



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXPLANTES ABOMASALES *in vitro* CON LARVAS
INFECTANTES DE *Haemonchus contortus* EN OVINOS DE LA RAZA BLACKBELLY.**

TESIS

**Que para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista**

**Presenta:
Francisco E. Reyes Villagómez**

**Asesor:
M en C Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXPLANTES ABOMASALES in vitro CON LARVAS INFECTANTES DE
Haemonchus contortus EN OVINOS DE LA RAZA BLACKBELLY

Que presenta el pasante: FRANCISCO EUSTOLIO REYES VILLAGÓMEZ
Con número de cuenta: 30524920-9 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 02 de Mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz	
VOCAL	M.V.Z. Gloria Josefina Ortiz Gasca	
SECRETARIO	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Rocío Silva Mendoza	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Marcos Javier Sánchez Pérez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

HHA/Vc

Me resulta curioso voltear al pasado y darme cuenta, no tanto de los errores cometidos, pero creo que sí he tomado algunas cosas a la ligera y pienso que sin ayuda de ciertas personas no hubiera sido posible la existencia de este escrito, el cual tiene una dedicatoria y agradecimiento infinito para las personas que han sido mi principal motor en el transcurso de mi vida, muchas gracias a ellos, a MI MADRE y MI PADRE, quienes me dieron la oportunidad de existir y todo el apoyo que tuvieron para crear en mí una persona de bien.

Igualmente infinito será siempre mi agradecimiento a mis Hermanos. FABIÁN, gracias porque siempre me has brindado tu apoyo incondicional y has sido el mejor ejemplo a seguir, un gran orgullo para todos, espero algún día poder ser aunque sea la mitad de exitoso que tú, siempre me van a faltar palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A FABIOLA, mi ángel, el otro ejemplo de entereza, fuerza y éxito, quien también mostró que siempre es posible ser mejor y todo se logra queriendo y trabajando, siempre te voy a llevar en mi corazón.

A FÁTIMA, de mis hermanos, con quien más he convivido, con quien crecí y quien en ciertos momentos me cuidó, gracias por ser una gran compañera, una gran hermana.

Muchas gracias a ustedes papás, muchas gracias hermanos por todo lo que me han dado y me siguen dando, siempre estaré agradecido con la vida por permitirme tenerlos como hermanos, sin su aliento, su apoyo y su compañía de verdad no sé qué sería de mí, este pequeño triunfo es más de ustedes que mío, LOS AMO INMENSAMENTE, GRACIAS.

Por su puesto agradezco a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por la oportunidad que nos brinda para formarnos como profesionales, esperando algún día retribuirle, no solo a la institución sino al país con nuestro trabajo responsable, ético y profesional, muchas gracias.

Le agradezco y estaré siempre agradecido con el Doc. Alfredo Cuellar, por su confianza y por brindarme de su tiempo y conocimientos para llevar a cabo este trabajo, de Igual manera a Víctor por dejarme ser parte de su trabajo, por ayudarme y por convertirse en un gran amigo, a mis sinodales, en especial a Doc. Jorge Tortora, quien además fue mi profesor en las materias de Patología, gracias por compartir sus conocimientos y hacer crecer los míos, gracias a Cesar Cuenca y a Oscar, quienes me regalaron un poco de su tiempo para armar este trabajo, muchas gracias

Muchas gracias también le doy al resto de mi familia Tíos y primos que ha estado presente en mi camino, muy especialmente a mis primos, con los que he crecido, quienes me han dado su cariño y apoyo incondicional, Gracias May, Gracias Quique, Gracias Beto, Gracias Martín y al otro ángel que se nos adelantó, Gracias Rojo, gracias por ser más que primos, hermanos de toda la vida, no quiero dejar de mencionar a Omar quien siempre me mostro gran cariño, este trabajo también va dedicado a él, sin dejar de lado a todos los demás integrantes del equipo, gracias a todos ustedes primos por esos increíbles momentos que hemos pasado y que nos faltan por vivir, gracias a todos ustedes y puro pa 'delante equipo.

