



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN ABOMASO DE OVINOS BLACKBELLY ASOCIADOS
A DIETA RESTRINGIDA Y HEMONCOSIS EXPERIMENTAL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

JOSÉ ROGELIO CATALÁN SÁNCHEZ

ASESOR:

DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2013



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Cambios histológicos en abomaso de ovinos Blackbelly asociados a dieta restringida y hemocosis Experimental

Que presenta el pasante: JOSE ROGELIO CATALAN SANCHEZ
 Con número de cuenta: 30112555-0 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Febrero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
VOCAL	M.V.Z. Rocío Silva Mendoza	
SECRETARIO	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
1er SUPLENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
2do SUPLENTE	Dra. Ma. de los Ángeles Ortíz Rubio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

AGRADECIMIENTOS.

Dr. Guillermo Valdivia Anda por brindarme la oportunidad de trabajar con usted, compartir su conocimiento y la paciencia que me tuvo.

M en C. César Cuenca Verde Técnico Académico del Laboratorio 3 de la UIMSA, por su apoyo y enseñanzas en la realización de este proyecto desde el procesamiento de muestras, hasta la escritura del mismo.

Dr. José Francisco Morales Álvarez por su apoyo en la escritura de la tesis.

M en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez por el apoyo brindado en la tinción azul de toluidina.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Esther Sánchez Ramírez y Valentín Catalán Díaz les agradezco todo su amor y comprensión brindada, quiero que sepan que han sido mi inspiración para seguir adelante y poder concluir esta meta.

A mi familia:

Araceli, que siempre has estado ahí cuando he necesitado de ti hermana.

Yan, sabes que te quiero mucho hermano y que he tratado de ser un ejemplo para ti, quiero que algún día me demuestres que no te he fallado.

Boni, aunque eres mi cuñado has sido para mí como un hermano mayor gracias.

Melanie y Alondra mis 2 sobrinas que tanto quiero.

Sara. Por haber estado apoyándome muchos años.

Al M en C. César Cuenca Verde eres una gran amigo gracias por el apoyo incondicional a lo largo de todo este proyecto.

A mis amigos de la FESC:

Paco(Alberto), Oscar, David, Tomas, Emmanuel, veri (angel), Zacate, Gerber, Ari, a todos gracias por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera de la FESC.

ÍNDICE

Índice.....	I
Índice de cuadros y figuras.....	II
Índice de anexos.....	III
Abreviaturas.....	IV
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	6
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	10
Material y Métodos.....	11
Resultados.....	15
Discusión.....	21
Conclusiones.....	23
Bibliografía.....	24
Anexos.....	29

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Agrupación de los animales de donde provinieron las muestras.....	8
Figura 1.	Composición celular de la glándula fúndica.....	3
Figura 2.	Diagrama de flujo utilizado para procesar las muestras.....	11
Figura 3.	Acumulado de las túnicas en las regiones pilórica y fúndica del abomaso de los grupos trabajados.....	13
Figura 4.	Media (\pm EE) de los acumulados de las túnicas del abomaso en la región pilórica de los grupos trabajados.....	14
Figura 5.	Media (\pm EE) de los acumulados de las túnicas del abomaso en la región fúndica de los grupos trabajados.....	15
Figura 6.	Media (\pm EE) del grosor de las diferentes túnicas de la región pilórica del abomaso en los animales de los grupos trabajados.....	16
Figura 7.	Media (\pm EE) del grosor de las diferentes túnicas de la región fúndica del abomaso en los animales de los grupos trabajados.....	17
Figura 8.	Media (\pm EE) del porcentaje de células reacción positiva a la tinción de PAS de las regiones pilórica y fúndica del abomaso de los grupos Trabajados....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).....	22
ANEXO 2.	Tinción de Ácido Periódico de Shift (P.A.S).....	23
ANEXO 3.	Tinción de Azul de toluidina.....	24
ANEXO 4.	Imágenes.....	30

ABREVIATURAS

Dppi	Días post primera inoculación
H-E	Tinción de Hematoxilina-Eosina
I	Infectado
NRC	National Research Council
NRNI	No restringido no infectado
PAS	Tinción Ácido Periódico de Shift
R	Restringido
RFA	Región Fúndica Abomasal
RI	Restringido Infectado
RPA	Región Pilórica Abomasal

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la restricción alimenticia aunado a una infección con *Haemonchus contortus* sobre los cambios histológicos en abomasos de corderos blackbelly. Las muestras empleadas en el presente trabajo, provinieron de los animales utilizados en el proyecto PAPIIT-IN218909-2. Los tejidos fueron procesados para cortes histológicos y tinciones con Hematoxilina-Eosina, PAS (ácido periódico-de Schiff) y azul de Toluidina, posteriormente fueron revisadas en el microscopio óptico, se tomaron imágenes y con la ayuda de un analizador semiautomático y software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, image tool 3.0) se realizaron las mediciones de las longitudes de las tunicas del abomaso en las regiones fúndica y pilórica en las laminillas con la tinción de Hematoxilina-Eosina. Se realizó el conteo del porcentaje de células reacción positiva a la tinción de PAS y el conteo de células con metacromacia (mastocitos) presentes en la tinción Azul de Toluidina. El grosor de la mucosa abomasal de la región pilórica fue de mayor tamaño en comparación con la región fúndica en los grupos no restringido no infectado (NRNI), infectado (I), restringido (R) y restringido infectado (RI). En la región pilórica en la túnica mucosa hubo diferencia significativa entre el grupo NRNI e RI con valores de 0.45mm y 0.64mm respectivamente ($p=0.003$). En cuanto a la cripta glandular entre el grupo R, I y el NRNI con valores de 0.27mm, 0.21mm y 0.15mm ($p=0.012$), ($p=0.008$) respectivamente, en la muscular de la mucosa hubo diferencias entre los grupos R y NRNI con valores de 0.076mm y 0.053mm respectivamente $p= (0.035)$. En cuanto a la región fúndica se encontró diferencia significativa en la túnica mucosa entre los grupos R e I ($p=0.02$).). La respuesta a los estímulos alimenticio y de infección se observan en las tunicas; muscular de la mucosa, cripta glandular y mucosa. En la tinción de PAS en la región pilórica se encontraron diferencias significativas entre los grupos NRNI e I con valores 32.6 y 15.9% respectivamente ($p=0.013$), en la región fúndica entre los grupos RI y NRNI con valores 4.91 y 1.52% respectivamente ($p=0.003$). Las células con reacción positiva a la tinción de PAS están asociadas con la hiperplasia producida por la presencia del parásito, que es más evidente cuando hay restricción alimenticia, además de una mayor presencia de estas células en la región pilórica.

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA DEL ESTÓMAGO DE RUMIANTES

El estómago de los rumiantes consiste de un rumen, retículo, omaso y abomaso. Las tres primeras cámaras o pre estómagos, están recubiertas por un epitelio escamoso estratificado a glandular. El primero de ellos, es una gran cámara de fermentación en la cual (bacterias y protozoarios) descomponen los alimentos ingeridos y producen ácidos grasos volátiles, estos son absorbidos a través del epitelio de la mucosa dentro de los vasos sanguíneos de la lámina propia de la mucosa (Banks, 1993), donde las células profundas del epitelio ruminal juegan un papel muy importante en su metabolismo (Coers, 2004).

La acción mecánica del retículo y el omaso convierten la ingesta fermentada en partículas finas. La absorción de los metabolitos ocurre a través del epitelio, después de esto la ingesta se mueve al abomaso, donde ocurre la digestión enzimática (Banks, 1993).

HISTOLOGIA DE LAS REGIONES ABOMASALES

En cuanto al revestimiento del abomaso el epitelio es columnar simple, en comparación del escamoso estratificado queratinizado encontrado en las porciones no glandulares (rumen, retículo y omaso). Las diferencias histológicas en la túnica mucosa gástrica del abomaso permiten la identificación de tres regiones:

- **Región del cardias:** Tiene una marcada transición del epitelio escamoso estratificado a columnar simple. Las glándulas, son ramificadas, tubulares y enrolladas, estas tienen dos porciones; el cuello que se localiza cerca de la apertura de la fosa gástrica y el cuerpo que es un remanente del adenomero. El cuello y la porción superior del cuerpo tienen un revestimiento de células cuboidales, las células restantes son columnares y ambas son secretoras de moco. También, se pueden encontrar células argentafines localizadas entre las células de revestimiento de la glándula y la membrana basal.
- **Región fúndica** es similar a la del cardias solo que las criptas glandulares son más largas y menos enrolladas. La longitud de las glándulas fúndicas hace que el grosor de la lámina propia sea mayor y que la cantidad de tejido conectivo se reduzca entre las glándulas ya que están muy cerca una de otra. Una glándula fúndica se divide en istmo, cuello cuerpo y base. El istmo es la apertura, la cual se continúa con el cuello. El

cuerpo o tubo principal es la continuación del cuello y termina como un adenomero doblado y dilatado que es la base. En esta región se pueden encontrar tres tipos de células, mucosas del cuello intercaladas entre las células parietales, las células principales que son las predominantes en las glándulas fúndicas y las células parietales que están dispersas a lo largo de la glándula hasta el cuello y metidas entre las células principales.

