros modelos experimentales, generalmente se observa la eliminación rápida de la infección, asociada a una gran actividad inflamatoria innata, inducida principalmente por el complemento activado por la vía alterna y mediada por mastocitos y eosinófilos no dependientes de IL-5, también llamados timo-independientes (Meeusen y Balic, 2000). En contraste con los modelos en roedores, la eliminación eficiente de las larvas de nematodos en rumiantes, generalmente requiere de infecciones múltiples o repetidas (Balic *et al.*, 2002). Esto es

debido a que por un lado, los modelos experimentales en roedores, que no son los hospederos habituales del parásito, desarrollan una respuesta inflamatoria mucho más agresiva y por otro lado, también puede ser debido a que los NGE son parásitos en los que las fases larvarias y las fases adultas tienen el mismo nicho ecológico, lo cual hace que la inmunidad que genera la fase larvaria pueda modular la respuesta a la fase adulta (Behm y Ovington, 2000; Meeusen y Balic, 2000).

La expulsión de las larvas de *Haemonchus contortus* puede ser inmediata o tardía. La **expulsión inmediata** se da cuando la larva antes de internarse en su nicho (glándula abomasal) es atacada por la acción de mastocitos, especialmente los del tipo intraepitelial conocidos como leucocitos globulosos (*globule leucocyte* GL), la hipermotilidad, la hipersecreción gástrica, la hiperplasia de células caliciformes y la eosinofilia timo-independiente, de manera muy similar a lo que ocurre en los modelos experimentales murinos (Balic *et al.*, 2002; Miller, 1996). Esta posiblemente es la forma en la que los genotipos naturalmente resistentes contrarrestan la infección desde etapas muy tempranas. De la misma forma en la que los hospederos no habituales eliminan de manera más agresiva a los nematodos, debe también haber diferencia en la permisibilidad de ciertas razas ovinas a la infección, dependiendo de la capacidad de adaptación del parásito a cada una de ellas.

La expulsión inmediata del parásito está también asociada a la presencia en el moco abomasal de histamina y sustancias de reacción lenta de la anafilaxia, como los leucotrienos y otras aun no caracterizadas que inhiben la motilidad de las larvas de nematodos *in vitro* (Douch *et al.*, 1983). Los mastocitos liberan histamina preformada cuando son estimulados a través del receptor FcεRI de alta afinidad para IgE, además de ésta, los mastocitos liberan algunas proteasas como la triptasa, la quimasa y la catepsina G. Estas células son atraídas en un inicio por moléculas derivadas de la reacción inflamatoria, tales como moléculas del complemento (C3a y C5a), el factor de activación plaquetaria (*platelet activating factor* PAF), la N-formil-metionil-fenilalanina, los leucotrienos, la eotaxina, el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), las proteínas quimiotácticas para monocitos (MCP-1 y MCP-4), la IL-3 y la IL-8 (Falcone, *et al.*, 2001). La histamina ha

sido encontrada en mayor concentración en el moco abomasal de animales con resistencia natural a la hemoncosis, coadyuva directamente a la expulsión del parásito promoviendo la hipersecreción e hipermotilidad del abomaso, afecta negativamente la fecundidad del gusano y su actividad motriz (Hohenhasus y Outteridge, 1995). Además de esto, facilita la translocación de proteínas plasmáticas, incluyendo anticuerpos humorales a la luz del abomaso (Miller, 1996). Douch *et al.* (1996), determinaron que los animales inmunizados con *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, al ser nuevamente desafiados con el parásito, presentaron niveles significativamente más altos de mastocitos y GL en la mucosa abomasal, los cultivos puros de estas células mostraron alta capacidad de secreción de leucotrienos y factores inhibidores de la migración larvaria.

La **expulsión tardía** se ha atribuido al ataque a la larva en su nicho, por la acción principalmente de eosinófilos, acompañado de cambios importantes en la mucosa abomasal, tales como aumento de linfocitos CD4+ y gama-delta, así como de linfocitos B (Balic., 2002). Posiblemente la base del proceso sea la transición entre la respuesta innata y la inmunidad adquirida. La eosinofilia, al igual que en otras especies, ocurre en rumiantes asociada a la infección por nematodos, sin embargo la relación entre los conteos de eosinófilos sanguíneos y la función protectora contra helmintos todavía no ha sido bien establecida (Miller, 1996). Los eosinófilos también son reclutados al tejido abomasal durante la infección primaria y con posteriores desafíos con *H. contortus*, en donde de manera más rápida se congregan alrededor de la larva en el tejido. A la fecha el estado de activación de los eosinófilos en los tejidos no ha sido determinado, sin embargo, es de suponer que las citocinas que predominan en el microambiente abomasal, pueden ser un factor determinante en la activación de estos para el ataque efectivo a los parásitos (Meeusen *et al.*, 2005).

La hipótesis de que la función primaria de los eosinófilos es la defensa del hospedador contra helmintos, está basada en la acumulación de observaciones tales como la capacidad de los eosinófilos para desgranularse y matar helmintos *in vitro* en presencia de anticuerpos y o complemento, su capacidad de movilización desde la sangre a los tejidos y de agregación en el sitio de infección helmíntica, la asociación estrecha de eosinófilos

con helmintos dañados *in vivo* y su capacidad de desgranulación en la superficie del parásito. A pesar de todas estas evidencias y de estudios epidemiológicos, en los que se encuentra correlación entre la eosinofilia y la protección contra algunos helmintos como *Schistosoma* sp., en la actualidad se carece de evidencia directa *in vivo* del papel del eosinófilo en la protección contra helmintos y no es claro si la presencia de estas células en el tejido circundante a las larvas es la causa de su muerte, o bien, es consecuencia de la misma (Meeusen y Balic, 2000; Falcone *et al.*, 2001). También existen otros estudios en roedores en los que la disminución de la eosinofilia a través de la administración de anticuerpos monoclonales (Mab) anti-IL-5 no exacerbó la infección por algunos parásitos como *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis* o *Toxocara canis* entre otros (datos citados por Behm y Ovington, 2000).

Entre las principales moléculas efectoras que poseen los eosinófilos se encuentran la proteína básica principal (*major basic protein* MBP), las proteínas catiónicas (*eosinophil cationic protein* ECP) y la peroxidasa (*eosinophil peroxidase* EPO). Todas estas moléculas tienen acción tóxica directa contra helmintos. Los eosinófilos también secretan mediadores lipídicos como leucotrienos, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), factor de agregación plaquetaria (PAF) y lipoxinas, que promueven el aumento de la permeabilidad, la secreción de moco, la quimiotaxis y la coagulación. Además, su capacidad de producir citocinas como la IL-2, IL4, IL-10, IL-12, IL-16, IFN $\gamma$ , GM-SCF, TGF $\alpha$ , RANTES y eotaxina entre otras, indican su función reguladora de la respuesta inmune (Behm y Ovington, 2000).

En trabajos recientes se ha demostrado la capacidad de los eosinófilos como células presentadoras de antígenos, particularmente en el caso de las infecciones helmínticas. Padigel *et al.* (2006) reportaron un aumento en la expresión de CD69, CD86 y MHC clase II en eosinófilos expuestos a antígenos de *Strongyloides stercoralis*, además estos eosinófilos fueron capaces de transformar *in vitro* linfocitos CD4<sup>+</sup> inexpertos a CD4<sup>+</sup> Th2, con producción de IL-5, de la misma forma que lo hicieron células dendríticas utilizadas como referencia.

No obstante todo lo que se ha podido señalar acerca de la función protectora de estas células en la infección helmíntica, también existen datos controversiales a esta función, Wildblood *et al.* (2005), demostraron que los extractos de *Haemonchus contortus* y *T. circumcincta* tienen una actividad quimiotáctica muy potente para eosinófilos *in vitro*, así mismo esta actividad también fue detectada en material de excreción-secreción de la L3 de ambos parásitos, en contraste, no se observó actividad alguna en extractos similares de *Caenorhabditis elegans*. Los autores concluyen que la atracción activa de eosinófilos puede estar relacionada con la patogenicidad y que probablemente el reclutamiento de estas células al tejido circundante, puede generar un microambiente adecuado para el establecimiento del parásito.

c).- Respuesta específica humoral.

La respuesta por anticuerpos también ha sido ampliamente estudiada, Gill *et al.* (1993a), utilizando animales genéticamente resistentes, determinaron la cinética de producción de anticuerpos en suero y extractos de materia fecal en comparación con un grupo no resistente, reportaron niveles significativamente mayores de IgG1 e IgA en el suero de los animales resistentes en comparación con los no resistentes, entre los días 10 a 31 post-infección, no encontraron diferencias en los títulos de IgG2 o IgM. Los niveles séricos de IgG1, IgA y los niveles de IgA en materia fecal correlacionaron negativamente con los conteos de huevos en materia fecal en ambos grupos, resistentes y no resistentes, lo cual indica que estos isotipos son parte importante de la habilidad genética para limitar la infección. Por otra parte Gómez-Muñoz *et al.* (1999), realizaron un estudio de la respuesta de anticuerpos séricos a la infección primaria con 200 L3/kg y posterior desafío a los 90 días con 400 L3/kg de *H. contortus* en corderos de la raza Castellana, determinaron una elevación significativa de los niveles de IgG1 en los corderos que fueron previamente infectados y posteriormente desafiados, en comparación con los que solo fueron desafiados, no encontraron diferencias entre los niveles de anticuerpos contra antígenos de larva o contra antígenos de adultos de *H. contortus*, la respuesta por IgM fue poco significativa y la respuesta por IgA, aunque se incrementó durante el desafío, en general fue baja a ambos antígenos. Los niveles de IgG1 estuvieron correlacionados negativamente en forma

significativa con la carga parasitaria. Sin embargo, otros autores han encontrado una pobre relación entre los anticuerpos séricos y los anticuerpos locales a nivel abomasal (Gill *et al.*, 1993a), lo cual es indicativo de que los anticuerpos séricos no necesariamente son protectores.

En algunos trabajos se ha buscado la respuesta por anticuerpos a nivel local en el sitio de la infección por *H. contortus*, algunos autores como Bowles *et al.* (1995), desarrollaron una metodología que utiliza cultivos de células productoras de anticuerpos como sondas (*antibodies secreting cells, ASC probes*) para la detección de antígenos específicos reconocidos localmente. Estos autores realizaron cultivos de linfocitos a partir de linfonodos abomasales y a partir de estos cultivos, obtuvieron del sobrenadante anticuerpos, con los que posteriormente determinaron antígenos de superficie de la L3 de *H. contortus*.

Por su parte Gill *et al.* (1992), utilizando conjugados fluorescentes anti-IgA, -IgG e -IgM lograron marcar a las células que contienen este tipo de inmunoglobulinas en el citoplasma (*immunoglobulin-containing cells, IgCC*) en el abomaso de animales infectados y no infectados con *H. contortus*, observaron un incremento en el número de IgCC en la submucosa del abomaso en los animales infectados teniendo un pico máximo a los siete días postinfección, las IgACC fueron las más frecuentemente observadas (68-84%) seguidas por la IgG1CC y las IgMCC. Las IgG2CC prácticamente no se encontraron. De la misma forma, se ha estudiado a nivel local a las células plasmáticas, utilizando algunos marcadores de linfocitos B activados como el CD45R (Balic *et al.*, 2000b; Balic, *et al.*, 2002), encontrándose, de igual manera, elevadas en los animales con infección activa con *H. contortus*.

Una de las inmunoglobulinas más estudiada en la respuesta a *H. contortus* es la IgA, esta inmunoglobulina generalmente está en cantidades elevadas en ovinos naturalmente resistentes. Es interesante el hecho de que la IgA generalmente está en niveles bajos en corderos y contrasta con los niveles elevados de los animales adultos con inmunidad adquirida. La función de esta inmunoglobulina aparentemente está relacionada



con la interferencia alimenticia en el parásito y posiblemente con la activación de células productoras de IL-5 (posiblemente eosinófilos) a través de complejos antígeno-IgA (Miller, 1996).

Martínez-Valladares *et al.* (2005), estudiaron la respuesta por IgA en moco abomasal, moco nasal y secreción salival a *T. circumcincta*, encontrando una correlación negativa significativa entre los niveles altos de IgA en el moco abomasal y la fertilidad y longitud promedio del parásito. Además encontraron una correlación positiva en los niveles de IgA entre todas las secreciones estudiadas.

Amarante *et al.* (2005), evaluaron la relación entre las células inflamatorias y la IgA específica a *H. contortus* con la resistencia a la infección natural en tres razas ovinas diferentes. En dos de las razas estudiadas (Santa Ines e Ile de France) encontraron correlaciones negativas significativas entre IgA anti L3 y carga parasitaria medida por el HGH y por número total de fases adultas, sin embargo, reportaron promedios similares de células inflamatorias y niveles de IgA entre la raza resistente (Santa Ines) y las dos razas susceptibles (Suffolk e Ile de France).

Una característica típica de las infecciones helmínticas es la inducción de IgE específica, lo cual es el resultado directo de una respuesta tipo Th2, de la cual se hablará más adelante. Sin embargo, a pesar de tener relación directa con las infecciones por helmintos, esta inmunoglobulina no ha sido estudiada en la hemoncosis ovina. Entre las funciones supuestas de la IgE está su participación en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, eosinófilos, células cebadas y macrófagos. En ensayos *in vitro*, se ha demostrado la capacidad de esta inmunoglobulina para reconocer alergenos en la superficie de nematodos a través de la región variable y por otro lado la activación del ataque de eosinófilos y células cebadas directo a la cutícula del parásito a través de un receptor de alta afinidad para IgE presente en la superficie de estas células (Fcε RI). Van Die *et al.* (1999) lograron determinar un epítipo con un dominio  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -fuc en la superficie de *H. contortus* que es reconocido por IgE, este epítipo ha sido encontrado con anterioridad en plantas,

helminchos y artrópodos pero no en mamíferos y se ha visto relacionado con la inducción de respuestas Th2 y alergias.

d).- Respuesta específica celular.

A nivel sistémico la inoculación de larvas de *H. contortus* induce un aumento de linfocitos en sangre e hipersensibilidad retardada hacia antígenos del parásito (Gill, 1994), proliferación de linfocitos T en linfonodos del abomaso (Jacobs *et al.*, 1995) que produce el agrandamiento de los mismos y el incremento de linfocitos CD4+ en sangre periférica (Pernthaner *et al.*, 1996).

Se ha establecido en modelos experimentales con roedores, que los linfocitos CD4+ o cooperadores son requeridos para el estado de inmunidad a NGE (Karanu *et al.*, 1997). Gill *et al.* (1993b), establecieron que la reducción de linfocitos CD4+ abate el estado de inmunidad a *H. contortus* en ovinos resistentes a la infección. Observaron que la administración de anticuerpos monoclonales (*monoclonal antibody* Mab) anti-CD4 a animales establecidos como resistentes a la hemoncosis, les impidió expresar la resistencia a la infección experimental y eliminaron altas cantidades de huevos en materia fecal, con cargas parasitarias elevadas. La hiperplasia de los mastocitos mucosales, así como la infiltración por eosinófilos en el tejido abomasal, se suprimió en estos animales. El desarrollo de la respuesta humoral de memoria, con producción de anticuerpos contra el parásito también fue significativamente inhibida. En contraparte la disminución de linfocitos CD8+ no tuvo ningún efecto en la alteración del estado de resistencia en estos animales.

En trabajos posteriores se han obtenido resultados variables a los de esta primera observación. Karanu *et al.* (1997), observaron que la reducción de linfocitos CD4+ abate parcialmente la inmunidad inducida por antígenos intestinales de *H. contortus* en ovinos F1 (Dorset X Columbia) y confirma la participación de los linfocitos CD4+ en el estado de inmunidad de los animales. Mientras que Peña *et al.* (2006), utilizando ovinos nativos de la costa del golfo (*Gulf Coast Native sheep*) reportan el aumento de la susceptibilidad de los

animales que fueron tratados con Mab anti-CD4 a la infección experimental con *H. contortus*, sin embargo no establecen diferencias entre el hematocrito, conteos de leucocitos o niveles de anticuerpos entre los animales tratados y no tratados con Mab anti CD4.

Balic *et al.* (2000b), reportaron un incremento significativo en las cuentas de linfocitos CD4+, gama-delta, linfocitos B y eosinófilos al desafiar animales con 50,000 L3 de *Haemonchus contortus* a los cinco días pos-infección. Sin embargo no encontraron cambios en estas subpoblaciones, a los 36 días pos-infección, aún cuando persistió la respuesta tisular incrementada por células cebadas. Estos resultados sugieren las fases larvarias inducen una respuesta por linfocitos CD4+ que no inducen las fases adultas.

A pesar de que se carece de datos para establecer las vías Th1-Th2 en rumiantes, muchas características de la infección por *H. contortus* podrían ser consideradas como respuestas típicas de la polarización de la respuesta hacia el perfil Th2, como la eosinofilia periférica o sanguínea (Douch y Morum, 1993; Pernthaner *et al.*, 1995), la hiperplasia de células cebadas en la mucosa abomasal y la respuesta por anticuerpos IgG1, IgA e IgE, particularmente esta última, regularmente se observa muy aumentada (Miller, 1996, Gill *et al.*, 2000).

Las citocinas son elementos fundamentales en la respuesta inmune contra helmintos. En modelos experimentales la infección primaria con helmintos despliega un perfil de citocinas tipo Th2, caracterizado principalmente por el incremento de IL-4, IL-5 e IL-13 (Meeusen, *et al.*, 2005). Sin embargo, en los ovinos la infección primaria con *H. contortus* no induce la elevación de estas citocinas sino hasta que los animales son retados en una segunda infección. (Balic *et al.*, 2003). Existe también evidencia de que las citocinas juegan un papel importante en el tipo de respuesta generada a la hemoncosis, Balic *et al.* (2002), establecieron que la IL-4, producida principalmente por mastocitos y GL, está fuertemente relacionada con el proceso de expulsión rápida, mientras que la IL-5, IL-13 y los eosinófilos están relacionados con la expulsión tardía. Las interleucinas son producidas en un inicio principalmente por los mastocitos (IL-4, IL-5 e IL-6) eosinófilos (IL-5, GM-CSF) y posiblemente por los linfocitos gama-delta (IL-4), la presencia local de altas cantidades,

sobre todo de IL-4, probablemente induzca la polarización de los linfocitos CD4+ hacia el subtipo Th2 (Miller, 1996).

La hipótesis de una respuesta tipo Th2 a la hemoncosis, está soportada por el trabajo realizado por Gill *et al.* (2000), estos autores reportaron que los cultivos de linfocitos derivados de linfonodos abomasales y mesentéricos provenientes de ovinos infectados con *H. contortus*, produjeron cantidades mayores de IL-5 (exclusiva del perfil Th2) que los de animales no infectados estimulados con antígenos larvarios o el mitógeno concanavalina A. También encontraron mayor cantidad de esta interleucina en un grupo de animales resistentes en comparación con un grupo susceptible a la hemoncosis, todos estos animales infectados y no infectados produjeron muy pocas cantidades de IFN $\gamma$  (exclusivo del perfil Th<sub>1</sub>). Los niveles altos de IL-5 en los animales resistentes correlacionó positivamente con los niveles de IgG1 e IgE séricas, así como con la cantidad de mastocitos y eosinófilos en la mucosa abomasal. Desafortunadamente en ese trabajo, no se realizó la evaluación del estado de resistencia de los animales a través de la medición de la carga parasitaria, sino que se supuso la susceptibilidad/resistencia de las líneas de animales utilizadas, con base en un reporte anterior realizado por Albers *et al.* (1987), por lo que no se puede establecer la eficiencia de la respuesta Th2 sobre la infección por *H. contortus*.

### **ALGUNOS ASPECTOS RELEVANTES DE LAS RAZAS OVINAS UTILIZADAS.**

Existen en la literatura científica muchos trabajos en los que se evaluó en forma comparativa la resistencia, la resiliencia y otros parámetros, principalmente productivos entre dos razas ovinas. Está reportada la mayor resistencia de la Nativa de Florida con respecto a la Rambouillet, de la Suffolk con la Dorset, o de la Saint Croix con la Dorset (datos citados por Mugambi *et al.*, 1997). La mayoría de estos estudios fueron realizados en condiciones de infección natural y fueron el antecedente para los programas de selección genética en algunos países.

El primer reporte con infección experimental fue hecho por Mugambi *et al.* (1996), comparando la resistencia y la resiliencia a la infección gradual controlada (ver *trickle*

*infection* más adelante) entre las razas Dorper y Red Maasai, resultando la segunda más resistente a la infección por *H. contortus*, además de mostrar mejor respuesta de resiliencia a la infección. Posteriormente, Wannyanu *et al.* (1997), confirman esos resultados en condiciones experimentales y de infección natural. En ambos trabajos la resistencia fue evaluada a través de conteos de huevos en heces y la resiliencia por medio del hematocrito, la cantidad de proteínas séricas totales y la ganancia diaria de peso. Estos trabajos han sido fundamentales para el programa de selección y reemplazo del rebaño ovino en Kenia, donde las pérdidas productivas por hemoncosis son considerables (Mugambi *et al.*, 1997).

La raza Blackbelly (**Bb**) ha sido señalada en estudios semejantes como una raza resistente a la infección por *H. contortus* (Yazwinski *et al.*, 1980; Gruner *et al.*, 2003). El Blackbelly (figura 8) también llamada Panza Negra de Barbados es una raza de pelo



Figura 8. Ejemplar de macho Blackbelly

desarrollada en el Caribe, que ha sido utilizada por su relativa alta resistencia a los NGE para su control (Gruner *et al.*, 2003). En la actualidad la raza se encuentra distribuida en el Caribe, Centroamérica, Sudamérica y en México es ampliamente utilizada. Ha sido seleccionada buscando principalmente prolificidad, ganancia de peso y resistencia a enfermedades. En general es un animal con buena rusticidad, no estacional, con excelente habilidad materna y buena producción lechera. Generalmente las hembras paren de dos a tres crías (AMCO, 2000). En algunos trabajos, esta raza se ha reportado con notable resistencia a la hemoncosis ovina, el primer reporte fue de Yazwinski *et al.* (1980).

Uno de los últimos reportes fue realizado por Gruner *et al.* (2003), en el cuál se compara la resistencia del Bb con la de la raza INRA 401, las dos razas presentaron resistencia a la hemoncosis ovina, sin embargo la raza Bb se mostró mucho más resistente a

la primera y segunda infección experimental con *H. contortus*, *T. colubriformis* y en menor grado a la infección con *T. circumcincta*. También la F1 entre ambas razas, mostró un aumento en la resistencia contra la raza INRA 401 pura, lo cuál resulta en una característica importante para los programas de mejoramiento genético.

Productivamente también la raza Bb tiene características notables. En un estudio llevado a cabo en Yucatán México, Carrillo y Segura (1993) compararon los parámetros productivos del Bb con los de la raza Pelibuey, con resultados muy similares entre las dos razas, sin embargo, el peso promedio y la ganancia diaria de peso resultaron con mejor heredabilidad en los animales Bb. Actualmente esta raza es bien aceptada por los productores y consumidores, tiene muy buenos parámetros productivos y reproductivos y muestra una alta resistencia natural a los NGE, por lo que en el futuro puede ser, como ha sido en otros países, una excelente opción para la mejora genética del ganado ovino en pastoreo en México (Notter *et al.*, 2003).

La raza Columbia es el resultado de la cruce de carneros Lincoln con ovejas Rambouillet y que desarrollada por el Departamento de Agricultura de los EE.UU., se le considera la primera raza creada en ese país. Esta raza tiene aún poca aceptación en México, estos animales son de doble propósito y se caracterizan por su gran tamaño y peso. Los machos alcanzan los 160



Figura 9. Ejemplar de macho Columbia

kg y las hembras hasta 110 kg. Presentan cara blanca cubierta de pelo, son acornes y carecen de arrugas en la piel (figura 9). Su presencia en México data de hace más de 20 años y se localiza principalmente en Tlaxcala, Puebla, Veracruz e Hidalgo (Lucas y Arbiza, 2001). Hasta la fecha no hay trabajos hayan evaluado la resistencia de esta raza a la hemoncosis ovina o cualquier otra parasitosis.

**EL MODELO DE INFECCIÓN GRADUAL CONTROLADA (*TRICKLE INFECTION*) EN EL ESTUDIO DE LA HEMONCOSIS OVINA.**

La mayoría de los trabajos realizados para evaluar la respuesta a la hemoncosis han utilizado infecciones únicas con un alto número de larvas de *H. contortus* (Schallig *et al.*, 1994; Gómez-Muñoz *et al.*, 1999; Terefe *et al.*, 2005) o se han utilizado infecciones naturales (Bricarello *et al.*, 2004). La ingestión de larvas en forma natural se realiza en forma paulatina, por lo que los resultados generados en las infecciones únicas masivas, probablemente no reflejen los patrones de una infección natural y exacerbaban la patogenicidad del parásito y la respuesta a la infección (Mugambi *et al.*, 1996). Por otro lado, en los trabajos que utilizan una infección natural, no se puede controlar el número de larvas ingeridas, que puede estar influido por el comportamiento individual de los animales al alimentarse en los potreros, ni se puede saber el instante de la infección, además tampoco se puede garantizar la homogeneidad de la infección y hay la posibilidad de pequeñas infecciones con otros nematodos diferentes a *H. contortus* que siempre están presente. Por lo anterior los resultados generados en infecciones a nivel de campo pueden ser una combinación de eventos. Mugambi *et al.* (1996), compararon la resistencia a NGE entre dos razas (Red Masaai vs Dorper) utilizando un modelo de infección gradual controlada (*trickle infection*), utilizando ocho dosis diferidas, con un bajo número de L3 de *H. contortus* durante diez semanas (1000 larvas semanales), para infectar corderos, con lo que controlaron el tiempo, la dosis y la especificidad de la infección. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este modelo probablemente tengan menos artefactos experimentales.

