



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“Efecto de la inoculación de antígenos del metacestodo de
Taenia hydatigena sobre las poblaciones linfocitarias a nivel
abomasal en corderos de la raza Columbia infectados
experimentalmente con *Haemonchus contortus*”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CYNTHIA JESSICA GONZÁLEZ ALVARADO

ASESOR:

Dr. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTITLÁN IZCALLI. ESTADO DE MEXICO.

2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Dr. Fernando Alba Hurtado, por su inmenso apoyo y permitirme ser parte de este proyecto.

Dr. Marco Antonio Muñoz, por todo su tiempo, enseñanzas y paciencia para sacar adelante este trabajo.

M. en C. César Cuenca, por tu amistad y todo el tiempo que dedicaste a este trabajo, gracias.

M. en C. Alfredo Cuellar, por el gran respeto, admiración y cariño que le tengo.

M. en C. Alejandro Buendía, por todo el apoyo y enseñanzas.

Dr. Juan Carlos del Rio, por su amistad y apoyo incondicional, gracias!

A los miembros de mi jurado, he sido muy afortunada al contar con gente que admiro y tengo un gran cariño:

Presidente Dr. Guillermo Tomás Oviedo Fernández.

Vocal MVZ Gloria Josefina Ortiz Gasca.

Secretario Dr. Fernando Alba Hurtado.

Primer Suplente MVZ Raúl García Tinajero.

Segundo Suplente Dr. José Francisco Morales Álvarez.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio 1: Lupita, Iliana, Tabata, Víctor Márquez, Víctor Hugo, Raúl, Mayra y Lore.

DEDICATORIAS

A mis abues, Arcelia Castro y Jorge Alvarado por construir una familia tan hermosa y formar con su ejemplo, cariño y trabajo buenas personas.

A mi mami, Yolanda Alvarado por apoyarme en todo, por tu abundante amor. Gracias mami, este trabajo es tuyo.

A mis tíos Achita y Jesús, porque los admiro y amo muchísimo, gracias por ser tan importante parte de mi vida.

A mis carnalitos, Jorge, Alfredo, Oscar y Patán por ser como son, nunca cambien, los amo mil!!!

A mis niños, David, Noelito, Lucy, Sebastián y Viggo por llenar de alegría nuestro hogar, los llevo siempre conmigo, los ama su tía.

A mi novio, Stewart, por toda tu paciencia, apoyo y ser mi sueño hecho realidad,
I love you!

A mis amigos, por todos los buenos momentos de esta hermosa carrera. Gracias Laks, Lore, Miguel, Rubén, Luis, David, Oscar, Marce, Alberto, Carlos, Víctor y omisiones, lo siento!

A mis grandes ejemplos, mis profesores a quienes admiro y les guardo un inmenso cariño, por hacer de mi una mejor persona.

A todos los seres que sacrificaron su vida para mi estudio, en mi remordimiento crece la sed de aprendizaje, gracias por tan valioso regalo.

Noviembre 2009.

ÍNDICE

Índice	I
Índice de figuras	III
Abreviaturas	IV
Resumen	V
1.- Introducción	1
1.1.- Morfología de <i>Haemonchus contortus</i>	2
1.2.- Ciclo biológico	2
1.3.- Epidemiología	3
1.4.- Factores predisponentes	5
1.5.- Patogenia	5
1.6.- Signos Clínicos	6
1.7.- Diagnóstico coprológico	7
1.8.- Control y prevención	7
1.9.- Resistencia del hospedador	8
1.9.1.- Respuesta inmunológica (Inmunidad adquirida)	9
1.9.2.- Resistencia a la hemoncosis ovina	10
1.9.3.- Modificación de la respuesta a <i>H. contortus</i> por infecciones concomitantes con <i>Oestrus ovis</i>	12
2.- Morfología de <i>Cisticercus tenuicollis</i>	13
2.1.- Ciclo biológico	13
3.- Justificación	14
4.- Objetivos	15
5.- Hipótesis	16
6.- Materiales y Métodos	17
6.1.- Ubicación	17
6.2.- Animales	17
6.3.- Diseño experimental	17
6.4.- Obtención del extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>	18
6.5.- Inoculación de L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	19
6.6.- Obtención de muestras	19
6.7.- Inmunohistoquímica para determinación de subpoblaciones linfocitarias	19
6.8.- Conteo celular de linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y WC1 ⁺	21
6.9.- Análisis estadístico	21

7.- Resultados	22
7.1.- Conteos linfocitarios en la región fúndica abomasal	22
7.2.- Conteos linfocitarios en la región pilórica abomasal	22
7.3.- Conteos linfocitarios en linfonodo abomasal	23
7.4.- Parámetros parasitológicos	23
7.5.- Correlaciones de las variables estudiadas	23
8.- Discusión	30
9.- Conclusiones	34
10.-Bibliografía	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental	18
Figura 2. Parámetros parasitológicos	24
Figura 3. Subpoblaciones linfocitarias de la Región Fúndica Abomasal	25
Figura 4. Subpoblaciones linfocitarias de la Región Pilórica Abomasal	26
Figura 5. Subpoblaciones linfocitarias de Linfonodo Abomasal	27
Figura 6. Correlaciones	28
Figura 7. Microfotografía de región Abomasal	29

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de un extracto del metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExMTh) sobre el número de linfocitos abomasales y la resistencia de corderos a la hemoncosis. Se utilizaron 25 corderos Columbia divididos en cuatro grupos. Los corderos de los grupos ExMTh (n=4) y ExMTh+L3 (n=6) recibieron parenteralmente ExMTh los días -10 -6 y -2 del experimento. Los corderos de los grupo L3 (n=6) y ExMTh+L3 se infectaron con 5000 larvas 3 de *H. contortus* el día 0. Cinco corderos se utilizaron como testigos, que solo recibió placebo, grupo T (n=5). Semanalmente se contó el número de huevos por gramo de heces (hgh). Todos los corderos fueron sacrificados el día 57. Se colectaron las fases adultas de todos los abomasos así como se colectaron muestras de linfonodo (LNA), región fúndica (RFA) y región pilórica (RPA) abomasal aproximadamente de 1cm² los cuales fueron procesados para realizar cortes histológicos con el fin de evaluar por medio de inmunohistoquímica las subpoblaciones linfocitarias. Los promedios de hgh y de FA en el grupo ExMTh+L3 fueron menores (p<0.05) que los del grupo L3. Se observó aumento (p<0.05) de linfocitos CD4⁺ en la RFA en el grupo ExMTh+L3 respecto a los demás grupos. La correlación entre CD4⁺ de la RFA y FA fue negativa (r= -0.64). En el grupo L3 se observó aumento (p<0.05) de linfocitos gama-delta de la RFA y LNA correlacionado a la presencia de FA. No se observaron efectos (p>0.05) sobre linfocitos CD8⁺ en abomaso. Estos resultados muestran una posible interacción antagónica entre *T. hydatigena* y *H. contortus*.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los principales problemas que repercuten en la salud de los animales y que por consiguiente se reflejan en su productividad, están los causados por las nematodosis gastroentéricas. Estas representan un problema de salud que afecta considerablemente a la producción ganadera, afectando a rumiantes de diferentes especies y edades. En los sistemas de producción animal el impacto económico causado por la nematodosis gastrointestinal o verminosis gastroentérica se refleja principalmente en el retraso en el crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, pérdida del apetito y la muerte en los animales más afectados (Farías *et al.*, 1988). Esta enfermedad, es producida por nematodos de varios géneros que interaccionan en el tracto digestivo de los rumiantes y traen como consecuencia trastornos metabólicos importantes (Cuellar, 1986).

Los nematodos gastroentéricos (NGE) pertenecen a dos principales familias (Trichostrongylidae y Strongylidae), los comúnmente encontrados en ovinos, son *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, y *Trichuris ovis* (Hoste *et al.*, 1998). Debido a su patogenia y distribución geográfica se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante en los ovinos de México (Cuellar, 1986). *H. contortus* es uno de los NGE más virulentos, causa alta mortalidad y reduce la producción y rentabilidad de las explotaciones (Morteo *et al.*, 2004), también se le conoce como: Gusano del cuajar de los rumiantes, gusano de poste de barbero, gusano del alambre, lombriz gruesa de estómago, lombriz de alambre enrollado, gran trichostrongilo (Lapage 1981).