- **Región pilórica** es similar a la región del cardias, las células predominantes son productoras de moco, una característica destacada en esta región es que se encuentra una lámina circular propia de la túnica muscular bien desarrollada, que forma el esfínter pilórico en la unión gastroduodenal (Banks, 1993). La diferencia entre las glándulas pilóricas y fúndicas es que las glándulas pilóricas tienen fosas gástricas más profundas (Coers, 2004).

Tipos celulares de las glándulas gástricas:

1. **Células madre:** presentes en el cuello de la glándulas dividiéndose y remplazando la superficie del epitelio
2. **Células mucosas del cuello,** se localizan en el cuello de la glándula y secretan moco.
3. **Células parietales** (oxínticas), éstas secretan ácido clorhídrico en el canalículo y forman invaginaciones de la membrana citoplasmática.
4. **Células principales** (zimogénicas) secretan pepsinógeno.
5. **Células enteroendócrinas** (argentafines), secretan localmente mensajeros químicos (serotonina, gastrina, somatostatina y entero glucagón) para controlar la digestión. Estas células son consideradas parte del sistema neuroendocrino difuso, ya que algunas de ellas consumen y procesan aminas biogénicas (Aughey, 2001).

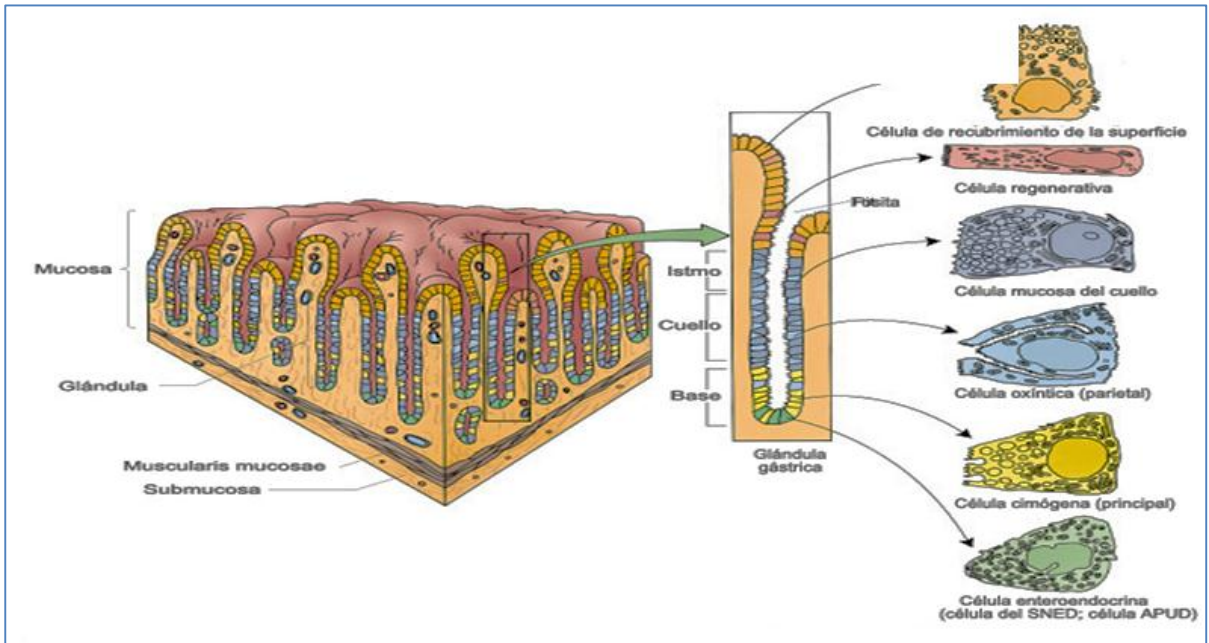


Figura 1. Composición celular de la glándula fúndica. (Tomado de Gartner 2002.)

Uno de los factores que pudiera afectar estos patrones histológicos normales del abomaso es la restricción alimenticia, la cual es común en nuestro país; por ejemplo en climas templados es moderada, debido al alto precio en los insumos, en cambio en climas tropicales la restricción alimenticia se debe principalmente a la baja calidad del forraje, como efecto de las altas temperaturas. Esta restricción alimenticia genera un bajo aporte proteico, lo que afecta el metabolismo y por ende la condición corporal (Valderrabano *et al.*, 2002, Doreau *et al.*, 2003). No obstante hay pocos trabajos dirigidos a describir las consecuencias de una restricción alimenticia en el desarrollo abomasal.

Otro factor que podría afectar la histología del abomaso son los parásitos que se localizan en este órgano. Se han observado cambios histológicos generalizados asociados con parásitos en el lumen del abomaso, debido a que el desarrollo larvario de nemátodos dentro de las glándulas, causa pérdida local de células parietales e hiperplasia de células productoras de moco, reduciéndose la secreción de ácido clorhídrico, con incremento de pepsinógeno y gastrina sérica (Simpson, 2000), esto también fue observado por Scott *et al.* (1998), quienes encontraron una reducción en el número de células parietales e hiperplasia de células mucosas en las glándulas abomasales de borregos parasitados por adultos de *Ostertagia circumcincta*. También se ha observado hipertrofia de la mucosa con aumento de células mononucleares e

infiltración leucocitaria eosinofílica en el abomaso de corderos en infecciones experimentales con *Haemonchus contortus* (Charleston, 1965), el cual se considera como el nematodo más importante en el síndrome de la verminosis gastroentérica debido a su distribución mundial y patogenicidad.

La presencia de *Haemonchus contortus* ocurre tanto en animales jóvenes como en adultos, sin embargo, la presentación clínica de la enfermedad es casi exclusiva de corderos. Además, existen otros factores propios del hospedador que condicionan la severidad de la parasitosis, como la especie, raza, estado nutricional y estado fisiológico (Cuéllar, 1992). En cuanto a ovinos se han identificado razas con resistencia natural a la hemoncosis como la Blackbelly (Yazwinski *et al*, 1980; Muñoz, 2007) y Katahdin (Burke *et al*, 2004).

ANTECEDENTES

En el desarrollo de rumiantes neonatos, la ingesta de alimento sólido es necesaria para promover el desarrollo normal del rumen. Además, la energía por sí sola no es el único factor determinante regulador del tamaño de los órganos viscerales a la edad del destete (Baldwin, 2000). Se ha observado en ratas destetadas que la restricción de proteína en la dieta afecta al estómago inhibiendo de cierta forma la proliferación celular (Kasai *et al*, 2012).

La subalimentación en ovinos de la raza blackbelly, afecta ligeramente la expresión de resistencia contra *Haemonchus contortus* en lo que respecta la eliminación de huevos (correlacionada con la presencia de parásitos), sin influir en la ganancia de peso y condición corporal (Alcántara y García, 2011). Por otro lado, en trabajos realizados con animales genéticamente susceptibles y resistentes, se observó que la suplementación de proteína metabolizable en la dieta influye positivamente en la respuesta de los ovinos a la hemoncosis, mostrando menor cantidad de huevos por gramo de heces (HGH) y cambios fisiopatológicos (edema submandibular, mucosas pálidas, anorexia) (Wallace *et al*, 1999) con diferentes respuesta reportada en cada uno de ellos (Wallace *et al.*, 1995, 1996).

Las dietas con elevada proteína incrementan la resistencia hacia *Haemonchus contortus*, esta se refleja en menores cantidades de HGH y baja carga parasitaria en razas resistentes. En razas susceptibles promueve la resiliencia; pues se observó que cuando estos animales fueron suplementados con proteína tuvieron mejores niveles en el volumen del paquete celular (VPC), proteína total en plasma y ganancia de peso en comparación con animales de la misma raza no suplementados (Bricarello *et al*, 2005).

En trabajos realizados por Koski *et al*, (1999) y Valederrábano *et al*. (2002) concluyeron que niveles adecuados de proteína en la dieta más la suplementación de energía mejoran la calidad de la canal y promueven el desarrollo de resistencia a nematodos gastroentéricos.

Se ha establecido que la respuesta a helmintos en mamíferos incluyendo los ovinos se caracteriza por eosinofilia tisular y sistémica (Wildblood *et al*, 2005), los eosinófilos poseen mediadores extremadamente potentes que pueden dañar y matar estadios larvarios infectantes en la mayoría de los helmintos (Meeusen y Balic., 2000). La eosinofilia se ha relacionado con la resistencia a *Haemonchus contortus* en ovinos de la raza Merino y Romney, ya que hay una

correlación negativa entre el número de HGE y los eosinófilos en sangre pero no con los tisulares (Hohenhaus y Outteridge, 1995). Aunque la más importante es la respuesta tisular ya que es donde se aloja el parásito y donde se ha reportado que la respuesta que protege en una raza de ovinos resistente es mediada por la proliferación en la mucosa abomasal de mastocitos, leucocitos globulares además de la eosinofilia (Gamble and Zajac, 1992), además de una respuesta de anticuerpos específica principalmente por IgGI e IgA (Gill *et al*, 1993^a; Schaling *et al*, 1995).

Balic *et al*, (2002) describe dos mecanismos efectores de resistencia, uno de ellos es la rápida expulsión de larvas recién ingeridas, en la cual los mastocitos son considerados un factor importante; el otro mecanismo efector mencionado por este autor es la expulsión de las larvas cuando se encuentran en su fase de invasión tisular. Se sabe que los mastocitos secretan mediadores químicos como leucotrienos, proteasa de mastocitos de ovino (PMO), histamina y prostaglandinas (Metcalf, 1984; Jones Huntley & Emery, 1992). La inducción de la sensibilización de mastocitos en la mucosa puede fallar debido a que una respuesta a parásitos es totalmente funcional en un ovino alrededor de los 9 meses de edad cuando es considerado adulto (Hein y Mackay, 1991). Por estas razones se realizó la tinción azul de toluidina en este trabajo, para contar los mastocitos presentes y poder evaluar la respuesta inmune a la infección artificial por *Haemonchus contortus* con y sin restricción alimenticia en corderos blackbelly.