Por último quiero agradecer a todas esas personas que he conocido gracias a esta bonita carrera y quienes también son parte importante de esto, gracias por su cariño, ayuda y apoyo en este camino, gracias a esos compañeros que se volvieron grandes amigos, Lalito Barrón, Checo, Chava, Mario, Jr Fer, Gís, Tani, Gabs, Alex Cuevas, Agustín, muchas gracias a ustedes amigos, principalmente por eso, por ser mis amigos. No puedo dejar de mencionar a quienes me han brindado un lugar donde he podido desarrollar mis habilidades profesionales gracias por toda su ayuda Marco y Cris, porque además gracias a ustedes conocí a quienes considero pilares importantes de mi conocimiento, porque no todo se aprende en la escuela, gracias a los que fueron mis profesores en la práctica real, gracias Edgar, gracias Gus, gracias Ariel, por ayudarme y por regalarme un poco de su conocimiento y experiencia.

De verdad siempre estaré muy agradecido con todos ustedes, y aunque sé que hay gente que no mencioné, también son parte importante no solo de lo que aquí se presenta, sino de la persona que soy ahora. MUCHAS GRACIAS A TODOS, ESTO ES DE USTÉDES.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Objetivo	14
Material y métodos.....	15
Resultados	18
Discusión	20
Conclusiones.....	22
Bibliografía	23

Resumen.

El objetivo del presente trabajo fue aplicar y evaluar la técnica de explantes para conocer el grado de asociación al tejido abomasal de ovino de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. El trabajo se efectuó en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, en el Módulo de Ovinos de la Unidad de Posgrado y en el Laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. La técnica consistió en desafiar el tejido abomasal de cuatro ovinos de la raza Blackbelly *in vitro* con larvas de tercer estadio de la cepa de *H. contortus* de la FES Cuautitlán. La proporción de larvas de *H. contortus* que penetraron a la mucosa abomasal del explante se expresó como porcentaje de asociación al tejido (PAT), el cual osciló entre 57.7 y 59.9% y del 60.0%, 58.4% y 56.9% para las regiones fúndica, cárdica y pilórica, respectivamente. Sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la región fúndica y pilórica. Se concluye que la técnica de explantes abomasales es una herramienta confiable para la investigación en el estudio de las primeras fases de establecimiento de la parasitosis provocada por *H. contortus* y de factores que las pueden modificar.

Introducción.

Las enfermedades parasitarias se encuentran entre las causas más frecuentes e importantes que ocasionan una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios del país. La nematodiasis gastroentérica es una enfermedad producida por la presencia y acción de varias especies de nematodos que se localizan en el abomaso, intestino delgado, ciego y colon de los rumiantes (Cuéllar, 2003).

De acuerdo a su localización, los géneros de los principales parásitos responsables de la nematodosis gastrointestinal en los rumiantes son:

Abomaso: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Mecistocirrus*.

Intestino delgado: *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Strongyloides* y *Bunostomum*.

Ciego: *Skrjabinema* y *Trichuris*.

Colon: *Chabertia* y *Oesophagostomum*.

La elevada prolificidad, adaptabilidad y resistencia a diversas condiciones climáticas, hacen que los nematodos gastroentéricos (NGE) tengan una amplia distribución geográfica y alta prevalencia, tanto en regiones con clima tropical, como en regiones templadas (Quiroz, 2003). Su desarrollo larvario puede darse incluso en temperaturas elevadas (climas tropicales), debido a que la humedad y la vegetación prevaleciente en estos climas son esenciales para mantener los huevos viables en el interior de las heces y asegurar el desarrollo de la larva. Otro factor que contribuye a la presencia de NGE es que algunas ovejas en áreas endémicas no desarrollan inmunidad eficaz frente a ellos, por lo que se produce una contaminación constante del pasto (Urquhart y col., 2001).

De la amplia gama de nematodos que afectan a los ovinos sobresale *Haemonchus contortus* que por sus hábitos hematófagos se convierte en uno de los que tiene mayor grado de virulencia (Quiroz, 2003).

El *H. contortus* tiene la siguiente clasificación taxonómica (Urquhart y col., 2001):

Reino: Animalia
Phylum: Nematelminthes
Clase: Nematoda
Orden: Strongylida
Suborden: Strongylina
Superfamilia: Trichostrongyloidea
Familia: Trichostrongyloidea
Subfamilia: Haemonchinae
Género: *Haemonchus*
Especie: *H. contortus*

Los adultos del *H. contortus* habitan en el abomaso, los machos miden de 10 a 20 mm y son de color rojo, las hembras miden de 18 a 30 mm y adoptan forma de espirales rojas y blancas (Soulsby, 1988), por eso se ha sugerido el término de gusano con forma de “poste de barbería” (Lapage, 1984; Quiroz, 2003); otra sinonimia es “gran gusano del estómago de los rumiantes” (Soulsby, 1988).