Los tratamientos antihelmínticos continúan siendo el método más usado para el control de los NGE sin embargo, además del costo que esto implica y la creciente preocupación sobre la contaminación ambiental que estos productos dejan, también han sido reportados fenómenos de resistencia a productos como el albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel (Campos *et al.*, 1992). Los sistemas de control alternativos basados en el manejo de la pastura no son atractivos cuando los productores ovinos no son los dueños de las tierras, en estas condiciones, un acercamiento potencialmente atractivo contra

los principales helmintos podría ser la inmunoprofilaxis (Morteo *et al.*, 2004) o la utilización de genotipos resistentes naturalmente a las parasitosis (Mugambi *et al.*, 1997; Bricarello *et al.*, 2004).

1.1. Morfología de *Haemonchus contortus*.

Los machos miden de 10 a 20 mm de longitud y las hembras de 18 a 30 mm. El macho tiene un color rojizo uniforme, mientras que en la hembra, los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo le dan un aspecto rayado. Las papilas cervicales son prominentes y espiniformes. Hay una pequeña cavidad bucal que contiene una lanceta dorsal (Alba, 2007) esta lanceta permite que los parásitos erosionen la mucosa del abomaso (Lapage, 1981). La bolsa del macho tiene lóbulos laterales alargados sustentados por radios largos y finos. El lóbulo dorsal es pequeño, asimétrico y está desviado hacia el lóbulo lateral izquierdo, siendo sustentado por un lóbulo dorsal en forma de Y. Las espículas miden de 1.46 a 0.50 mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo; la vulva de la hembra está cubierta por un proceso lingüiforme llamada también solapa o labio vulvar. Los huevos miden de 70 a 85 μm de largo y 41 a 80 μm de ancho, salen con las heces del hospedador y presentan en su interior de 8 a 16 estructuras redondas llamadas blastómeros (Alba, 2007).

1.2. Ciclo biológico

Es directo y se divide en una fase no parásita fuera del hospedador y otra parásita en su interior (Lapage, 1981). Los adultos de *H. contortus* se localizan en el abomaso del hospedador. Las hembras producen de 5000 a 10000 huevos al día, los cuales son eliminados en la materia fecal, si las condiciones ambientales son adecuadas como temperatura no menor a 20 grados centígrados y humedad relativa 80% (Farías., *et al* 1988), se desarrolla la larva 1 que eclosiona en la materia fecal de 1 a 2 días (Quiroz, 2003), ésta se alimenta de bacterias de sus alrededores. Al completar su crecimiento muda de epidermis (primera ecdisis) y se transforma en larva 2 la cual también se alimenta de bacterias y crece hasta que madura y muda su epidermis (segunda ecdisis), en esta segunda ecdisis la epidermis no se desecha permanece como una envoltura alrededor de la tercera larva (L3) y por lo tanto no puede alimentarse. En condiciones adecuadas la L3 alcanza su

desarrollo de 4 a 7 días después de la eliminación de huevos en materia fecal. La L3 es la fase infestante y para continuar su desarrollo debe ser ingerida por un nuevo hospedador. Esta L3 sobrevive de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1976). La L3 presenta varios tropismos como son hidrotropismo positivo, fototropismo negativo, termotropismo positivo, la temperatura optima es de 15 a 37 °C y un geotropismo negativo (Quiroz, 2003). La muda se produce en el Rumen y la L3 migra hacia el abomaso, donde la L3 penetra las criptas glandulares gástricas, teniendo mayor afinidad por la mucosa de la región fúndica (Soulsby, 1987). La L3 crece y se alimenta de sangre de la mucosa abomasal, muda a larva 4 (L4), esta también crece e ingiere sangre, sale de la mucosa a la luz abomasal y muda a larva 5 (Maena y Rojo 1999). Esta quinta larva ya no pasa por un proceso de ecdisis ya que a partir de ella se desarrolla el gusano adulto, macho o hembra (Lapage, 1976). Después de la cópula las hembras comienzan a producir huevos cerrando el ciclo (Maena y Rojo 1999).

Durante el ciclo de vida se puede producir un fenómeno de adaptación denominado hipobiosis, que consiste en la suspensión temporal y facultativa de su desarrollo cuando existen condiciones adversas como los inviernos en regiones templadas o la estación seca en algunos climas tropicales (Cordero *et al*, 1999). Este proceso permite al parásito sobrevivir en la mucosa abomasal del hospedador como L4 hipobiótica, durante el periodo donde las condiciones no son favorables para el desarrollo de los estados evolutivos fuera del hospedador, la reanudación del desarrollo de las larvas hipobióticas, se produce cuando las condiciones ambientales son adecuadas para la supervivencia de las fases libre y normalmente está relacionada con estímulos estacionales (Lapage, 1981). En ausencia de hipobiosis el periodo de prepatencia es de 15 a 20 días (Soulsby, 1987).

1.3. Epidemiología

H. contortus se presenta con más frecuencia en el cinturón ecuatoriano entre los paralelos 30° al norte y al sur, tiene una mayor persistencia en el verano predominando mayormente en, India, Irán, Nigeria, Centro y Sudamérica además otras regiones como Nueva Zelanda y Australia. En México *H. contortus* es el nematodo que presenta mayor

prevalencia, debido a las características climáticas que permiten el desarrollo y sobrevivencia de la larva infectante (Farías *et al.*, 1988).

En áreas templadas la epidemiología es diferente a la de las zonas tropicales, las condiciones climáticas en las áreas templadas solo permiten una generación de parásitos al año (ciclo sencillo anual), las larvas infestantes que se han desarrollado de los huevos depositados en primavera son ingeridos por ovejas y corderos al principio de verano, la mayoría de ellas se inhiben en el abomaso como L4 y no completan su desarrollo hasta la primavera siguiente, los huevos producto de la generación de parásitos que entraron en estado de hipobiosis llegan a su estado infectivo en el pasto pero cuando los borregos los ingieren las L3 resultantes entran en estado de hipobiosis (Dunn, 1983). La maduración de las larvas hiopobioticas a estadios adultos en las ovejas suelen coincidir con la temporada de partos, dándose un periodo de eliminación elevada de huevos en materia fecal denominada alza posparto (Urquhart *et al.*, 2001). Esta contaminación permite una máxima disponibilidad larvaria en los pastos a mediados de verano cuando las larvas son ingeridas por los corderos se producen infestaciones intensas, capaces de producir enfermedad hacia finales de julio agosto y septiembre (Soulsby, 1978).

Otro aspecto importante entre los factores ambientales es la hora del día en la que pastorean los animales, aumentando el riesgo por las mañanas debido al rocío que permite la hidratación de las larvas. Los animales nativos son menos susceptibles a las infecciones parasitarias en relación con animales de raza pura debido a una selección natural en los animales nativos, con una progenie con las mismas características además, que las razas puras son criadas y mantenidas bajo condiciones estabuladas en las que difícilmente tienen contacto con los parásitos. El estado nutricional también es un factor importante, los animales subnutridos que consumen menos de 3% de proteína cruda en su ración son susceptibles a infestaciones masivas en comparación con aquellos que llevan una dieta con los niveles adecuados de proteína cruda. El estado fisiológico favorece una mayor población cuando ocurre la “alza posparto” relacionada con el aumento en la eliminación de huevos en ovejas después del parto cuando se encuentran lactando, el pico máximo

ocurre entre las cuatro y ocho semanas después del parto, se considera que la prolactina es la responsable de la reactivación de las L4 hipobióticas (Cuellar, 1992).

La expulsión de parásitos adultos se da por vejez del parásito o por la respuesta inmune. Se ha observado que algunos animales que han tenido infecciones previas expulsan adultos tres días después de una nueva infección, se considera que esto es debido a una hipersensibilidad de tipo 1 contra el líquido de muda de L3 y L4, cuando la infección es intensa incluso las nuevas larvas son expulsadas (Quiroz, 2003).

1.4. Factores predisponentes

Diversos factores han sido atribuidos a la presentación y severidad de las parasitosis por *H. contortus*, incluyendo factores intrínsecos y extrínsecos, dentro de los intrínsecos se encuentra el estado nutricional e inmunológico del animal y la susceptibilidad de cada individuo. Por otro lado los factores extrínsecos, son básicamente factores externos que se dividen en factores bióticos y abióticos teniendo dentro de los factores bióticos al agente etiológico, presencia de organismos antagónicos como hongos nematófagos, bacterias productoras de nematotoxinas y plantas productoras de sustancias nematicidas. Dentro de los factores abióticos están los directamente relacionados con el clima como temperatura, humedad, pH del suelo, etc. (Mendoza de Gives, 1998).