## 2.- JUSTIFICACIÓN

En México y en otras partes del mundo, la resistencia de los NGE a los fármacos antihelmínticos es cada vez más común, por lo que es necesario emplear y comprender otras estrategias alternativas para el control de los NGE. Entre estas estrategias se encuentra la utilización de razas de ovinos resistentes o resilientes a la infestación por *H. contortus*, por lo anterior, es importante evaluar la resistencia de las razas de ovinos presentes en México, así como entender los mecanismos inmunológicos que están involucrados en la resistencia a la hemoncosis.

Hasta el momento, los reportes de la respuesta inmune local en los ovinos son aislados y se han estudiado poco las subpoblaciones linfocitarias a nivel abomasal. No hay estudios que comparen a dos razas con diferente grado de resistencia a la hemoncosis y al mismo tiempo evalúen diferentes parámetros de resistencia asociándolos a la respuesta inmunológica al parásito.

En el presente trabajo se pretende evaluar comparativamente la resistencia entre dos razas ovinas, a través de los conteos de HGH, el conteo de FA en el abomaso, asociándolos con elementos de la respuesta inespecífica (mastocitos y los eosinófilos sanguíneos y tisulares), con parámetros de resiliencia (proteínas totales, albúmina, globulinas, pepsinógeno sérico), así como con parámetros inmunológicos (niveles de IgG sérica anti-L3 de *H. contortus*, células plasmáticas y subpoblaciones linfocitarias en mucosa abomasal) entre las razas Blackbelly y Columbia desafiados con una infección gradual controlada con *H. contortus*. Lo anterior puede ayudar a aclarar el papel de la respuesta innata y la respuesta inmunológica en el grado de susceptibilidad/resistencia en diferentes razas a la hemoncosis ovina.



### **3.- HIPÓTESIS.**

Los ovinos Blackbelly presentan a nivel local y sistémico una respuesta inmunológica diferente contra *Haemonchus contortus* que la producida por los Columbia, lo que permite explicar su menor susceptibilidad a la hemoncosis.

## 4.- OBJETIVOS.

### General:

Comparar la resistencia y la respuesta inmune a la hemoncosis ovina entre corderos de la raza Blackbelly y Columbia infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

### Particulares:

1. Determinar mediante la medición de la eliminación de huevos en heces y el conteo de las fases adultas en el abomaso, las diferencias en la susceptibilidad/resistencia a *Haemonchus contortus* entre ovinos de las razas Blackbelly y Columbia infectados de manera gradual y controlada con el parásito.
2. Determinar las diferencias en el estado de resiliencia entre las dos razas ovinas en estudio, midiendo la afección por la hemoncosis en los animales a través de los niveles de pepsinógeno sérico, proteínas séricas totales, albúmina sérica y globulinas séricas.
3. Comparar la respuesta no específica a la hemoncosis ovina entre las dos razas ovinas en estudio mediante el conteo de eosinófilos sanguíneos, así como eosinófilos y mastocitos abomasales.
4. Comparar la inmunidad humoral sistémica a la hemoncosis ovina entre las dos razas ovinas en estudio por medio de la realización de la cinética de anticuerpos séricos contra antígenos de L3 de *H. contortus* que son reconocidos por animales Blackbelly y Columbia.

5. Analizar por Western blot los patrones de antígenos de L3 de *H. contortus* reconocidos por la respuesta de anticuerpos de los animales Blackbelly y Columbia.
6. Determinar las diferencias en las subpoblaciones de linfocitos T (CD4+, CD8+ y gama-delta) y linfocitos B (células plasmáticas productoras de IgM, IgG e IgA) entre los ovinos Blackbelly y Columbia a nivel de la región fúndica, pilórica y linfonodo abomasal.
7. Correlacionar las variables estudiadas con el grado de susceptibilidad/resistencia a la hemoncosis ovina en los animales infectados.

**VOLVER AL INDICE**

## 5.- MATERIAL Y MÉTODOS

### LUGAR DE REALIZACIÓN.

El presente proyecto se realizó en la Unidad de investigación Multidisciplinaria en Salud Animal L-504 (C-4) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la Unidad de Posgrado de la misma facultad.

### ANIMALES.

Se utilizaron 27 corderos machos de la raza Blackbelly (Bb) y 29 de la raza Columbia (Cb) de 6 a 8 meses de edad. Los corderos provinieron de rebaños de pie de cría para asegurar pureza racial, antes del experimento los animales fueron encontrados clínicamente sanos y negativos a NGE. Fueron mantenidos en condiciones libres de nematodos y alimentados con una mezcla de 50% de alimento comercial para ovino (14% de proteína cruda) y 50% de alfalfa seca molida. Cada animal recibió el 4% de su peso vivo de la mezcla alimenticia por día y agua *ad libitum*.

### OBTENCIÓN DE LARVAS DE TERCER ESTADIO DE *Haemonchus contortus*.

La cepa de *H. contortus* utilizada en este trabajo, fue aislada a partir de un rebaño ovino en Jilotepec Edo. de México y ha sido mantenida a través de pases sucesivos en corderos libres de NGE. De uno de estos animales, a partir de los 28 días posteriores a la infección con 5000 L3 del parásito, se hizo la recolección de materia fecal con bolsa colectora en la región perianal, los cultivos larvarios fueron realizados según la técnica de Corticely-Lay (Alba-Hurtado, 2007) como se describe: Se colocaron aproximadamente 10 a 15 g de materia fecal dentro de una caja de Petri de 9 cm de diámetro, ésta a su vez, fue colocada dentro de otra caja de 15 cm de diámetro con agua destilada sin que ésta estuviera en contacto directamente con la materia fecal, los cultivos se incubaron a 28-30 C por siete

días, posteriormente la caja con la materia fecal fue retirada y las larvas se colectaron con la totalidad del agua destilada, la viabilidad de las mismas, fue evaluada a través del porcentaje de larvas móviles. Finalmente, las larvas fueron contabilizadas para estandarizar los inóculos y estos fueron almacenados en agua destilada a 4 °C hasta su utilización.

#### EXPERIMENTO 1.

Los grupos infectados (n = 10) y testigos no infectados (n = 5) de cada raza fueron balanceados de acuerdo al peso corporal. Diez corderos Bb y 10 corderos Cb fueron infectados por medio de sondeo ruminal con seis inoculaciones semanales de 1000 L3 de *H. contortus* (Mugambi *et al.*, 1996). Desde la semana 0 (al momento de la primera inoculación) a la semana 15, se colectó materia fecal y sangre con anticoagulante (EDTA). Se determinó semanalmente el número de HGH y los valores de eosinófilos sanguíneos (ES). Cinco animales de cada raza fueron utilizados como testigos (figura 9). Los datos de HGH de todos los animales infectados de ambas razas fueron promediados, el resultado del promedio más/menos dos errores estándar (**EE**) fueron tomados como criterio de selección. Los cinco primeros animales de cada extremo (menores y mayores eliminadores de HGH) correspondieron a corderos de la raza Bb y Cb respectivamente. La correlación estadística entre HGH y eosinófilos periféricos fue realizada con los datos de estos diez animales.

#### EXPERIMENTO 2.

Los grupos infectados (n = 10) y testigos no infectados (Bb n = 2; Cb n = 4) de cada raza fueron balanceados de acuerdo al peso corporal. Se formaron grupos de 10 animales infectados y dos animales testigos para la raza Bb y 10 infectados y cuatro testigos para la raza Cb. A cada animal de los grupos infectados se les inoculó por sondeo ruminal 1000 L3 de *H. contortus*, semanalmente durante seis semanas. Durante 16 semanas (semanas 0 a 15) se tomaron muestras de materia fecal directamente del recto, de sangre a través de punción yugular con y sin anticoagulante (EDTA) y se determinó semanalmente el número de HGH, la cantidad de IgG sérica anti-L3, la cantidad de proteínas totales (PT), albúmina (ALB) y globulinas séricas (GLOB). En la semana 15 todos los animales fueron

sacrificados humanitariamente usando pistola de émbolo cautivo, se contó el número de fases adultas (FA) en el abomaso y se tomaron muestras de aproximadamente un cm<sup>3</sup> de la región fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso así como del linfonodo abomasal (LNA). Estas muestras fueron fijadas por partes iguales en paraformaldehído al 4% por 24 horas para cortes en parafina y en OCT (Tissue-Tek) hasta su utilización para cortes en criotomo (figura 10).

Los datos de HGH de todos los animales infectados de ambas razas fueron promediados, el resultado del promedio más o menos dos errores estándar fue tomado como criterio de selección. Los cinco primeros animales de cada extremo (menores y mayores eliminadores de HGH) correspondieron a corderos de la raza Bb y Cb respectivamente. Las correlaciones estadística, los conteos de subpoblaciones linfocitarias y las células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) fueron realizados con las muestras de estos animales.

#### DETERMINACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA.

La eliminación de huevos en la materia fecal de cada animal se determinó semanalmente mediante la técnica de McMaster modificada (Alba-Hurtado, 2007) y se expresó como la media del número de huevos por gramo de heces (HGH). Para los conteos de las fases adultas presentes en abomaso (FA), a las 15 semanas de la primera inoculación los animales fueron sacrificados y el abomaso fue ligado y removido, el contenido abomasal fue llevado a dos litros con agua destilada y se tomo una muestra del 10%, todos los gusanos adultos fueron separados entre sí mediante aguja de disección y contados en forma separada hembras y machos (Le Jambre, 1995).

#### DETERMINACIÓN DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS (ES).

Para el conteo de ES se utilizó sangre fresca en relación de 1:10 con solución de Carpentier (eosina Y al 1 % y 40 % de formaldehído), se homogenizó con pipeta de Thoma durante 3 minutos, posteriormente la mezcla se dejó reposar durante 15 minutos y el conteo

fue realizado en un hemocitómetro con objetivo de 40x, los resultados fueron expresados como eosinófilos por  $\text{mm}^3$  (Hohenhaus *et al.*, 1998).

#### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (PT), ALBÚMINA (ALB), GLOBULINAS (GL) SÉRICAS.

La medición de PT y ALB se realizó por espectrofotometría mediante un kit comercial Proti 2, (Wiener labs) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las GL se determinaron de manera indirecta por medio de la diferencia entre la proteína total y albúmina.

#### DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PEPSINÓGENO SÉRICO.

Para la determinación de los niveles de pepsinógeno sérico, se acidificaron 0.5 ml del suero problema con 1.25 ml de una solución 0.06M de HCl durante dos horas a 37 °C, posteriormente toda la proteína del suero fue precipitada con 4 ml de ácido tricloroacético al 10%, la mezcla fue centrifugada a 3500 rpm (rotor de 10 cm) por 10 minutos, se separó un mililitro del sobrenadante y fue neutralizado con 2 ml de una solución 0.5M de NaOH. Finalmente a la muestra le fue adicionado 0.5 ml de reactivo de Folin Ciocalteau (SIGMA Labs.) y fue leída por espectrofotometría a 700 nm antes de 20 minutos. Para cada prueba se corrió en forma paralela un tubo blanco, en el cuál, el suero inmediatamente de ser acidificado con la solución 0.06M HCl fue precipitado con ácido tricloroacético y leído de la misma manera que el tubo problema, la diferencia de absorbancia entre el tubo problema y el blanco fue tomado para los promedios semanales de cada grupo (Simpson *et al.*, 1997).

#### OBTENCIÓN DE EXTRACTOS SOMÁTICOS DE L3 DE *Haemonchus contortus*.

El extracto se hizo a partir de  $10^6$  L3 de *H. contortus* obtenidas como se describió anteriormente. Las larvas fueron lavadas tres veces en solución salina fisiológica estéril con antibióticos (penicilina 10,000 UI, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , anfotericina B 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SIGMA Labs) y maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , iodoacetamida 1.8

mg/ml y PMSF 1mM SIGMA Labs) hasta la obtención de una pasta homogénea sin fragmentos identificables de larvas. Posteriormente el extracto fue centrifugado por 1 hora a 20,000 g a 4 °C y el sobrenadante fue filtrado con membrana de 0.22 µm, alicuotado y conservado a -20 °C hasta su utilización (Camargo *et al.*, 1992). La cantidad de proteína total fue determinada por el método de Bradford, (1976), utilizando albúmina sérica bovina como referencia.

#### ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EXTRAIDAS DE LA L3 DE *Haemonchus contortus*.

Las proteínas de L3 de *H. contortus* fueron separadas por electroforesis en condiciones reductoras, utilizando SDS-PAGE en sistema discontinuo (gel concentrador al 4% y gel separador al 12%). Se utilizó una cámara de electroforesis Mini - Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Labs). Las muestras fueron mezcladas en relación 1:1 con buffer reductor de Laemmli y se sometieron a ebullición durante 2 minutos, de esta mezcla se corrieron 4.5 µg de proteínas por pozo. En cada corrimiento se utilizaron marcadores de referencia de peso molecular (Prestained Standards Biorad Labs.). Las constantes del corrimiento fueron: 150 voltios, 120 miliamperes para el gel concentrador y 150 voltios, 85 miliamperes para el gel separador. Todo el corrimiento fue realizado en cámara fría. Las proteínas en el gel fueron visualizadas con una tinción de nitrato de plata (Johansson, 1988; Muñoz, 1997).

#### TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS DE *Haemonchus contortus*.

El extracto de proteínas de L3 fue separado por electroforesis con peine continuo a razón de 75 µg por gel. Después del corrimiento, los geles se equilibraron por 15 minutos en buffer de transferencia y posteriormente fueron colocados entre dos membranas de nitrocelulosa y varias capas de papel filtro empapados con el mismo buffer. El sandwich fue puesto entre dos placas de vidrio y presionados con 10 kg de peso por 48 hrs. Al finalizar la transferencia, las membranas fueron retiradas. La eficiencia de la transferencia fue verificada realizando una tinción de tinta china a una tira de cada membrana. Por último



las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 5% (ASB 5%) en Tris-buffer salino durante toda la noche a 4° C, para ser conservada a -20°C hasta su utilización (Kyhse-Andersen, 1988; Muñoz, 1997).

#### DESARROLLO DEL INMUNOBLOT.

Las membranas transferidas fueron cortadas en tiras de aproximadamente 4 mm, cada una de las tiras fue incubada con los sueros problema, a una dilución 1:10 en PBS-ABS 1% por 3 horas en agitación constante, posteriormente las membranas fueron lavadas con PBS-Tween al 0.1% e incubadas por una hora con una dilución 1:1500 de IgG de conejo peroxidado anti-IgG ovina (Bethyl A130-101P), finalmente las tiras fueron reveladas con una solución de 4-Cl-naftol al 0.05%, en PBS y metanol al 16% (Coligan *et al.*, 1994). Los pesos moleculares de los antígenos fueron determinados por medio de un software Gene Tools (Syngene Inc).

#### ELISA PARA DETERMINACIÓN DE IgG ESPECÍFICA a *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp NUNC Labs) sensibilizadas con 1.25 µg/ml de antígeno de L3 de *H. contortus* en buffer de carbonatos (pH 9.6) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente las placas fueron bloqueadas con ASB 5% y conservadas a 4 °C hasta su utilización. Para cada muestra se utilizaron por triplicado 50 µl por pozo de una dilución 1:400 del suero en PBS con ASB 1% por 2 horas a 37 °C, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS -Tween 20 al 0.01% y a cada pozo se le colocaron 50 µl de IgG de conejo peroxidado anti-IgG ovina (Bethyl A130-101P) a una dilución de 1:10 000 por una hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces como se describió anteriormente y el desarrollo del color se realizó con OPD al 0.05% y peróxido de hidrógeno 0.001% en solución reguladora de citratos (Gómez-Muñoz *et al.*, 1999). La lectura de las placas se realizó a 492 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent).

## CUENTAS DE EOSINÓFILOS, MASTOCITOS Y CÉLULAS PLASMÁTICAS TISULARES EN CORTES EN PARAFINA.

Los tejidos fijados en paraformaldehído al 4% fueron deshidratados y embebidos en parafina para realizar cortes histológicos. Los cortes fueron teñidos con cromótopo 2R al 1% por 30 minutos para el conteo de eosinófilos, azul de toluidina al 0.5% por 40 minutos para el conteo de mastocitos o con verde metil-pironina al 2% por 5 minutos para el conteo de células plasmáticas. Para cada caso, las distintas células (eosinófilos, mastocitos o células plasmáticas) se contabilizaron en la RFA y RPA por medio de un analizador semi-automático y un software de análisis de imágenes (Image Pro Plus). Para cada región del abomaso se contaron 20 campos con un lente objetivo de 40X y lente ocular de 10X, desde la muscular hasta la superficie de la mucosa. Los eosinófilos tisulares fueron contabilizados también en el linfonodo abomasal, en este caso, se contaron 15 campos continuos pasando por el centro del órgano. En los conteos de eosinófilos y mastocitos, se registró el número de células y el área de tejido analizado en  $\mu\text{m}^2$  y las cuentas fueron expresadas en cantidades totales de células por  $\text{cm}^2$  de tejido (Bricarello *et al.*, 2004). En el caso de las células plasmáticas, se reportaron como células verde metil-pironina positivas (CEL-VMP+) por campo.

## INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD4+, CD8+ Y WC1+ (gama-delta) EN MUCOSA Y LINFONODO ABOMASAL.

Se realizaron cortes en congelación a 5  $\mu\text{m}$  de las regiones fúndica y pilórica abomasal así como de linfonodo abomasal y estos fueron adheridos a los portaobjetos con poli-L-lisina (SIGMA LABS). La inmunohistoquímica fue realizada con un kit comercial (Zymed labs) con sistema biotina avidina peroxidada. Cada tejido fue bloqueado con peróxido, biotina y avidina previo al ensayo. La detección de cada marcador fue realizada incubando las muestras 24 horas a 4 °C con anticuerpos monoclonales anti-CD4 ovina, anti- CD8 ovina (VMRD Labs.) o anti-WC1 bovina (Serotec Labs.), se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS, posteriormente se incubó una hora con el anticuerpo secundario cabra anti-IgG de ratón biotinilado (Zymed) y finalmente 15 minutos con

estreptavidina peroxidada. El revelado se realizó con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina del kit.

#### INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE CÉLULAS IgM+, IgG+ e IgA+ (CEL-Ig+) EN MUCOSA ABOMASAL.

Se realizaron cortes en congelación a 5  $\mu\text{m}$  a partir de las muestras, estos fueron adheridos en portaobjetos tratados con poli-L-lisina y posteriormente fijados con acetona durante 3 segundos. Las láminas ya preparadas se conservaron en refrigeración a 4° C. Para el conteo de células totales productoras de IgM, IgG o IgA se siguió una técnica modificada de Gill *et al.* (1992). Las láminas se sumergieron por 24 h en PBS a 4 °C, posteriormente el tejido fue bloqueado con ASB 2% durante 90 minutos, se efectuaron 3 lavados cada 5 minutos con PBS, se incubaron a 37° C con 40  $\mu\text{l}$  de anticuerpo de conejo anti-IgA (A 130-108 A-2 Bethyl), anti-IgG (A 130-101 A-5) o anti-IgM (A130-109 A-3) ovinas en PBS-ASB 2% durante 90 minutos, se hicieron tres lavados en PBS y después las muestras se incubaron a 37° C con 30  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina TRITC (SIGMA Labs.) a una dilución de 1:25 en PBS con suero de cabra al 10%. Se hicieron lavados con PBS y finalmente los tejidos fueron montados en glicerol al 90%. Los conteos de células marcadas fueron realizadas en un microscopio de epifluorescencia (OLIMPUS Inc) abarcando toda la mucosa abomasal, variando el número de campos entre 25 y 35 por muestra, y las cuentas fueron expresadas en células por campo. En cada lamina, un corte con el mismo proceso exceptuando la adición de conjugado, fue utilizado como control negativo.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.

Los datos de HGH, proteína sérica total, albúmina, globulinas y niveles de IgG fueron analizados mediante un modelo general lineal (*General Linear Model*) para muestras repetidas del programa Statistica for Windows®. Los datos de HGH fueron transformados por la fórmula  $\log_{10}(\text{HGH} + 1)$  para estabilizar las varianzas previo al análisis. Para los antígenos de L3 reconocidos en el Western blot se realizó un análisis de

varianza multifactorial con Stat Graphics ver. 3.0. Los datos de los conteos de eosinófilos, mastocitos, linfocitos y células plasmáticas tisulares fueron analizados por ANOVA factorial, utilizando el Software Statistica for Windows. Se utilizó una correlación de Pearson para todas las variables utilizadas.

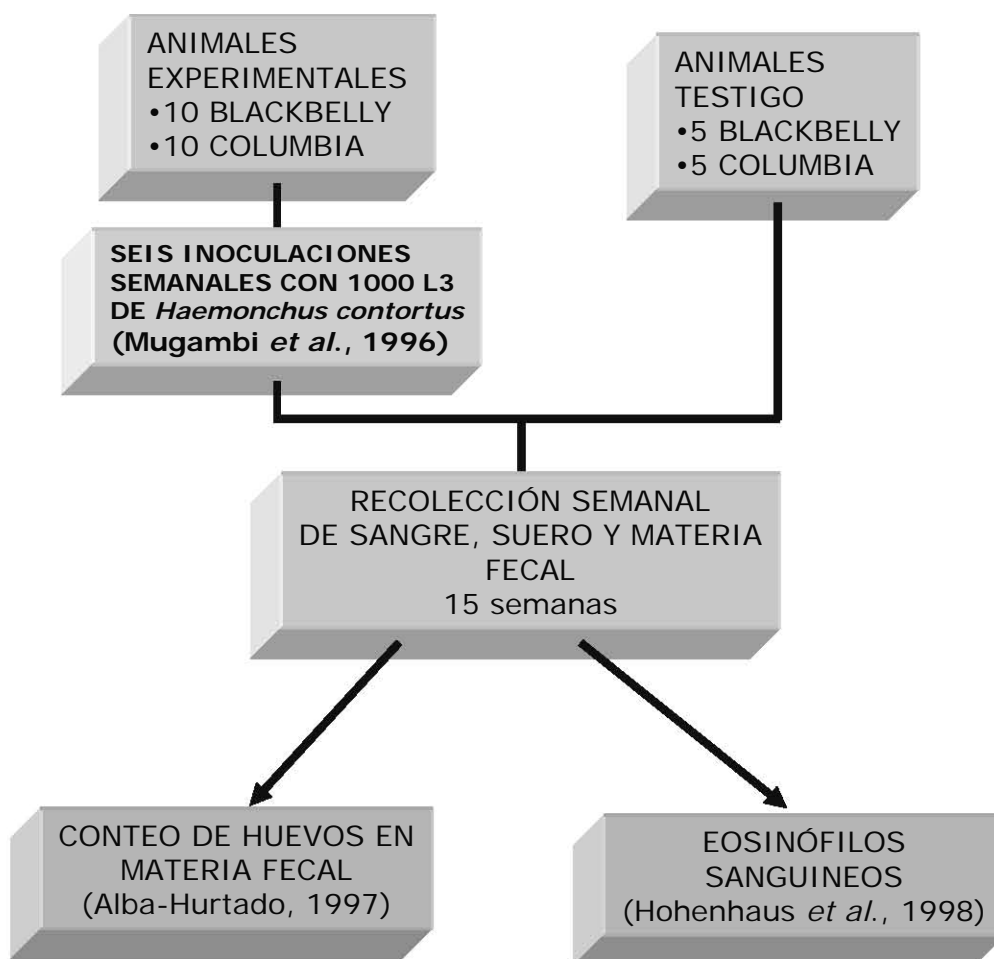


Figura 10. Diseño del experimento 1

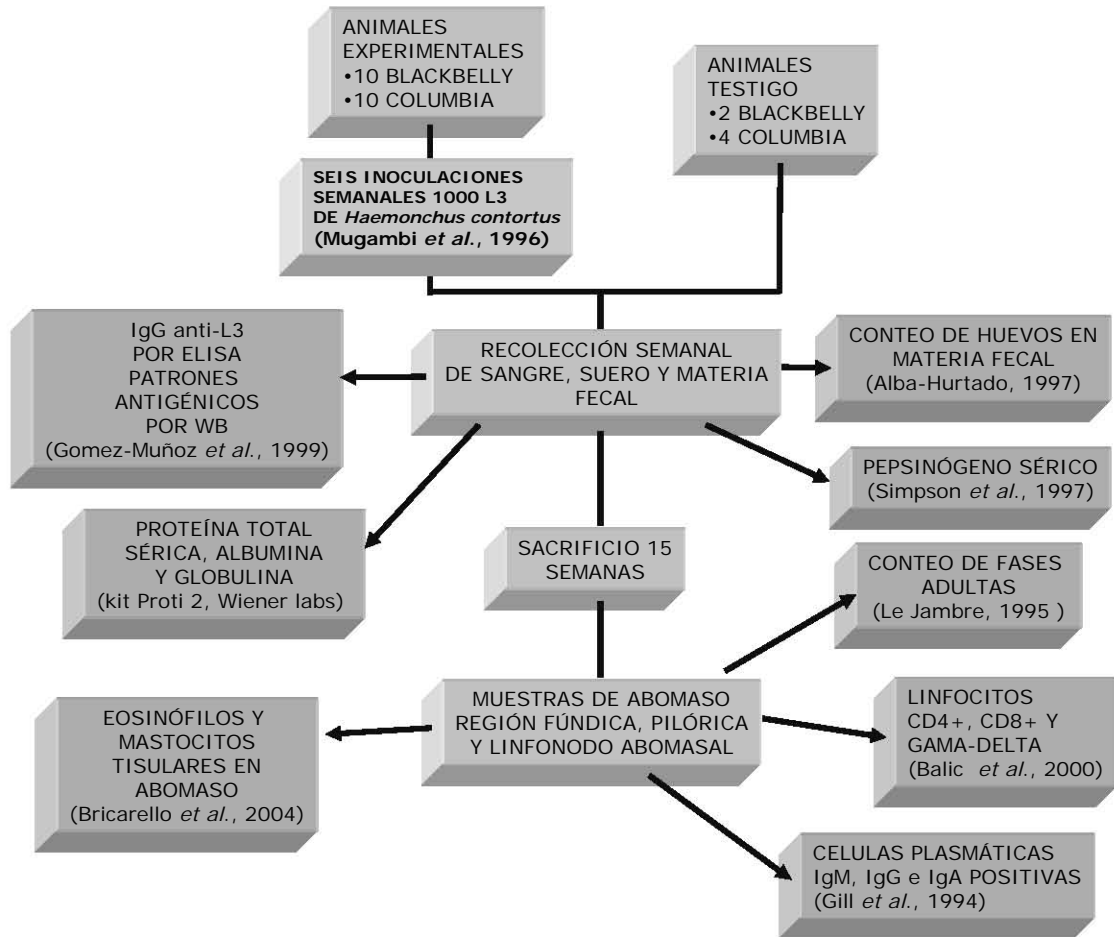


Figura 11. Diseño del experimento 2

VOLVER AL INDICE

## RESULTADOS

VOLVER AL INDICE

### I.- EXPERIMENTO 1

#### A).- ELIMINACIÓN DE HGH EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *Haemonchus contortus*.

Los promedios semanales de eliminación de HGH por los grupos Bb y Cb infectados durante el primer experimento, se ilustran en la figura 12. En la tercera semana pos-infección (**p.i.**) los animales de ambas razas comenzaron a eliminar huevos de *H. contortus* en la materia fecal. El Análisis de varianza para muestras repetidas mostró un efecto raza ( $p = 0.005$ ) y una interacción semana/raza ( $p = 0.029$ ) estadísticamente significativo. A partir de la semana ocho y hasta el final del experimento, los animales infectados de la raza Cb mostraron números de HGH mayores ( $p < 0.05$ ) que los animales de la raza Bb. Los promedios totales de HGH fueron de 1930.6 ( $\pm 136.9$ ) y 567.7 ( $\pm 60.9$ ) para los grupos Cb infectado y Bb infectado respectivamente. Los animales testigo, no infectados, de ambas razas no eliminaron huevos en la materia fecal durante el desarrollo del experimento.