En la parte anterior tiene una pequeña cavidad bucal con una lanceta, sobre la superficie de tercio anterior del cuerpo hay un par de papilas cervicales. Los machos terminan en una bolsa copulatriz bien desarrollada, poseen dos espículas iguales que sobresalen del cuerpo. Las hembras terminan en punta roma, con la vulva localizada al finalizar el segundo tercio del cuerpo y está cubierta por una prolongación de la cutícula llamada labio vulvar (Soulsby, 1988; Alba, 2007).

Los huevos son ovales e incoloros, miden de 70 a 85 μm de largo por 41 a 48 μm de ancho y están blastomerados. Los huevos de este parásito son muy parecidos a los de otros NGE por lo que en términos generales, los huevos de *H. contortus* se reportan como huevos de NGE y es necesario realizar un cultivo larvario para precisar el género y especie (Soulsby, 1988; Alba, 2007).

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo, el ciclo completo tiene una duración de 28 a 35 días dependiendo de la zona y el clima (Quiroz, 2003) y consta de dos fases una no parasitaria o también llamada exógena y una parasitaria o también llamada endógena (Lapage, 1981).

La fase exógena inicia con la eliminación de huevos en la materia fecal, contaminan los pastizales, donde se desarrollan tres etapas larvarias no

parásitarias (Lapage, 1984; Quiroz, 2003; Bowman y col., 2004). Se requieren condiciones adecuadas de humedad, temperatura y oxígeno para el desarrollo de la larva de primer estadio (L_1) dentro del huevo (Quiroz, 2003). Las L_1 eclosionan uno o dos días después de que fueron eliminados los huevos y se alimentan de bacterias, hongos y materia orgánica de sus alrededores, después de algunos días mudan su epidermis (primera ecdisis) y se transforman en larva dos (L_2) que también se alimenta de bacterias y materia orgánica, sigue creciendo hasta que madura y forma una nueva epidermis y se transforma en larva de tercer estadio (L_3), que son las infectantes (Lapage, 1984; Soulsby, 1998; Meana y Rojo, 1999).

En la segunda ecdisis la epidermis se conserva temporalmente como una envoltura o una vaina protectora suelta alrededor de la L_3 y no se desprende de ella hasta que encuentra al hospedador adecuado (Bowman y col., 2004), por lo tanto no se puede alimentar y se mantiene de los gránulos de material alimenticio que se almacenaron dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1984). Esta envoltura protege a la L_3 de la desecación y otros factores ambientales a los cuales se encuentra expuesta fuera del hospedador y puede resistir condiciones desfavorables sobre los pastos, en esto difieren de las L_1 y de las L_2 , además de no poder infectar a un nuevo hospedador, si son ingeridas por algún animal serán digeridas (Lapage, 1984). En condiciones adecuadas el desarrollo de la L_3 se alcanza de 4 a 7 días después de haber sido eliminados los huevos (Lapage, 1984). La L_3 es muy activa y es capaz de desplazarse verticalmente sobre la superficie húmeda de los vegetales. La migración vertical les permite subir a las gotas de rocío que se encuentran en las puntas de los pastos en las mañanas o en los días nublados (Soulsby, 1988). Esto último por los tropismos de esta larva: hidrotropismo positivo, que es lo que le hace buscar zonas húmedas; fototropismo negativo, que quiere decir que la larva evita el contacto con la luz intensa; termotropismo positivo a la temperatura óptima (de 15 a 30° C) y por último geotropismo negativo, ya que se aleja del suelo buscando la parte alta de los pastos (Quiroz, 2003).