La infección por *Haemonchus contortus* no solo afecta en la celularidad a nivel inmunológico también se ha observado cambios en la morfología del abomaso como lo son hiperplasia de células productoras de mucina y una marcada reducción en el número de células parietales (Christie *et al*, 1975), esto también ocurrió en la inoculación de adultos de *Ostertagia circumcincta* el cual es otro nematodo presente en el síndrome de la verminosis gastroentérica y que se localiza en el abomaso como *Haemonchus contortus*, solo que este parásito forma nódulos en la mucosa (Scott *et al*, 1998). Los cambios histológicos después de una infección con *O. circumcincta* son más evidentes en animales adultos por la mayor infiltración celular. (Salman, 1984).

La hiperplasia de células productoras de mucina puede evaluarse por medio de la tinción de PAS ya que esta tiñe células productoras de mucina neutra, las cuales están presentes en abomaso (Myers, 2009), corroborando con la medición de la longitud de la mucosa,

encontrando Scott et al. (1998) un mayor grosor en la mucosa fundica abomasal de animales parasitados con *O. circumcisa*.

JUSTIFICACION

El crecimiento normal del rumen de animales en desarrollo, es influenciado por la ingesta de alimentos sólidos. La infusión oral de ácidos grasos volátiles no estimuló el rumen, sin embargo, el crecimiento del tejido intestinal si fue estimulado. Además, la energía por sí sola no es el único factor determinante regulador del tamaño de los órganos viscerales a la edad del destete. Por lo cual se requieren investigaciones adicionales para determinar los efectos específicos de la nutrición en el metabolismo energético de los órganos viscerales y para dilucidar los factores y mecanismos que controlan estos importantes procesos (Baldwin, 2000).

Hay relativamente pocos reportes de los cambios adaptativos en la histología del abomaso durante una restricción alimenticia y son nulos los trabajos dirigidos a la evaluación histológica durante la restricción alimenticia aunada a la infección artificial con *Haemonchus contortus*. Aunque hay bastantes trabajos sobre hemoncosis, la mayoría de estos solo hacen referencia a la respuesta inmunológica (Balic *et al*; 2000; Muñoz, 2007; Pérez, 2008). Por lo cual el presente trabajo se realizó para obtener más información sobre la histología abomasal cuando están presentes estos dos fenómenos.

HIPOTESIS

La restricción de alimento y la hemoncosis experimentales producen cambios adaptativos en la histología del abomaso de ovinos Blackbelly.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la restricción alimenticia y la hemoncosis experimental sobre algunas características histológicas del abomaso.

Objetivos particulares.

- Comparar el grosor de las diferentes capas del abomaso en animales sometidos a desnutrición y a una infección experimental con *H. contortus*.
- Comparar la cantidad de células reacción positiva a la tinción de PAS, presentes en la región pilórica y fúndica del abomaso para evaluar la posible hiperplasia de células productoras de mucina de los animales trabajados.
- Contar y comparar la cantidad de mastocitos presentes en la región pilórica y fúndica del abomaso teñidos con azul de Toluidina, para evaluar la respuesta local a la presencia del parásito.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se efectuó en el laboratorio 3 de “Patogenicidad Microbiana” en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM y laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario DIVET®.

Las muestras empleadas, provinieron de los animales utilizados en el proyecto PAPIIT-IN218909-2 titulado “Efecto del estado nutricional sobre la expresión de resistencia a *Haemonchus contortus* en ovinos infestados experimentalmente”. Se trabajaron muestras de las porciones fúndica y pilórica del abomaso de cada animal utilizado en el proyecto mencionado anteriormente, los cuales fueron ovinos machos Blackbelly de menos de un año de edad, recibiendo el siguiente manejo:

Una vez recibidos los animales se dieron cinco semanas de adaptación a las nuevas condiciones de manejo y alimentación, esta última consistió en alimento comercial (ovina 14 de purina) en una proporción de 80 % de alimento y 20 de forraje, la cantidad de alimento ofrecido se calculó en función al 4 % de peso vivo.

A partir de la 6ª semana se comenzó la restricción de alimento dividiendo en dos grupos iniciales. La alimentación consistió en proporcionar el 100% de las necesidades nutricionales diarias (dieta no restringida) según las recomendaciones del National Research Council (NRC) y el 50% de dichos requerimientos (dieta restringida). En la 10ª semana con dieta completa o restringida, los animales se subdividieron en cuatro grupos como se indica en la Tabla 1. Los animales de los grupos con infección, fueron inoculados con 5,000 larvas de *Haemonchus contortus* (1.000 larvas/semana durante cinco semanas); para esto, se empleó una cepa de *H. contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán, dicha inoculación se realizó mediante un sondeo buco ruminal.

Grupo	N	Restricción de dieta	Hemoncosis experimental
I	14	No	Si
NRNI	3	No	No
RI	15	Si	Si
R	3	Si	No

Tabla 1. Agrupación de los animales de donde provinieron las muestras.

Las siguientes cinco semanas posteriores al desafío los animales fueron monitoreados (eliminación de huevos) dentro de cada grupo experimental, posteriormente fueron sacrificados y se contaron los nematodos adultos presentes.

Dinámica en la eliminación de huevos.

A los 15 dppi los animales que recibieron ambas dietas (100% y 50%) mostraron promedios bajos en la eliminación de huevos (13.3 y 14.3 hgh, respectivamente). Los ovinos con la dieta al 100% mantuvieron una baja eliminación de huevos (>100 hgh), excepto a los 28dppi (133.3 hgh). Los que tenían restricción alimenticia, mostraron un incremento en la eliminación de huevos llegando a los 200 hgh a los 28dppi y 1000 hgh en el muestreo correspondiente a los 56 dppi.

Fases adultas de *Haemonchus contortus*.

El grupo que accedió al 50 % de sus requerimientos nutricionales tuvo un promedio de 163.4 fases adultas (FA) de *H. contortus*, mientras que el grupo que recibió el 100% de esas necesidades, solo se recuperaron 32.5 FA por animal.

Las muestras del abomaso se tomaron inmediatamente después del sacrificio y fueron fijadas en para formaldehído al 4%, donde se mantuvieron hasta su uso.

Procesamiento de tejidos:

Las muestras de abomaso fueron seleccionadas y se realizaron secciones de aproximadamente 2 x 2 cm, cuidadosamente fueron colocadas en capsulas histológicas, posteriormente, se enjuagaron con agua corriente y se sometieron a un tren de deshidrataron con alcohol etílico

en concentraciones crecientes (72°, 80°, 90°, 96° y absoluto) durante una hora en cada uno, después se procedió a la aclaración con xilol/alcohol (un cambio) por 30 minutos y xilol absoluto (dos cambios) por 5 minutos en cada cambio (Barrera y Cárdenas, 1997; Reyes, 2006). Posteriormente se infiltraron en parafina líquida por 48 horas a 56-60°C, e incluyeron en parafina (Reyes 2006).

Una vez que se obtuvieron los cubos de parafina con los tejidos incluidos se realizaron cortes de 5µm de espesor con ayuda de un microtomo.

Los cortes fueron colocados en un baño de temperatura constante con agua a 37°C que contenía (1g de grenetina por 1 litro de agua), esto para extenderlos, evitar pliegues y que se pudieran adherir al portaobjetos, se secaron en una platina a 60° C. (Barrera y Cárdenas, 1997).