#### B).- NIVELES DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *Haemonchus contortus*.

Los promedios semanales de conteos de eosinófilos sanguíneos en los cuatro grupos experimentales se ilustran en la figura 13. En el análisis de varianza para muestras repetidas de todos los animales experimentales el efecto infección ( $p = 0.011$ ), el efecto raza ( $p = 0.001$ ) y la interacción raza/infección ( $p = 0.020$ ) fueron estadísticamente significativos. Los promedios totales de eosinófilos sanguíneos fueron de 132.8 ( $\pm 4.2$ ) y de 75.7 ( $\pm 3.0$ ) eosinófilos por  $\text{mm}^3$  para el grupo Bb infectado y testigo respectivamente, y de 105.0 ( $\pm 4.6$ ) y 73.3 ( $\pm 4.2$ ) eosinófilos por  $\text{mm}^3$  para los grupos Cb infectado y testigo respectivamente. Los datos mostraron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la semana 4

FIGURA 12

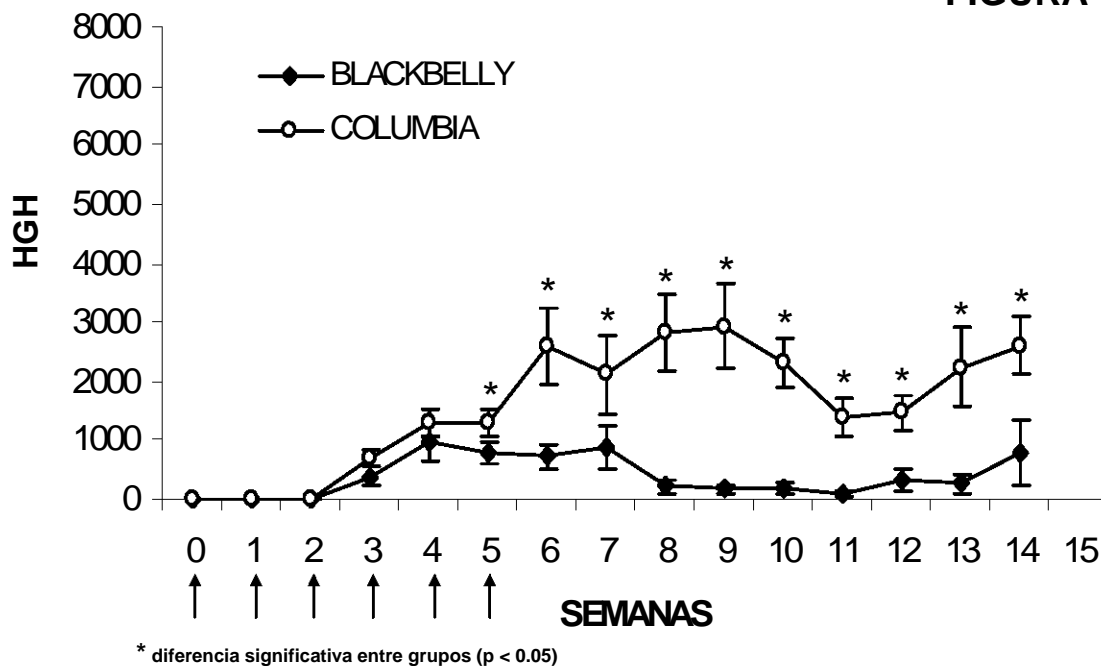
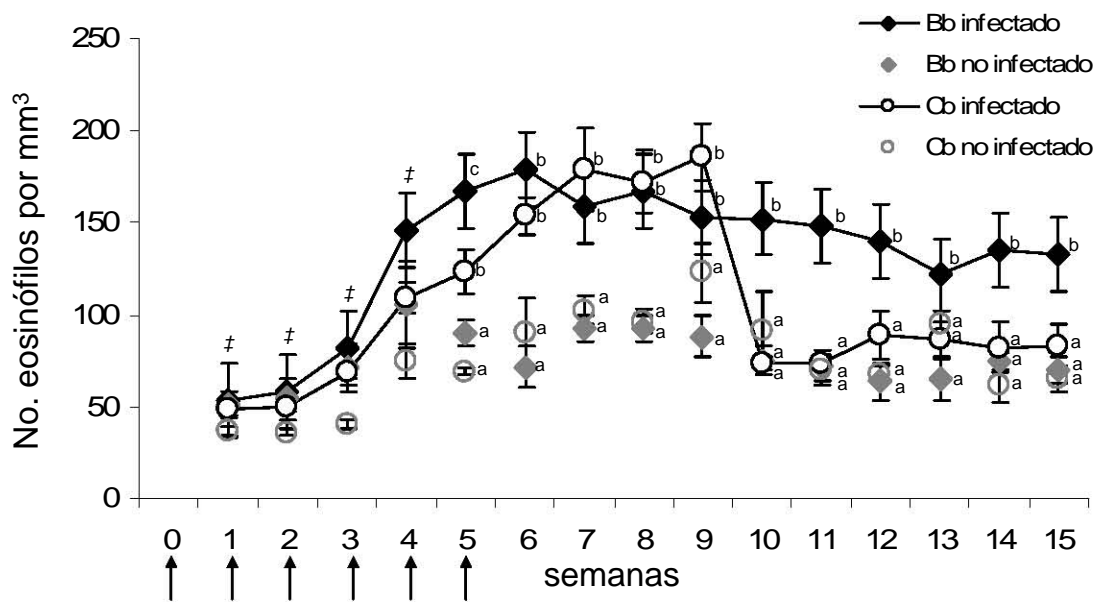


FIGURA 12. Media semanal  $\pm$  error estándar ( $\pm$ EE) de los conteos de huevos por gramo de heces (HGH) en corderos Blackbelly (n = 10) y Columbia (n = 10) del experimento 1. Los corderos fueron infectados con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en forma gradual y controlada. Las flechas (↑) indican cada inoculación con 1000 L3. Los animales no infectados no eliminaron huevos del parásito en ninguna semana del experimento (datos no mostrados en la gráfica).

**FIGURA 13**



Letras diferentes entre grupos indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).  
 #Semanas en donde no hubo diferencias estadísticas entre grupos infectados.

FIGURA 13. Media semanal ( $\pm$ EE) del conteo de eosinófilos sanguíneos en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* ( $n = 10$ ) y animales no infectados ( $n = 5$ ) en el experimento 1. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito.



hasta la semana 15 del experimento en los animales Bb infectados con respecto su grupo testigo y de la semana 10 a la 15 con respecto al grupo Cb infectado. El grupo Cb infectado mostró un aumento significativo de la semana 5 a la 9 del experimento con respecto a su grupo testigo no infectado, a partir de la semana 10 se registró una caída súbita de los promedios de ES en el grupo infectado no habiendo diferencias estadísticas en los promedios de ES a partir de esta semana con el grupo testigo y hasta el final del experimento. En los animales Bb infectados los valores se mantuvieron elevados hasta el final del experimento. La correlación entre los eosinófilos sanguíneos y la eliminación de HGH en los animales infectados fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) y se muestra en la figura 14.

## II.- EXPERIMENTO 2.

### A).- ELIMINACIÓN DE HGH EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *Haemonchus contortus*.

Los resultados semanales de la eliminación de HGH por las razas experimentales en el segundo experimento se ilustran en la figura 15. De manera similar al primer experimento, en la tercera semana p.i., los animales de ambas razas comenzaron a eliminar huevos de *H. contortus* en la materia fecal. A partir de la semana cuatro y hasta el final del experimento, los animales inoculados de la raza Cb mostraron números de HGH mayores ( $p < 0.05$ ) que los animales de la raza Bb siendo los promedios finales de 2402.0 y 124.3 para los grupos Cb y Bb infectados respectivamente. Los animales no infectados no eliminaron huevos en la materia fecal durante los experimentos.

### B).- CONTEO DE FASES ADULTAS EN ABOMASO.

Los resultados de los conteos de fases adultas en abomaso de los animales del experimento 2 se ilustran en el cuadro 1. El número de FA fue significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) en los animales de la raza Cb con respecto a los Bb, ( $2368 \pm 780.7$  y  $57 \pm 20.8$

FIGURA 14

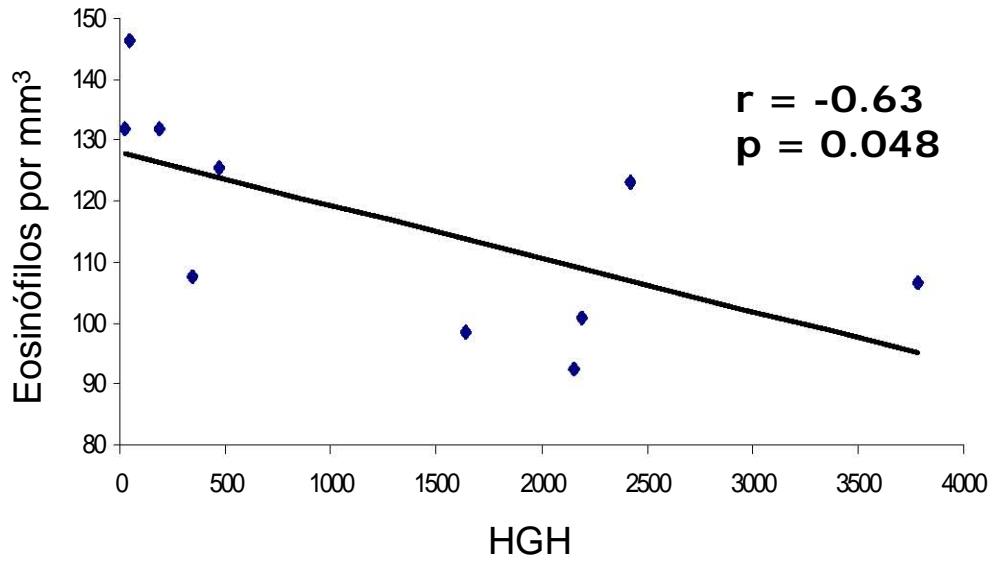


FIGURA 14. Correlación de eosinófilos sanguíneos y huevos por gramo de heces (HGH) en corderos con alta ( $n = 5$ ) y baja ( $n = 5$ ) eliminación de HGH infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en el experimento 1.

FIGURA 15

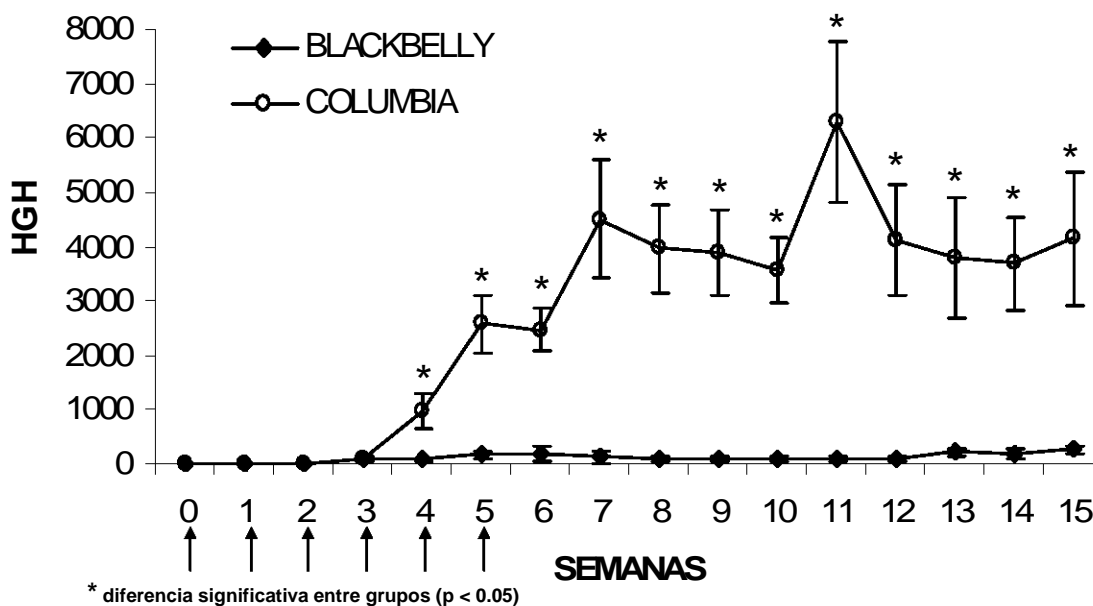


FIGURA 15. Media semanal ( $\pm$ EE) de los conteos de huevos por gramo de heces (HGH) en corderos Blackbelly (n = 10) y Columbia (n = 10) del experimento 2. Los corderos fueron infectados con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* en forma gradual y controlada. Las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito. Los animales no infectados no eliminaron huevos del parásito en ninguna semana del experimento (datos no mostrados en la gráfica).

## CUADRO 1

**CUADRO 1. NÚMERO DE FASES ADULTAS DE *Haemonchus contortus* RECUPERADAS DEL ABOMASO DE CORDEROS COLUMBIA Y BLACKBELLY INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 6000 L3 DEL PARÁSITO.**

Raza	Arete	No. de hembras (h)	No. de machos (m)	Total	Relación h/m	Establecimiento (%)
Bb	33	15	5	20	3,00	0,33
Bb	40	45	45	90	1,00	1,50
Bb	47	70	10	80	7,00	1,33
Bb	35	75	30	105	2,50	1,75
Bb	36	0	0	0	ND	0,00
Bb	37	1	0	1	ND	0,02
Bb	45	0	3	3	ND	0,05
Bb	34	110	100	210	1,10	3,50
Bb	38	25	15	40	1,67	0,67
Bb	43	20	10	30	2,00	0,50
PROMEDIOS		36,1	21,8	57,9 <sup>a</sup>	2,61	0,97 <sup>a</sup>
Cb	801	1960	1690	3650	1,16	60,83
Cb	811	625	437	1062	1,43	17,70
Cb	806	4410	3660	8070	1,20	134,50
Cb	812	740	1100	1840	0,67	30,67
Cb	816	120	30	150	4,00	2,50
Cb	805	1080	540	1620	2,00	27,00
Cb	809	2560	2240	4800	1,14	80,00
Cb	813	170	270	440	0,63	7,33
Cb	804	330	615	945	0,54	15,75
Cb	820	520	590	1110	0,88	18,50
PROMEDIOS		1251,5	1117,2	2368,7 <sup>b</sup>	1,37	39,48 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

respectivamente). La tasa de establecimiento (determinada dividiendo el número de fases adultas encontradas entre el número total de larvas suministradas en las inoculaciones) fue de 39.4% en la raza Cb y de 0.97% en la raza Bb. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la proporción hembra/machos del parásito entre razas.

#### C).- NIVELES DE PEPSINÓGENO SÉRICO EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *H. contortus*.

A partir de la semana cinco del experimento los animales infectados de ambas razas mostraron niveles elevados ( $p < 0.01$ ) de pepsinógeno sérico con respecto a los animales no infectados. Los corderos Bb mantuvieron estos niveles elevados hasta la semana ocho del experimento y posteriormente bajaron en la semana nueve a niveles no significativos con respecto a los no infectados, mientras que en los Cb se mantuvieron elevados hasta la semana diez del experimento (figura 16). Los animales Cb infectados mostraron en las semanas seis y diez (0.22 y 0.32 D.O. respectivamente), picos significativamente ( $p < 0.01$ ) más elevados que los Bb (0.15 y 0.04 D.O. respectivamente) y los Cb no infectados (0.03 y 0.02 D.O. respectivamente).

#### D).- NIVELES DE PROTEÍNAS TOTALES, ALBUMINA Y GLOBULINAS EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *Haemonchus contortus*.

El análisis de proteínas séricas totales (PST) de todos los animales experimentales mostró efecto significativo raza ( $p < 0.05$ ) e interacción raza/infección ( $p < 0.05$ ) sobre la concentración de PST, El efecto de la infección por si solo no fue significativo ( $p = 0.75$ ). Los promedios de los niveles de PST fueron de  $6.8 \pm 0.042$  g/dl para la raza Bb y de  $6.3 \pm 0.046$  g/dl para la raza Cb. Los animales de la raza Cb mostraron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en los niveles de PST desde la semana 2 hasta la 15, con respecto al grupo Bb infectado (figura 17). El análisis de albúmina sérica (AS) de todos los animales infectados mostró solo efecto significativo raza ( $p < 0.001$ ). Los niveles de AS mostraron ser más bajos ( $p < 0.05$ )

FIGURA 16

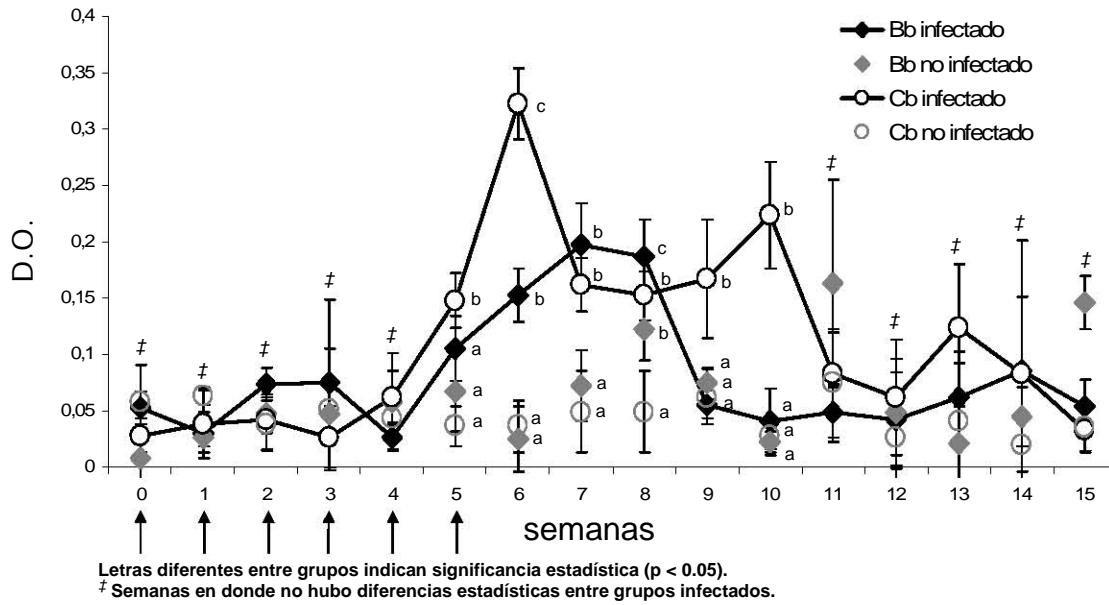


FIGURA 16.- Media semanal ( $\pm$ EE) de los niveles de pepsinógeno sérico en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). las flechas ( $\uparrow$ ) indican cada inoculación con 1000 L3 del parásito.

FIGURA 17

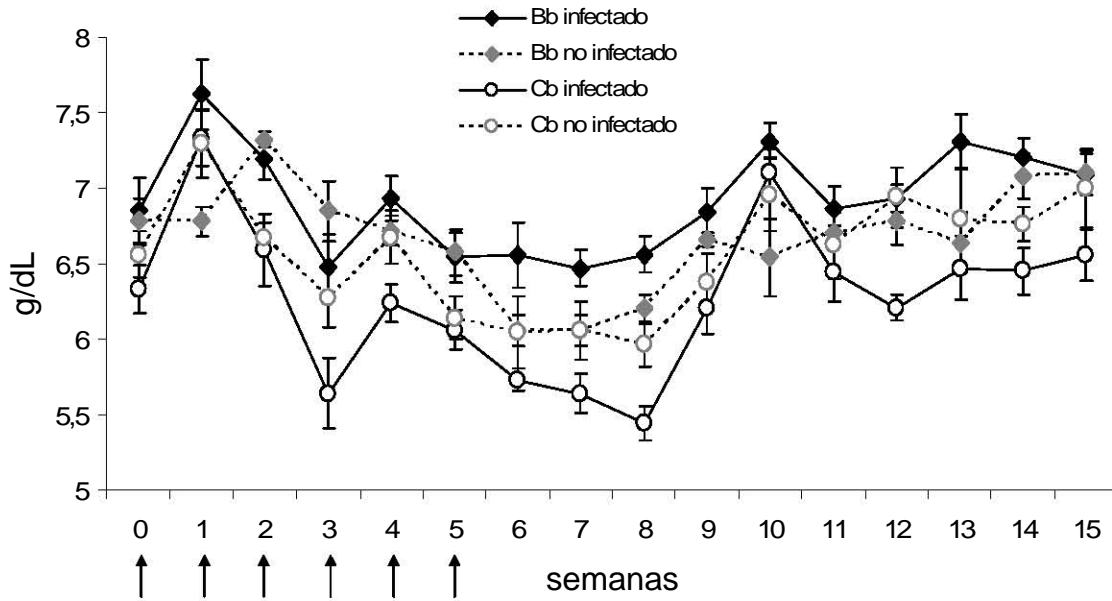


FIGURA 17. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de proteínas séricas totales en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito.

en la raza Cb con respecto a la raza Bb, siendo los promedios de 3.3 ( $\pm 0.12$ ) g/dl para la raza Cb y de 3.6 ( $\pm 0.12$ ) g/dl para la raza Bb (figura 18).

La interacción raza/infección fue significativa ( $p < 0.01$ ) sobre los niveles de globulinas (GLOB). El efecto raza ( $p = 0.871$ ) y el efecto infección ( $p = 0.542$ ) por si solos no fueron significativos. Los niveles de globulina resultaron ser más elevados ( $p < 0.01$ ) en la raza Bb infectados durante las semanas 10, 13 y 14 del experimento con respecto a los otros grupos experimentales. El grupo Cb infectado mostró una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) solo en la tercera semana en sus niveles de globulinas con respecto al resto de los grupos experimentales. Los promedios de GL fueron de 3.6 ( $\pm 0.25$ ) g/dl para el grupo Bb infectado y de 3.3 ( $\pm 0.17$ ) g/dl para el grupo Cb infectado (figura 19).