La dispersión de las larvas se ve favorecida por diversos factores, entre los cuales se encuentra la lluvia; en forma mecánica cuando el ganado acarrea materia fecal en sus patas; por los insectos y ácaros coprófagos; también se ha mencionado que esporas de hongos del género *Pilobolus* son capaces de lanzar las larvas de un metro a metro y medio de distancia del bolo fecal, esto es importante debido a que los animales no consumen forraje

que se encuentra cerca de la materia fecal (Lapage, 1984; Soulsby, 1988; Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

Una característica de sobrevivencia de estos parásitos es su resistencia a la desecación y algunas pueden sobrevivir de uno a tres meses en el pasto o heces (Meana y Rojo, 1999). El rango de temperatura ideal para su desarrollo es de 15 a 27° C. La humedad relativa para que las larvas se desarrollen oscila del 70 al 100%, de lo contrario mueren (Meana y Rojo, 1999), por lo tanto, cuando las condiciones son favorables, se pueden acumular una gran cantidad de larvas infectantes sobre los pastos en muy poco tiempo. Sin embargo, las posibilidades de transmisión se encuentran limitadas por la susceptibilidad de las larvas a la deshidratación y al frío (Radostits y col., 2002).

Los animales se infectan al ingerir las L₃ junto con el pasto (Bowman y col., 2004) e inicia la fase endógena. Aproximadamente a los 30 minutos la L₃ pierde su vaina en el rumen (Lapage, 1984; Meana y Rojo, 1999), después pasa al abomaso y penetra las criptas glandulares gástricas, *H. contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Meana y Rojo, 1999), una vez ahí, la L₃ comienza a alimentarse de sangre y muda a larva cuatro (L₄) en el interior de las glándulas gástricas, causando daños tisulares diversos durante todo este proceso (Soulsby, 1988; Simpson y Lawton, 1997; Gómez y col., 1999; Velázquez, 2000). La L₄ sale de la mucosa a la luz abomasal y muda a larva cinco (L₅) o preadulto (Norman, 1978; Meana y Rojo, 1999), ésta se desarrolla directamente, sin ecdisis hasta transformarse en el gusano adulto, macho o hembra (Lapage, 1984).

Las fases adultas copulan y la hembra comienza a producir huevos en aproximadamente 18 días después de la ingestión de la L₃, según las condiciones climáticas. La producción de huevos aumenta hasta alcanzar una descarga máxima de los mismos en un periodo de 25 a 30 días (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003). Las hembras pueden producir de 5,000 a 10,000 huevos al día (Lapage, 1984; Meana y Rojo, 1999).

En algunas circunstancias el desarrollo larvario se detiene dentro del hospedador en la fase de L₄ durante 4 ó 5 meses, se le conoce como hipobiosis (Meana y Rojo 1999). La naturaleza del estímulo se desconoce aunque algunos trabajos mencionan que se debe a factores genéticos, inmunológicos o ambientales, el fenómeno coincide con condiciones ambientales adversas (meses fríos y épocas secas) (Quiroz, 2003; Meana y

Rojo 1999). La hipobiosis ayuda a garantizar supervivencia y parece tener un carácter heredable considerado como una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador (Meana y Rojo 1999).

La reanudación del desarrollo de las larvas se produce cuando las condiciones ambientales son adecuadas para la supervivencia de las fases libres y está asociada con algún estímulo estacional (Lapage, 1984). Se ha mencionado que esa reanudación también está asociada a estímulos ligados a factores hormonales e inmunológicos de los animales parasitados; en las ovejas gestantes se ha propuesto que la inmunosupresión y las hormonas producidas alrededor del parto, principalmente la prolactina actúan como estímulo para la reactivación larvaria (Blitz y Gibbs, 1971). Desde el punto de vista patológico es muy importante, pues la desinhibición sincrónica de las larvas hipobióticas puede dar lugar a procesos graves. También es importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que al coincidir en el tiempo de madurez sexual de los adultos procedentes de larvas hipobióticas, se eliminan cantidades elevadas de huevos que contribuyen en forma significativa a la contaminación ambiental, en una época del año favorable para el desarrollo de L₃, que aumenta el riesgo de infección para los animales jóvenes (Meana y Rojo, 1999).

En ausencia de hipobiosis, el periodo de prepatencia varía entre 15 y 20 días (Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999).