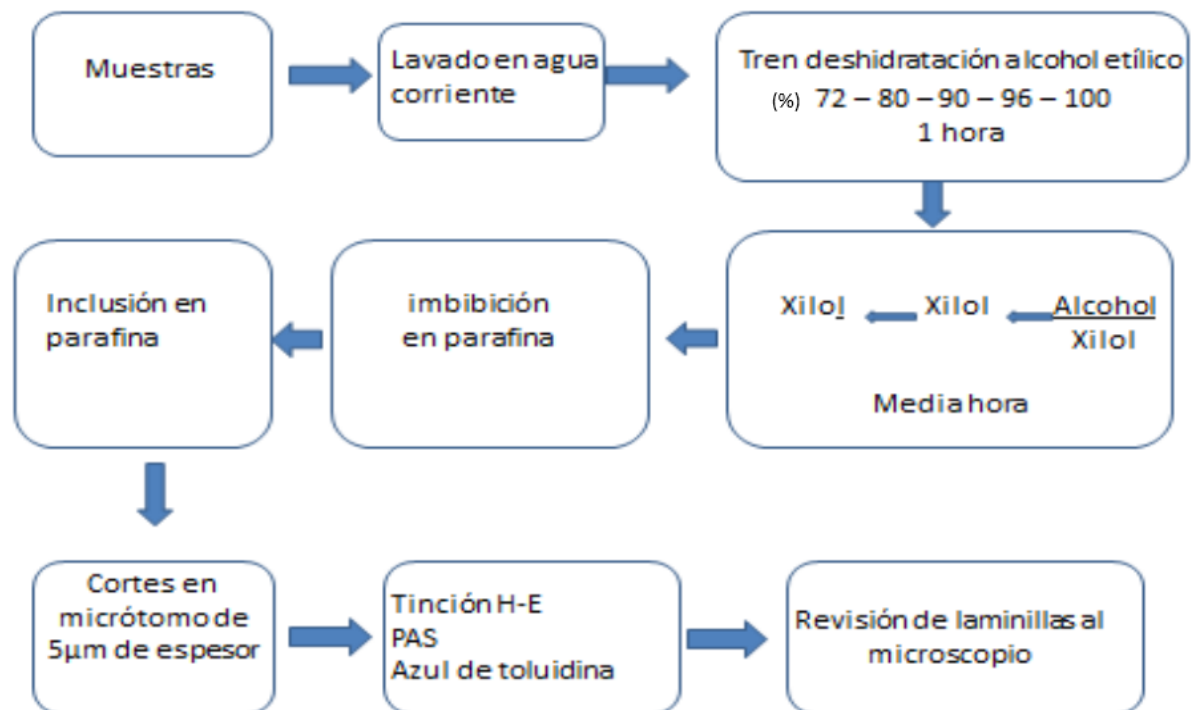


Figura 2. Diagrama de flujo del utilizado para procesar las muestras.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis ANOVA con la prueba T de student, para la comparación de medias entre grupos para cada una de las variables, con un valor de p (<0.05) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con el apoyo de los programas Excel (Microsoft Office) y SPSS 17.

COMPARACION DEL GROSOR DE LAS CAPAS DEL ABOMASO

Para realizar la comparación del grosor de las capas se utilizó la tinción Hematoxilina-Eosina. La medición de las criptas gástricas, tunicas mucosa, muscular de la mucosa, submucosa, muscular y serosa, se observaron al microscopio y se capturaron imágenes de 3 regiones aleatorias en porción fúndica y pilórica con un lente objetivo de 10x y lente ocular de 10x desde la serosa hasta la superficie de la mucosa, con la ayuda de un analizador semiautomático y software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, image tool 3.0) se realizaron las mediciones.

PORCENTAJE DE CÉLULAS REACCIÓN POSITIVA A LA TINCIÓN DE PAS (ÁCIDO PERIÓDICO DE SHIFT)

En este caso los cortes de los tejidos, se tiñeron con P.A.S, se observaron en el microscopio con un lente objetivo de 40x y lente ocular de 10x, se revisaron 10 campos aleatorios desde la muscular de la mucosa hasta la superficie de ésta.

Por medio de un analizador semiautomático y un software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, image tool 3.0), se contaron células con reacción positiva a la tinción de P.A.S y el total de células presente por campo para sacar un porcentaje de células P.A.S reacción positiva.

CÉLULAS CON METACROMACIA (AZUL DE TOLUIDINA)

Se revisaron 20 campos aleatorios con un lente objetivo de 40x y lente ocular de 10x desde la submucosa hasta la superficie de la mucosa para el conteo de mastocitos presentes en las regiones fúndica y pilórica por medio de un analizador semiautomático y un software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, image tool 3.0).

RESULTADOS

Tinción de Hematoxilina-Eosina.

Para poder mostrar si hubo algún efecto de la restricción alimenticia y la hemonchosis en el grosor del abomaso, se realizó el acumulado; que es la sumatoria de las tunicas mucosa, muscular de la mucosa, submucosa, muscular del órgano y serosa, dicho resultado se presenta en la Figura 3. En la cual podemos observar que el acumulado de los grupos NRNI, I, R y RI en la RPA fue mayor en comparación con su contraparte de la RFA, teniendo ésta casi la mitad del grosor que la RPA en todos los grupos.

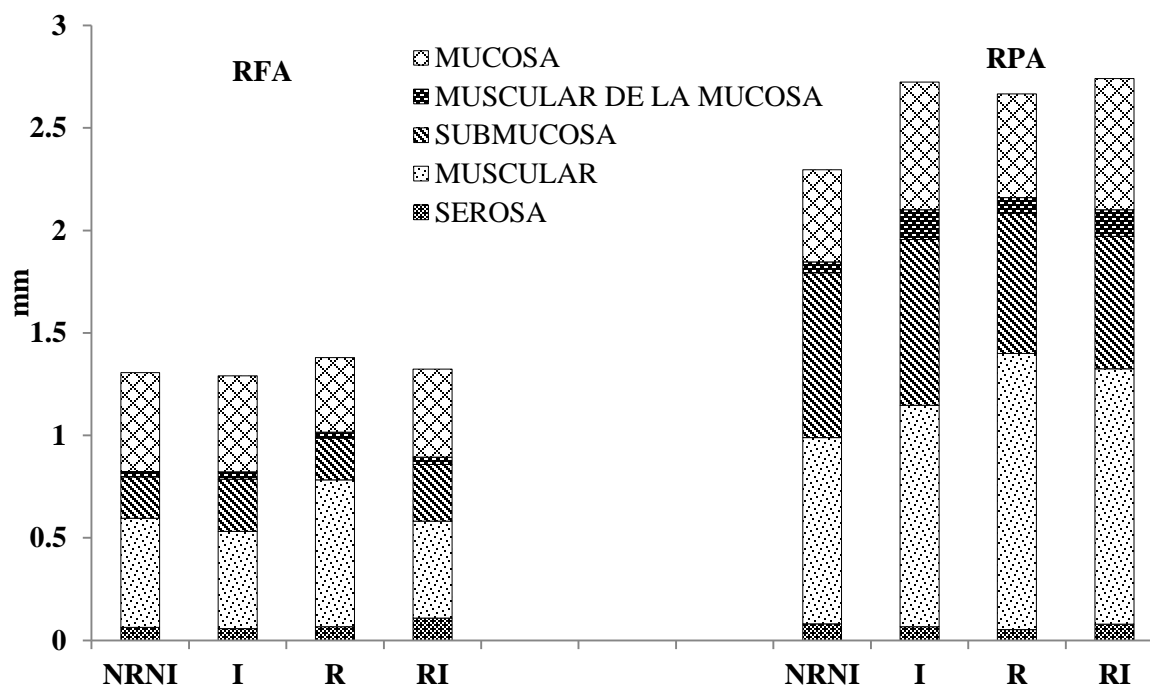


Figura 3. Acumulado de las tunicas en las regiones pilórica (RPA) y fúndica (RFA) del abomaso en cada grupo. Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI).

ACUMULADO REGION PILORICA

En la Figura 4, se muestra el resultado del acumulado de la RPA. Aquí, se puede observar un mayor grosor en el acumulado de las tunicas en los grupos tratados I, R, RI, en comparación con el grupo testigo NRNI, siendo el grupo I quien presento el mayor grosor (2.74mm), seguido por el grupo RI (2.72mm), R (2.67mm) y por último NRNI (2.30mm), aunque ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

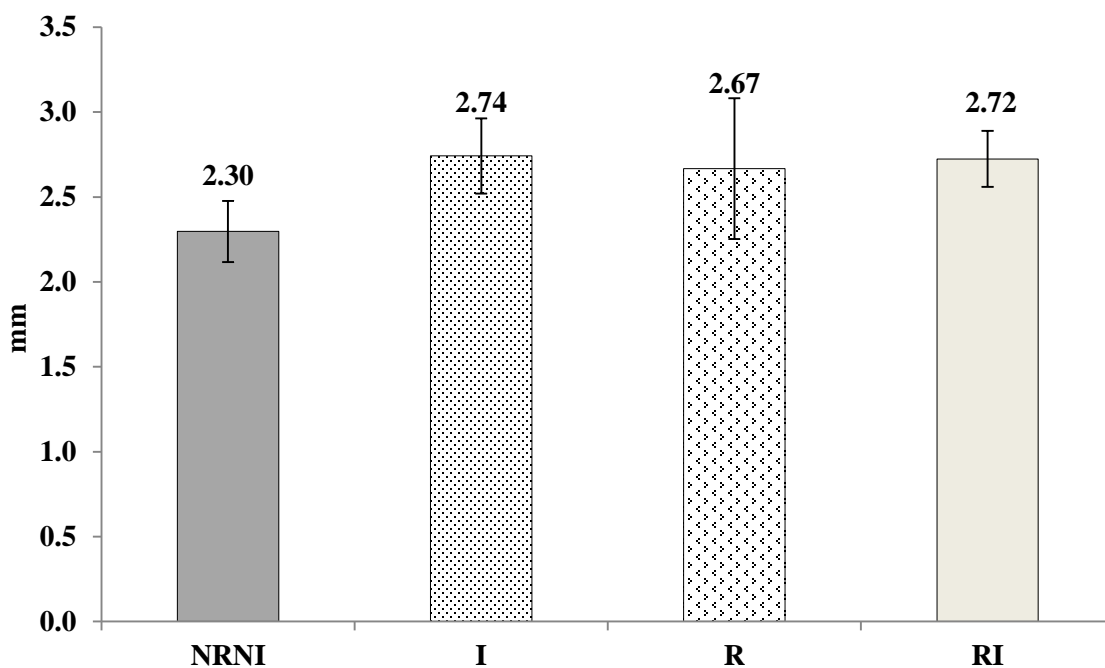


Figura 4. Media de los acumulados de las tunicas del abomaso en la región pilórica de los grupos trabajados. Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI).