#### E).- NIVELES DE ANTICUERPOS IgG anti-L3 de *Haemonchus contortus*.

Los grupos experimentales de ambas razas mostraron un aumento en los niveles de IgG sérica contra antígenos de L3 a partir de la semana 7 del experimento (figura 20). Los animales de la raza Bb mostraron mayores niveles de anticuerpos ( $0.32 \pm 0.038 - 0.40 \pm 0.042$  D.O.) entre la semanas 9 y 15 del experimento ( $p < 0.05$ ) en relación a los de la raza Cb ( $0.19 \pm 0.015 - 0.23 \pm 0.017$  D.O.) y al grupo control ( $0.21 \pm 0.017 - 0.27 \pm 0.04$  D.O.). Por otro lado, los animales Cb en la semana 9 mostraron una disminución en sus niveles de anticuerpos con respecto al grupo control que persistió hasta el final del experimento.

La regresión múltiple mostró en los animales Bb una tendencia positiva significativa ( $p < 0.05$ ) en sus niveles de anticuerpos a lo largo de las 15 semanas del experimento, por el contrario los Cb mostraron una tendencia negativa no significativa.

#### F).- RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS DE L3 POR CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INOCULADOS CON *H. contortus*.

En la electroforesis del extracto somático de L3 de *H. contortus* se identificaron un total de 20 proteínas, cuyos pesos moleculares fueron: 277, 182, 159, 80, 74, 66, 59, 57, 45,



FIGURA 18

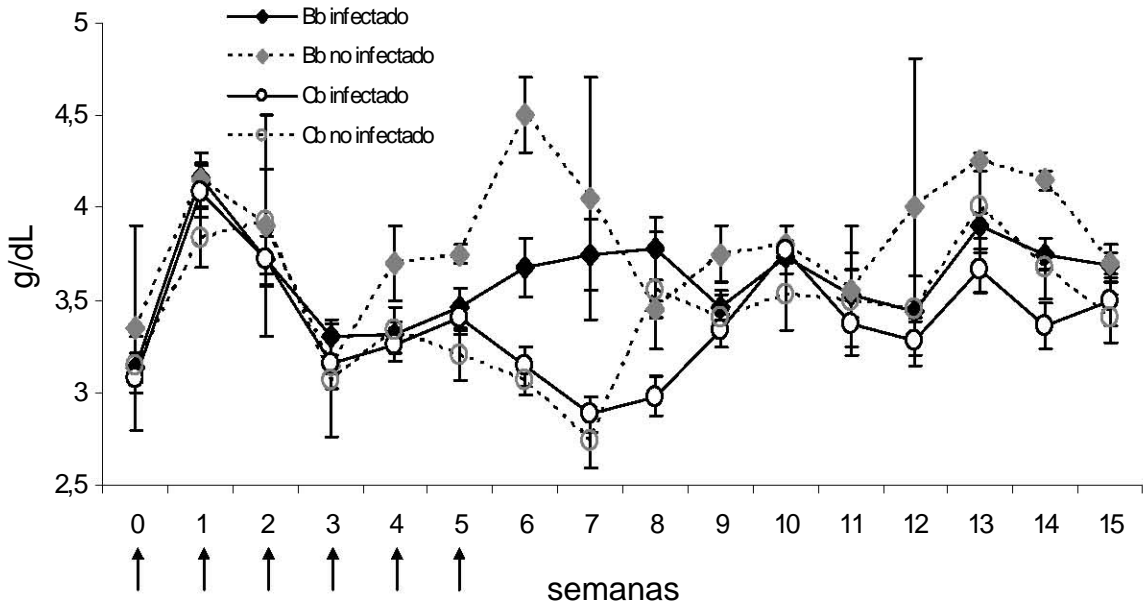


FIGURA 18. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de albúmina sérica en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito.

FIGURA 19

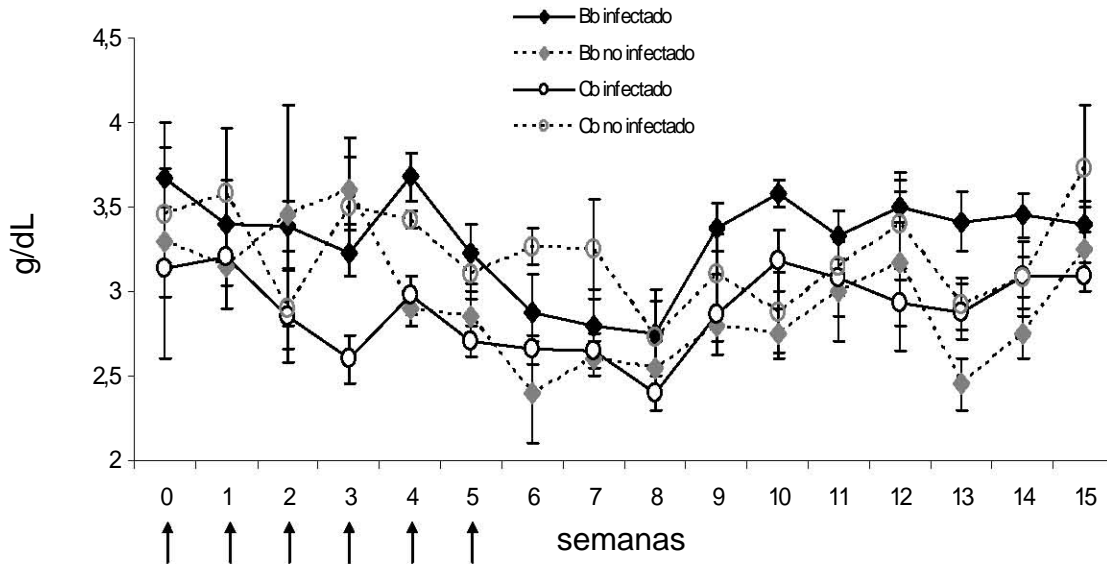


FIGURA 19. Media semanal ( $\pm$ EE) de las concentraciones de globulinas séricas en corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). Las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3 del parásito.

FIGURA 20

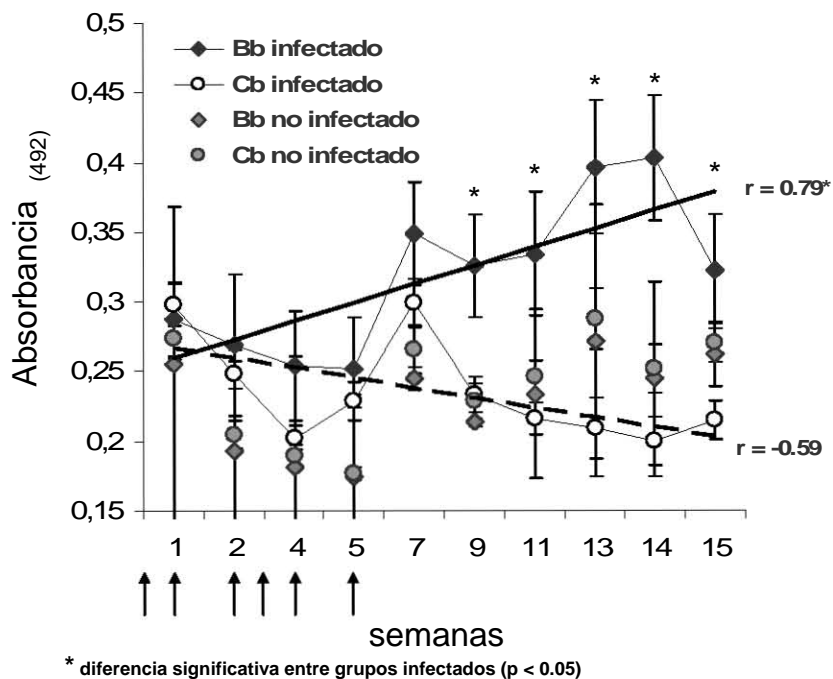


FIGURA 20. Media semanal ( $\pm$ EE) de los niveles de anticuerpos IgG contra L3 de *Haemonchus contortus* en corderos Blackbelly (Bb) y columbia (Cb) infectados en forma gradual y controlada con 6000 L3 (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). Se presenta la tendencia lineal de la raza Bb (—) y Cb (---), las flechas ( $\uparrow$ ) indican las semanas de inoculación con 1000 L3.

42, 39, 36, 35, 31, 29, 28, 19, 18, 14 y 11 kD respectivamente (figura 21). Por Bradford se determinó una concentración de 360 µg de proteína por mililitro.

Los sueros de los corderos reconocieron por Western blot un total de 11 bandas de antígenos de L3 de *H. contortus* (416, 298, 182, 114, 95, 78, 57, 45, 39, 29 y 19 kD) que fueron reconocidos por el conjunto de los animales del experimento (figura 22).

En la figura 23 se muestra el análisis de varianza multifactorial de las frecuencias de reconocimiento de los antígenos de L3 de *H. contortus*. Los corderos Bb inoculados reconocieron en forma significativa cuatro antígenos de 182, 95, 57 y 39 kD respectivamente, mientras que los Bb no infectados y el grupo Cb infectado reconocieron en forma significativa tres de estas bandas (182, 57 y 39 kD), el grupo Cb no infectado solo reconoció la banda de 182 kD.

#### G).- CONTEOS DE EOSINÓFILOS TISULARES EN ABOMASO Y LINFONODO ABOMASAL EN CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *H. contortus*.

El cromótopo 2R permitió una adecuada identificación de los eosinófilos tisulares en el abomaso y linfonodo abomasal en todos los animales del experimento. Se registraron igual número de eosinófilos en la submucosa que en la mucosa abomasal sin diferencias en la distribución de estas células. En la figura 24 se ilustran los resultados de los conteos de eosinófilos por cm<sup>2</sup> en las tres regiones abomasaes estudiadas. Los animales infectados de ambas razas mostraron mayor cantidad de eosinófilos tisulares que los animales no infectados en las tres regiones muestreadas ( $p < 0.05$ ). En la RFA no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la cantidad de eosinófilos tisulares entre los grupos Bb y Cb infectados. En la RPA y en el LNA los animales infectados de la raza Bb mostraron mayor cantidad ( $20849 \pm 5935$  y  $40849 \pm 23102$  respectivamente) de eosinófilos por cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ) que los animales infectados de la raza Cb ( $8397 \pm 1274$  y  $10822 \pm 3524$  respectivamente).

**FIGURA 21**

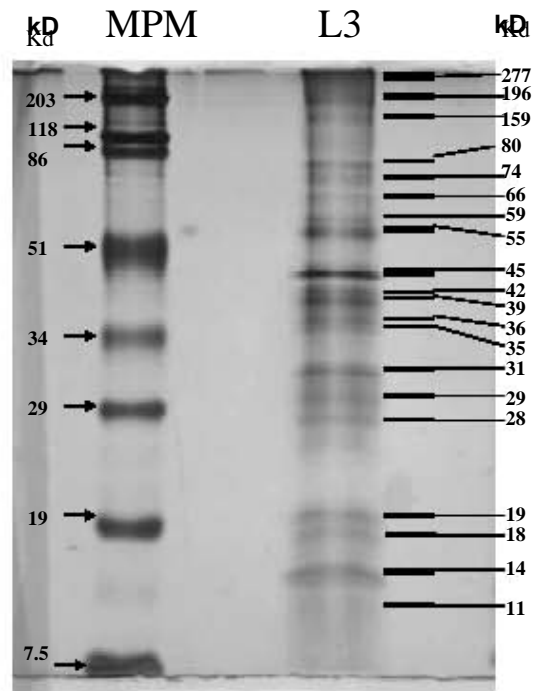


FIGURA 21. Corrimiento electroforético en gel de SDS-poliacrilamida del extracto proteínico de larva 3 (L3) de *Haemonchus contortus*. Los pesos moleculares de las proteínas están mostrados en kilodaltones (kD), del lado izquierdo se muestran los marcadores estándar de peso molecular (MPM).

**FIGURA 22**

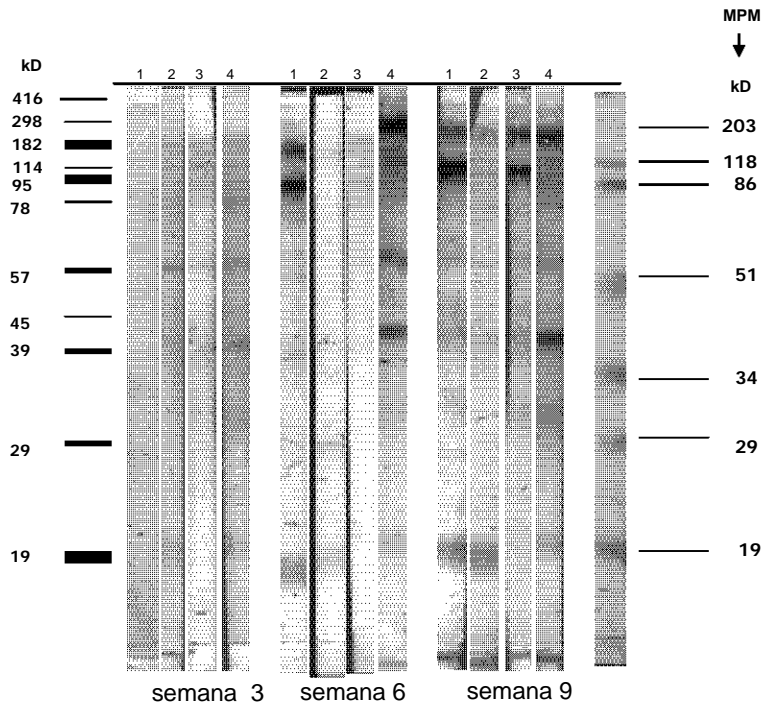


FIGURA 22. Antígenos de L3 de *Haemonchus contortus* reconocidos por el suero de corderos Blackbelly (1 y 2 ) y Columbia (3 y 4) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 del parásito, los pesos moleculares de los antígenos están mostrados en kilodaltones (kD). Del lado derecho se muestran marcadores estándar de peso molecular (MPM).

FIGURA 23

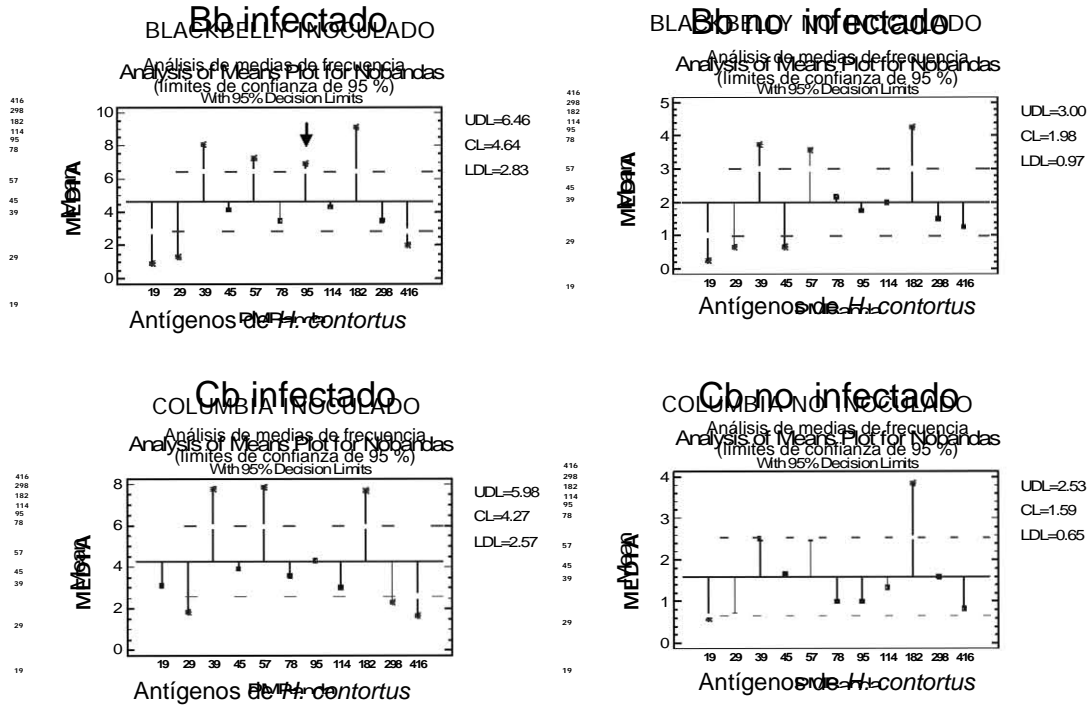
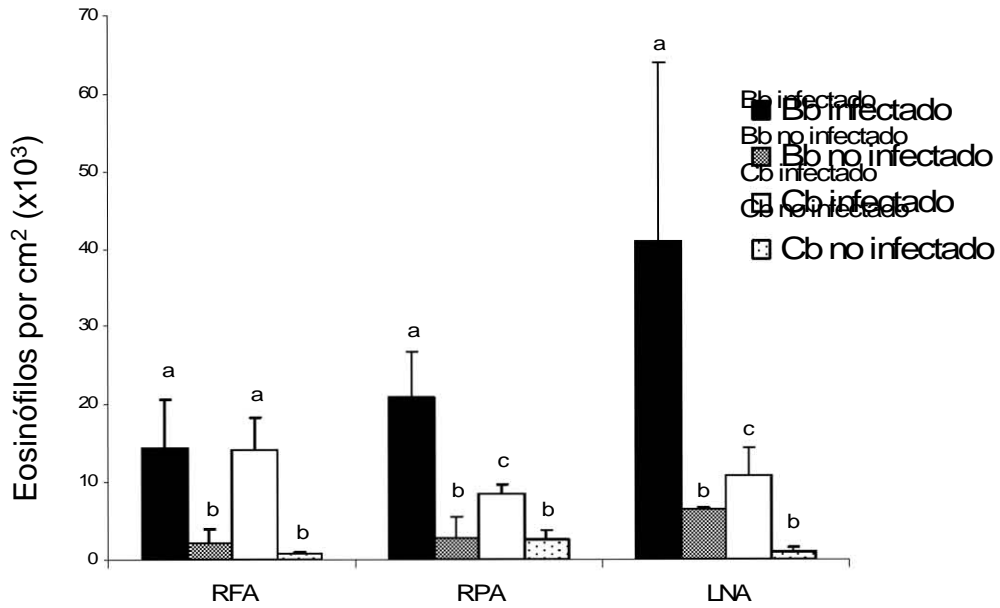


FIGURA 23. Análisis de las medias de frecuencia del reconocimiento de antígenos de L3 por el suero de corderos Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4). Las líneas discontinuas representan los límites de confianza al 95% en cada grafica. La flecha (↓) señala la banda de 95 kd reconocida de manera significativa solo por los corderos Bb infectados.

**FIGURA 24**



Letras diferentes en cada región indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 24.- Media (+EE) de eosinófilos por centímetro cuadrado de tejido en regiones fúndica abomasal (RFA), pilórica abomasal (RPA) y linfonodo abomasal (LNA) en corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6,000 L3 de *Haemonchus contortus* ( $n = 10$ ) y corderos no infectados (Bb  $n = 2$  y Cb  $n = 4$ ).



#### H).- CONTEOS DE MASTOCITOS TISULARES EN ABOMASO DE CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *H. contortus*.

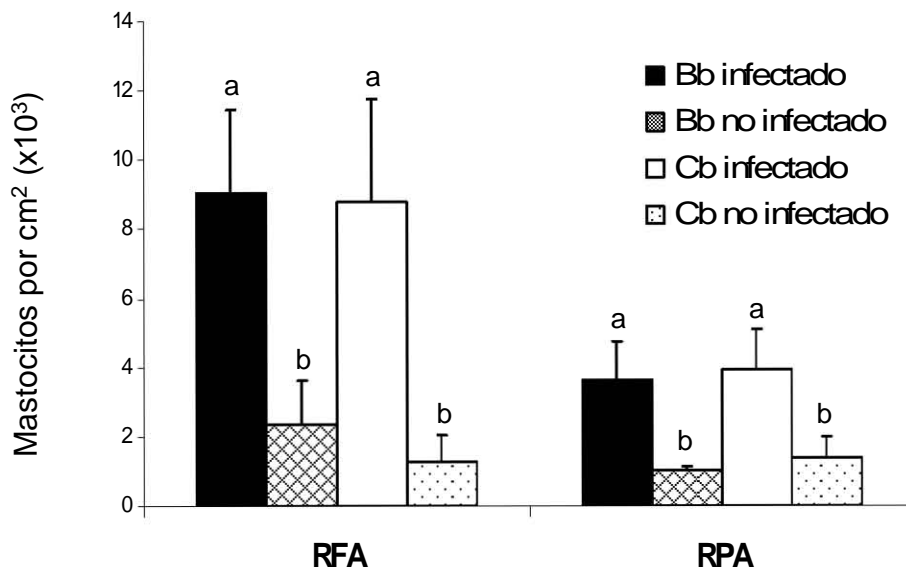
Se observó de un menor número de mastocitos en la zona muscular del abomaso, en relación a la mucosa, que presentó la mayor parte de las células registradas. En el análisis de los mastocitos, de las RFA y la RPA se encontró un efecto significativo por la infección ( $p < 0.01$ ) sobre el número de mastocitos por  $\text{cm}^2$ . Ambas razas mostraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los grupos infectados con respecto a su grupo testigo, en las dos regiones del abomaso. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la cantidad de mastocitos por  $\text{cm}^2$  en las regiones estudiadas entre los grupos Bb y Cb infectados (figura 25).

#### I).- CONTEO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TISULARES EN EL ABOMASO Y LINFONODO ABOMASAL DE CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *H. contortus*.

El análisis ANOVA factorial de la RFA abomasal, mostró un efecto por el tipo de subpoblación significativo sobre el número de linfocitos por  $\text{cm}^2$ . El número de linfocitos CD8+ en ambas razas ( $1048.4 \pm 314.8$  y  $948.9 \pm 315.5$  Bb y Cb respectivamente) fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en esta región con respecto a los CD4+ ( $5105.8 \pm 1840.6$  y  $4800.7 \pm 1982.4$  Bb y Cb respectivamente) y los gama-delta ( $5847.8 \pm 1982.4$  y  $5841.0 \pm 1309.6$  Bb y Cb respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en ninguna subpoblación estudiada entre los grupos infectados y no infectados de ambas razas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre el número de linfocitos CD4+, CD8+ o gama-delta entre los grupos Bb y Cb infectados (figura 26).

En el ANOVA factorial de la RPA mostró efectos significativos por el tipo de subpoblación ( $p < 0.001$ ), raza ( $p < 0.001$ ), infección ( $p < 0.001$ ), y las interacciones subpoblación/raza ( $p < 0.001$ ), subpoblación/infección ( $p < 0.001$ ) y raza/infección ( $p < 0.01$ ) sobre el número de linfocitos por  $\text{cm}^2$ . En la figura 27 se ilustran los resultados de los conteos de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en esta región del abomaso. Los datos

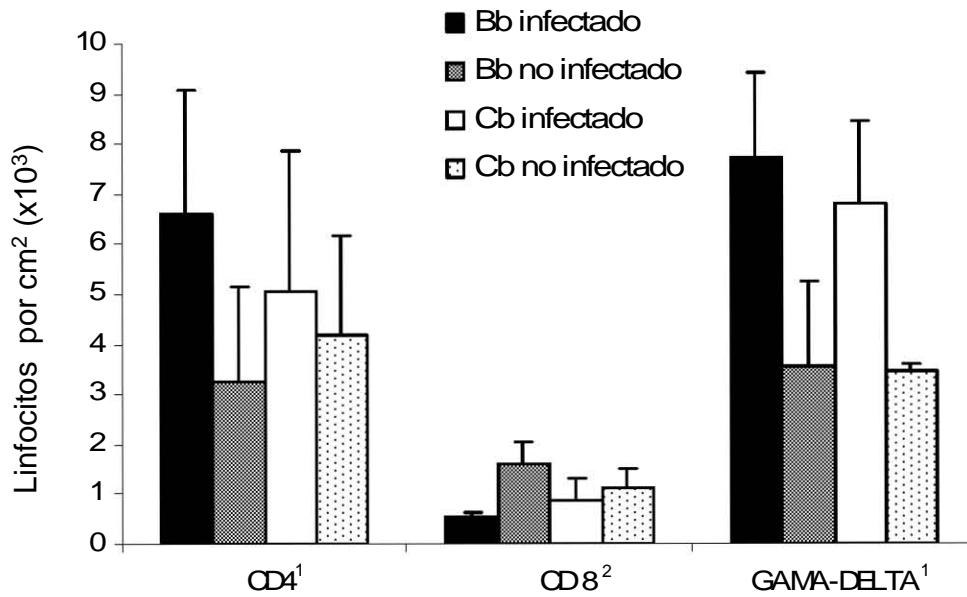
FIGURA 25



Letras diferentes en cada región indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 25.- Media (+EE) de mastocitos por centímetro cuadrado de tejido en regiones fúndica abomasal (RFA) y pilórica abomasal (RPA) en corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* ( $n = 10$ ) y corderos no infectados (Bb  $n = 2$  y Cb  $n = 4$ ).