La epidemiología de la hemoncosis está condicionada principalmente por la elevada fecundidad de las hembras y por la velocidad a la que las larvas infectantes pueden desarrollarse (Cuéllar, 1986; Soulsby, 1988) y es diferente en las áreas tropicales, subtropicales o en zonas templadas (Urguhart y col., 2001). Los factores predisponentes de la enfermedad son la sobrecarga del pastoreo, pastos succulentos, climas húmedos y cálidos. Además existen otros factores propios del hospedador, entre los que se encuentra la raza, su estado nutricional y fisiológico (Cuéllar, 1992; Miller y col., 1998; Bowman y col., 2004). Los hábitos alimenticios de los ovinos favorecen la infección, estos son altamente selectivos, consumen forraje fresco, tierno, que contiene mucha humedad, que por lo tanto pueden contener un gran número de larvas infectantes que desencadenan cuadros clínicos de la enfermedad (Cuéllar, 1992)

En México la parasitosis es muy común, la mayoría de los rumiantes se encuentran en pastizales comunales, en los que pastan animales de distintos dueños y en terrenos sobrepastoreados, donde la contaminación es muy grande (Cuéllar, 1992).

La presencia de *H. contortus* ocurre tanto en animales jóvenes como en adultos, sin embargo, la presentación clínica de la enfermedad es más común en corderos de seis a ocho meses de edad (Cuéllar, 1992).

Las L₃ migran mejor en climas húmedos y cálidos. Una larva puede encontrarse a 90 cm de los residuos de materia fecal en 24 horas, pero más del 90% se encuentran a 10 cm, por lo tanto el número disminuye logarítmicamente al aumentar la distancia (Blood y col., 1986).

El factor racial es uno de los que determina la severidad de la hemoncosis. Es una opinión generalizada el hecho de que los animales nativos o genéricamente llamados *criollos*, resisten más las infecciones parasitarias en relación a los animales de razas puras o exóticas, esta situación se explica por una selección natural que ha ocurrido en los animales nativos, dando lugar a una progenie con las mismas características de resistencia a este nematodo (Cuéllar, 1992; Coop y Sykes, 2002).

El estado nutricional del animal juega un papel muy importante en la susceptibilidad a la hemoncosis. Los animales subnutridos por lo regular presentan cargas parasitarias mayores en relación a aquellos que mantienen condiciones nutricionales óptimas (Cuéllar, 1992).

El estado fisiológico, puede favorecer una mayor población de nematodos adultos en abomaso. Particularmente en el *alza posparto* o *alza lactacional*, hay un aumento en la eliminación de huevos de NGE en las ovejas que están cerca del parto o lactando (Soulsby, 1988). En realidad existen dos aumentos de la cantidad de huevos de NGE que en general coinciden en tiempo, el lactacional en las hembras en cualquier tiempo y el de la primavera, que además de presentarse en hembras que paren se presenta con menor intensidad en las hembras vírgenes y en machos (Quiroz, 2003).

La hemoncosis se puede presentar como una enfermedad hiperaguda o aguda resultado de la maduración o ingestión de grandes cantidades de larvas. Puede provocar una enfermedad crónica más insidiosa si las cargas

de vermes son bajas o moderadas (Jubb y Kennedy, 1990). Los efectos del gusano sobre el animal también varían de acuerdo con la edad del individuo, el grado de inmunidad que se haya producido, el estado nutricional y la salud del individuo (Quiroz, 2003).

La actividad hematófaga de *H. contortus* en la mucosa del abomaso provoca una disminución notable en el paquete celular (Cuéllar, 1986; Lapage, 1984) ya que las L₄ y L₅ succionan sangre, ocasionan lesiones hemorrágicas en la mucosa del abomaso y viven bajo los coágulos de sangre que ahí se forman. Los gusanos adultos también perforan la mucosa del abomaso por medio de sus lancetas bucales, lo que provoca inflamación y succionan sangre (Quiroz, 2003). En forma individual cada gusano adulto produce una pérdida de unos 0.05 ml de sangre por día en los ovinos y se puede perder diariamente un volumen eritrocitario del orden de un décimo a un cuarto del total (Jubb y Kennedy, 1990), estas pérdidas de sangre, si el hospedador no es capaz de reemplazarla con suficiente rapidez, determina anemia e hipoproteïnemia. Aparece edema en diferentes partes del cuerpo, producto de la baja concentración de proteínas en sangre (Radostits y col., 2002).