1.5. Patogenia

La principal característica de la infestación por *H. contortus* es la anemia, tanto los adultos como las larvas del cuarto estado son hematófagos y producen lesiones hemorrágicas en el abomaso. La pérdida media de sangre se ha calculado en 0.05 ml por parásito al día, presentándose sangre en las heces a los 6-12 días de la infestación. El parásito afecta principalmente la mucosa del abomaso causando cambios estructurales importantes en las glándulas gástricas, distensión local, histólisis y pérdida de células parietales. También se altera la unión entre células, lo que permite la salida de proteínas endógenas a la luz abomasal y posteriormente a la luz intestinal (Soulsby, 1978).

Las células parietales y las cimogénicas o principales productoras de pepsinógeno son remplazadas por células no diferenciadas y no funcionales, dando lugar a una disminución en su secreción. El incremento del pH abomasal se encuentra relacionado con la disminución de las células parietales fúndicas encargadas de producir ácido clorhídrico, repercutiendo negativamente en el proceso de digestión al disminuir la transformación de la proenzima pepsinógeno a su forma activa pepsina, que resulta en una incompleta digestión de las proteínas, aunado a esto se pierde el efecto bacteriostático del pH aumentando el número de bacterias (Kassai, 2002). Los adultos generan también una acción tóxica, por medio de sustancias anticoagulantes que infiltran en los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasionan para succionar sangre; al cambiar el sitio de alimentación, la úlcera continua sangrando, lo que favorece la pérdida de sangre y consecuentemente la anemia (Quiroz, 2003).

1.6. Signos clínicos

Los signos clínicos de la hemoncosis pueden dividirse en tres cuadros característicos, hiperagudo, agudo y crónico.

Hemoncosis hiperaguda: es muy poco común pero puede darse en animales susceptibles, se debe a la ingestión súbita de grandes cantidades de L3 lo que provoca un rápido desarrollo de anemia, heces de color oscuro y muerte súbita, debido a la pérdida de sangre, gastritis hemorrágica intensa y se puede producir la muerte en una semana (Soulsby, 1978). A la necropsia, la mucosa del abomaso se observa cubierta de una masa rojiza o achocolatada que forma una capa con vermes móviles. La mucosa no presenta alteración catarral notable, pero con frecuencia el contenido del abomaso es rojizo y hasta parduzco y a veces con pequeños coágulos de sangre (Marek, 1973).

Hemoncosis aguda: Se presenta principalmente en animales jóvenes susceptibles con infestaciones intensas pero diferidas de L3. La anemia puede desarrollarse rápidamente, se produce una respuesta eritropoyética por parte de la médula ósea, la anemia va acompañada de hipoproteinemia, edema submandibular facial y abdominal, pérdida de la condición de la lana, debilidad, letargo y muerte. La cantidad de huevos suele ser alta de

mas de 100,000 por gramo de heces y se pueden encontrar de 1000 a 10,000 parásitos en el abomaso (Soulsby, 1978, Urquhart *et al* 2001).

Hemoncosis crónica: Es muy común y de considerable importancia económica, el número de parásitos es notablemente bajo de 100 a 1000. La morbilidad es de 100% pero la mortalidad es baja, los animales afectados están débiles, agotados y emaciados, la anemia y la hipoproteinemia pueden ser graves dependiendo de la capacidad eritropoyetica del animal, la cantidad de huevos puede ser menor a 2000 huevos por gramo de heces (Soulsby, 1978). Esta presentación es importante debido a que pasa inadvertida por el productor trayendo como consecuencia grandes pérdidas económicas a largo plazo, dada la ineficiencia económica y biológica de los animales afectados (Cuellar, 1986).

1.7. Diagnóstico coprológico

Se utiliza la técnica de flotación para detectar la presencia de huevos de nematodos gastrointestinales en las heces de los animales, por otro lado, la técnica de Mc Master es mundialmente utilizada como un método semi- cuantitativo para tener una estimación del número de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de heces, estas dos técnicas tienen la limitante de determinar únicamente la presencia de huevos de un grupo de diferentes géneros y especies de NGE, la identificación específica se realiza mediante cultivos larvarios para determinar las características morfológicas de las fases larvarias (Alba, 2007).

1.8. Control y prevención

El control puede basarse en la tecnificación del pastoreo, manejo del rebaño, tratamientos antihelmínticos, utilización de genotipos resistentes, utilización de microorganismos controladores y sistemas integrados que incluyan todos estos factores. (Duddington, 1955;Soulsby, 1978; Athanasiadou, 1999).

- Pastoreo alterno. Se refiere a la idea de hacer pastar a otros animales de diferente especie en potreros destinados a borregos para eliminar muchas de las L3.

Utilizando bovinos ya que no son susceptibles a algunos de los parásitos de los borregos, por lo que todas las L3 que ingieran serán destruidas (Cordero, 1999).

- Rotación de potreros. Se traslada al rebaño a nuevos potreros cada semana por lo menos ya que la larva no eclosiona de los huevos antes de una semana, aunque hoy en día se escucha muy poco hablar de estas medidas por la dificultad del manejo que se requiere para aplicarlos (Cordero, 1999).
- Destete temprano. Esto se realiza para asegurarse que los animales del rebaño mas susceptibles tengan contacto con las praderas infectadas el menor tiempo posible, sin embargo debe tenerse mejor manejo y muchos cuidados con los corderos destetados tempranamente y criados estabulados para evitar una baja de peso (Cordero, 1999).
- Método de inspección FAMACHA, consiste en la evaluación del estado anémico de un animal para poder tomar la decisión correcta de desparasitar o no al individuo. Con esta idea desde 1990 y con apoyo de la FAO se desarrolló un proyecto dirigido a ganaderos y profesionales en Sudáfrica que permitió sintetizar en un método muy sencillo la decisión de si un animal debe ser tratado o no según su nivel de adaptación a la carga parasitaria que soporta. Su nombre viene de las siglas de su primer ideólogo Francois (Faffa) Malan (FAffa MAlan CHArt) y los estudios llevados a cabo para llegar hasta la conclusión del método se realizaron pruebas de hematocrito, análisis de heces y valoraciones clínicas y a partir de ahí se estandarizaron los niveles de anemia según los colores de la conjuntiva. Este paso ha sido de extrema importancia porque se constató que con niveles de hematocrito peligrosos, la conjuntiva todavía tenía cierta coloración rosada y es precisamente cuando el animal está más propenso, debido a que la debilidad y la alta carga parasitaria llevan al animal a la muerte (Cordero, 1999).
- Hongos nematófagos, han sido considerados dentro de los principales enemigos de los nematodos. Estos son microorganismos del suelo que desarrollan órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos para finalmente nutrirse de sus tejidos (Duddington, 1955; Cordero, 1999).

1.9. Resistencia del hospedador

Se entiende como resistencia la capacidad de los ovinos de evitar el establecimiento de los vermes o para la eliminación de los mismos, diferenciándose entre la resistencia natural, de origen genético y la resistencia adquirida con la edad (inmunidad), se han descrito dos tipos de mecanismo de regulación de la resistencia a las infecciones, la carga parasitaria se encuentra regulada por la vida media corta de los parásitos con una pérdida constante de adultos y relacionada con el número de larvas ingeridas, que no se ve afectada por la administración de cortisona, lo que hace suponer que dicha regulación no se da inmunológicamente (Cordero, 1999).

Por otro lado, para la respuesta inmune se requiere un umbral mínimo de estímulo antigénico para que haya resistencia del asentamiento de los vermes o a su expulsión, de esta forma cuando disminuye la dosis aumenta el tiempo de respuesta necesario, la respuesta varía en animales inmunodeficientes, por lo que, pasado un cierto umbral de información. La respuesta inmunitaria del hospedador evita cargas parasitarias masivas. Los efectos de la respuesta del hospedero pueden dar como resultado:

Disminución en la prolificidad de las hembras. En los animales resistentes las hembras parásitas tienen un menor número de huevos y menor desarrollo. La respuesta inmunitaria del hospedador impide la adecuada alimentación del parásito con las consecuencias que ello tiene en su desarrollo y capacidad reproductora.

Autocuración. Es un drástico descenso en la excreción fecal de huevos en animales expuestos a infecciones y re infecciones por *Haemonchus contortus*, debido a la expulsión masiva de adultos. Depende de una reacción de hipersensibilidad de la mucosa gástrica al estímulo de nuevas larvas, pero no parece estar inmunológicamente mediada, pues aparece en animales adultos y jóvenes con altas y bajas cargas.

Inhibición del desarrollo larvario. Los factores ambientales son determinantes en la inhibición del desarrollo. Además de causas climáticas, se admite una respuesta del hospedador frente a la infección continuada de larvas, provocando un alargamiento en el tiempo de desarrollo endógeno, por ejemplo se encuentran mayor número de larvas

inhibidas de *H. contortus* en animales que ya tenían una población anterior, que en animales primoinfectados (Cordero, 1999).