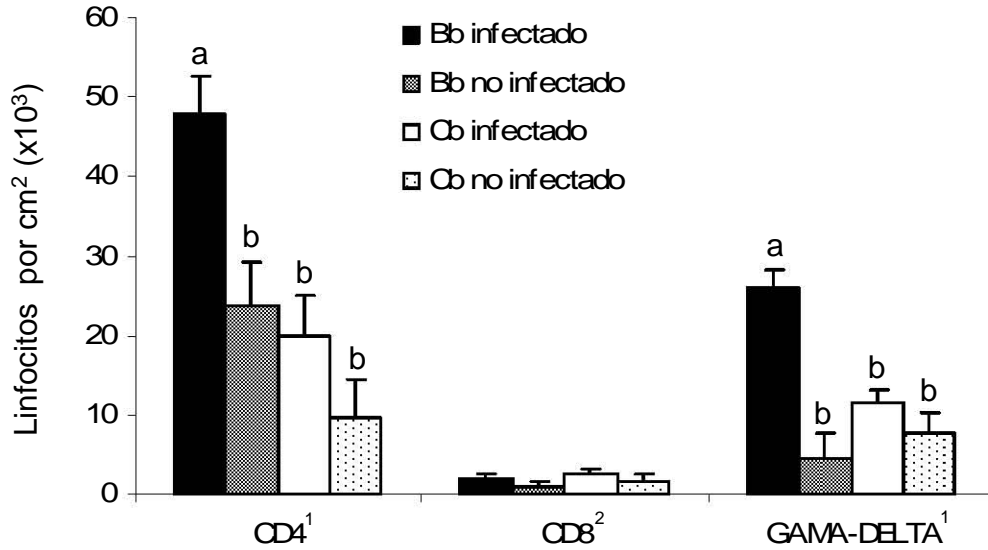
FIGURA 26



Números diferentes indican diferencia estadística significativa entre los totales de las subpoblaciones ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 26. Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gamma-delta) por centímetro cuadrado en la región fúndica abomasal (RFA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4).

**FIGURA 27**



Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).  
 Números diferentes indican diferencia estadística significativa entre los totales de las subpoblaciones ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 27. Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gamma-delta) por centímetro cuadrado en la región pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4).

mostraron un mayor número de linfocitos CD4<sup>+</sup> en los grupos infectados Bb ( $p < 0.001$ ) y Cb ( $p < 0.05$ ) estadísticamente significativos ( $47700.2 \pm 5047.5$  y  $19891.5 \pm 5147.2$  cel/cm<sup>2</sup> respectivamente) en relación con sus respectivos grupos control ( $23611.2 \pm 5694.4$  y  $9567.0 \pm 4812.2$  cel/cm<sup>2</sup> respectivamente). El contraste entre grupos infectados, también mostró un mayor número de linfocitos CD4<sup>+</sup> en los animales Bb en comparación con los animales Cb ( $p < 0.05$ ). El análisis de los linfocitos CD8<sup>+</sup> no mostró diferencias estadísticas entre los grupos Bb y Cb infectados ( $1915.0 \pm 632.8$  y  $2559.8 \pm 543.4$  respectivamente) con sus grupos testigo no infectados ( $1060.8 \pm 564.1$  y  $1671.4 \pm 860.7$  respectivamente), ni entre los grupos Bb y Cb infectados. En esta región, los linfocitos gama-delta se presentan en un mayor número ( $p < 0.005$ ) en los animales Bb infectados ( $26074.2 \pm 2216.1$ ) en relación con su grupo testigo ( $4411.2 \pm 3380$ ). La raza Cb solo muestra diferencias numéricas, siendo mayor en el grupo infectado ( $11594.8 \pm 1543.9$  y  $7724.0 \pm 2648.9$  infectados y no infectados respectivamente). El análisis entre los animales infectados de ambas razas mostró mayor número de linfocitos gama-delta ( $p < 0.005$ ) en los animales de la raza Bb en comparación con los Cb ( $26074.2 \pm 2216.1$  y  $11594.8 \pm 1543.9$  respectivamente).

En el ANOVA factorial de las subpoblaciones linfocitarias del LNA mostró solo un efecto significativo por el tipo de subpoblación ( $p < 0.01$ ) sobre el número de linfocitos por cm<sup>2</sup>. Los números de linfocitos CD8<sup>+</sup> en ambas razas ( $86572.7 \pm 22919$  y  $112318.5 \pm 27542.0$  Bb y Cb respectivamente) fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en esta región con respecto a los CD4<sup>+</sup> ( $118885.8 \pm 33299.0$  y  $154162.9 \pm 22678.1$  Bb y Cb respectivamente) y los gama-delta ( $45634.7 \pm 9852.0$  y  $60997.2 \pm 8235.7$  Bb y Cb respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en ninguna subpoblación estudiada entre los grupos infectados y no infectados de ambas razas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o gama-delta entre los grupos Bb y Cb infectados (figura 28).

**FIGURA 28**

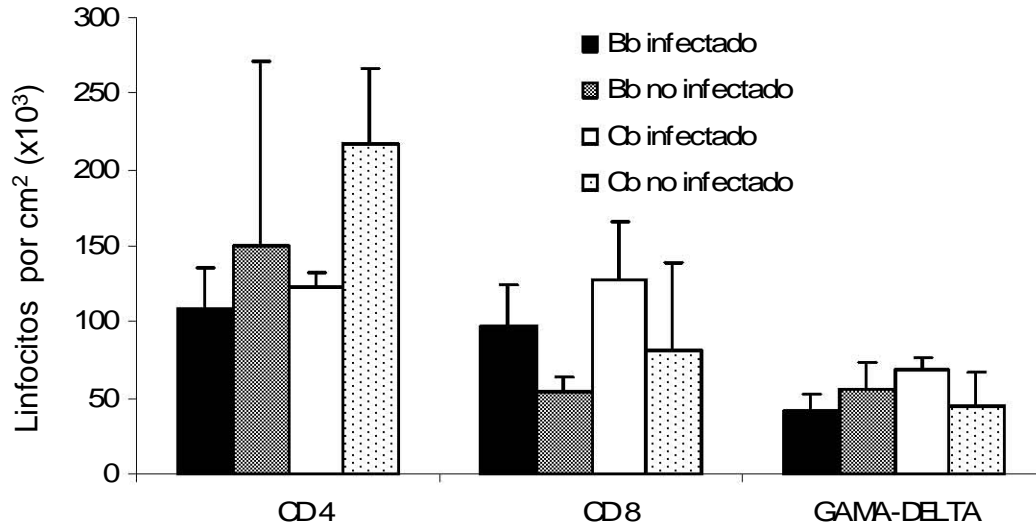


FIGURA 28.- Media (+EE) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y WC1+ (gamma-delta) por centímetro cuadrado en el linfonodo abomasal (LNA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4).

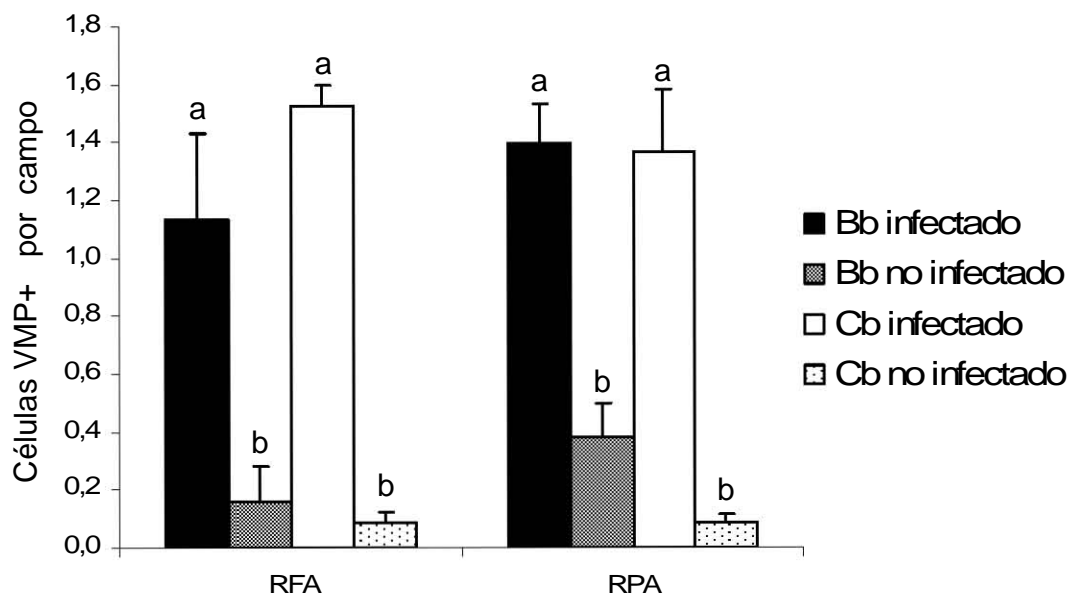
J).- CÉLULAS PLASMÁTICAS E INMUNOGLOBULINAS POSITIVAS (CEL-Ig<sup>+</sup>) EN TEJIDO ABOMASAL Y LINFONODO REGIONAL DE CORDEROS BLACKBELLY Y COLUMBIA INFECTADOS CON *Haemonchus contortus*.

Los animales infectados de ambas razas mostraron niveles de células verde-metil pironina positivas, significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ) que los animales testigo no infectados en las dos regiones del abomaso estudiadas (figura 29).

El ANOVA factorial de la RFA mostró efectos significativos por el tipo de inmunoglobulina o isotipo ( $p < 0.05$ ) e infección ( $p < 0.01$ ) sobre el número de CEL-Ig<sup>+</sup> por campo. Ambas razas mostraron cuentas más altas de CEL-IgA<sup>+</sup> en forma significativa con respecto a las CEL-IgG<sup>+</sup> y CEL-IgM<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ). Los animales Bb mostraron cuentas de CEL-IgG<sup>+</sup> y CEL-IgA<sup>+</sup> ( $1.86 \pm 0.80$  y  $2.48 \pm 0.45$  respectivamente) significativamente más altos ( $p < 0.01$ ) que su grupo testigo ( $0.13 \pm 0.08$  y  $0.60 \pm 0.14$  respectivamente), esta raza no mostró diferencia significativa entre el grupo infectado y el testigo con respecto a las CEL-IgM<sup>+</sup>. Los animales Cb infectados solo mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las cuentas de CEL-IgA<sup>+</sup> con respecto a su grupo testigo ( $2.86 \pm 0.47$  y  $1.27 \pm 0.87$  respectivamente), las CEL-IgG<sup>+</sup> y las CEL-IgM<sup>+</sup> no mostraron diferencias significativas. No se establecieron diferencias entre los grupos Bb y Cb infectados con ningún tipo de CEL-Ig<sup>+</sup> (figura 30).

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<sup>+</sup> por campo. Ambas razas mostraron cuentas más altas de CEL-IgA<sup>+</sup> en forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las CEL-IgG<sup>+</sup> y CEL-IgM<sup>+</sup>. Los animales Bb y Cb infectados mostraron cuentas de CEL-IgA<sup>+</sup> ( $3.48 \pm 0.80$  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<sup>+</sup> y CEL-IgM<sup>+</sup>. No se establecieron diferencias entre los grupos Bb y Cb infectados con ningún tipo de CEL-Ig<sup>+</sup> (figura 31).

**FIGURA 29**

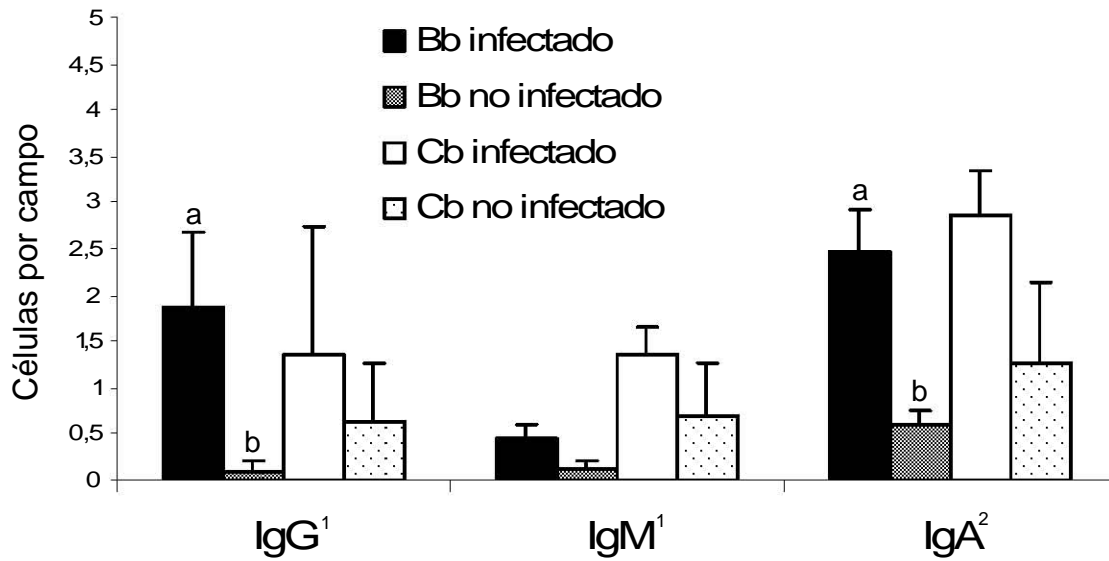


Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 29.- Media (+EE) de células verde metil pironina positivas (VMP+) por campo en las regiones fúndica abomasal (RFA) y pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* ( $n = 10$ ) y corderos no infectados (Bb  $n = 2$  y Cb  $n = 4$ ).



FIGURA 30

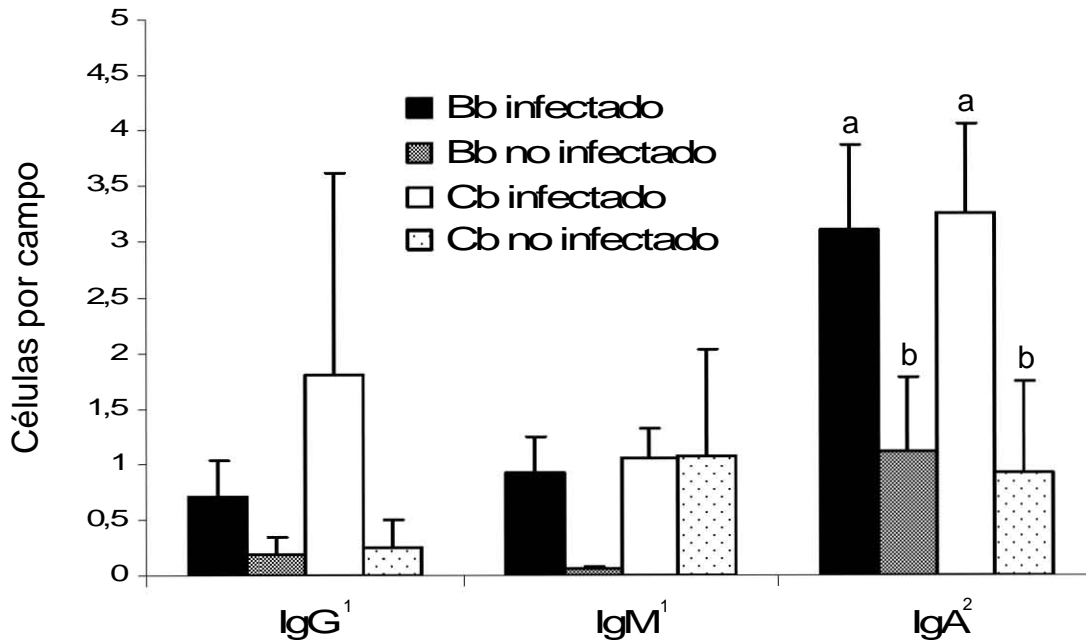


Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales (p < 0.05).

Números diferentes indican diferencia estadística significativa entre los totales de las diferentes CEL-Ig+ (p < 0.05).

FIGURA 30. Media (+EE) de células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) por campo en la región fúndica abomasal (RFA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* (n = 10) y corderos no infectados (Bb n = 2 y Cb n = 4).

FIGURA 31



Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

Números diferentes indican diferencia estadística significativa entre los totales de las diferentes CEL-Ig+ ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 31. Media (+EE) de células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) por campo en la región pilórica abomasal (RPA) de corderos de las razas Blackbelly (Bb) y Columbia (Cb) infectados de manera gradual y controlada con 6000 L3 de *Haemonchus contortus* ( $n = 10$ ) y corderos no infectados (Bb  $n = 2$  y Cb  $n = 4$ ).

## K).- COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

Los coeficientes de correlación más significativos entre las variables estudiadas en los animales infectados de ambas razas, son presentados en los cuadros 2, 3, 4 y 5. Entre los parámetros de resistencia y los parámetros hematológicos se encontraron correlaciones positivas entre HGH y FA ( $r = 0.69$ ), IgG anti-L3 con PT y ALB ( $r = 0.66$ ,  $r = 0.71$  respectivamente), PT con ALB y GLOB ( $r = 0.81$  y  $r = 0.98$  respectivamente); ALB y GLOB ( $r = 0.71$ ). Las correlaciones negativas más importantes fueron entre HGH con IgG anti-L3, PT, ALB y GLOB ( $r = -0.80$ ,  $r = -0.91$ ,  $r = -0.95$  y  $r = -0.83$  respectivamente), así como entre FA con PT y GLOB ( $r = -0.67$  y  $r = -0.70$  respectivamente).

En la RFA se encontró correlación significativa entre eosinófilos y mastocitos tisulares ( $r = 0.94$ ), y entre las CEL-IgG+ con linfocitos CD4+ y gama-delta ( $r = 0.65$  y  $r = 0.82$  respectivamente). En la RPA se encontraron correlaciones positivas entre los linfocitos gama-delta con los eosinófilos y los linfocitos CD4+ ( $r = 0.83$  y  $r = 0.85$  respectivamente) así como correlaciones negativas significativas entre HGH con linfocitos CD4+ y gama-delta ( $r = -0.88$  y  $r = 0.92$  respectivamente) y FA con linfocitos CD4+ ( $r = 0.78$ ). En el linfonodo abomasal no se encontraron correlaciones estadísticas significativas entre las variables estudiadas.

## CUADRO 2

CUADRO 2. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS PARASITOLÓGICOS Y HEMATOLÓGICOS EN CORDEROS CON ALTA (n = 5) Y BAJA (n = 5) ELIMINACIÓN DE HGH INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 6000 L3 DE *Haemonchus contortus*.

	<i>HGH</i>	<i>FA</i>	<i>IgG</i>	<i>PT</i>	<i>ALB</i>	<i>GLOB</i>	<i>PEP</i>
<i>HGH</i>	1,00						
<i>FA</i>	0,69 *	1,00					
<i>IgG</i>	-0,80 ***	-0,42	1,00				
<i>PT</i>	-0,91 ***	-0,67 *	0,66 *	1,00			
<i>ALB</i>	-0,95 ***	-0,58	0,71 *	0,81 **	1,00		
<i>GLOB</i>	-0,83 **	-0,70 *	0,59	0,98 ***	0,71 *	1,00	
<i>PEP</i>	0,62	0,60	-0,64 *	-0,36	-0,52	-0,28	1,00

HGH, HUEVOS POR GRAMO DE HECES; FA, FASES ADULTAS EN ABOMASO; IgG, ANTICUERPOS SÉRICOS IgG ANTI-L3; PT, PROTEÍNA TOTAL; ALB, ALBUMINA SÉRICA; GLOB, GLOBULINAS SÉRICAS; PEP, PEPSINÓGENO SÉRICO.

\*p < 0.05

\*\*p < 0.01

\*\*\*p < 0.001

## CUADRO 3

**CUADRO 3. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS PARASITOLÓGICOS Y CÉLULAS DE RESPUESTA TISULAR (EOSINÓFILOS, SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y CÉLULAS PLASMÁTICAS) DE LA REGIÓN FÚNDICA ABOMASAL DE CORDEROS CON ALTA (n = 5) Y BAJA (n = 5) ELIMINACIÓN DE HGH INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 6000 L3 DE *Haemonchus contortus*.**

	HGH	FA	EOS.	MAST.	CD4+	CD8+	WC1+	CEL-VMP+	CEL-IgG+	CEL-IgM+	CEL-IgA+
HGH	1,00										
FA	0,69	1,00									
EOS.	0,34	-0,05	1,00								
MAST.	0,20	0,03	0,70 *	1,00							
CD4+	-0,03	0,47	-0,27	-0,25	1,00						
CD8+	-0,02	-0,16	-0,36	-0,14	0,27	1,00					
WC1+	-0,15	-0,35	0,10	-0,20	0,24	0,46	1,00				
CEL-VMP+	0,39	0,31	0,06	0,46	-0,22	0,03	0,05	1,00			
CEL-IgG+	-0,17	-0,07	-0,06	-0,19	0,65 *	0,41	0,82 **	-0,02	1,00		
CEL-IgM+	0,61	0,64	0,14	-0,16	0,19	-0,40	0,12	0,31	0,21	1,00	
CEL-IgA+	0,42	0,64	0,14	0,36	0,40	0,11	-0,31	0,44	0,01	-0,02	1,00

HGH, HUEVOS POR GRAMO DE HECEs; FA, FASES ADULTAS EN ABOMASO; Eo, EOSINÓFILOS; MAST, MASTOCITOS; CD4+ LINFOCITOS CD4+; CD8+, LINFOCITOS CD8+; WC1+, LINFOCITOS GAMA-DELTA; CEL-VMP+, CELULAS VERDE METIL PIRONINA POSITIVAS; CEL-IgG,M,A+ CELULAS PLASMÁTICAS IgG, IgM O IgA POSITIVAS; .

\*p < 0.05

\*\* p < 0.01

## CUADRO 4

**CUADRO 4. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS PARASITOLÓGICOS Y CÉLULAS DE RESPUESTA TISULAR (EOSINÓFILOS, SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y CÉLULAS PLASMÁTICAS) DE LA REGIÓN PILÓRICA ABOMASAL DE CORDEROS CON ALTA (n = 5) Y BAJA (n = 5) ELIMINACIÓN DE HGH INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 6000 L3 DE *Haemonchus contortus*.**

	HGH	FA	EOS.	MAST.	CD4+	CD8+	WC1+	CEL-VMP+	CEL-IgG+	CEL-IgM+	CEL-IgA+
HGH	1,00										
FA	0,62	1,00									
EOS.	-0,62	-0,30	1,00								
MAST.	0,28	0,26	-0,50	1,00							
CD4+	-0,88 **	-0,78 *	0,69	-0,36	1,00						
CD8+	0,09	0,29	-0,14	0,24	-0,06	1,00					
WC1+	-0,92 ***	-0,49	0,83 *	-0,40	0,85 **	-0,16	1,00				
CEL-VMP+	0,14	0,67	0,42	0,50	-0,55	0,19	-0,30	1,00			
CEL-IgG+	0,50	0,26	-0,04	-0,25	-0,53	-0,16	-0,52	0,46	1,00		
CEL-IgM+	0,05	0,40	-0,03	0,12	-0,37	0,41	-0,26	0,40	0,53	1,00	
CEL-IgA+	-0,03	-0,23	0,18	0,19	0,14	0,25	-0,11	0,43	0,64	0,60	1,00

HGH, HUEVOS POR GRAMO DE HECES; FA, FASES ADULTAS EN ABOMASO; Eo, EOSINÓFILOS; MAST, MASTOCITOS; CD4+ LINFOCITOS CD4+; CD8+, LINFOCITOS CD8+; WC1+, LINFOCITOS GAMA-DELTA; CEL-VMP+, CELULAS VERDE METIL PIRONINA POSITIVAS; CEL-IgG,M,A+ CELULAS PLASMÁTICAS IgG, IgM O IgA POSITIVAS; .

\*p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\*p < 0.001

## CUADRO 5

CUADRO 5. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS PARASITOLÓGICOS Y CÉLULAS DE RESPUESTA TISULAR (EOSINÓFILOS Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS) DEL LINFONODO ABOMASAL DE CORDEROS CON ALTA (n = 5) Y BAJA (n = 5) ELIMINACIÓN DE HGH INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 6000 L3 DE *Haemonchus contortus*.

	<i>HGH</i>	<i>F.A.</i>	<i>Eo</i>	<i>CD4+</i>	<i>CD8+</i>	<i>WC1+</i>
<i>HGH</i>	1,00					
<i>F.A.</i>	0,69	1,00				
<i>Eo</i>	-0,31	-0,29	1,00			
<i>CD4+</i>	0,13	0,08	-0,52	1,00		
<i>CD8+</i>	0,24	0,15	-0,52	0,29	1,00	
<i>WC1+</i>	0,53	0,44	-0,41	0,40	0,66	1,00

HGH, HUEVOS POR GRAMO DE HECES; FA, FASES ADULTAS EN ABOMASO; Eo, EOSINÓFILOS; CD4+ LINFOCITOS CD4+; CD8+, LINFOCITOS CD8+; WC1+, LINFOCITOS GAMA-DELTA .