ACUMULADO REGION FÚNDICA

En la Figura 5, se muestra el resultado del acumulado de la RFA donde se observa el grupo RI fue el de menor grosor (1.29mm), seguido en orden ascendente por el grupo NRNI (1.31mm), I (1.32mm), siendo el grupo R el que presentó mayor grosor (1.38mm), en este caso tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas.

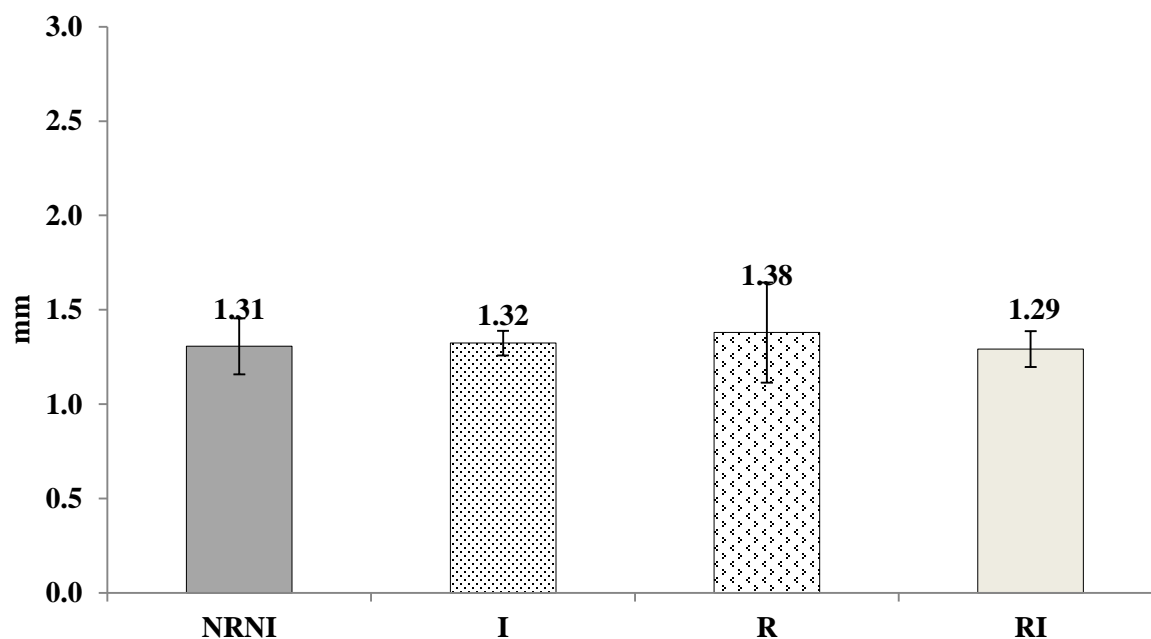


Figura 5. Media de los acumulados de las tónicas del abomaso en la región Fúndica de los grupos trabajados. Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI).

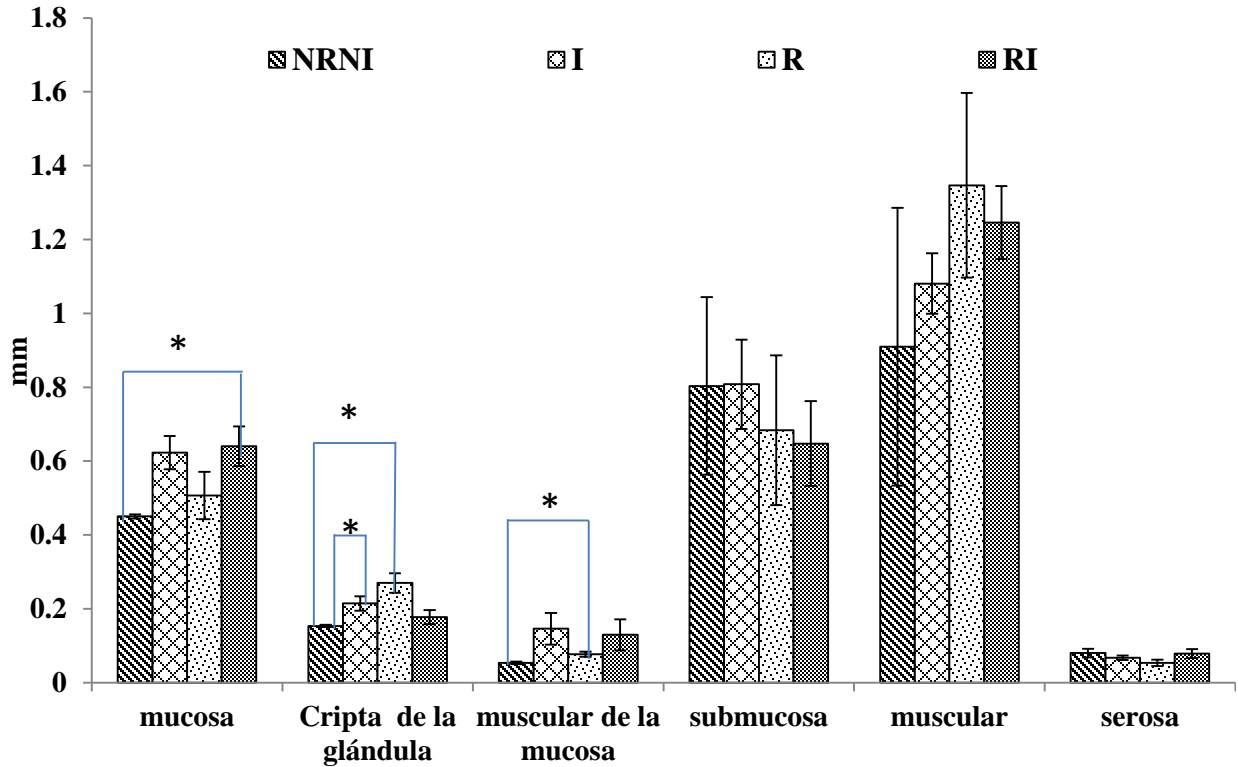


Figura 6. Medida promedio del grosor de las diferentes tunicas de la región pilórica del abomaso en los animales de los grupos, Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI). * Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En la RPA la túnica muscular fue la de mayor grosor seguido por submucosa, mucosa, muscular de la mucosa y por último serosa ya que este es un epitelio simple. Los promedios del grosor de la túnica serosa van de 0.05 mm a 0.08 mm, en la túnica muscular de 0.91 mm a 1.34 mm, en submucosa de 0.06 mm a 0.08 mm, en la muscular de la mucosa de 0.05 mm a 0.14 mm, mucosa de 0.45 mm a 0.64 mm y cripta de la glándula de 0.15 mm y 0.27 mm.

En la mucosa hubo diferencia significativa entre el grupo NRNI e RI con valores de 0.45mm y 0.64mm respectivamente con valor ($p=0.003$). En cuanto a la cripta glandular entre el grupo R, I y el NRNI con valores de 0.27mm, 0.21mm y 0.15mm ($p =0.012$), y ($p=0.008$) respectivamente, en la muscular de la mucosa hubo diferencias entre los grupos R y NRNI con valores de 0.076mm y 0.053mm respectivamente y ($p=0.035$).