1.9.1. Respuesta inmunológica (inmunidad adquirida).

Para que el sistema inmunitario combata con éxito un helminto invasor debe utilizar células que destruyan la cutícula intacta o atacarlo en puntos débiles de su superficie, como el aparato digestivo. Los parásitos adultos son bañados por enzimas del hospedador, IgA y mucina al tiempo que su abertura oral y su aparato digestivo se encuentra con células efectoras, citocinas anticuerpos y complemento. La capacidad de expulsar nematodos gastrointestinales depende de los linfocitos T CD4⁺, los animales que expulsan parásitos montan una reacción de predominio Th2. Los animales incapaces de controlar la carga parasitaria quedando crónicamente infectados montan una reacción tipo Th1 (Karanu, *et al* 1997).

La respuesta Th2 se asocia a la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 lo que ocasiona movilización de eosinófilos, acumulación intestinal de mastocitos y con el tiempo la producción de IgE (Meussen, *et al* 2005). Cada una de estas consecuencias de la respuesta Th2 tiene un efecto en las cargas intestinales de gusanos ya que la expulsión de estos se acompaña de mastocitos, en la mucosa, eosinofilia intestinal, concentración sérica elevada de IgE y títulos altos de IgG1 específica contra el parásito. La producción de citocinas Th2 tiene un efecto directo en las poblaciones de helmintos. No se sabe que es lo que determina si un animal montará una reacción Th1 o Th2, es posible que ello dependa de cómo se procese el antígeno, la carga antigénica o el halotipo, complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) del animal. Los linfocitos T WC1⁺ (gamma delta) son activados por la presencia de nematodos gastrointestinales y también pueden dividirse en los fenotipos Th1 o Th2 (Tizzard, 2002).

1.9.2. Resistencia a la hemoncosis ovina.

El tamaño de las cargas parasitarias en un hospedador es controlado por factores genéticos de éste y por la naturaleza de la reacción del hospedador a ese parásito. Algunos animales son predispuestos a una infestación masiva como resultado de factores genéticos,

conductuales, nutricionales o ambientales (Tizzard, 2002). Se ha documentado que algunas razas de ovinos son genéticamente resistentes a infecciones de *Haemonchus contortus*. La complejidad de la resistencia a los helmintos está bien demostrada en ovejas resistentes a *H contortus*, comparadas con ovejas susceptibles, éstas son distintas en actividad de linfocitos B en que se presentan cantidad considerablemente mayores de IgA e IgE y también hay diferencias en la actividad de linfocitos T, ya que las ovejas resistentes reaccionan mejor a un antígeno dependiente de T como la ovoalbúmina. El tratamiento de los corderos resistentes con un anticuerpo monoclonal contra CD4⁺ suprime por completo su resistencia a *H contortus*. La cantidad de células cebadas de la mucosa (mastocitos) y la eosinofilia tisular también se redujeron en estas ovejas tratadas y por el contrario el agotamiento de células CD8⁺ no tuvo efecto en la resistencia (Pfeffer, 1996). Se ha demostrado que la resistencia genética es inmunológicamente mediada por la proliferación de mastocitos a nivel de la mucosa, leucocitos y eosinófilos (Gill, 1991; Stankiewicz, 1993) así como la participación de anticuerpos específicos que son representados básicamente por IgG e IgA en razas resistentes (Gill, 1993). La respuesta celular local parece desempeñar un papel crucial en la respuesta eficaz del hospedador. La proliferación de linfocitos T CD4 parece necesaria para la generación de hiperplasia de mastocitos, eosinofilia en el tejido y la producción de anticuerpos específicos (Gill, 1993; Karanu *et al* 1997; Bowles, 2000).

Dado que los nematodos inducen reacciones Th2, las concentraciones de IgE y de eosinofilos suelen elevarse, muchas infecciones por helmintos presentan reacciones de hipersensibilidad tipo 1, como eosinofilia, edema asma y urticaria. La producción de IgE mediada por linfocitos Th2 es esencial para controlar las cargas parasitarias como la reacción autocurativa que se observa en las ovejas infestadas por *H contortus*, estos gusanos no secretan antígenos mientras se encuentran enclavados en la mucosa intestinal y en el abomaso, la combinación de los antígenos de los helmintos con la IgE unida a las células cebadas hace que estas últimas se degranulen y liberen moléculas vasoactivas y proteasas, estimulando así la contracción del músculo liso e incrementando la permeabilidad vascular ocasionando la acumulación de líquido en la luz intestinal dando el desprendimiento y la expulsión de muchos gusanos.

En ovejas que se ha experimentado esta autocuración los títulos de IgE son altos. Macrófagos, plaquetas y eosinófilos tienen CD23, por tanto estas células pueden unirse a parásitos cubiertos por IgE y una vez activadas eliminarlos. Los macrófagos que se unen a las larvas de helmintos a través de IgE se activan con el aumento en las concentraciones de enzimas lisosómicas y la producción de metabolitos reactivos del oxígeno, IL1, leucotrienos, prostaglandinas y factor activador plaquetario teniendo un aumento en la destrucción de parásitos. Los eosinófilos son atraídos hacia sitios de invasión helmíntica por moléculas quimiotácticas liberadas de mastocitos en desgranulación, IL5 y linfocitos Th2 también movilizan el depósito de eosinófilos de la médula ósea, resultando grandes cantidades de eosinófilos en la circulación. Una de las funciones de los eosinófilos es la destrucción de helmintos dado a que tienen receptores FcεR2 (baja afinidad) que se unen a parásitos cubiertos de anticuerpo, una vez unidos se degranulan liberando el contenido de sus gránulos (proteína básica principal, proteínas catiónicas lisofosfolipasa, fosfolipasa D etc.) directamente en la cutícula del gusano (citotoxicidad dependiente de IgE), si bien la respuesta antihelmíntica mediada por eosinófilos y dependiente de IgE es quizás el mecanismo más importante de resistencia a los helmintos, también los anticuerpos de otras clases de inmunoglobulinas cumplen función protectora.

Entre los mecanismos participantes, están la neutralización mediada por anticuerpos de las proteasas empleadas por las larvas para penetrar los tejidos, el bloqueo de los poros anal y oral de dichas larvas por complejos inmunitarios a medida que los anticuerpos se combinan con sus productos excretorios y secretorios y la inhibición de la ecdisis y el desarrollo larvario por anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la descamación. Los linfocitos T citotóxicos también pueden atacar helmintos que se adentran mucho en la mucosa intestinal o que pasan por etapas tisulares prolongadas (Tizzard, 2002).

1.9.3. Modificación de la respuesta a *H. contortus* por infecciones concomitantes con *Oestrus ovis*

Se ha encontrado que en corderos con infecciones concomitantes entre *Oestrus ovis* y *H. contortus*, hay un aumento de eosinófilos, mastocitos y leucocitos abomasales, observando una menor carga parasitaria por *H. contortus* comparados con corderos no

infectados y corderos infectados solamente con *H. contortus*. (Dorchies *et al*, 1997., Yacob *et al*, 2005) también se ha reportado la reducción significativa en el tamaño promedio de las hembras de *H. contortus*, así como en el número de huevos dentro del útero de las mismas (Terefe *et al*, 2005). Este mismo efecto en la reducción de la carga parasitaria ha sido observado también en infecciones mixtas de *Trichostrongylus colubriformis* y *O. ovis* (Yacob *et al.*, 2004., Yacob *et al.*, 2006).

2.Morfología de *Cysticercus tenuicollis*

Se encuentra en la cavidad abdominal y en el hígado de ovinos, caprinos, bovinos, ardillas, cricetos, perros, gatos y humanos. Tiene aspecto de vesícula ovoide de 5 a 7 cm de diámetro. La pared es translúcida y encierra en un líquido transparente. Fijado a la pared se encierra el escólex invaginado, con cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos.

2.1. Ciclo biológico

El perro es el hospedero del parásito adulto *Taenia hydatigena*, este elimina proglótidos en las heces que contaminan el suelo, donde los ovinos se infestan al ingerir huevos que han contaminado su alimento. En el tracto digestivo se libera la oncosfera por acción enzimática, pasa la pared del intestino y llega al torrente sanguíneo por vía porta. Algunas veces pasa a la vena cava posterior en donde es transportado a varias partes del cuerpo pero por lo general emigra por el hígado y llega a la superficie, luego pasa a la cavidad abdominal en donde se desarrolla en 3 a 4 semanas. Clínicamente no hay síntomas evidentes de enfermedad, aunque infestaciones masivas podrían originar la muerte de los corderos de 2-3 meses, que estaría debida a la hepatitis traumática que originan las oncosferas errantes. En los casos avanzados se observan los típicos cisticercos, del tamaño de guisantes al de nueces, depositados en las membranas serosas, sobre todo a nivel del epiplón. Las vesículas no están llenas del todo y contienen un escólex de pequeño tamaño.