VOLVER AL INDICE

## DISCUSIÓN

La hemoncosis es una de las principales causas de pérdidas económicas en las explotaciones ovinas de México y de muchas otras partes del mundo. El control de esta enfermedad usualmente se ha realizado con antihelmínticos, sin embargo, la aparición en muchos lugares del mundo de cepas de *H. contortus* resistentes a estos fármacos ha estimulado el desarrollo de nuevas alternativas de control. Una de estas alternativas es el uso de razas de ovinos con alto grado de resistencia a la hemoncosis, lo que de manera lógica lleva al planteamiento de nuevas preguntas en relación a las diferencias en las respuestas de los ovinos de alta y baja susceptibilidad, principalmente las de tipo inmunológico.

La mayoría de los trabajos realizados para evaluar la respuesta a la hemoncosis han utilizado infecciones únicas con un alto número de larvas de *H. contortus* (Schallig *et al.*, 1994; Gómez-Muñoz *et al.*, 1999; Balic *et al.*, 2000; Balic *et al.*, 2002; Terefe *et al.*, 2005). En ellos, los ovinos reciben en forma súbita un estímulo parasitario extremo, lo cuál es una circunstancia poco probable en condiciones naturales de infección y por lo tanto, la respuesta generada por los animales infectados puede estar reflejando fenómenos distorsionados no existentes en la infección natural.

Por otro lado, los trabajos que utilizan la infección natural (Bricarello *et al.*, 2004; Amarante *et al.*, 2004), no pueden controlar el número de larvas ingeridas, lo cuál puede estar influido por el comportamiento, jerarquía, selectividad, u otras características de cada animal al alimentarse en los potreros, tampoco hay control sobre la especificidad de la infección siendo habituales las infecciones mixtas, en las que predomina *H. contortus* y otros nematodos como *Trychostrongylus* spp. *Oesophagostomum* spp. y *Strongylides papillosus* (Torres-Acosta *et al.*, 2006) o también *Nematodirus* spp. y *Trichuris* spp (Amarante *et al.*, 1999). Finalmente, no se puede homologar el instante de la infección, por lo que los resultados pueden ser el reflejo de distintos momentos de la respuesta en cada



animal o de una serie de combinaciones de eventos en el tiempo, lo cual tampoco es un indicador real de la respuesta inmunológica a la hemoncosis.

En este trabajo, siguiendo el esquema de infección gradual controlada (*trickle infection*) utilizada por Mugambi *et al.* (1996), se administraron seis dosis diferidas con un bajo número de L3 de *H. contortus* (1,000 larvas cada semana) para infectar a los corderos. Con este procedimiento se controló el tiempo de infección que fue el mismo en todos los animales. La dosis de infección, fue cuantificada y depositada directamente en el rumen en forma homogénea en todos los animales experimentales, se aseguró la especificidad de la infección, al usar cultivos puros de L3 de *H. contortus*. Se simuló la forma en la que hipotéticamente ocurre la infección en los potreros. Los datos obtenidos de las cargas parasitarias por razas variaron en rangos de 1 a 210 nematodos en la raza Bb y de 150 a 8070 nematodos en la raza Cb (cuadro 1), estos resultados fueron similares a los de Bricarello *et al.* (2004), que utilizaron la infección natural y reportaron cargas parasitarias en rangos de 70 a 630 para la raza resistente y de 370 a 6330 para la raza susceptible. Por lo anterior, los resultados obtenidos probablemente reflejen tendencias de cargas parasitarias similares a las que se obtienen en condiciones naturales, con menos artefactos experimentales atribuibles a sobreinfecciones súbitas o infecciones mixtas.

La resistencia a la hemoncosis se define como la habilidad de los animales para prevenir el establecimiento de las fases larvarias y/o de promover la eliminación espontánea de las fases adultas, lo cual disminuye directamente la carga parasitaria de los animales (Bricarello *et al.*, 2004). En el primer experimento, se demostró la diferencia en la resistencia a la infección por *H. contortus* entre las dos razas utilizadas, los corderos de la raza Bb eliminaron menor cantidad de HGH que los animales de la raza Cb (figura 12). Lo anterior es una medida indirecta de la carga parasitaria, que ha sido utilizada ampliamente como parámetro de resistencia a la hemoncosis (Douch *et al.*, 1996). En el segundo experimento, las diferencias en los promedios semanales de HGH entre las razas estudiadas fueron, aún de mayor amplitud que las observadas en el primer experimento (figura 15) y la mayor resistencia de los corderos Bb fue corroborada. La mayor resistencia a la hemoncosis de los corderos Bb también fue determinada a través del conteo de las FA

en abomaso, siendo estadísticamente menor que los conteos registrados en la raza Cb (cuadro 1). La resistencia observada en los Bb es similar a la reportada por otros investigadores (Yazwinski *et al.*, 1980; Gruner *et al.*, 2003), pero este trabajo constituye el primer reporte de evaluación de la raza Cb. Además, también constituye el primer estudio comparativo de la resistencia y la respuesta inmunológica a la hemoncosis en las razas Bb y Cb utilizando la infección gradual controlada.

El conteo de FA es la forma más directa de evaluar la carga parasitaria, estos dos parámetros medidos en el segundo experimento (HGH y FA) tuvieron una correlación positiva significativa. La medición de estos parámetros indicó la mayor resistencia de la raza Bb a la infección por *H. contortus*. En un estudio similar al actual, Mugambi *et al.* (1996), determinaron con base únicamente en la eliminación de HGH, mayor grado de resistencia de la raza Red Maasai con respecto a la raza Dorper utilizando *trickle infection*, sin embargo, esta diferencia solo se mantuvo hasta la semana 14 post-infección, siendo similares los promedios de eliminación de HGH en la semana 15 del experimento, además, la raza resistente (Red Maasai) alcanzó picos de eliminación de 15,000 HGH. En este estudio, los promedios de eliminación de HGH se mantuvieron sustancialmente diferentes hasta el final del experimento (15 semanas) y la raza resistente (Bb) no sobrepasó los 1000 HGH en el primer experimento y de los 400 HGH en el segundo experimento. En resumen, la manifestación de la susceptibilidad/resistencia de las razas Cb/Bb en este estudio, fue más acentuada que la demostrada entre Dorper/Red Maasai.

La capacidad de los animales de contrarrestar los efectos negativos de la infección (resiliencia) fue determinada a través de la medición de las proteínas séricas (PT, ALB, y GLOB) y el pepsinógeno sérico. Los datos de pepsinógeno sérico son un indicador directo del daño en el abomaso producido por la presencia del parásito en este sitio, mientras que las proteínas séricas pueden verse disminuidas por efecto de la menor digestión y asimilación de nutrientes así como por la acción hematófaga del parásito. Las PT, ALB y GLOB séricas tuvieron correlaciones negativas significativas con los conteos de HGH y en el caso de las PT y GL con las FA (cuadro 2), lo cual es indicativo de la relación inversa

que existe entre la resistencia y el efecto del parásito sobre el animal (a mayor resistencia menor daño).

La resiliencia también se mostró diferente en las dos razas experimentales, los datos obtenidos mostraron un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de los niveles de pepsinógeno sérico en los corderos Cb infectados desde la semana cinco a la diez post-infección con respecto a su grupo testigo, mientras que los Bb solo elevaron sus niveles de la semana seis a la ocho con respecto a su grupo testigo. Por otro lado los corderos Cb infectados mostraron dos picos de elevación ( $p < 0.01$ ) de pepsinógeno en las semanas seis y diez con respecto al grupo Bb infectado (figura 16), si como algunos autores proponen, el aumento de pepsinógeno sérico es un indicador de daño (Simpson *et al.*, 1997), el mayor aumento de este, en los corderos Cb indica su mayor afectación con respecto a los corderos Bb por la infección con el parásito.

En este estudio, el tiempo en el que aparece el pico de los niveles de pepsinógeno sérico es diferente al observado por otros autores, que han utilizado infección masiva. Simpson *et al.* (1997), reportaron la elevación del pepsinógeno sérico en corderos infectados con dosis única de 10,000 L3 de *H. contortus* desde el día cinco hasta el día 20 p.i. Por otra parte Scott *et al.* (2000), reportan el aumento de este precursor en un grupo de corderos infectados con 40,000 L3 de *Teladorsagia circumcincta* entre los días 10 y 15 post-infección. En el presente estudio los animales infectados en forma gradual con 6,000 larvas, mostraron el incremento del pepsinógeno sérico a partir del día 42 post-infección y se mantuvieron elevados hasta el día 56 en la raza Bb y hasta el día 70 en la raza Cb. La diferencias anteriores pueden ser el resultado de la forma de inoculación, en una infección gradual controlada, las fases larvarias paulatinamente se acumulan en la mucosa abomasal por lo que el tiempo en el que se produce el daño en la mucosa es más prolongado que el observado en la infección experimental masiva, en donde el aumento de pepsinógeno es mas rápido y por menos tiempo, lo cual puede ser un artificio de una infección súbita que no se da en la naturaleza.

Por otra parte en los dos trabajos citados anteriormente, se reportó el aumento rápido (en horas) de los niveles de pepsinógeno sérico en corderos, cuando fueron infectados a través de una cánula abomasal, aproximadamente con 9,000 *H. contortus* y 20,000 *T. circumcincta* en fase adulta respectivamente, los niveles altos fueron mantenidos hasta por 15 días y bajaron cuando los animales fueron desparasitados. En este estudio se observaron niveles significativamente elevados de pepsinógeno sérico todavía hasta la semana 10 post-infección, si se toma en cuenta que el período de prepatencia fue de 21 días, se asume que la presencia de fases adultas en el abomaso fue máxima en la semana 8 post-infección. En la raza Bb los niveles de pepsinógeno bajaron en la semana 9 por lo que en estos animales, los niveles altos de pepsinógeno producido por el efecto único de los gusanos adultos fue muy breve, en contraste, los animales Cb mantuvieron sus niveles de pepsinógeno sérico elevados hasta la semana 10 post-infección por lo que estos animales mantuvieron elevados estos niveles probablemente por efecto de los gusanos adultos por al menos dos semanas, lo cual por una parte es consistente con lo observado por los autores anteriormente citados y por otra parte indica que el daño producido a la mucosa por las fases adultas, a diferencia de las fases larvarias, sí es proporcional a la carga parasitaria, la cuál fue mayor en los corderos Cb.

Los menores niveles de proteínas totales y albúmina de los corderos Cb con respecto a los Bb durante algunas semanas del experimento (principalmente semanas 3, 7 y 8), sugieren que los corderos de la raza Cb fueron más afectados en la asimilación de nutrientes por la parasitosis que los corderos de la raza Bb, posiblemente debido a la elevación del pH abomasal y la baja conversión de pepsina que interfiere la digestión de proteína y a la pérdida gradual de sangre por la acción hematófaga directa del parásito adulto. La recuperación de estas proteínas en las siguientes semanas p.i. probablemente sea el resultado de una recuperación de la capacidad digestiva de proteínas, asociada a la disminución de larvas en la mucosa y a la conducente normalización de la cantidad de pepsina abomasal. Lo anterior, sumado a la calidad del alimento que se administró a los animales (14% de proteína cruda) es congruente con lo reportado por algunos autores que han señalado que la calidad proteínica de la dieta influye directamente en la resiliencia de

los animales (Fox, 1997; Wallace *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1998; Haile *et al.*, 2002; Kahn *et al.*, 2003).

La eosinofilia es uno de los factores más frecuentemente asociados a las helmintiasis y se ha relacionado con la resistencia contra *H. contortus* (Miller, 1996). Aunque existen muchos trabajos en donde se asocian los eosinófilos periféricos o circulantes a la resistencia, existen pocos estudios comparativos de la eosinofilia en distintas razas con infección experimental por nematodos gastroentéricos. Buddle *et al.* (1992), reportaron la asociación de la eosinofilia con la expresión de la resistencia a través de bajos índices de eliminación de HGH en corderos Romney infectados con *Trichostrongylus colubriformis*, reportaron además con base en la comparación entre grupos de corderos provenientes de progenie resistente y no resistente, que esta asociación fue mayor en los corderos de línea genética resistente. Por otro lado Mugambi *et al.* (1996), además de la diferencia en la susceptibilidad/resistencia, indican diferencias significativas en el desarrollo de la eosinofilia entre Red Maasai y Dorper, con mayores cantidades de eosinófilos periféricos en la raza Red Maasai (resistente).

En el experimento 1 se encontró una correlación negativa significativa entre la eliminación de HGH y la eosinofilia (figura 14), sumado a esto, los corderos Bb después de la infección mostraron una mayor eosinofilia con respecto a los corderos Cb ( $p < 0.05$ ) durante la mayor parte del experimento. Los resultados obtenidos señalan que los corderos Bb presentan eosinofilia ligada a la resistencia y que los eosinófilos periféricos son un importante indicador de resistencia.

El tiempo en que se mantuvieron elevados los niveles de eosinófilos varió notablemente en las dos razas estudiadas. Resulta interesante el hecho de que en los corderos Cb infectados, decreciera súbitamente el número de eosinófilos periféricos en las mismas semanas en las que hubo la disminución de los niveles de anticuerpos. Lo anterior sugiere que esta disminución de eosinófilos no es un evento aislado y está relacionado con otros elementos de la respuesta, lo que puede estar ligado a un mecanismo de regulación inmunológica que puede afectar estas dos variables en común. Un efecto similar se ha

observado en otras parasitosis como la leishmaniosis murina, en donde se ha visto que la respuesta puede estar regulada por interleucinas producidas por células reguladoras como las Th3 o los CD4+ CD25+ que pueden inducir un fenómeno de tolerancia y la disminución de los mecanismos efectores del control parasitario (Tavares *et al.*, 2006).

Los animales Bb infectados también tuvieron estadísticamente un mayor número de eosinófilos tisulares (lámina 1 c y d) en la RPA y LNA que los animales Cb infectados, además, de una correlación negativa aunque no significativa entre la presencia de eosinófilos tisulares en la RPA con el número de HGH y de FA (cuadros 4 y 5). Lo anterior sugiere que los eosinófilos locales juegan un papel importante en la protección y que los animales resistentes son capaces de mantener niveles elevados de eosinófilos locales y periféricos que pudieran impedir el establecimiento de larvas en la mucosa o eliminar gusanos adultos. Los datos observados en este trabajo son similares a lo reportado por Amarante *et al.* (2005), quienes encuentran una correlación negativa significativa entre los eosinófilos tisulares y el número de HGH en la raza resistente Santa Ines, en comparación con las razas de menor resistencia Suffolk e Ile de France.

Los mastocitos tisulares (lámina 1 a y b), al igual que los eosinófilos, también han sido relacionados con la protección local contra los nematodos gastroentéricos (Meeusen y Balic, 2000), sin embargo, en el presente estudio, la correlación de estas células con los parámetros de resistencia (HGH y FA) fueron bajas en las dos regiones del abomaso. Los grupos infectados de ambas razas mostraron mayor cantidad de mastocitos en las dos regiones del abomaso que sus respectivos grupos testigo (efecto infección significativo  $p < 0.001$ ), lo cual indica que la infección provoca el aumento de los mastocitos en la mucosa abomasal. Sin embargo, al no encontrarse diferencias significativas entre los corderos de las razas Bb y Cb infectados, este aumento posiblemente no está relacionado a la resistencia de los animales Bb, por lo menos en la infección crónica (15 semanas p.i.).

Se ha descrito la participación de los mastocitos en la inflamación inespecífica y la expulsión temprana de las fases larvianas (Balic *et al.*, 2002; Miller, 1996). Sin embargo, en este estudio, no fue posible medir la cantidad de mastocitos en las fases iniciales de la

infección, en donde pudiera observarse diferencia en el tiempo en que se monta la respuesta inflamatoria entre las dos razas y esto estuviera relacionado a la resistencia. Estudios posteriores, en donde se sacrifiquen animales y se cuente el número de mastocitos en las fases tempranas de la infección posiblemente den respuesta a esta pregunta. Pese a esto, los resultados obtenidos en este estudio, dejan claro que estas células no tienen participación importante en la expulsión de las FA. Resultados similares han sido reportados anteriormente, Bricarello *et al.* (2003), no encontraron diferencias en el número de mastocitos tisulares en el abomaso de corderos Criollos y Corriedale con alta y baja resistencia a la hemoncosis respectivamente; de la misma manera, Amarante *et al.* (2005), solo registraron diferencias numéricas en el número de mastocitos tisulares entre las razas Santa Ines, Suffolk e Ile de France.

En la RFA se observó la única correlación significativa con respecto a los mastocitos tisulares, ésta fue con los eosinófilos tisulares ( $r= 0.70$ ), lo cual es diferente a lo encontrado en los reportes de Bricarello *et al.* (2003) y Amarante *et al.* (2005) donde las correlaciones fueron bajas (0.48 y 0.54 respectivamente), en este trabajo la correlación fue más alta y significativa. Lo anterior sugiere una participación conjunta de estas células como mecanismo efector contra los nematodos como ha sido propuesto por Miller *et al.* (1996) y por Balic *et al.* (2002).

La infección de los corderos con *H. contortus* indujo un aumento en los niveles de anticuerpos IgG anti-L3 de *H. contortus* en ambas razas, a partir de la semana siete p.i. En las siguientes semanas, los niveles de anticuerpos continuaron aumentando en la raza Bb con una tendencia final positiva y significativa (figura 20), en tanto que los niveles de anticuerpos en la raza Cb bajaron incluso por debajo de los iniciales, en una tendencia negativa. La correlación entre los niveles de anticuerpos con la eliminación de HGH fue negativa y significativa, así mismo también hubo correlación negativa significativa entre carga parasitaria (HGH y FA) y cantidad de globulinas séricas (cuadro 2). Los datos anteriores, indican que los animales resistentes son capaces de montar una respuesta por anticuerpos sostenida, que bien pudiera tener un efecto directo sobre la menor carga parasitaria en estos animales, o bien solo pudiera ser un indicador de la respuesta protectora

a nivel abomasal. Se ha demostrado en corderos de la raza Castellana, que una infección experimental previa induce aumento de anticuerpos séricos y protección cuando los animales son desafiados nuevamente (Gomez-Muñoz *et al.*, 1999). Schallig *et al.*, (1994), observaron en ovinos Texel la inducción de anticuerpos en un segundo desafío, con una respuesta más rápida y duradera, lo que sugiere memoria inmunológica.

El aumento de anticuerpos séricos observado en este trabajo y en los anteriores, no necesariamente indica que estos sean los responsables de la resistencia, considerando la localización de larvas y adultos de *H. contortus* en mucosa abomasal, es probable que los mecanismos inmunológicos locales puedan ser más importantes que los sistémicos, sin embargo, la constante aparición de anticuerpos séricos asociada a protección, quizá sea consecuencia natural del tipo de respuesta local montada en animales resistentes.

En este estudio se observó que los niveles de anticuerpos séricos anti-L3 en los animales Cb tiene un aumento inicial y posteriormente decrece, incluso por debajo de los niveles iniciales, sin embargo, la cantidad de huevos eliminados y el número de FA al sacrificio se mantuvo elevado y el estímulo antigénico por lo tanto debió ser constante, lo que puede sugerir que los animales susceptibles entraron en un estado de tolerancia, que es responsable de la falta de una respuesta inmunológica eficiente para eliminar los gusanos. Esta demostrado que la tolerancia puede inducirse por falta de moléculas coestimuladoras como el B7-1 y B7-2 por parte de las células presentadoras de antígeno o por la estimulación repetida de los linfocitos T por antígenos persistentes, que produzcan muerte celular inducida por activación, la disminución observada de linfocitos T CD4+ cooperadores en los animales Cb, puede estar relacionada a la anergia de los linfocitos B y la consecuente reducción de anticuerpos (Abbas y Lichtman, 2004; Bailey y Haverson, 2006).

En el ensayo de Western blot, tanto los animales infectados como los no infectados de ambas razas reconocieron antígenos de L3 de *H. contortus*. En el caso de los animales infectados, por efecto de la respuesta inmunológica a *H. contortus* y en el caso de los no infectados, probablemente debido a reacciones cruzadas con otros parásitos. Es sabido que



algunos helmintos pueden inducir respuestas por anticuerpos que reconocen antígenos de otros parásitos relacionados. En el caso de *Toxocara canis* estas reacciones cruzadas, sobre todo con *Ascaris lumbricoides*, han ocasionado problemas en los sistemas de inmunodetección diagnóstica (Lynch *et al.*, 1993; Cuéllar *et al.*, 1995). De la misma forma, ha sido documentada la reacción cruzada que existe entre *H. contortus* y *Oestrus ovis* (Terefe *et al.*, 2005). La infestación de los corderos con *Oestrus ovis* aunque no fue detectada durante el desarrollo del estudio, tampoco puede descartarse por completo ni durante, ni antes de la fase experimental. Además, en algunos de los corderos utilizados en este estudio se pudo determinar durante la inspección *post-mortem*, la presencia de metacéstodos de *Taenia* spp. En ensayos de WB se demostró el reconocimiento de antígenos de *Toxocara canis* y de metacéstodos de *Taenia* spp. por los animales infectados, sin embargo, los ensayos de absorción de sueros con antígenos de *Taenia* spp. mostraron resultados muy pobres en cuanto a la disminución de la respuesta a los antígenos de *H. contortus*, por lo que no fue posible demostrar la reacción cruzada en forma definitiva (datos no incluidos).

El análisis de ANOVA multifactorial de las bandas reconocidas por los animales infectados y no infectados, evidenció la presencia de tres antígenos reconocidos en forma importante, estos antígenos tuvieron un peso molecular de 182, 57 y 39 kD respectivamente. El que hayan sido detectados tanto por animales infectados como por animales testigos, puede ser consecuencia de alguna reacción cruzada con otro organismo. El antígeno de 95 kD fue reconocido significativamente ( $p < 0.05$ ) por el suero de los corderos Bb infectados (figura 23). Aunque posiblemente la reacción cruzada no permitió identificar en forma precisa los antígenos inmunodominantes de la hemoncosis, el análisis multifactorial sugiere que el reconocimiento del antígeno de 95 kD puede ser importante en el estado de inmunidad, posiblemente constituyendo algún elemento clave en la fisiología de parásito (*e.g.* células intestinales), sin embargo, también es sabido, que difícilmente en el caso de los helmintos, un antígeno inmunodominante puede explicar completamente el estado de inmunidad, de ahí que actualmente los antígenos que han sido empleados como vacunas experimentales no logren buena protección (Eady *et al.*, 2003). Hacen falta estudios mas precisos en los que se elimine completamente la posibilidad de

infecciones con otros parásitos (a través de animales gnotobióticos o monoespecíficos) para poder confirmar estos resultados.

La presencia de linfocitos B activados y de células plasmáticas en la infección por *H. contortus* ha sido estudiada por diversos autores a través de marcadores como el CD45R (Pernthaner *et al.*, 1996), CPH-II e inmunoglobulinas (Balic *et al.*, 2000), o solo por el marcaje de inmunoglobulinas en el citoplasma (Gill *et al.*, 1994). En el presente estudio, se evaluó en las dos regiones de la mucosa abomasal el número de células plasmáticas identificándolas a través de dos criterios: la reacción positiva con verde metil pironina, que tiñe particularmente a células con grandes cantidades de RNA en el citoplasma y la morfología típica de estas células. 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 entre los corderos infectados de ambas razas. Sin embargo, las bajas correlaciones con las CEL-Ig<sup>+</sup> (cuadros 3 y 4) podría ser porque este tipo de colorante puede teñir otros tipos celulares que no son células plasmáticas o por la presencia importante de otra inmunoglobulina como la IgE que no fue evaluada por inmunofluorescencia.

Por otra parte, se realizaron marcajes con anticuerpos fluorescentes anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA, para determinar y contar a las células positivas a cada inmunoglobulina (lámina 2) así como su asociación con la presencia o ausencia de *H. contortus*. Los resultados mostraron principalmente la presencia de CEL-IgA<sup>+</sup> en ambas regiones del abomaso, asociadas a la infección (efecto isotipo y efecto infección significativo  $p < 0.05$ ). Los corderos Bb infectados mostraron mayores cuentas de CEL-IgG<sup>+</sup> y CEL-IgA<sup>+</sup> en la RFA así como de CEL-IgA<sup>+</sup> en la RPA, con respecto a los Bb no infectados; por su parte los corderos Cb infectados solo presentaron diferencias significativas en las cuentas de CEL-IgA<sup>+</sup> en la RPA, con respecto a los Cb no infectados, sin embargo, no se observaron diferencias en el número o tipo de estas células entre los grupos infectados de las razas evaluadas. No obstante la mayor presencia de CEL-IgA<sup>+</sup> en el tejido, solo las CEL-IgG<sup>+</sup> tuvieron correlación positiva con los linfocitos CD4<sup>+</sup> y gama-delta en la región fúndica

abomasal. Los linfocitos T gama-delta son inespecíficos, por lo que su correlación con las CEL-IgG+ no necesariamente indica que puedan tener alguna dependencia, sin embargo, los linfocitos CD4+ si pueden tener una función cooperadora con los linfocitos B que pudiera estar relacionado al aumento en la expresión de esta inmunoglobulina. La presencia de un mayor número de CEL-IgG+ en los corderos Bb es consistente con sus mayores niveles séricos de IgG anti-L3 de *H. contortus*, lo cuál indica que esta inmunoglobulina puede estar relacionada con la protección local.