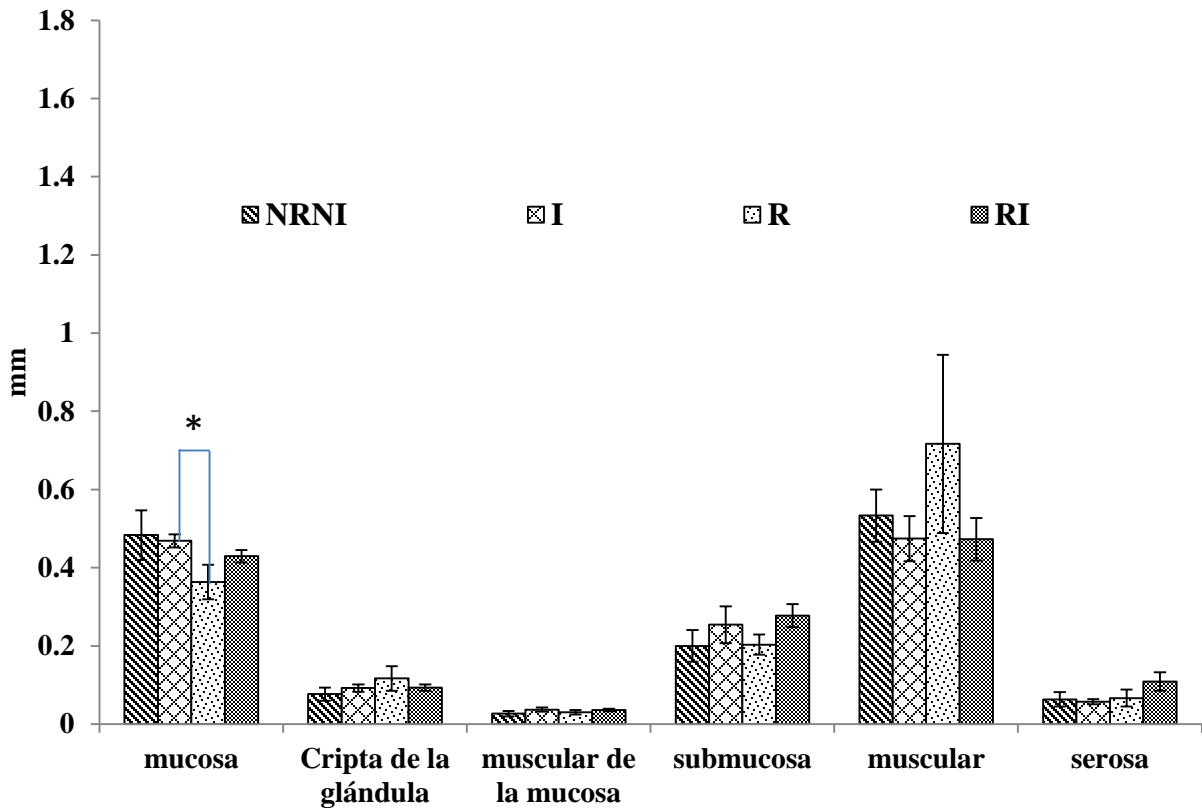


Figura 7. Medida promedio del grosor de las diferentes capas de la región fúndica del abomaso en los animales trabajados. Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI). * Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En la RFA la túnica muscular fue la de mayor grosor, después la mucosa, submucosa, serosa y muscular de la mucosa. Los promedios del grosor de las túnicas son: serosa de 0.57mm a 0.10mm, muscular de 0.47mm a 0.71mm, submucosa de 0.20mm a 0.27mm, muscular de la mucosa de 0.02mm a 0.03mm, mucosa de 0.36mm a 0.48mm y cripta de la glándula de 0.07mm a 0.11mm.

Solo se observó diferencia estadística en la túnica mucosa entre los grupos R e I ($p=0.02$).

Tinción Ácido Periódico de Shift.

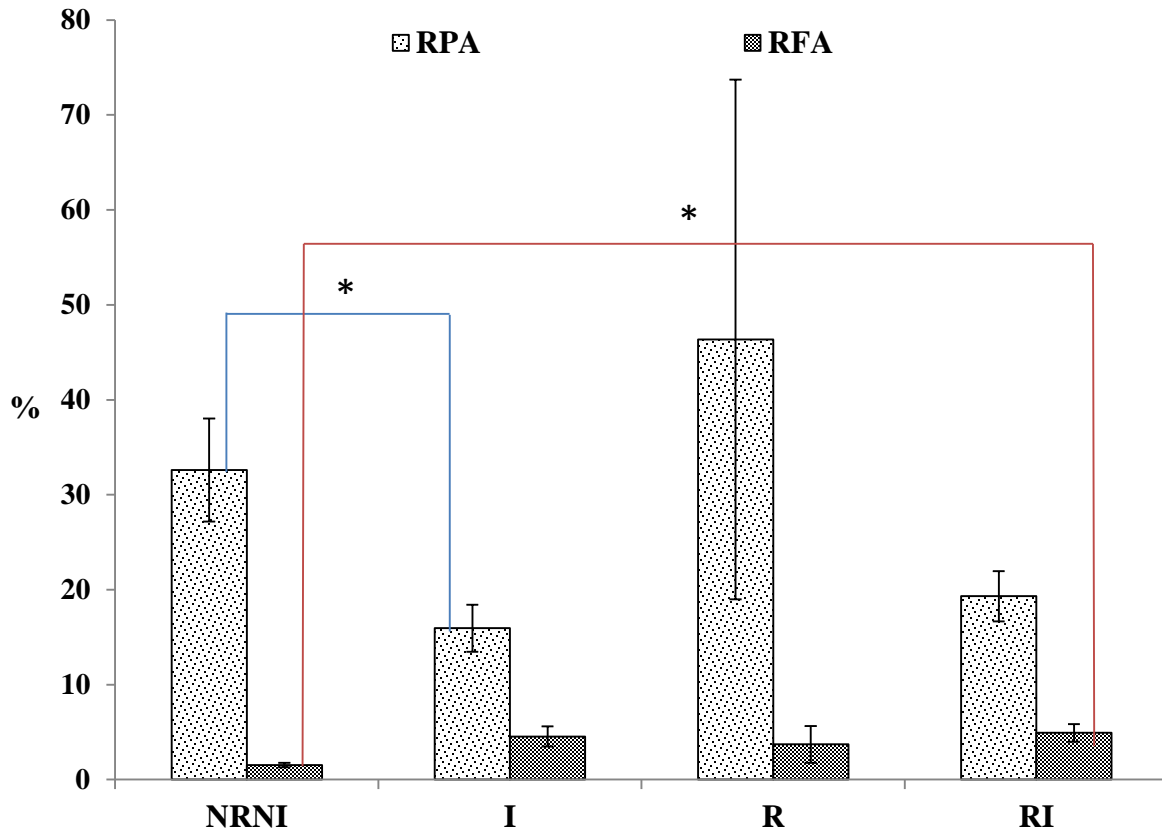


Figura 8. Media del porcentaje de células reacción positiva a la tinción de PAS de las regiones pilórica y fúndica del abomaso de los grupos trabajados. Testigo (NRNI), infectado con *Haemonchus contortus* (I), con restricción alimenticia (R), infectados con *Haemonchus contortus* y con restricción alimenticia (RI). * Indica diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

En la Figura 8, se presentan los porcentajes de células con reacción positiva a la tinción de PAS (productoras de mucina) en la RPA y RFA de la túnica mucosa. En la RPA se observó un mayor porcentaje de células con reacción positiva a la tinción de PAS observándose diferencias significativas entre los grupos NRNI e I con valores 32.6 y 15.9% respectivamente ($p=0.013$), y en la RFA entre los grupos RI y NRNI con valores 4.91 y 1.52% respectivamente ($p=0.003$).

Tinción Azul de toluidina

En todas las muestras revisadas no se encontraron células con metacromacia.

DISCUSIÓN

En la mucosa de la región pilórica se observa la interacción entre la restricción alimenticia y la infección, donde el grupo RI tuvo una mayor longitud que el NRNI en la que se esperaría lo contrario, esto siendo estadísticamente significativo, pero hay estudios previos que podrían explicar esta situación ya que la presencia de parásitos gastrointestinales puede disminuir el consumo voluntario y la eficiencia de la utilización de los nutrientes (Coop *et al*, 1977), aunado a la infección parasitaria que provoca cambios adaptativos en la mucosa.

La diferencia encontrada en la cripta de la glándula de la región pilórica entre los grupos NRNI y R siendo en el último de mayor longitud, puede ser debido al estrés que la restricción provoca, reflejándose en un aumento en el pH por la secreción de ácido clorhídrico que se ha observado en cabras y borregos (Zhao *et al*, 1993; Kabré *et al*, 1995), esto aunado a una menor ingestión de fibra por la restricción alimenticia en comparación con el grupo NRNI lo cual pudo influir en el desarrollo de la glándula y por ende una mejor condición fisiológica para la digestión de alimentos (Ybalmea, 2005). El efecto de la restricción también se observa en la capa muscular de la mucosa donde el grupo R tuvo un mayor grosor que el grupo NRNI, en la cual la restricción evita que haya una distensión suficiente del intestino delgado con quimo que incremente la acidez y productos de la proteólisis que activen un reflejo neural que disminuya la motilidad gástrica (Banks, 1993), esto como un mecanismo adaptativo para garantizar la absorción de nutrientes de la dieta, ya que esta función es esencial para mantener el metabolismo y crecimiento (Kasai *et al*, 2012).

En cuanto a lo ocurrido entre el grupo NRNI e I en la cripta de la glándula pilórica, la mayor longitud en el grupo infectado con las L3 de *H. contortus* es debido a que como se ha observado anteriormente estas penetran las criptas glandulares (Meana y Rojo, 1999), provocando cambios adaptativos como hiperplasia de células productoras de moco (Christie *et al*, 1975; Salman *et al*, 1984; Scott *et al*, 1998).

En cuanto a la región fúndica se encontró diferencia estadísticamente significativa en la mucosa entre los grupos restringido e infectado, en estos grupos se observa una interacción entre la infección y restricción alimenticia teniendo mayor grosor el grupo I, debido a que las L3 de *H. contortus* tienen afinidad por la mucosa de la región fúndica provocando la hiperplasia de células productoras de moco (Meana y Rojo, 1999), además que se ha

observado que la nutrición e infección influyen en los pesos de los tejidos y rendimiento de canal (Valderrabano *et al*, 2002), esto pudiera tener una relación con el mayor desarrollo en la mucosa del grupo sin restricción alimenticia ya que esta regula la proliferación de células epiteliales en el tracto gastrointestinal (Kasai *et al*, 2012).

En las células con reacción positiva a la tinción de PAS en la región pilórica hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos NRNI e I en la cual el grupo NRNI tuvo mayor porcentaje ya que no fue afectado el epitelio, ya que *H. contortus* se establece en la región fúndica además que con los nutrientes necesarios se desarrolla normalmente el epitelio (Valderrabano, 2002). Y que se ha observado que el efecto de la restricción de proteína es más severa en el estómago que en el intestino en un trabajo realizado en ratas (Kasai *et al*, 2012). En el presente estudio hubo un mayor porcentaje de células con reacción positiva a la tinción de PAS en la RPA comparada con la RFA lo que confirma respuestas diferentes entre regiones (Muñoz *et al*, 2012).

En la región fúndica hubo diferencia estadística entre los grupos NRNI y RI en la que el grupo infectado con restricción alimenticia tuvo el mayor porcentaje de células con reacción positiva a la tinción de PAS ya que es generalmente asociada a la hipergastrinemia por la presencia de este nematodo que es provocado por una hiperplasia de células productoras de mucina (Scott *et al*, 1998).