3.JUSTIFICACIÓN

La hemoncosis es una de las principales causas de pérdidas económicas en las explotaciones ovinas. Los gastos en antihelmínticos son muy altos, además de las pérdidas por baja en todos los parámetros reproductivos. La aplicación de estos productos ha contribuido al desarrollo de cepas de *Haemonchus contortus* resistentes a medicamentos, por este motivo se trata de buscar nuevas alternativas para controlar esta enfermedad una de estas ha sido el uso de razas resistentes a la hemoncosis y uno de los mecanismos fisiológicos de las razas resistentes ante la hemoncosis es el aumento de eosinófilos sanguíneos y tisulares teniendo un efecto negativo sobre el establecimiento de los parásitos (Bricarello *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*,2006; Cuenca., 2008).

Estudios anteriores han establecido que los linfocitos T CD4⁺ están asociados a la resistencia a la hemoncosis disminuyendo la carga parasitarias y el número de huevos por gramo de heces. En infecciones concomitantes se ha demostrado que el número de linfocitos CD4⁺ afecta negativamente en el establecimiento del parásito.

La cisticercosis hepática forma parte de un proceso parasitario frecuente por lo que en un trabajo previo se utilizó un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExMTh) para observar las cuentas eosinofílicas, las cuales aumentaron significativamente así como el estado de resistencia a *H. contortus* (Cuenca.,2008).

Aún no se han estudiado las modificaciones que esto induce en las subpoblaciones linfocitarias a nivel abomasal para correlacionarlo con el estado de resistencia, por lo que en este trabajo se busca encontrar si el número de linfocitos a nivel abomasal aumenta por la presencia del ExMTh y si estos tienen un efecto negativo en el establecimiento de *H. contortus*, pudiendo encontrar mas alternativas en el control de la hemoncosis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de un extracto de *Taenia hydatigena* sobre el número de linfocitos (CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺) en el tejido abomasal y la resistencia en ovinos de la raza Columbia infectados experimentalmente por *Haemonchus contortus*.

4.2. Objetivos específicos.

1. Cuantificar el número de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺ en la mucosa abomasal de corderos infectados con larvas de *Haemonchus contortus*, corderos inoculados con extracto de *Taenia hydatigena* y corderos inoculados con el extracto e infectados con *H. contortus*.

2. Correlacionar las diferentes subpoblaciones de linfocitos con la eliminación de huevos en la materia fecal y la presencia de *H. contortus* adultos en el abomaso de los corderos infectados.

5. HIPÓTESIS

La inoculación de un extracto de *Taenia hydatigena* modifica el número de linfocitos abomasales en ovinos infectados con *H. contortus* y esto tiene efecto sobre la resistencia de los ovinos a la hemoncosis.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Ubicación.

El trabajo se realizó en el laboratorio 1 (Inmunología y Biología Molecular de Parásitos) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la unidad de posgrado de la facultad.

6.2. Animales.

Se utilizaron 25 corderos de la raza Columbia, menores de ocho meses de edad provenientes de una explotación ovina dedicada a la producción de animales para pie de cría, lo cual garantizó su homogeneidad y pureza racial. Se les realizó una valoración clínica para confirmar su estado de salud y como medida preventiva fueron desparasitados con albendazol 10% 5mg/Kg. pv y se verificó la ausencia de huevos de nematodos gastroentéricos en la materia fecal antes de la realización del experimento. Una vez en las instalaciones, tuvieron un periodo de dos semanas de adaptación a las nuevas condiciones de manejo. Todos los corderos se mantuvieron en condiciones de confinamiento total en corraletas con capacidad para seis corderos. La alimentación consistió en alimento balanceado comercial para ovinos con 15.5% de proteína cruda, así como forraje seco molido, en una proporción de 80% alimento y 20% forraje. El alimento se ofreció diariamente en cantidad del 4% del peso vivo de cada grupo de corderos. El agua se ofreció *ad libitum* con bebederos automáticos de pivote.

6.3. Diseño experimental

Los corderos fueron divididos en cuatro grupos. Los corderos del grupo T (n=5) se utilizaron como grupo testigo y solo se les administró agua, los corderos del grupo L3 (n=6) recibieron 5000 L3 de *H. contortus* mediante sondeo buco-esofágico el día 0 del experimento, los corderos del grupo ExmTh+L3 (n=6) recibieron por vía intraperitoneal (v.i.p.) 600 mg de un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExmTh) y 600 mg por vía intramuscular el día -10, 600mg v.i.p. de ExmTh el día -6, 600 mg v.i.p. de ExmTh el día -2 y 5000 L3 de *Haemonchus contortus* el día 0. Los animales del grupo ExmTh (n=8)

recibieron 600 mg i.p y 600 mg i.m de ExmTh el día -10, 600 mg v.i.p. De ExmTh el día -6 y 600 mg i.p de ExmTh el día -2 del experimento, este grupo no recibió larvas. Semanalmente se tomaron muestras de materia fecal de todos los corderos.

Todos los corderos fueron sacrificados el día 57, se tomaron muestras histológicas de linfonodo abomasal (LNA), región fúndica abomasal (RFA) y región pilórica abomasal (RPA). En los animales de los grupos L3 y ExMTh+L3 se contaron el número de gusanos adultos en el abomaso.

Grupos	Placebo	L3	ExMTh
Testigo (5)	+	-	-
L3 (6)	-	5000 L3 de <i>H. contortus</i> día 0.	-
ExMTh (8)	-	-	600 mg i.p y 600 mg i.m día -10, 600 mg i.p día -6 y -2.
ExMTh+L3 (6)	-	5000 L3 de <i>H. contortus</i> en día 0.	600 mg i.p y 600mg i.m el día -10, 600 mg i.p día -6 y -2.

Figura 1. Diseño experimental. Grupo Testigo solo recibió placebo; grupo L3, sólo recibió estadio 3 de larva de *H. contortus*; grupo ExMTh sólo recibió extracto de metacestodo de *T. hydatigena*; grupo ExMTh+L3 recibió extracto de metacestodo de *T. hydatigena* y estadio 3 de larva de *H. contortus*

6.4. Obtención del extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena*.

Se colectaron metacestodos de *T. hydatigena* a partir de ovinos sacrificados en el rastro de Tlalnepantla, Edo de México. Las larvas colectadas se trasladaron en refrigeración a la UIMSA-FESC, donde se mantuvieron en congelación a -20°C. Para obtener los extractos, se descongelaron los metacestodos y se rompieron las membranas colectando el

líquido vesicular, al cual se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µ/ml, iodoacetamida 1.8 mg/ml y PMSF 1mM SIGMA Labs) y posteriormente fue filtrado, se adicionó (NH₄)₂SO₄ a razón de 0.42g por ml y se centrifugó por una hora a 5000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en PBS. El extracto fue nuevamente filtrado a través de membrana millipore de 0.22µm, alícuotado y almacenado a -20°C, hasta su utilización. La cantidad de proteína contenida en el extracto fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.5. Inoculación de L3 de *Haemonchus contortus*.

Los inóculos fueron obtenidos mediante una técnica de cultivo larvario (Corticelli-Lai) realizada a partir de materia fecal de corderos infectados mono-específicamente con una cepa de *H. contortus* mantenida en el laboratorio (Cuenca, 2008). Cada inóculo consistió en una suspensión de 5000 L3 de *H. contortus* y estos fueron suministrados a través de sondeo bucoesofágico directamente en el rumen de los corderos experimentales.

6.6. Obtención de muestras.

En los días -14 y -7, 0, 7, 14, 20, 28, 36, 43, 50, y 57 del experimento se realizó la recolección de materia fecal directamente del recto de todos los animales. El día 57 todos los corderos fueron sacrificados humanitariamente utilizando una pistola de émbolo oculto. Inmediatamente después del sacrificio, se tomaron muestras de aproximadamente 1cm² de la RFA, RPA y LNA completo de cada uno de los animales. Estas muestras se incluyeron en un criopreservador OCT (Tissue Tek) y se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenadas a -80°C en un ultracongelador hasta su utilización.

6.7. Inmunohistoquímica para determinación de subpoblaciones linfocitarias.

Las muestra de tejido obtenidas fueron procesadas para la obtención de cortes de 5 µm en un criotomo, los cortes fueron adheridos en porta objetos previamente tratados con poli-

L-lisina (SIGMA LABS) y fijados con acetona por 3 minutos, para posteriormente ser almacenados en refrigeración a 4° C hasta su utilización.