Los corderos padecen más severamente la hemoncosis. Entre los animales de más edad, los peores efectos se observan en individuos que por alguna razón están débiles o sufren de estrés. Así las hembras, durante la gestación o lactancia, sufren más intensamente la enfermedad, al igual que los individuos que padecen otras enfermedades que disminuyen su resistencia a la hemoncosis (Quiroz, 2003).

En los animales con enfermedad crónica, posiblemente complicada por un bajo plano nutricional, puede haber depleción de los depósitos de grasa y atrofia muscular. Con frecuencia el contenido del abomaso está líquido y de color marrón rojizo oscuro, debido a la presencia de sangre (Jubb y Kennedy, 1990; Carlton y Mc Gabin 1995).

En las ovejas y cabras afectadas clínicamente, en general se encuentran de 1,000 a 12,000 gusanos. La severidad de la enfermedad depende de la cantidad de vermes y hasta cierto grado, del tamaño del animal. En los corderos, 2,000 a 3,000 fases adultas representa una gran carga, mientras que en las ovejas y cabras adultas 8,000 a 10,000 parásitos se asocian a infección fatal (Jubb y Kennedy, 1990).

La necropsia puede revelar la presencia de líquido en la cavidad abdominal (ascitis), en la bolsa pericárdica (hidropericardio) y en la cavidad torácica (hidrotorax), reflejando una severa hipoproteinemia (Jubb y Kennedy, 1990; Soulsby, 1988; Le Jambre, 1995). Hay palidez extrema debido a la anemia, muy aparente en la conjuntiva y todos los tejidos internos. El hígado muestra degeneración grasa y por esta razón, aparece de color claro o amarillo y friable (Jubb y Kennedy, 1990).

Los pliegues del abomaso pueden estar edematosos y en la superficie se evidencian áreas focales de hemorragia. En los animales que aún no están en descomposición, los vermes se podrán ver a simple vista (Jubb y Kennedy, 1990).

Los mecanismos de resistencia dependen de las respuestas inmunitarias adquiridas tras el contacto con los parásitos y de la capacidad fisiológica innata de los animales para adaptarse a la infección. La inmunidad a los nematodos gastrointestinales es dependiente de la respuesta celular de linfocitos T, incluye importantes alteraciones inflamatorias en la mucosa, y se ve facilitada por la presencia de anticuerpos específicos frente a los parásitos (Meana y Rojo, 1999).

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

Las respuestas inmunitarias eficaces tienen una serie de características según las distintas fases de desarrollo. Así, se observa que la respuesta a las larvas infectantes evita su asentamiento y da lugar a su eliminación a las pocas horas de ser ingeridas, relacionada con la presencia de elevadas cantidades de inmunoglobulina (IgA), histaminas y leucotrienos en el moco, la acción a las L₄ conlleva a su eliminación o al retraso de su desarrollo (Meana y Rojo, 1999).

En cuanto a los adultos, las respuestas inmunitarias repercuten en la habilidad del hospedador para mantener la carga parasitaria a niveles bajos o reducir la fecundidad de las hembras (Meana y Rojo, 1999).

El diagnóstico debe realizarse sobre los signos clínicos, historial epidemiológico y análisis de laboratorio. Aunque algunos signos son muy sugestivos, diarrea, baja de peso, mucosas pálidas, edema submandibular y muertes ocasionales, se debe comprobar el diagnóstico enviando al laboratorio muestras de materia fecal colectadas directamente del recto de los animales, para detectar presencia de huevos eliminados por los parásitos. Se realiza la prueba de Mc Master para la detección de huevos. Los huevos de *H. contortus* son muy parecidos a los de otros nematodos, por lo que debe complementarse el diagnóstico con cultivo larvario e identificación de larvas en tercer estadio (Alba, 2007).

Es de gran utilidad efectuar biometría hemática para conocer el estado general del animal y evaluar el efecto parasitario (Cuéllar, 1986). El diagnóstico clínico de la hemoncosis crónica es más difícil porque se puede confundir con una nutrición deficiente o incluso con una fasciolosis crónica (Cuéllar, 1986).

Hay una gran variedad de productos utilizados para el tratamiento de la haemoncosis, pero los más conocidos son los grupos de los bencimidazoles, albendazol, fenbendazol y oxfendazol, todos a razón de 5 mg/kg por vía oral, los probencimidazoles, febantel a una dosis de 6 mg/kg; tiofanato, 50 mg/kg; netobimin, 7.5 mg/kg, por vía oral, imidazol, levamisol, 7.5 mg/kg; por vía subcutánea, las lactonas macrocíclicas, ivermectina, moxidectina y doramectina, todas a razón de 0.2 mg/kg por vía subcutánea y salicilanilida, closantel, 5 mg/kg por vía subcutánea.