La presencia de cualquier antígeno a nivel intestinal, induce principalmente la producción de anticuerpos de la clase IgA y por lo tanto, de CEL-IgA+. La posible razón de que la mayoría de células B estimuladas por antígenos cambie al isotipo IgA, es la mayor producción de IL-5 y TGF $\beta$  en el tracto digestivo por parte de linfocitos Th2 (Abbas y Litchman, 2004), lo anterior puede explicar la mayor presencia de CEL-IgA+ en los animales infectados, sin embargo no es un factor que esté relacionado en forma importante con la mayor resistencia a la hemoncosis en los animales Bb, por lo tanto, al igual que los mastocitos, parecen ser un efecto de la infección, por la contribución a su control, puede ser acumulativa con otros elementos de la respuesta inmune, *e.g.* la citotoxicidad de eosinófilos dependiente de anticuerpos (Behm y Ovington, 2000).

Uno de los principales objetivos del presente trabajo fue la determinación y comparación de las subpoblaciones linfocitarias a nivel abomasal en las dos razas estudiadas (lámina 3). Algunos trabajos anteriores, han estudiado estas subpoblaciones en animales infectados comparándolos con animales no infectados, pero no existen trabajos comparativos entre dos razas de diferente susceptibilidad/resistencia. En general los resultados obtenidos en este estudio mostraron una correlación positiva significativa (cuadro 4) entre los linfocitos CD4+ y gama-delta, así como un mayor número de estas dos subpoblaciones en los animales infectados, con respecto a los no infectados en las dos regiones de la mucosa abomasal estudiadas, lo cual relaciona a estas células de manera directa con la protección contra la infección. Sin embargo, solo en la RPA se registraron diferencias estadísticas significativas, en esta región los corderos Bb infectados mostraron mayor número en estas subpoblaciones con respecto a los Bb no infectados, no siendo así

entre los grupos de la raza Cb. También se registraron importantes diferencias significativas en estas dos subpoblaciones entre los corderos Bb y Cb infectados, siendo mayores en los primeros, lo cual indica que las dos subpoblaciones están relacionadas con la mayor resistencia a la hemoncosis observada en la raza Bb.

Adicional a esto, también en la RPA se encontraron correlaciones negativas significativas entre el número de HGH y FA con respecto a los linfocitos CD4+ y entre el número de HGH y los linfocitos gamma-delta (cuadro 4), lo cual también es indicador de que ambas subpoblaciones están relacionadas a una menor carga parasitaria. En contraste a estos resultados, Pernthaler *et al.* (1996), reportaron mayor cantidad de CD4+ en sangre periférica, en una línea genética susceptible de la raza Romney en comparación a la línea genética resistente, sin embargo, en trabajos realizados en modelos experimentales con roedores, se ha establecido que los linfocitos cooperadores (CD4+) son requeridos para el estado de inmunidad a NGE.

Gill *et al.*, (1993b), establecieron que la reducción de linfocitos CD4+ abate el estado de inmunidad a *H. contortus* en ovinos resistentes a la infección. Del mismo modo, Karanu *et al.* (1997), observaron que la reducción de linfocitos CD4+ mediante Mab anti-CD4+ abate parcialmente la inmunidad inducida por antígenos intestinales de *H. contortus* en ovinos F1 (Dorset X Columbia) y confirma la participación de los linfocitos CD4+ en el estado de inmunidad de los animales. De esta manera, los resultados de este trabajo son totalmente contrarios a los de Pernthaler *et al.* (1996), pero son más coherentes con los estudios de Balic *et al.* (2000a y 2002), y Gill *et al.* (1993b), en donde se ha demostrado que la mayor resistencia a la hemoncosis está relacionada principalmente a la presencia de linfocitos CD4+, solo que en este caso, lo anterior ha sido corroborado en el sitio de la infección empleando dos diferentes razas ovinas. El número de linfocitos en el abomaso es diferente a los que se encuentran en circulación, debido a que estos, se encuentran transitando en espera de las moléculas de adhesión que le permitan acumularse en la submucosa abomasal por medio de receptores del *homing*, por tal motivo, la disminución de los linfocitos circulantes puede ser consecuencia de la mayor acumulación de estas células en los tejidos (Kuby, 1997).

Los linfocitos gamma-delta son una subpoblación linfocitaria considerada particularmente importante en la inmunidad inespecífica de las mucosas de los rumiantes, (Montaño, 2005). Su presencia en las infecciones con *H. contortus* ha sido reportada constantemente, sin embargo, su participación no es clara hasta el momento. En el presente trabajo se encontraron resultados similares a los de Balic *et al.* (2002), en los que se reporta aumento de estas células por la infección. Se sabe que estas células son capaces de reconocer antígenos no proteínicos, se consideran timo-independientes y pueden responder en forma muy temprana a la infección con citocinas como el IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e IL-12 además de IL-5 (Balic *et al.*, 2000b; Rojas-Espinoza, 2003) en forma independiente de CMH-II, con lo que pueden modular la respuesta inmunológica en las fases iniciales.

Los resultados con respecto a los linfocitos CD8+ no fueron muy diferentes a los reportados por Balic *et al.* (2002), esta subpoblación no se incrementó por efecto de la infección y no presentó ninguna relación significativa con los parámetro de resistencia, en las dos regiones del abomaso donde el número de estas células fue significativamente menor en comparación con los CD4+ y los gamma-delta (efecto subpoblación significativo  $p < 0.05$ ), por lo que es clara la nula participación de los mecanismos citotóxicos celulares en el control de la infección por *H. contortus*.

En relación al linfonodo abomasal, ninguna subpoblación presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales, aunque contrariamente a lo observado en el abomaso, los corderos infectados de ambas razas mostraron menores números de linfocitos CD4+ en relación a los grupos testigo, lo cual puede sugerir una mayor movilización de estas células a la mucosa desde el linfonodo inducido por la sobreexpresión de moléculas de adhesión para estas células en la mucosa abomasal (Janeway, 1997).

En ratones se ha demostrado que los linfocitos CD4+ llamados también cooperadores, son capaces de diferenciarse, dependiendo del mecanismo de estimulación, en dos tipos diferentes de células con distintos perfiles de producción de citocinas, la

respuesta por el perfil de linfocitos T cooperadores (*helper*) tipo 1 (Th1) se caracteriza por la producción de IFN $\gamma$  e IL-2 entre otras y se considera una respuesta principalmente de tipo celular, mientras que la tipo 2 (Th2) se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5, IL-10 y se considera respuesta humoral (Mosmann y Coffman, 1989). Existe un efecto antagónico entre las respuestas tipo Th1 y Th2. La estimulación inicial de una respuesta tipo Th2 es capaz de regular la respuesta Th1 a través de la producción de IL-4 e IL-5 y viceversa (Rojas, 2003).

Aunque no se ha demostrado completamente que el antagonismo de las respuestas Th1-Th2 se presente en los ovinos, ni tampoco se ha establecido claramente la aplicación de este tipo de respuestas en las infecciones por nematodos intestinales (Balic *et al.*, 2000b); algunos autores como Gill *et al.* (2000), encontraron que las células de linfonodos abomasales y linfonodos mesentéricos de animales infectados con *H. contortus* aumentaban los niveles de producción de IL-5 y disminuían los niveles de IFN $\gamma$ , lo que sugiere una respuesta antagónica. Además hay muchas características de la infección por *H. contortus* que podrían ser consideradas como respuestas típicas de la polarización de la respuesta hacia el perfil Th2, como la eosinofilia periférica o tisular (Douch and Morum, 1993; Pernthaner *et al.*, 1995), la hiperplasia de células cebadas en la mucosa abomasal y la respuesta por anticuerpos IgG1, IgA (Miller, 1996, Gill *et al.*, 2000).

De manera particular en este estudio, se demostró en el primer experimento que la infección con *H. contortus* indujo un aumento de eosinófilos circulantes a partir de la semana 3 post-infección. En la raza Bb, la eosinofilia se mantuvo elevada durante 14 semanas (tiempo que duró el experimento), en el segundo experimento se observó también en los corderos Bb infectados, la presencia de anticuerpos, eosinófilos y linfocitos CD4+ fuertemente asociados a la resistencia, además de hiperplasia de células cebadas y proliferación de células plasmáticas en la mucosa abomasal asociados a la infección. Por el contrario, en los corderos Cb los niveles de eosinófilos sanguíneos bajaron a partir de la semana 10 post-infección y en el segundo experimento se observó en los animales susceptibles una disminución en los niveles de IgG anti-L3 a partir de la semana 7 pi, acompañado de un reducido número de eosinófilos tisulares en el momento del sacrificio.

En los animales resistentes, el aumento y mantenimiento de anticuerpos séricos, de eosinófilos circulantes y locales, así como la presencia de un mayor número de linfocitos CD4+, concuerda con el desarrollo y mantenimiento de una respuesta inmunológica tipo Th2. Sin embargo todavía no hay una explicación acerca de la mayor presencia en estos animales de linfocitos gama-delta, que en otras enfermedades están asociados a una respuesta Th1. El aumento inicial y la posterior disminución de anticuerpos séricos, eosinófilos circulantes así como el bajo número de eosinófilos tisulares en los corderos de la raza susceptible, sugieren el desarrollo inicial de una respuesta tipo Th2 y un posterior mecanismo antagónico que explica los cambios en la respuesta de estos animales, posiblemente por un cambio a una respuesta tipo Th1.

Una de las principales limitaciones en el estudio de la inmunidad en ovinos es la carencia en el mercado de monoclonales específicos para algunas moléculas como isotipos o subtipos de anticuerpos (IgG1, IgG2, IgG4 e IgE), kits de medición de interleucinas como la IL-5 o el IFN $\gamma$  entre otros. Frecuentemente se han utilizado kits o monoclonales dirigidos a moléculas bovinas con relativo éxito, en particular en este trabajo, se utilizó un marcador anti-WC1 bovina que anteriormente fue reportado con buenos resultados.

La determinación de anticuerpos IgG1, IgG2 e IgE en los animales de experimentación, podría corroborar los datos obtenidos acerca de la posible respuesta Th2, además el estudio de las citocinas específicas de ovinos producidas *in situ* utilizando herramientas de estudios como la hibridación o la RT-PCR *in situ* buscando los RNAm de estas interleucinas, también puede ayudar a esclarecer plenamente el tipo de respuesta protectora y su grado de participación en la manifestación de la resistencia de los corderos Bb a la hemoncosis.

Finalmente hay que hacer notar las diferencias encontradas en el presente trabajo entre la RFA y la RPA. En ningún estudio hecho con anterioridad, se han realizado comparaciones entre dos regiones distintas del abomaso en el mismo animal con respecto a la presencia de *H. contortus*. En la RPA se encontraron mayores cantidades de eosinófilos,

linfocitos CD4+ y linfocitos gamma-delta que en la RFA. Las correlaciones entre los CD4+ y gama-delta con la carga parasitaria (HGH y FA) en la RPA fueron significativas, en tanto que en la RFA no lo fueron. Por otro lado, en la RFA hubo correlación positiva significativa entre los mastocitos y eosinófilos tisulares, así como una correlación significativa entre las CEL-IgG+ con los linfocitos CD4+ y gama-delta. Estos resultados sugieren que la respuesta en el abomaso no necesariamente es homogénea en toda la mucosa. La mayor parte de la carga parasitaria se encuentra en la RFA, por lo que se puede suponer que es ahí en donde se concentra la mayor parte de la respuesta local, sin embargo los datos obtenidos muestran una mayor reacción de la RPA en algunos parámetros inmunológicos. Esto puede ser debido al mayor consumo de estos elementos efectores en la RFA, que muestra una relativa disminución de los mismos con respecto a la RPA, si esto es así, la RPA puede ser una zona de reserva de estos elementos o también de regulación de la respuesta. Es interesante observar que posiblemente la RPA es mejor área de estudio para observar las relaciones existentes entre las diferentes células efectoras, en relativa lejanía del efecto parásito. Posiblemente un estudio posterior dirigido a la observación detallada de estas diferencias puedan confirmar esta hipótesis.



## CONCLUSIONES

Los corderos Bb son naturalmente más resistentes a la hemoncosis que los corderos Cb.

La resiliencia también es diferente entre las razas estudiadas, la afectación de los parámetros evaluados, por la presencia del parásito, fue más evidente en los corderos Cb.

La resistencia a la hemoncosis de los corderos Bb está relacionada con elementos de la respuesta innata como son eosinófilos periféricos, eosinófilos tisulares y linfocitos gamma-delta.

La presencia de células cebadas en el abomaso está relacionada con la infección pero no con la resistencia.

La resistencia a la hemoncosis de los corderos Bb también está relacionada a elementos de respuesta específica como son anticuerpos IgG anti-L3, y linfocitos CD4+.

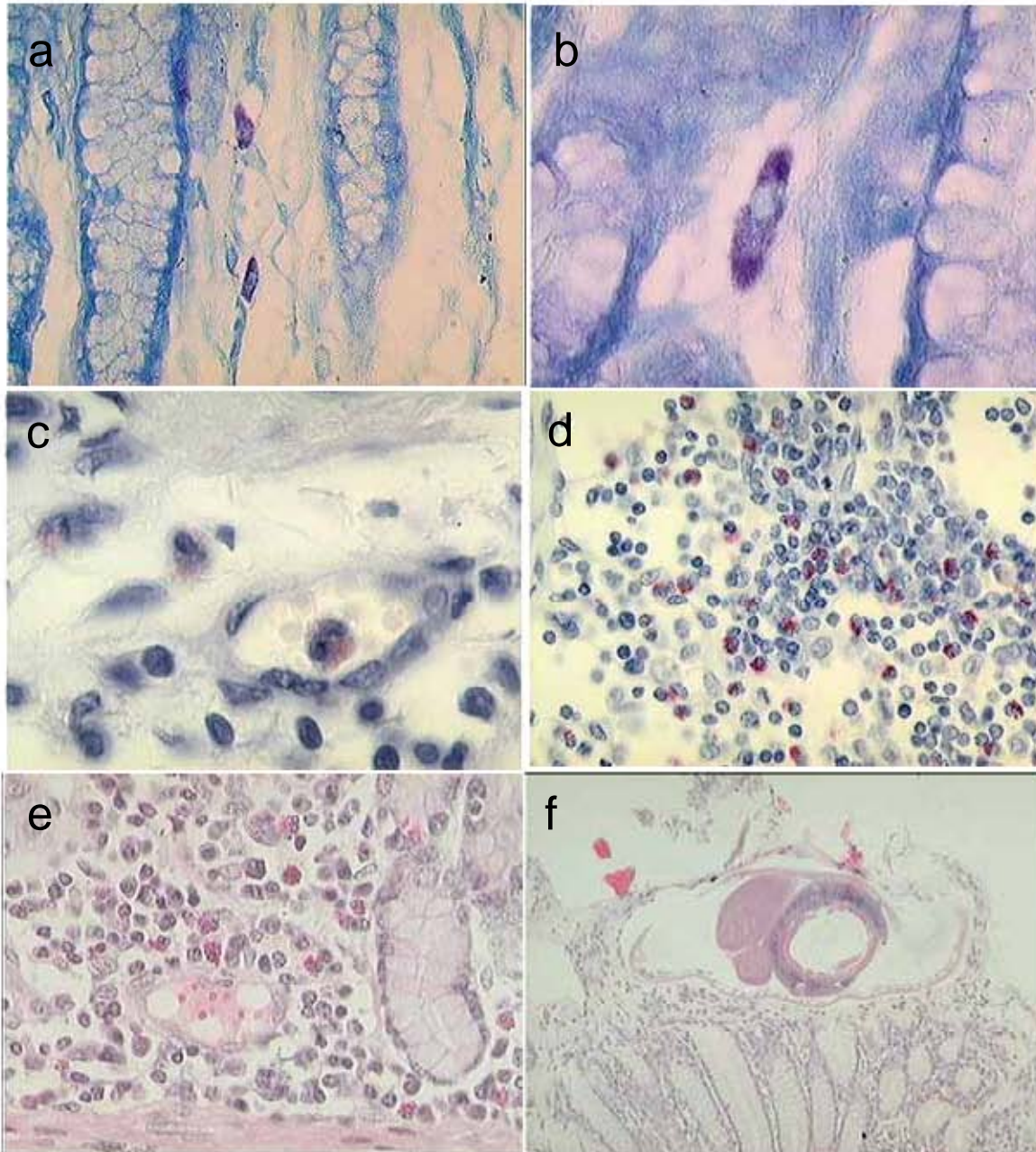
El antígeno de 95 kD de la L3 de *Haemonchus contortus* fue reconocido en forma significativa únicamente por los corderos Bb resistentes a la hemoncosis.

La presencia de células plasmáticas productoras de IgG, IgM e IgA en el abomaso está relacionada con la infección pero aparentemente no con la resistencia a la hemoncosis.

La respuesta en el abomaso es diferente en las dos regiones estudiadas siendo más evidente en la región pilórica abomasal.

Los corderos Cb después de la infección con *H. contortus* posiblemente entran en un estado de tolerancia lo que disminuye su respuesta protectora a la hemoncosis.

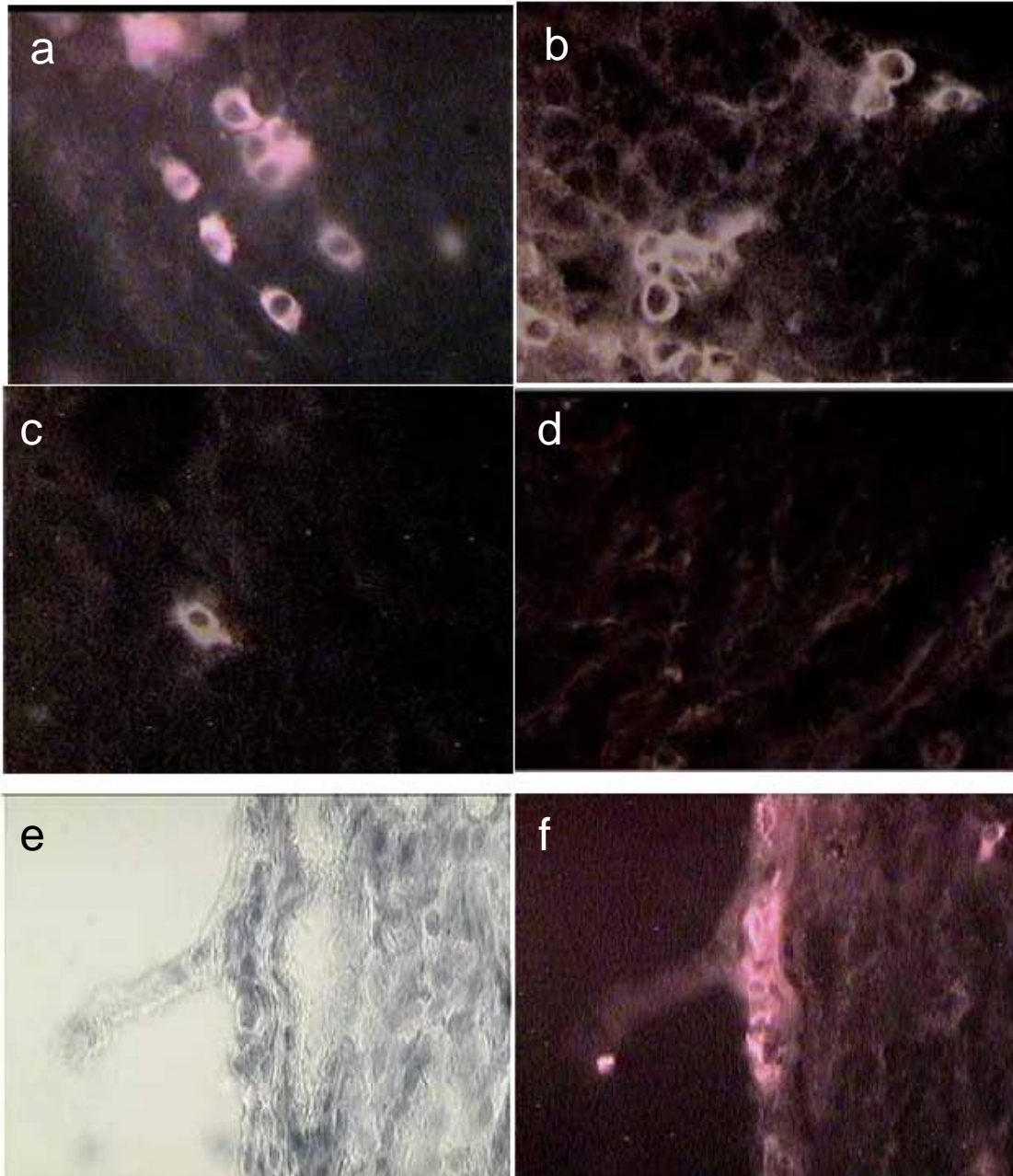
**VOLVER AL INDICE**



## LÁMINA EN COLOR

**1:** Microfotografías de cortes en microtomo de mucosa y linfonodo abomasal de ovinos, procesados por distintas técnicas de tinción. **a)** Tinción con azul de toluidina (objetivo 40x), mastocitos en la lámina propia de la cripta abomasal; **b)** Tinción con azul de toluidina (objetivo 100x), acercamiento a un mastocito; **c)** Tinción con cromótopo 2R (objetivo 100x), eosinófilos en mucosa abomasal; **d)** Tinción con cromótopo 2R (objetivo 40x) eosinófilos en linfonodo abomasal; **e)** Tinción con H.E. (objetivo 40x) infiltración leucocitaria en mucosa abomasal de un animal infectado con *Haemonchus contortus*; **f)** Tinción con H.E. (objetivo 10x), sección transversal de un *H. contortus* adulto adherido a la mucosa abomasal.

[VOLVER AL INDICE](#)

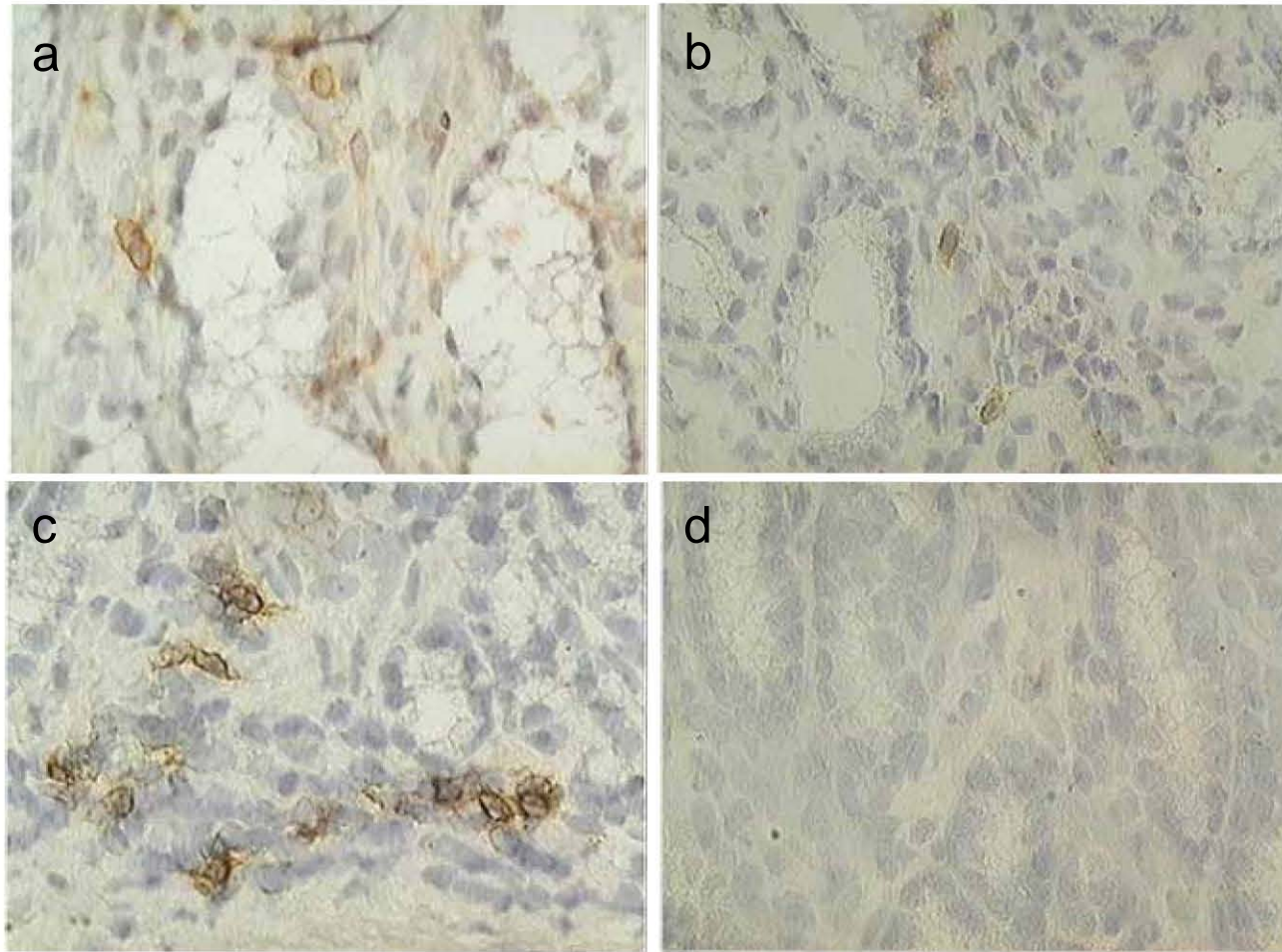


## LÁMINA EN COLOR

**2:** Microfotografías de cortes en criotomo de la mucosa abomasal de ovinos (objetivo 40x), procesados por inmunofluorescencia para el marcaje de las distintas células inmunoglobulina positivas (CEL-Ig+) específicas para IgM, IgG e IgA. **a)** CEL-IgA+; **b)** CEL-IgG+; **c)** CEL-IgM+; **d)** control negativo; **e) y f)**, mismo campo observado con microscopio de campo claro (izquierda) y microscopio de epifluorescencia (derecha) de un tejido procesado para marcaje de CEL-IgA+.