Previo al ensayo, los cortes fueron sumergidos durante 10 minutos en PBS para eliminar la poli-L-lisina y rehidratar la muestra. Para la detección inmunológica de los diferentes marcadores de superficie se utilizó un kit comercial para inmunohistoquímica (Zymed), modificando el protocolo descrito por Coligan (2004).

1. Bloqueo de la peroxidasa endógena. Los cortes se incubaron por 45 segundos en una solución bloqueadora (Peroxo Block) a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
2. Bloqueo de biotina endógena. Los cortes se incubaron con 20 µl del reactivo A del kit (Avidin Solution, Reagent "A") en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
3. Bloqueo de avidina endógena (d-Biotin Solution, Reagent "B"). En cámara húmeda se colocan las laminillas por 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
4. Aplicación de Suero-Bloqueo. Se incubaron con suero de cabra al 10% y albúmina sérica bovina al 2% en cámara húmeda a 4 °C durante 24 horas. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
5. Aplicación de Anticuerpo Primario. Las laminillas se incubaron en cámara húmeda para la detección de los marcadores con anticuerpos monoclonales anti- CD4⁺, anti-CD8⁺ y anti-WC1⁺ (SEROTEC) cada uno respectivamente a temperatura ambiente durante 2 horas. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
6. Aplicación de Anticuerpo Secundario. Se incubaron las laminillas en cámara húmeda con suero de cabra anti-IgG de ratón biotinilado (ZYMED LAB) durante una hora a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.

7. Aplicación de Streptovidina Peroxidasa. Se incubaron las laminillas en cámara húmeda con streptovidina peroxidasa (HRP_Steptovidin) por 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS.
8. Revelado. Las laminillas se incubaron con DAB (diaminobencidina), hasta observar reacción con el microscopio óptico (de 5 a 10 segundos) y las muestras fueron lavadas por inmersión con PBS 3 veces durante cinco minutos.
9. Contraste. Las laminillas fueron sumergidas en hematoxilina durante 3 segundos, se enjuagaron con agua, hasta cuatro segundos se sumergieron en carbonato de litio al 1%, se lavó con agua corriente. Se realizó la deshidratación de las muestras con alcoholes al 90,96 y 100 %. Las laminillas se aclararon con alcohol-xilol y xilol al 100%. Se montaron con resina sintética y se observaron en el microscopio.

6.8. Cuento celular de Linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺.

Se utilizó un software de análisis de datos (Image Pro Plus) con un lente objetivo de 40X. Se contó el número de células marcadas CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺ de las regiones fúndica y pilórica abomasal así como de linfonodo abomasal. Para cada subpoblación linfocitaria se leyeron 30 campos, 15 de submucosa y mucosa y 15 de mucosa, en el caso del linfonodo se leyeron 30 campos continuos registrándose el número de células marcadas y el número de células del tejido analizado en μm^2 . Las cuentas fueron expresadas en cantidades totales de células por cm^2 de tejido (Bricarello *et al*, 2003).

6.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y las diferencias entre medias fueron obtenidas mediante prueba de Tukey utilizando un software estadístico (Graph Pad Prism ver 4).

7. RESULTADOS

7.1. Conteos linfocitarios en la región Fúndica abomasal.

Los resultados de los conteos linfocitarios de la RFA se muestran en la Figura 3. El análisis de varianza de los resultados obtenidos mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número de linfocitos $CD4^+$ en el grupo ExMTh+L3 con respecto a los otros grupos experimentales y al grupo testigo. Los promedios de linfocitos $CD4^+$ fueron: T 1.3 (± 0.8); L3 7.1 (± 2.3); L3+ExMTh 19.5 (± 8.6) y ExMTh 3.1 (± 0.4) células por mm^2 . También se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) de los linfocitos $WC1^+$ en el grupo L3 con respecto testigo. Los promedios fueron: T 12.3 (± 1.6); L3 32.3 (± 7.8); ExMTh+L3 23.0 (± 4.9) y ExMTh 24.6 (± 4.1) células por mm^2 . En el caso de los linfocitos $CD8^+$ en esta región del abomaso, solo se observaron diferencias numéricas no significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. Los promedios de linfocitos $CD8^+$ fueron: T 1.4 (± 0.0); L3 5.3 (± 1.8); ExMTh+L3 10.6 (± 5.5) y ExMTh 15.0 (± 7.3) células por mm^2 .

7.2. Conteos linfocitarios en la región Pilórica abomasal.

Los resultados de los conteos linfocitarios de la RPA se muestran en la Figura 4. El análisis de varianza de los resultados obtenidos no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los promedios de células por mm^2 de las diferentes subpoblaciones linfocitarias estudiadas en esta región del abomaso. Los promedios de linfocitos $CD4^+$ fueron: T 0.5 (± 0.5); L3 7.5 (± 0.2); ExMTh+L3 4.4 (± 4.4) y ExMTh 5.1 (± 1.12) células por mm^2 . Los promedios de los linfocitos $CD8^+$ fueron: T 1.3 (± 1.3); L3 7.4 (± 6.4); ExMTh+L3 7.4 (± 3.5) y ExMTh 10.9 (± 3.5) células por mm^2 . Los promedios de los linfocitos $WC1^+$ en esta región fueron: T 2.8 (± 2.8); L3 13.5 (± 2.5); ExMTh+L3 9.2 (± 2.3) y ExMTh 10.6 (± 2.8) células por mm^2 .

7.3. Conteos linfocitarios en Linfonodo Abomasal.

Los resultados de los conteos linfocitarios de LNA se muestran en la Figura 5. El análisis de varianza de los resultados obtenidos mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número de linfocitos $CD4^+$ en el grupo L3 con respecto al grupo testigo. Los promedios de linfocitos $CD4^+$ fueron: T 1.0 (± 0.4); L3 37.8 (± 6.3); ExMTh+L3 24.1 (± 10.3) y ExMTh 13.66 (± 6.3) células por mm^2 . En el caso de los linfocitos $CD8^+$ no se observaron diferencias estadísticas significativas, se observaron solo diferencias numéricas. Los promedios fueron los siguientes: T 1.4 (± 0.2); L3 19.9 (± 16.0); ExMTh+L3 15.6 (10.3) y ExMTh 16.7 (± 6.6) células por mm^2 . El análisis de varianza de los resultados obtenidos mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número de linfocitos $WC1^+$ en el grupo L3 con respecto el grupo testigo. Los promedios de los linfocitos $WC1^+$ fueron: T 7.0 (± 3.1); L3 38.3 (± 4.7); ExMTh+L3 27.8 (± 5.6) y ExMTh 31.5 (± 13.0) células por mm^2 .

7.4. Parámetros parasitológicos

El promedio final de hgh (Figura 2A) de los corderos del grupo L3 (5332.4 ± 2795.8) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de los corderos del grupo ExMTh+L3 (2950.5 ± 1029.3). Con respecto a el número de FA encontradas en el abomaso (Figura 2B) también el grupo L3 (501.6 ± 404.4) tuvo un promedio significativamente más alto ($p < 0.05$) que el grupo ExMTh+L3 (133.0 ± 92.1).

7.5. Correlaciones de las variables estudiadas.

Las correlaciones de los promedios de células por mm^2 de las diferentes subpoblaciones con los parámetros de resistencia (hgh y FA) se muestran en la Figura 6. Las correlaciones positivas más importantes observadas fueron: En la RPA: entre $CD8^+$ y hgh (0.7), entre $WC1^+$ y hgh (0.65) y entre $WC1^+$ y FA (0.67) y en el LNA: entre $CD4^+$ y FA (0.7) y entre $WC1^+$ y FA (0.73). Las correlaciones negativas encontradas fueron en la RFA: entre $CD4^+$ y hgh (-0.13) y FA (-0.64).

8. DISCUSIÓN

Se ha documentado la presencia de una mayor cantidad de eosinófilos, mastocitos y algunas subpoblaciones linfocitarias en respuesta a la infección por *H. contortus* en razas ovinas resistentes naturalmente en comparación con razas susceptibles a la hemoncosis. Entre las razas ovinas en las que esta mayor cantidad ha sido observada están la Red Maasai en comparación a la Dorper (Mugambi *et al.*, 1996), la criolla de lana de Brazil en comparación a la Corriedale (Bricarello *et al.*, 2003) y Santa Cruz en comparación a la Dorper y a la Katahdin (Burke and Miller, 2004).