En todas las muestras revisadas no se encontraron células con metacromasia (mastocitos) esto se debió probablemente a que la revisión fue aleatoria, además estudios previos han demostrado que estos se encuentran en números muy bajos, encontrando hasta 9 mastocitos por centímetro cuadrado en corderos Blackbelly infectados con *H. contortus* (Salman 1984; Muñoz, 2007). Además de que se ha observado en primeras infecciones con *Haemonchus contortus* no inducen una sensibilización de mastocitos incluso después de administrar por 12 semanas dosis de 1000 L3 por semana (Bendixen *et al*, 1994).

CONCLUSIONES

- Se observó una respuesta a la restricción alimenticia e infección en las tunicas mucosa, cripta glandular y muscular de la mucosa.
- Las células con reacción positiva a la tinción de PAS tienen asociación con la hiperplasia de células productoras de moco por la presencia del parásito y es más evidente en la restricción alimenticia
- Hay más células con reacción positiva a la tinción de PAS en la región pilórica abomasal.
- No se identificaron mastocitos presentes en todas las muestras trabajadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara NJA, García CT (2011). Efecto de la desnutrición sobre algunos parámetros productivos en ovinos Blackbelly con infección experimental por *Haemonchus contortus*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Aughey E, Frye FL (2001). Comparative Veterinary Histology. 1st ed. Manson Publishing. London UK.
3. Baldwin RL (2000). Sheep gastrointestinal development in response to different dietary treatments. Small Rum. Res. 35: 39-47.
4. Balic A, Bowles VM (2000). Celular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Veterinary Immunology and Immunopathology. 75:109-120.
5. Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunology. 24: 39-46.
6. Bancroft J, Stevens M (2008). Theory and Practice of Histological Techniques. 6a Ed. USA. Edit. Churchill Livingstone.
7. Banks JW (1993). Applied Veterinary Histology. 3rd ed. Mosby- Inc. USA.
8. Barrera EH, Cárdenas RR (1997). El Microscopio Óptico. FES-IUNAM. D.F. 47-68.
9. Bendixen T, Emery DL, Jones WO (1994). The Sensitization of Mucosal Mast Cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. International Journal for Parasitology. 25;6: 741-748.
10. Bicarelo PA, Amarante AFT, Rocha RA, Cabral FSL, Huntley JF, Houdijk JGM, Abdalla AL, Gennari SM (2005). Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infection with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. Vet. Parasitol. 134: 99-109.
11. Burke JM, Miller JE (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.
12. Charleston WAG (1965). Pathogenesis of experimental haemonchosis in sheep with especial reference to the development of resistance. J. Comp. Pathol. 75: 55-67.

13. Christie MG, Angus KW, Hotson IK (1975). Manifestations of resistance to *Haemonchus contortus* in sheep: Worm populations and abomasal changes in sheep superinfected with 1,000,000 larvae of *H. contortus*, *International Journal for Parasitology*. 5 : 193-198
14. Coers EJA (2004). *Veterinary Histology*. University of Illinois. 1st ed. Teton New-Media. USA.
15. Coop RL, Kyriazakis I (1999). Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84: 187-204.
16. Cuellar OJA (1992). Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo y respiratorio en ovinos y caprinos. Mem. Curso Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
17. Doreau M, Michalet- Doreau M, Grimaud P, Atti N, Noizere P (2003). Consequences of underfeeding on digestion and absorption in sheep. *Small Rum. Res.* 49: 289-301.
18. Gaete BA (1996). Manual de técnicas histológicas e histopatológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
19. Gamble HR, Zajac AM (1992). Resistance of St Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet. Parasitol.* 41: 211-225.
20. Gartner PL, Hiatt LJ (2002). *Texto Atlas de Histología*. 2nd ed. Edit. McGraw-Hill. USA.
21. Gill HS, Gray GD, Watson DL, Husband AJ (1993). Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite immunology*. 15: 61-67
22. Hein WR, Mackay CR (1991). Prominence of $\gamma\delta$ T cell in the ruminant immune system. *Immunol. Today*. 12:30-34.
23. Hohenhaus MA, Outteridge PM (1995). The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br. Vet. J.* 151: 119-140.
24. Jones WO, Emery DL (1992). Isolation and degranulation of mucosal mast cell from the small intestine of parasitized sheep. *International Journal for parasitology*. 22: 519-521.
25. Kabré P, Doreau M, Michalet DB (1995). Effects of underfeeding and of fish meal supplementation on forage digestion in sheep. *J. Agric. Sci. Camb.* 124:119-127.

26. Kasai A, Gama P, Alvares EP (2012). Protein restriction inhibits gastric cell proliferation during rat postnatal growth in parallel to ghrelin changes. *Nutrition*. 28:707-712.
27. Koski KG, Su Z, Scott ME (1999). Energy deficits suppress both systemic and gut immunity during infection. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 264, 796–801.
28. Luna LG (1958). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces institute of Pathology*. 3a ed. Blaskiston Division-Mc Graw Hill Co. USA.
29. Meana MA, Rojo VFA (1999). *Tricostrogilosis y otras nematodiasis*. En: *parasitología veterinaria*. Edit. Por: Cordero, CM y Rojo, V.F.A., Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
30. Meeusen ENT, Balic A (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology today*. 16; 3: 95-101.
31. Metcalfe DD (1984). Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cells. *Annals of allergy*. 53: 563-575.
32. Muñoz GMA (2007). *Evaluación Comparativa de la respuesta inmune contra Haemonchus contortus en razas ovinas de alta y baja susceptibilidad*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
33. Muñoz GMA, Cuenca VC, Valdivia AG, Cuéllar OJA, Alba HF (2012). Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 185:175-180.
34. Myers R (2009). *Special Stains Techniques for the Evaluation of mucins*. Leica Biosystems. Wetzlar, Germany.
35. Pérez J, Zafra R, Buffoni L, Hernández S (2008). Cellular phenotypes in the abomasal mucosa and abomasal lymph nodes of goats infected with *Haemonchus contortus*. *J. Comp. Path.* 108:102-107.
36. Reyes CA (2006). *Manual de Laboratorio de Histología*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
37. Salman SK, Duncan JL (1984). The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 16: 43-54.
38. Schalling HDFH, Vanleeuwen MAW, Hendriks WML (1995). Isotype-specific serum antibody responses of the sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet. Parasitol.* 56: 149-162.

39. Scott I, Simpson HV, Hodgkinson SM, Khalaf S, Lawton DEB, Collett MG, Reynolds GW, Pomroy WE (1998). Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *International Journal for parasitology*. 28:1383-1392.
40. Simpson HV (2000). Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *The Veterinary Journal*. 160(3):177-191.
41. Simpson HV (2000). Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *The Veterinary Journal*. 160(3):177-191.
42. Valderrabano J, Delfa R, Uriarte J (2002). Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Vet Parasitol*. 104: 327-338.
43. Wallace DS, Bairden K, Duncan JL, Fishwick G, Gill M, Holmes PH, Mckellar QA, Murray M, Parkins JJ, Stear MJ (1995). Influence of supplementation with dietary soyabean meal on resistance to haemonchosis in Hampshire down lambs. *Res. Vet. Sci*. 58:232-237.
44. Wallace DS, Bairden K, Duncan JL, Fishwick G, Gill M, Holmes PH, Mckellar QA, Murray M, Parkins JJ, Stear MJ (1996). Influence of soyabean meal supplementation on the resistance of Scottish blackface lambs to haemonchosis. *Res. Vet. Sci*. 60:138-143.
45. Wallace DS, Bairden K, Duncan JL, Eckersall PD, Fishwick G, Holmes PH, Mckellar QA, Mitchell S, Parkins JJ, Stear MJ (1999). The influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. *Anim. Sci*. 69: 457-463.
46. Wildblood LA, Kerr K, Clark DA, Cameron A, Turner DG, Jones DG (2005). Production of eosinophil chemoattractant activity by ovine gastrointestinal nematodes. *Vet. Immunol. Immunophatol*. 107: 57-65.
47. Yazwinski TA, Goode L, Moncol DJ, Morgan GW, Linnerud AC (1980). *Haemonchus contortus* resistance in straight bred Barbados Blackbelly sheep. *J. Anim. Sci*. 51: 279-284.
48. Ybalmea R, Jordán H, Delgado D, Chongo B, Ortega J, Vera AM (2005). Efecto de la proporción y tipo de fibra de las dietas integrales en la morfometría y desarrollo del estómago de terneros jóvenes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 39 (3):279-285.

49. Zhao JY, Shimojo M, Goto I, (1993). The effects of feeding level and roughage/concentrate ratio on the measurement of protein degradability of two tropical forages in the rumen of goats, using the nylon bag technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41:261.269.