VOLVER AL INDICE





**LÁMINA EN COLOR 3:** Microfotografías de cortes en microtomo de mucosa abomasal de ovinos (objetivo 40x), procesados por inmunohistoquímica para el marcaje de las distintas subpoblaciones linfocitarias. **a)** linfocitos CD4+; **b)** linfocito CD8+; **c)** linfocitos WC1+ (gama-delta); **d)** control negativo.

[VOLVER AL INDICE](#)

## Referencias

Abbas, A. K., and Lichtman, A.H. Capítulo 1: Propiedades generales de la respuesta inmunitaria, Inmunología celular y molecular 3ra ed. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España, 2004. pp. 4-15.

Adogwa, A., Mutani, A., Ramnanan, A., Ezeokoli, C. 2005. The effect of gastrointestinal parasitism on blood copper and hemoglobin levels in sheep. *Can. Vet. J.* 46, 1017-1021.

Alba-Hurtado F.: Parasitología veterinaria. Manual de laboratorio. UNAM, 2007.

Albers, G.A.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, L.R., Le Jambre, S.F., Barger, I.A. 1987. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino lambs. *Int. J. for Parasitol.* 17, 1355-1363.

Amarante, A.F., Bagnola junior, J., Amarante, M.R., Barbosa, M.A. 1997. Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 73, 89-104.

Amarante, A.F.T., 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 crossbreed lambs. *Vet. Parasitol.* 80, 311-324.

Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M. 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.* 120, 91-106.

Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Huntley, J.F., Mazzolin, L.P., Gomes, J.C. 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 128, 99-107.

AMCO. Rústico y prolífico, el Blackbelly. La revista del Borrego 5. Ed. EKLIPSE México, 2000.

Bailey, M., Haverson, K. 2006. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet. Res.* 37, 443-453.

Bakker, N., Ververde, L., Kanobana, K., Knox, D.P., Cornelissen, A.W., Vries, E., Yadsuda A.P. 2004. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22, 618-628.

Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T. 2000a. The immunobiology of gastrointestinal nematode infection in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181-241.

Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen E.N.T. 2000b. Cellular profiles in the mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75, 109-120.

Balic, A., Bowles, V.M. Meeusen, E.N.T. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39-46.

Balic, A., Bowles, V.M., Liu Y.S., Meeusen, E.N.T. 2003. Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 25, 375–381.

Bang, K.S., Familton A.S., Sykes, A.R. 1990. Effect of ostertagiasis on copper status in sheep: a study involving use of copper oxide wire particles. *Res. Vet. Sci.* 49, 306-314.

Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Georgi, J.R., Davies, H.I. 1985. Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep expressed to continuous infection. *Int. J. Parasitol.* 15, 529-533.

Behm, C.A., Ovington, K.S. 2000. The role of eosinophils in parasitic helminthes infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today* 16, 202-209.

Blitz, N.M., Gibbs, H.C. 1971. An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep. *Can. J. Comp. Med.* 35, 178-180.

Borchet, A: Superfamilia Trichostrongyloidea, *Parasitología Veterinaria* 3 ra ed. Acribia, Zaragoza, España. 1981. pp. 316-353.

Bouix, J., Krupinski, J., Rzepecki, R., Nowosad, B. 1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *Int. J. Parasitol.* 28, 1797-1804.

Bowles, V.M., Brandon, M.R., Meeusen, E. 1995. Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunology* 84, 669-674.

Bowman, D. Parasitología para veterinarios. 8ª ed. SOUNDERS ELSEVIER. España, 2004.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Bricarello P.; Gennari T.; Olivera-Sequeira T.; Vaz C. Goncalves I. and Echeverria F., 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small. Rum. Res.* 51, 75-83.

Bricarello, P.A. Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdijk, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M. 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet. Parasitol.* 134, 99–109

Buddle, B.M., Jowett, G., Green, R.S., Douch, P.G.C., Risdon, P.L. 1992. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int. J. for Parasitol.* 22, 955-960.

Burke, J.M., Miller, J.E. 2004. Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper Katahdin, and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United States. *Small Rum. Res.* 54, 43-51.

Burke, J.M., Miller, J.E. 2006. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. *Vet. Parasitol.* 139, 145-149.

Camargo, E., Nakamura, P., Vaz, A., Silva, M., Chieffi, P., Melo, E. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 34, 55-60.

Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H. 1990. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Téc. Pecu. Méx.* 28, 30-34.

Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H. 1992. Diagnóstico *in vivo* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet. Méx.* 23, 51-56.

Carrillo, L. and Segura, J.C. 1993. Environmental and genetic effects on preweaning growth performance of hair sheep in Mexico. *Trop. Anim. Health. Prod.* 25,173-178.

Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N. 1998. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Rum. Res.* 29, 33-41.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. Strober, W. Immunoblotting and immunodetection, *Current protocols in immunology Vol 2.* Published by John Wiley & Sons, Inc. U.S.A., 1994. 8.10.1 - 8.10.14.

Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martínez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernández, R.S., Navarrete, L.C. I., Diez, B.P., Quiroz, R.H., Carvalho, V.H. Parte III: Parasitosis de los rumiantes, *Parasitología Veterinaria*, Mac Graw Hill-Interamericana, Madrid España, 1999. pp 195-448.

Cuéllar, O.J.A. Nematodiasis gastroentérica, Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. editores Pijoan A. C., Tórtora P.J. UNAM-Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán, México, 1986. pp. 112-118.

Cuéllar C., Fenoy S., and Guillen J. L. 1995. Cross. Reaction of sera from *Toxocara canis* infected mice with *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. *Int. J. for Parasitol.* 22, 301-307.

Datta, F.U., Nolan, J.V., Rowe, J.B., Gray, G.D. 1998. Protein supplementation improves the performance of parasited sheep fed a straw-based diet. *Int. J. Parasitol.* 28, 1269-1278.

Datta, F.U., Nolan, J.V., Rowe, J.B., Gray, G.D. 1999. Long-term effects of short-term provision of protein-enriched diets on resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29, 479-488.

Doligalska, M., Moskwa, B., Stear, M.J. 1999. Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and faecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 299-308.

Domínguez, T.I.A., Cuquerella, M., Gómez, M.M., Méndez, S., Fernández, P.F., Malunda, J. 2000. Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunol.* 22, 131-138.



Douch, P.C.G., Harrison, G.B.L., Buchanan, L.L. and Green, K.S. 1983. In vitro bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int. J. for Parasitol.* 13, 207-212.

Douch, P.G.C., Morum, P.E. 1993. The effect of age on the response of Romney sheep to gastrointestinal nematodes during grazing. *Int. J. Parasitol.* 23, 651-655.

Douch, P.C.G., Morum, P.E., Rabel, B. 1996. Secretion of antiparasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. *Int. J. Parasitol.* 26, 205-211.

Eady, S.J., Woolaston, R.R., Mortimer, S.I., Lewer, R.P., Raadsma, H.W., Swan, A.A., Ponzoni, R.W. 1996. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: sources of genetic variation. *Aust. J. Agr. Res.* 47, 895-915.

Eady, S.J., Woolaston, R.R., Barger, I.A. 2003. Comparison of genetic and non-genetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Lives. Prod. Sci.* 81, 11-23.

Emery, D.L., McClure, S.J., Davey, R.J. 2000. Protection of Merino lambs against *Haemonchus contortus* by trickle infection of neonates. *Parasitol. Int.* 49, 165-170.

Eysker, M., Bakker, N., van der Hall, Y.A., van Hecke, I., Kooyman, F.N.J., van der Linden, D., Schrama, C., Ploeger, H.W. 2006. The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematodes infections in their lambs in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 141, 91-100

Falcone, F.H., Pritchard, D.I. Gibbs, B.F. 2001. Do basophils play a role in immunity against parasites?. *TRENDS in Parasitol.* 17, 126-129.

Fox, M.T. 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.* 72, 285-297.

Gamble, H.R., Purcell, J.P., Fetterer, R.H., 1989. Purification of a 44 kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 49-58.

Gill, H.S. 1991. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite. Immunol.* 13, 617-628.

Gill, H.S., Husband, A.J., Watson, D.L. 1992. Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15, 178-187.

Gill, H.S., Gray, G.D., Watson, D.L. Husband, A. J. 1993a. Isotype specific antibody response to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol.* 15, 61-67.

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

Gill, H.S. 1994. Cell-mediated immunity in Merino lambs with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 24, 749-756.

Gill, H.S., Husband, A.J., Watson, D.L., Gray, G.D. 1994. Antibody-containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 56, 41-47.

Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J. 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99, 458-463.

Gómez, A.P., Araujo, J.V., Ribeiro, R.C. 1999. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Manocrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 79-83.

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

Gray, G.D., Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Douch, P.G.C. 1992. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22, 417-425.

Gruner, L., Aumont, G., Getachew, T., Brunel, J.C., Pery, C., Cognié, Y. Guérin Y. 2003. Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Vet. Parasitol.* 116, 239-249.

Haile, A., Tembely, S., Anidondo, D.O., Mukasa-Mugerwa E., Rege, J.E.O., Yami, A. Baker, R.L. 2002. Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in Ethiopian sheep. *Small Rum. Res.* 44, 247-261.

Haile, A., Anidondo, D.O., Tembely, S., Mukasa-Mugerwa, E., Tibbo, M., Yami A., Baker, R.L., Rege J.E.O. 2004. Effects of dietary protein supplementation and infection with gastrointestinal nematodes parasites on some nutritional and metabolic parameters in Ethiopian Menz and Horro sheep. *Lives. Prod. Sci.* 91, 183-195.

Hielscher, A., Brandt, H., Erhardt, G., Gauly, M. 2006. Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhöen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. *Vet. Parasitol.* 141, 279-284.

Hong, C., Hunt, K.R., Coles, G.C. 1996. Ocurrance of anthelmintic resistant nematodes of sheep farms in England and goat farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 139, 83-86.

Hohenhaus, M.A., East, J., Eisemann, C.H., Pearson, L.D., Douch, P.G.C., Green, R.S., Outteridge, P.M. 1995. Variation in immune responsiveness of sheep to the antigens of intestinal nematodes and blowfly larvae. *Int. J. for Parasitol.* 25, 629-636.

Hohenhaus, M.A., Outteridge, P.M. 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br. Vet. J.* 151, 119-140.

Hohenhaus, M.A., Josey, M.J., Dobson, C., Outteridge, P.M. 1998. The eosinophil leukocyte, a phenotypic marker of resistance to nematodes parasites, is associated with calm behaviour in sheep. *Immunol. Cell Biol.* 76, 153-158.

Hooda, V., Yadav, C.L., Chaudhri, S.S., Rajpurohit, B.S. 1999. Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J. Helminthol.* 73, 137-142.

Hoste, H., Le Frileux, Y., Goudeau, C., Chartier, C., Pors, I., Broqua, C., Bergeaud, J.P. 2002. Distribution and repeatability of nematode faecal egg counts in dairy goats: a farm survey and implications for worm control. *Res. Vet. Sci.* 72, 211-215.

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

Jacobs, H.J., Wiltshire, C., Ashman, K. and Meeusen E.N.T. 1999. Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-368.

Janeway jr, . C.A., Travers, P., Hunt, S., Walport M. Basic concepts in immunology, Immunobiology, the immune system in health and disease. 3th ed. Current biology Ltd./Garland Publishing Inc. New York, U.S.A. 1997. pp. 1:1-1:30.

Jasmer, D., McGuire, T. C. 1991. Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. *Infect. Immun.* 59, 4412-4417.

Jasmer, D., Perryman L.E., McGuire, T.C. 1996. *Haemonchus contortus* GA1 antigens: Related, phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein and released from the nematode during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8642-8647.

Johansson K.E. Separation of antigens by analytical gel electrophoresis, Handbook of immunoblotting of proteins. Vol. I Editors Bjerrum, O.J, Heegaard N.H.H. CRC-Press Inc. Florida, U.S.A. 1988. pp. 31-50.

Kahn, L.P., Knox, M.R., Walkden-Brown, S.W. Lea, J.M. 2003. Regulation of the resistance to nematode parasites of single and twin bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet. Parasitol.* 114, 15-31.

Kaplan, R.M. Burke, J.M., Terrill, T.H., Miller, J.E Getz, W.R. Mobini, S. Valencia, E., Williams, M.J. Williamson, L.H. Larsen, M. A. Vatta, F. 2004. Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Vet. Parasitol.* 123, 105–120

Karanu, F.N., McGuire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E., Jasmer, D.P. 1997. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19, 435-445.

Kassai, T. Trichostrongylidosis, Veterinary helminthology. Butterworth Heinemann, Oxford, Grain Britain. 1999. pp. 75-83.

Knox, M.R., Steel, J.W. 1999. The effects of urea supplementation on production and parasitological response of sheep infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 83, 123-135.

Knox, M.R. 2002. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust. Vet. J.* 80, 224-247.

Kotze, A.C., Grady, J.O., Gough, J.M., Pearson, R., Bagnall, N.H., Kemp, D.H., Akhurst, R.J. 2005. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int. J. for Parasitol.* 35, 1013-1022.

Kuby, J. *Immunology* 3 ed. W.H. Freeman and Company New York 1997.

Kyhse-Andersen, J. Semi-dry electroblotting transfer using equipment without buffer vessel, *Handbook of immunoblotting of proteins*. Vol. I Editors Bjerrum, O.J, Heegaard N.H.H. CRC-Press Inc. Florida, U.S.A. 1988. pp. 31-50.

Lapage G.: Capítulo 8: Clase Nematoda Orden 2 Strongyloidea Familia 3 Trichostrongylidae, *Parasitología Veterinaria*. Continental. México D.F. México, 1984. pp. 121-142.

Le Jambre, L.F., 1995. Relationship of blood loss to worm burdens, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *Int. J. Parasitol.* 25, 269-273.

Levine, N. D.: Capítulo 15: Trichostrongylus, *Tratado de parasitología veterinaria*. Acribia, Zaragoza, España, 1978. pp. 106-114.

Lucas, T.J., Arbiza A.I.S. *Producción ovina en México, Producción ovina en el mundo y México*. Editores Mexicanos unidos S.A. México D.F., México. 2000. 83-136.

Lynch, N.R., Hagel, I., Vargas, V., Rotundo, A., Varela, M.C. Di Prisco, M. 1993. Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Parasitol. Res.* 79, 547-550.

Martínez-Valladares, M., Vara del Río, M.P., Cruz-Rojo, M.A., Rojo-Vázquez, F.A. 2005. Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunol.* 27, 213-218.

Mendoza de Gives, G.P.M., Flores, C.J., Herrera, R.D., Vázquez, P.V., Liébano, H.E., Ontiveros, F.G.E. 1998. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. J. Helminthol. 72, 343-347.

Mendoza de Gives, G.P.M., Davies, K.G., Clark, S.J., Behnke, J.M. 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against *erf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. Parasitol. 119, 95-114.

Meeusen, E.N.T., Balic, A. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? Parasitol. Today 16, 95-101.

Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V. 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 121-125.

Miller, H.R.P. 1996. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, Can it be harnessed?. Int. J. for Parasitol. 26, 801-811.

Miller, J.E., Bahirathan, M., Lemarie, S.L., Hembry, F.G., Kearney, M.T., Barras, S.R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 74, 55-74.

Miller, M.R., White, A., Boots, M. 2005. The evolution of host resistance: Tolerance and control as distinct strategies. J. Theo. Biol. 236, 198–207.

Montaño H.J.A.: Complejo principal de histocompatibilidad, Temas selectos de inmunología veterinaria. Manual moderno. México D.F., México, 2005. pp. 47-60.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. Adv. Immunol. 46, 111.

Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Kari, M., Owango, M.O., Duncan, J.L., Stear, M.J. 1996. Response of Dorper and red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infection. Res. Vet. Sci. 61, 218-221.

Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J. 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 69, 265-273.

Mugambi, J.M., Audho, J.O., Njomo, S., Backer, R.L. 2005. Evaluation of phenotypic performance of Red Maasai and Dorper double backcross resource population: indoor trickle challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 127, 263-275.

Muñoz, G.M.A., Determinación por western blot de los antígenos de excreción-secreción de la larva 2 de *Toxocara canis* que son reconocidos por sueros de cachorros infectados naturalmente. Tesis de licenciatura, UNAM, México, 1997.

Newton, S.E., Munn, E.A. 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15, 116-122.

Nikolaou, S., Gasser, R.B. 2006. Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 36, 859-868.

Notter, D.R., Andrewa, S.A., Zajac, A.M. 2003. Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose of infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Small Rum. Res.* 47, 221-225.

Padigel, U.M., Lee, J.J., Nolan, T. J., Schad, G. A., Abraham D. 2006. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune response to *Strongyloides stercoralis*. *Infec. Immun.* 74, 3232-3238.

Paolini, V., De la Farge, F., Prevot, F., Dorchies Ph. And Hoste, H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 227-283.

Peña, M.T., Miller, J.E., Horohov, D.W. 2006. Effect of CD4+ lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 138, 240-246.

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Bisset, S.A., Jonas, W.E., Cabaj, W., Pulford, H.D. 1995a. 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.* 25, 523-529.

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Cabaj, W., Jonas, W.E. 1995b. Immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: field studies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 97-103.

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Cabaj, W., Pfeffer, A., Green, R.S., Douch, P.G.C. 1996. Immune responsiveness of nematode-resistant or susceptible Romney line-bred sheep to continuous infection with *Trichostrongylus axei*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 137-146.

Pernthaner, A., Shaw, R.j., McNeill, M.M. Morrison, L., Hein, W.R. 2005. Total and nematode-specific IgE responses in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 69-80.

Pfeffer, A., Douch, P.G.C., Shaw, R.J., Gatehouse, T.K., Rabel, B., Green, R.S., Shirer, C.L., Jonas, W.E., Bisset, S. 1996. Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. *Int. J. Parasitol.* 26, 765-773.

Quiroz, R.H.. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 2da ed. LIMUSA. México D.F. México, 2000.

Radostis, O. M. Gay, C. C. Blood, D. C. Hinchcliff K.W. 26.- *Enfermedades causadas por parásitos helmintos, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9na ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España, 2002. pp 1689-1646.

Roitt, I.M. *Inmunidad innata, Inmunología Fundamentos*. 10ma ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 2003. pp. 3-21.

Rojas, D.K., López, J., Tejada, I., Vázquez, V., Shimada, A., Sánchez, D., Ibarra, F. 2006. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Anim. F. Sc. And Tech.* 128, 218-228.

Rojas-Espinoza O.: 2. *Inmunidad y resistencia no específica, Inmunología (de memoria)*. 2da ed. PANAMERICANA. México D.F., México, 2003. pp. 11-29.

Schallig, H.D.F.H., Van Leeuwen, M.A.W., Bernardina, W.E., Hendrikx, M.L. 1994. Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 57, 63-68.



Schallig, H.D.F.H. 2000. Immunological response of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120, s63-s72.

Schallig, H.D.F.H., van Leeuwen, M.A.W., Verstrepen, B.E., Cornelissen, A.W.C.A. 1997. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88, 203-213.

Schnyder, M., Torgenson, P.R., Schönmann, M., Kohler, L., Hertzberg, H. 2005. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 128, 285-290.

Scott, I., Hodgkinson, S.M., Khalaf, S., Lawton, D.E.B., Collet, M. G., Reynolds G.W., Pomroy, W.E., Simpson, H.V. 1998. Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *Int. J. Parasitol.* 28, 1383-1392.

Scott, I. Dick, J., Stear M.J., McKellar, Q. 1999. The distribution of pepsinogen within the abomasal of cattle and sheep infected with *Ostertagia* spp. and sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 82, 145-159.

Scott, I., Khalaf, S., Simcock, D.C., Knigth, C.G., reynolds, G.W., Pomroy, W.E. and Simpson, H.V. 2000. A sequential study of pathology associated with the infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 89, 79-94.

Simpson, H.V., Lawton, D.E., Simcock, D.C., Reynolds, G.W. and Pomroy, W.E. 1997. Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *Int. J. Parasitol.* 27, 825-831.

Singh, S., Yadav, C.L., Banerjee, D.P. 1997. Comparison of the post-parturient rise in faecal egg counts of indigenous and cross-bred ewes. *J. Helminthol.* 71, 249-252.

Soulsby. E.J.L.: Superfamily Trichostrongyloidea, Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7ma ed. Lea and Febiger, London, Grain Britain, 1987. 212-258.

Sréter, T., Kassai, T., Takács, E. 1994. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24, 871-876.

Stear, M.J., Murray, M. 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 54, 161-176.

Suchitra, S., Joshi, P., 2005. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biophys. Biochem. Acta* 1722, 293-303.

Tavares, D., Conceição-Ribeiro, R., da Silva, A.C. 2006. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microb. Infec.* 8, 957-964.

Terefe, G., Yacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dumas, E., Bergeaund, J.P., Dorchies, P., Hoste, H., Jacquet, P. 2005. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* 128, 271-283.

Todd, K.S., Mansfield, M.E., Levine, N.D. 1978. *Haemonchus contortus* infections in Targhee and Targhee-Barbados Black-belly cross lamb. *Am. J. Vet. Res.* 39, 865-866.

Torres-Acosta, J.F.J., Dzul-Canche, U., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas R.I. 2003. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México. *Vet. Parasitol.* 114, 33-42.

Torres-Acosta, J.F.J., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, C., Sandoval-Castro, C., Cob-Galera, L., May-Martínez, M. 2006. Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* 135, 163-173.

Urquhart G M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. *Helmintología veterinaria, Parasitología Veterinaria* Acriba, Zaragoza, España, 2001. pp. 3-155.

Vadas, M.A. 1982. Genetic control of eosinophilia in mice: Gene(s) expressed in marrow-derived cells control high responsiveness. *J. Immunol.* 128, 691-695.

Van den Broek, A.H.M., Huntley, J.F., Mackellar, A., Machell, J., Taylor, M.A., Miller, H.R.P. 2005. Characterization of lesional infiltrates of dendritic cells and T cells subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 141-150.

Van Die, I., Gomord, V., Kooyman, F.N.J., van den Berg, T. K., Cummings, R.D., Vervelde, L. 1999. Core  $\alpha$ 1-3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminthes and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep. *FEBS Lett.* 463, 189-193.

Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Bath, G.F. 1997. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa —what are the options? In: Van Wyk, J.A., Van Schalkwyk, P.C. (Eds.), Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites. Workshop held at the 16th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Sun City, South Africa, August 1997.

Van Wyk, J.A., Van der Merwe, J.S., Vorster, R.J., Viljoen, P.G. 1999. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. Onderstepoort J. Vet. Res. 66, 273-284.

Van Wyk, A.J., Bath, G.F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. Vet. Res. 33, 509-529.

Vázquez, H.M., González, G.R., Torres, H.G., Mendoza, G.P., Ruiz, R.M. 2006. Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo. Vet. Méx. 37, 15-27.

Wallace, D.S., Bairden, K., Duncan, J.L., Eckersall, P.D., Fishwick, G., Gill, M., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Murray, M., Parkins, J.J., Stear, M.J. 1998. The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. Parasitol. 116, 67-72.

Waller, P.J., Echevarria, F., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J.W. 1996. The prevalence of antihelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. Vet. Parasitol. 62, 181-187.

Waller, P.J., Chandrawathani, P. 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from tropics- polar circle. Problems and prospects control based on epidemiology. Trop. Biomed. 22, 131-137.

Wanyangu, S.W., Mugambi, J.M., Bain, R.K., Duncan, J.I., Murray, M., Stear, M.J. 1997. Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in red Maasai and Dorper ewes. Vet. Parasitol. 69, 275-282.

Wildblood, L.A., Kerr, K., Clark, D.A., Cameron, A., Turner D.G., and Jones, D.G. 2005. Production of eosinophil chemoattractant activity by ovine gastrointestinal nematodes. Vet. Immunol. Immunopathol. 107, 57-65.

Woolaston, R.R. 1993. Factors affecting the prevalence and severity of footrot in a Merino flock selected for resistance to *Haemonchus contortus*. Aust. Vet. J. 79, 365-369.

Woolaston, R.R., Baker, RL. 1996. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. Int. J. Parasitol. 26, 845-55.

Yazwinski, T.A., Goode, L., Moncol, D.J., Morgan, G.W., Linnerud, A.C. 1980. *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. J. Anim. Sci. 51, 279-284.

**VOLVER AL INDICE**