Gamble y Zac *et al.* (1992), reportaron que la respuesta de protección en una raza resistente fue mediada por la proliferación de mastocitos en mucosa abomasal leucocitos globulares y eosinofilos. Muñoz-Guzmán *et al.* (2006), demostraron mayor resistencia a la hemoncosis experimental de la raza Blackbelly en comparación a la raza Columbia, correlacionada al aumento de la eosinofilia tisular y periférica, mastocitos, anticuerpos específicos contra la larva, así como de algunas subpoblaciones linfocitarias como CD4⁺ y linfocitos gama-delta en el abomaso, sugiriendo que la mayor resistencia de la raza Blackbelly está relacionada a elementos de la respuesta inespecífica y específica.

Por otra parte en la mayoría de las infecciones naturales los animales presentan más de una especie parasita (Clark, 2001., Cox, 2000). Se han demostrado efectos antagónicos o sinérgicos entre dos o más parásitos en el hospedador (Terefe *et al.*, 2004., Yacob *et al.*, 2008., Yacob *et al.*, 2004., Yacob *et al.*, 2006., Dorchies *et al.*, 1997).

Yacob *et al.* (2004), encontraron que la carga parasitaria abomasal por *H. contortus* fue reducida significativamente asociado a el aumento de eosinófilos producido por la presencia de *O. ovis* en animales con infecciones mixtas. En otro estudio, realizado en corderos infectados con *Trichostrongylus colubriformis* y *O. ovis* en forma mixta se observó un aumento de eosinofilos, mastocitos y leucocitos en el tracto respiratorio y digestivo asociado a una menor carga parasitaria por *H. contortus* concluyéndose la existencia de un efecto antagónico entre los dos parásitos (Yacob, 2004). Otros parásitos como *Taenia*

hydatigena que se encuentran con una alta incidencia en los ovinos de México, no han sido estudiados en su posible interacción con *H. contortus*.

En un trabajo precedente a este, realizado con los mismos animales experimentales de este estudio, Cuenca (2008), determinó que la administración de un extracto del metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExMTh) provocó el aumento significativo de los eosinófilos tisulares y sanguíneos correlacionado a la disminución significativa de la eliminación de huevos y la presencia de fases adultas en el grupo ExMTh+L3 (figura 5). Estas observaciones fueron muy similares a la interacción antagónica anteriormente reportada con *O. ovis*. Es por eso que resultó de particular interés el saber si también las subpoblaciones linfocitarias eran afectadas por el ExMTh en estos corderos Columbia y si estos cambios pudieron estar relacionados con la mayor resistencia observada, lo cual daría indicios de la participación de los elementos de la respuesta específica.

En este estudio, se observó aumento en el número de linfocitos CD4⁺ en los grupos infectados (L3+ y ExMTh+ L3) con respecto a el grupo testigo en las tres regiones del abomaso, sin embargo, solo fueron significativas ($p < 0.05$) las encontradas en el grupo ExMTh+ L3 en la RFA y en el grupo L3 en el LNA. Además en la RFA se observó una correlación negativa entre CD4⁺ y hgh ($r = -0.13$) así como CD4⁺ y FA ($r = -0.64$). Aunque las correlaciones mencionadas no fueron significativas ($p > 0.05$), estas podrían indicar que la activación de esta subpoblación linfocitaria tiene efectos negativos en el establecimiento de fases adultas y consecuentemente en la eliminación de huevos, efecto que pudo ser propiciado por la estimulación tanto de la L3 de *H. contortus* así como del ExMTh.

En la RFA se encontró aumento significativo ($p < 0.05$) de linfocitos CD4⁺ en el grupo L3+ExMTh con respecto a el grupo L3, lo anterior confirma la interacción existente entre los dos parásitos mencionados en este estudio y además sugiere que la presencia al mismo tiempo de moléculas antigénicas de los dos parásitos pueden aumentar de manera sinérgica la presencia de algunos elementos de la respuesta específica. Sin embargo, en otras regiones del abomaso esto no fue observado, lo cual puede ser debido a que la

respuesta no es homogénea en toda la mucosa abomasal como fue observada por Muñoz-Guzmán *et al.* (2006).

En el LNA se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número de linfocitos $CD4^+$ en el grupo L3 y una correlación positiva en la misma región de los linfocitos $CD4^+$ con la presencia de FA en el abomaso, sugiriendo que la mayor presencia de fases adultas produce mayor activación de linfocitos $CD4^+$ en este órgano linfoide.

Como anteriormente se ha dicho, se ha estudiado que los linfocitos $CD4^+$ participan en infecciones contra nematodos gastrointestinales (Katona *et al.*, 1991). Las citocinas de los linfocitos T $CD4^+$ en particular citocinas del tipo T_H2 como la IL4 e IL3 promueven mastocitosis en la mucosa y la eosinofilia tisular es producida por la IL5, estas células efectoras en conjunto con los anticuerpos han demostrado efectos en la inmunidad contra nematodos (Katona *et al.* 1991, Madden *et al.* 1991). De la misma forma la IL-4 favorece la síntesis de anticuerpos IgE específicos frente a helmintos, los cuales participan junto con los eosinófilos en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos sobre la cutícula del parásito (Abbas, 2004).

Se ha demostrado que los mecanismos específicos de defensa también resultan ser fundamentales para la resistencia a la hemoncosis. Peña *et al.* (2006), demostraron que la depleción de linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) por anticuerpos monoclonales en corderos aumentó significativamente la susceptibilidad a la infección por *H. contortus*. Algunos estudios han demostrado que la expresión de la resistencia de algunas razas genéticamente resistentes a la hemoncosis, también está relacionada con el aumento regional (abomasal) de la subpoblación de linfocitos $CD4^+$, (Gill *et al.*, 1993, Pérez, 2008). Así como de la subpoblación gamma-delta (Balic *et al.*, 2002).

En este estudio no se observó ningún incremento en los linfocitos $CD8^+$ en ninguna de las regiones estudiadas, observación que concuerda con estudios anteriores en ovejas y cabras (Balic *et al.*, 200., Balic *et al.*, 2002., Pérez *et al.*, 2008). Estos linfocitos se relacionan más con antígenos citosólicos que aloja cualquier célula, estos pueden reconocer

péptidos asociados a la clase I y destruir cualquier célula que exprese antígenos de tipo tumoral o viral (Abbas, 2004).

Los linfocitos gamma-delta son una subpoblación linfocitaria que participa de manera inespecífica en el reconocimiento de antígenos no proteicos (principalmente lipídicos) y que se han visto relacionados a la respuesta contra algunas bacterias y helmintos. Además son consideradas particularmente importantes en la inmunidad inespecífica de mucosas en los rumiantes (Montaño, 2005). Los resultados del presente trabajo mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) de esta subpoblación en la RFA y LNA en el grupo L3 con respecto a los animales no infectados. Anteriormente se ha reportado el aumento de esta subpoblación linfocitaria en el abomaso de corderos infectados con *H. contortus*. (Balic *et al.*, 2000; Balic *et al.*, 2002), otros autores observaron un cambio en la población de linfocitos de la mucosa abomasal y de linfonodo abomasal, pero en ovinos inmunizados contra *H. contortus* no se observaron cambios (Gamble *et al.*, 1998., Balic *et al.*, 2002) sugiriendo que el aumento de esta subpoblación linfocitaria es inducido por la presencia de la larva de *H. contortus* dentro de la mucosa. La correlación positiva observada entre linfocitos gamma-delta de LNA ($r = 0.73$) y de la RPA ($r = 0.67$) con la presencia de FA en el abomaso, sugiere que la presencia de fases adultas produce una mayor irritación provocando la proliferación de esta subpoblación linfocitaria.

Los resultados de este estudio muestran una posible interacción antagónica entre *T. hydatigena* y *H. contortus* y permiten plantear estudios en donde se realicen infecciones mixtas con estos dos parásitos para hacer observaciones más concluyentes a este respecto.

9. CONCLUSIONES

- La administración previa del extracto del metacestodo de *Taenia hydatigena* propició un aumento significativo en el número de linfocitos T CD4⁺ en la región fúndica de la mucosa abomasal en ovinos de la raza Columbia infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus* en comparación a ovinos con infección únicamente por L3.
- En la RFA se observó una correlación negativa entre CD4⁺ y hgh así como CD4⁺ y FA, sugiriendo que la activación de esta subpoblación linfocitaria tiene efectos negativos en el establecimiento de fases adultas y consecuentemente en la eliminación de huevos.
- La administración intraperitoneal del extracto del metacestodo de *T. hydatigena* así como la administración de L3 en corderos de la raza Columbia no provocó ninguna alteración en el número de linfocitos CD8⁺ en ninguna de las regiones estudiadas.
- Se observó un aumento en el número de linfocitos CD4⁺ en el LNA en el grupo L3 y una correlación positiva en la misma región de los linfocitos CD4⁺ con la presencia de FA en el abomaso, sugiriendo que la mayor presencia de fases adultas produce mayor activación de linfocitos CD4⁺.
- Se observó un aumento en el número de linfocitos gama-delta de la RFA y de LNA en el grupo L3 correlacionado a la presencia de fases adultas en abomaso, sugiriendo la proliferación de esta subpoblación linfocitaria en presencia del parásito.