ANEXO TINCIONES

1. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)

1. Xileno al 100% 10 minutos.
2. Alcohol absoluto 2 minutos.
3. Alcohol al 96% 2 minutos.
4. Alcohol al 80% 2 minutos.
5. Alcohol al 70% 2 minutos.
6. Alcohol al 60% 2 minutos.
7. Agua destilada 3 minutos.
8. Hematoxilina de Harris 10 minutos
9. Agua corriente 3 minutos.
10. Se observa al microscopio para ver la tonalidad de la muestra del tejido.
11. Alcohol acido al 70% (99cc EtOH al 70% + 1cc HCl concentrado) 3 segundos.
12. Agua corriente 3 minutos.
13. Se verifica en el microscopio que se diferenciaron los núcleos del citoplasma.
14. Eosina alcohólica “solución de trabajo” 5 minutos.
15. EtOH al 96% 60 segundos.
16. EtOH absoluto 15 minutos.
17. Xileno al 100% por 15 minutos.
18. Se le agrega una gota de resina a la laminilla y se coloca un cubreobjetos.

Descrita por Gaete (1996) y Bancroft (2008).

2. Tinción de Ácido Periódico de Shift (P.A.S).

1. Xileno al 100% 10 minutos.
2. Alcohol absoluto 2 minutos.
3. Alcohol al 96% 2 minutos.
4. Alcohol al 80% 2 minutos.
5. Alcohol al 70% 2 minutos.
6. Alcohol al 60% 2 minutos.
7. Agua destilada 3 minutos.
8. Ácido periódico 5 minutos.
9. Lavar con agua destilada.
10. Reactivo de Schiff.
11. Tres lavados de ácido sulfuroso, de dos minutos cada uno.
12. Lavar con agua corriente.
13. Contraste con hematoxilina de Harris 30 segundos y diferenciado con alcohol ácido.
14. Lavar con agua destilada.
15. EtOH al 96% 60 segundos.
16. EtOH absoluto 15 minutos.
17. Xileno al 100% por 15 minutos.
18. Se le agrega una gota de resina a la laminilla y se coloca el cubreobjetos.

Descrita por Luna (1998).

3. Tinción de Azul de toluidina

SOLUCIÓN STOCK AZUL DE TOLUIDINA

Azul de toluidina-----1g

Alcohol al 70%-----100 ml

CLORURO DE SODIO (1%)

Cloruro de sodio-----0.5 g

Agua destilada-----50ml

Se ajusta el pH a 2.0- 2.5 con HCL. La solución se prepara cada vez que se use

SOLUCIÓN DE TRABAJO AZUL DE TOLUIDINA (PH 2.0-2.5):

Solución stock azul de toluidina-----5ml

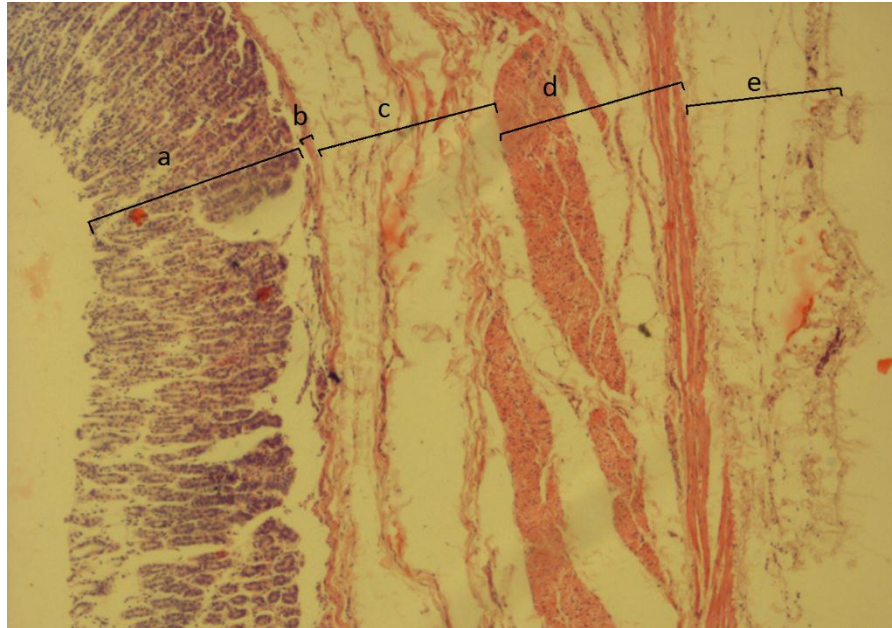
Solución cloruro de sodio 1%, pH 2.3----45ml

Se homogeniza la solución y ajusta el pH de 2.3-2.5, la solución debe ser fresca y después de usar se desecha.

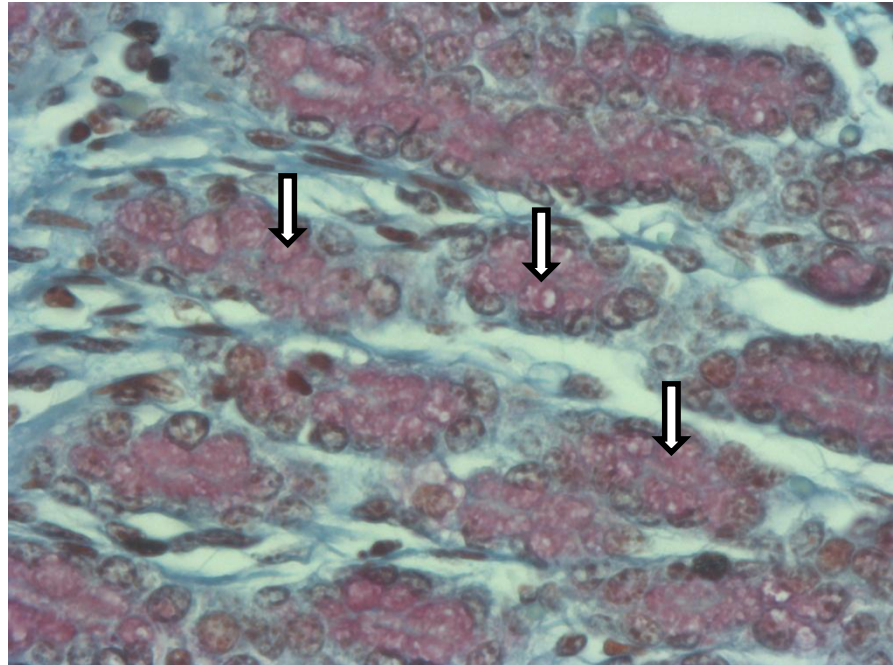
1. Xileno al 100% 10 minutos.
2. Alcohol absoluto 2 minutos.
3. Alcohol al 96% 2 minutos.
4. Alcohol al 80% 2 minutos.
5. Alcohol al 70% 2 minutos.
6. Alcohol al 60% 2 minutos.
7. Agua destilada 3 minutos.
8. Solución de trabajo azul de toluidina 3 minutos.
9. Lavar en agua destilada 3 minutos.
10. EtOH al 95% 10 inmersiones.
11. EtOH absoluto 10 inmersiones.
12. EtOH absoluto 10 inmersiones.
13. Xilol absoluto 3 minutos.
14. Xilol absoluto 3 minutos.
15. Se le agrega una gota de resina a la laminilla y se coloca el cubreobjetos.

Descrita por Bancroft (2008).

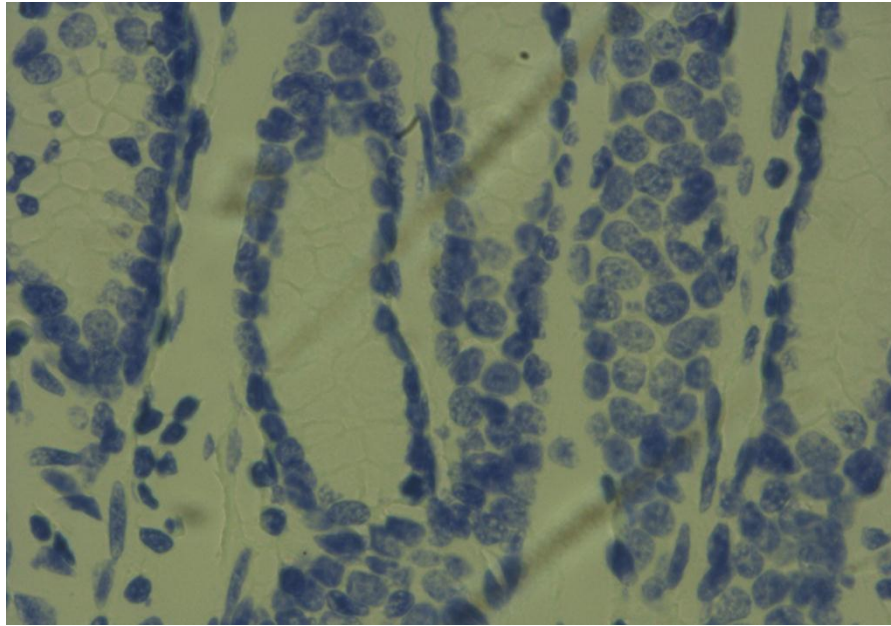
4. Imágenes



Fotomicrografía de cortes en micrótomos de mucosa abomasal de ovinos procesado con la técnica de tinción de hematoxilina-eosina objetivo (4x), (a) Mucosa, (b) muscular de la mucosa, (c) submucosa, (d) muscular, (e) serosa. Aumento de 40x.



Fotomicrografía de cortes en micrótomos de mucosa abomasal de ovinos procesado con la técnica de Ácido Periódico de Schiff (Objetivo 40x). la letra (a) indica las células con reacción positiva a la tinción de PAS.



Microfotografía de cortes en micrótopmo de mucosa abomasal de ovinos procesado con la técnica de tinción de azul de toluidina (Objetivo 40x)