La medida de control más utilizada para la hemoncosis consiste en la medicación estratégica (Campos y Herrera, 1992; Fox, 1997; Figueroa y col., 2000; Quiroz, 2003). Aunque se debe de contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos, con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de la infección. Estas medidas deben de ser diseñadas para cada zona, de acuerdo con los sistemas de producción y las condiciones climáticas (Meana y Rojo, 1999). El uso de la rotación de potreros puede ser utilizado en el control de nematodos (Cuéllar, 1986). La separación por edades permite utilizar los potreros con mayor carga de larvas por kg de pasto para los animales adultos, con

mayor resistencia y a los animales jóvenes introducirlos o permitir el acceso a pastos nuevos con menor carga de larvas (Quiroz, 2003).

Otra opción es el uso del sistema FAMACHA. Su nombre viene de las siglas de su ideólogo Francois (FAffa) MAlan CHArt. Es un sistema que identifica clínicamente el desarrollo de anemia en los animales parasitados con *H. contortus*. Este se basa en la coloración de la conjuntiva y es representado en una escala numérica (de 1 a 5) donde 1 y 2, son animales con una infección leve, mientras que animales clasificados con la escala 3, 4 y 5 son animales con infecciones y anemia severas y deben desparasitarse (Van Wyk, 2002; Kaplan y col., 2004).

Una buena nutrición aumenta la resistencia de los ovinos contra la infección por *H. contortus*. La suplementación con proteína estimula la capacidad de algunas razas, más susceptibles, a resistir los efectos patógenos de la infección (Datta y col., 1999; Torres y Aguilar, 2000). El suplemento de minerales como el cobalto y el molibdeno en las dietas, ha demostrado aminorar los efectos de la hemoncosis (Suttle y col., 1992).

Recientemente se están utilizando partículas de óxido de cobre (2.5 ó 5 g por animal) para reducir la infección por *H. contortus* en corderos (Bang y col., 1990; Knox, 2002). Las partículas de cobre pasan del rumen al abomaso, donde se mantiene durante al menos 32 días, aumentan las concentraciones de cobre en el líquido abomasal y posteriormente, pasa a ser reserva en el hígado (Bang y col., 1990; Burke y col., 2004). Esta concentración de cobre soluble crea un entorno que de alguna manera afecta a los gusanos disminuyendo su capacidad de establecimiento en el abomaso facilitando su expulsión (Knox, 2002; Burke y col., 2004).

Para el estudio de los NGE se han puesto en práctica distintos métodos, tanto *in vivo* como *in vitro*, entre estos últimos están los explantes abomasales, una técnica que consiste en mantener al tejido viable y fue desarrollada a partir de características similares a las del cultivo celular y de tejidos.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison, es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales en 1907 (Cultek, 2007). Él fue

el primero que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada. La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows en 1910 empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel (Cultek, 2007).

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos para cultivar células de mamífero, consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión (Cultek, 2007).

El término *explante* es una versión castellanizada del vocablo inglés *explant*; acuñado especialmente para identificar a los tejidos vegetales cultivados *in vitro* y sin otro significado. La selección del explante es un aspecto clave para tener éxito en el cultivo de tejidos, ya que dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra (Pelayo y col., 2009). El explante es cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas), estructuras como las anteras y los ovarios o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas (Pelayo y col., 2009).

Esta técnica ofrece la posibilidad de evaluar tejidos provenientes de animales sacrificados y observar su capacidad de respuesta a una infección. Los primeros trabajos con explantes se realizaron para evaluar la colonización de *Helicobacter pylori* en tejido estomacal de cerdo, demostrando que sólo permanecían viables por 72 horas (Rosberg y col., 1991).

En estudios con animales, Jackson y col. (2004) infectaron corderos y cabritos *in vivo*, para posteriormente desafiar sus explantes abomasales y demostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en el número de larvas de *Teladorsagia circumcincta* asociadas al tejido abomasal. El método también se ha utilizado para demostrar la influencia de la nutrición proteica sobre el establecimiento de las larvas de *T. circumcincta* en tejido abomasal (Jackson y col., 2004).