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
ExMTh	Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>
FA	Fases adultas
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
hgh	huevos por gramo de heces
i.m	Intramuscular
i.p	Intraperitoneal
LNA	Linfonodo abomasal
L 3	Larva de tercer estadio
L 4	Larva de cuatro estadio
mg	Miligramos
RFA	Región fúndica abomasal
RPA	Región pilórica abomasal

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas, K. Abul. Inmunología celular y molecular. Madrid, España: Elsevier, 2004.
- Alba, H. Fernando. Parasitología veterinaria (manual de laboratorio). 1^{ed}. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I.R.L., Coop, R., Jackson, F. Evidence of direct antihelminthic effect of condensed tannin. Abstracts of the 17th international conference of the world association for the advancement of veterinary parasitology. Copenhagen, Denmark. 1999.
- Balic, A., Bowles, V.M. and Meeusen, E.N.T. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 2002; 24:39-46.
- Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Olivera-Sequeira, T.C.G., Vaz, C.M.S.L., Goncalves de Goncalves, I. and Echeverria, F.A.M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small. Rum. Res.* 2003; 51: 75-83.
- Burke, J.M. and Miller, J.E. 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.* 2004; 54:43-51.
- Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H. Diagnóstico *in vivo* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet. Méx.* 1992; 23: 51-56.
- Cuenca, V.C. Efecto del aumento de eosinófilos sanguíneos inducido con Ag de metacestodo de *Taenia hidatigena* sobre el establecimiento de larvas de *Haemonchus*

contortus en ovinos inoculados experimentalmente. Tesis de maestría, UNAM, México, 2008.

Clark, I.A. Heterologous immunity revisited. *Parasitol.* 2001; 122: 51-59.

Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martínez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernández, R.S., Navarrete, L.C.I., Díez, 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.

Cox, F.E.G. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitol. Res.* 2001; 122: 23-38.

Cuéllar, O.J.A. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo en ovinos y caprinos. Mem. Curso; *Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos*. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Cuéllar, O.J.A., Pijoan, P., Tortora, J. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos (Parasitosis del aparato digestivo). Ed P. Pijoan., J. Tortora. Coordinación de posgrado FESC. México. 1986.

Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Van Khanh, N and Morand, S. Reduce egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophiles?. *Parasitol. Res.* 1997; 83:727-730.

Duddington, C.L. Fungi that attack microscopic animals. *Botanical Review* 1955; 21: 377-439

Dunn, A. Helmintología veterinaria. 3ª edición. El manual moderno.1983.

Dwight D. Bowman. Georgia parasitología para veterinarios. España: Elsevier, 2004; 234-236.

Farías, S.U., Vázquez, P.V. y Campos, R.V. Determinación del incremento en la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos posparto en ovejas. *Tec. Pecu. Méx.* 1988; 26: 259-566.

Gamble, H.R., Zajac, A.M. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet. Parasitol.* 1992; 41: 211-225.

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

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

Gill, H.S., Colditz, I.G., Watson, D.L. Localization of immunoglobulincontaining cells in the abomasums of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992;15: 178-187.

Hoste H. *et al.* *Trichostrongylus colubriformis*: effects on villi and crypts along the whole small intestine in infected rabbits. *Exp. Parasitol.* 1998; 67: 39-46.

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

Kassai, T. *Helmintología veterinaria*. Editorial, Acribia, Zaragoza España. 2002.

Katona, I.M., Urban, J.F., Jr Kang, S.S., Paul, W.E. and Finkelman, F.D. IL-4 requirements for the generation of secondary in vivo Ige responses. *J. Immunol.* 1991; 146: 4215-4221.

Lapage, G. *Parasitología veterinaria* 6^a edición. Continental S.A. México. 1981 pp 121-127.

Madden, K.B., Urban, J.F., Jr, Ziltener, H.J., Schraden, J.W., Finkelman, F.D. and

Katona, I.M. antibodies to Il-3 and Il-4 supresses helminth-induced intestinal mastocytosis. J. Immunol. 147, 1387-1391.

Maena, M.A., Rojo, V.F.A. Tricostrogilosis y otras nematodosis. En: Parasitología veterinaria. Edit. por Cordero, C.M. y Rojo, V.F.A. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. 1999.

Meeusen, N.T., Balic, A. and Bowels, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. Vet. Immunol. Immunopahtol. 2005; 108: 121-125.

Mendoza de Gives, P., Flores, C.J., Herrera, R.D., Vazquez, P.V., Liébano Hernández, E., Ontiveros, F.G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans chlamydo spores* to sheep. J. Helminthol. 1998;72: 343-347.

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

Morteo-Gómez, R.G., Torres, H.G., Nuncio, O.G., Becerril, P.C., Gallegos, S.J. y Aranda, I.E. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. Agrociencia. 2004 Vol 38 No 4.

Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. Vet.Parasitol. 1977; 69: 265-273.

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

Muñoz-Guzmán, M.A., Cuellar-Ordaz, J.A., Valdivia-Anda, A.G., Buendía Jiménez, J.A. and Alba Hurtado, F. Correlation of parasitological and immunological paraneters

in sheep with high and low resistance to haemonchosis. 2006. Can. J. Anim. Sci. 2006; 86: 363-371.

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

Pérez, J., Zafra, R., Buffoni, L., Hernández, S., Cámara, S and Moreno, M.A. Cellular Phenotypes in the Abomasal Mucosa and Abomasal Lymph Nodes of Goats Infected with *Haemonchus contortus*. J. Comp. Path. 2008; 138: 102-107.

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Cabaj, W., Pfeffer, A., Green, R.S. and Douch, P.G.C. Immune responsiveness of nematode-resistant or susceptible Romney line-bred sheep to continuous infection with *Trichostrongylus axei*. Vet. Immunol. Immunopathol. 1996; 51: 137-145.

Pfeffer, A., Douch, P.G.C., Shaw, R.J., Gatehouse, T.K., Rabel, B., Green, R.S., Shirer, C.L., Jonas, W.E. and Bisset, S. Sequential Cellular and Humoral Responses in the Abomasal Mucosa and Blood of Romney Sheep Dosed with *Trichostrongylus axei*. Int. J. Parasitol. 1996; 26: 765-773.

Quiroz, R. H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 1^a ed. Edit Limusa. México. 2003.

Sloulsby, E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos 7^a ed. Interamericana. México. 1987

Stankiewicz, M., Jonas, W.E., Douch, P.C., Rabel, B., Bisset, S., Cabaj, W. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. J. Parasitol. 1993; 79: 940-945.

Terefe, G., Yacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dumas, E., Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., Hoste, H and Jacquiet, P. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length

reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Ostridae) larvae. Vet. Parasitol. 2004; 128: 271-283.

Tizzard Ian, R. Inmunología veterinaria. Mac Graw Hill-Interamericana 6ª edición. México D.F. 2002.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. Helminología veterinaria, Parasitología veterinaria Acribia, Zaragoza, España, 2001. pp. 3-155.

Van-Hourter, M.F.J., Barger, I.A. and Steel J.W. Supplementary feeding and gastrointestinal nematode parasitism in young grazing sheep. Proceedings of the New Zealand society of animal production. 1996; 56: 94-98.

Yacob, H.T., Basaznew, B.K. and Basu, A.K. Experimental concurrent infection of Afar breed goats with *Oestrus ovis* (L₁) and *Haemonchus contortus* (L₃): Interaction between parasite populations, changes in parasitological and haematological parameters. Exp.Parasitol. 2008; 120:180-184.

Yacob, H.T., Duranton-Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Jacquiet, Ph., Dorchies, Ph and Hoste, H. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: negative interactions between parasite populations and related changes in the cellular responses of nasal and digestive mucosae. Vet. Parasitol. 2004; 104:307-317.

Yacob, H.T., Terefe, G., Jacquiet, Ph., Hoste, H., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P. and Dorchies, Ph. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: Effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. Vet. Parasitol. 2006; 137: 184-188.

Yacob, H.T., Dorchies, Ph., Jacquiet, Ph., Bleuart, C., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P. and Hoste, H. Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by a subsequent infection with *Oestrus ovis*. Vet. Parasitol. 2004; 121: 297-306.