En 2008, Brunet y col, realizaron otro estudio con el método de cambios directos *in vitro* (IVDC) con una planta rica en taninos *Onobrychis viciifolia* (esparceta), agregando su extracto a los explantes de abomaso realizados, observaron una disminución en la asociación al tejido de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* y *Haemonchus contortus*, a mayor concentración de esparceta fue menor la asociación al tejido abomasal, cuando utilizaron un tratamiento previo de las muestras con polivinil polipirrolidona (PVPP) se inhibió la disminución de asociación provocada por los taninos.

Objetivo.

- Evaluar la técnica *in vitro* de explantes, para conocer la asociación de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en el tejido abomasal de ovinos Blackbelly.

Material y métodos.

Localización.

El trabajo se efectuó en el Módulo de Ovinos de la Unidad de Posgrado y en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, de la FES Cuautitlán de la UNAM, carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5 en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Animales.

Se emplearon cuatro machos de la raza Blackbelly libres de parásitos. Fueron adquiridos en una unidad de producción de pie de cría en estabulación y se mantuvieron en condiciones libres de nematodos gastroentéricos, recibieron alimento comercial seco y agua *ad libitum*.

A su llegada los corderos se mantuvieron por cuatro semanas en recuperación y adaptación, se le hizo un examen coproparasitoscopico con la técnica de Mc Master para confirmar que los animales estuvieran libres de parásitos. Las siguientes seis semanas se les suministroo una dieta al 100% de las necesidades nutricionales según el *National Research Council* (NRC).

Cepa de *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron larvas de una cepa de *H. contortus*, aislada de un rebaño ovino comercial de Jilotepec, Estado de México (Ramírez y col., 2006).

Obtención posmortem de los abomasos.

Los animales se sacrificaron atendiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995: *Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*, la cual señala que se debe insensibilizar al animal utilizando una pistola de perno cautivo y desangrarlos por las arterias carótidas y las venas yugulares. El abdomen se abrió a lo largo de la línea media para la remoción del tracto digestivo.

Técnica de explantes abomasales.

Para la preparación de los explantes abomasales se efectuó la técnica recomendada por Rosberg y col. (1991):

1. Después del sacrificio de los animales se hizo una inmediata remoción del abomaso.
2. Se abrió el abomaso y se retiró el contenido abomasal.
3. La mucosa abomasal se lavó con solución salina fisiológica (0.85% de NaCl) tibia (37° C).
4. Se tomaron tres porciones de las diferentes regiones del abomaso de aproximadamente 2 x 2 cm.
5. Cada porción se colocó en placas de seis pozos con medio de Hanks con 20 mmol L de solución Hepes, 2 ml de rojo de fenol y 1 L de agua destilada con NaOH, pH de 7.6.
6. Con jeringas de 5 ml se hicieron cilindros de aislamiento en el centro el tejido para contener a las larvas.
7. El tejido abomasal se expuso a una dosis de 2,500 L₃ infectantes de *H. contortus*. Dichas larvas fueron sometidas previamente a un proceso de desnudamiento con hipoclorito de sodio.
8. Las placas se colocaron en una incubadora a 38° C.
9. Las muestras se incubaron por tres horas en oscuridad.
10. Después de la incubación los tejidos se lavaron con SSF en tubos de 50 ml.
11. Después las muestras se enjuagaron vigorosamente por inmersión 30 veces en 25 ml de SSF.
12. Posteriormente, los tejidos se digirieron con solución de HCl y pepsina al 1%, a 38°C por 12 horas.

13. El contenido de cada tubo se igualó a 50 ml y se le agregaron 2 ml de iodo helmintológico.
14. Finalmente se realizó el conteo de larvas en un microscopio estereoscópico (100 x), tomando de cada una de las alícuotas el 2% de cada muestra procesada, utilizando rejillas de 55 mm.

Análisis de resultados.

El porcentaje de la población de larvas asociadas con la mucosa se calculó utilizando la fórmula estándar:

$$PA = \frac{LD}{PTL} \times 100$$

Donde:

PA= Porcentaje de larvas asociadas al tejido abomasal.

LD= Número de larvas en tejido abomasal digerido.

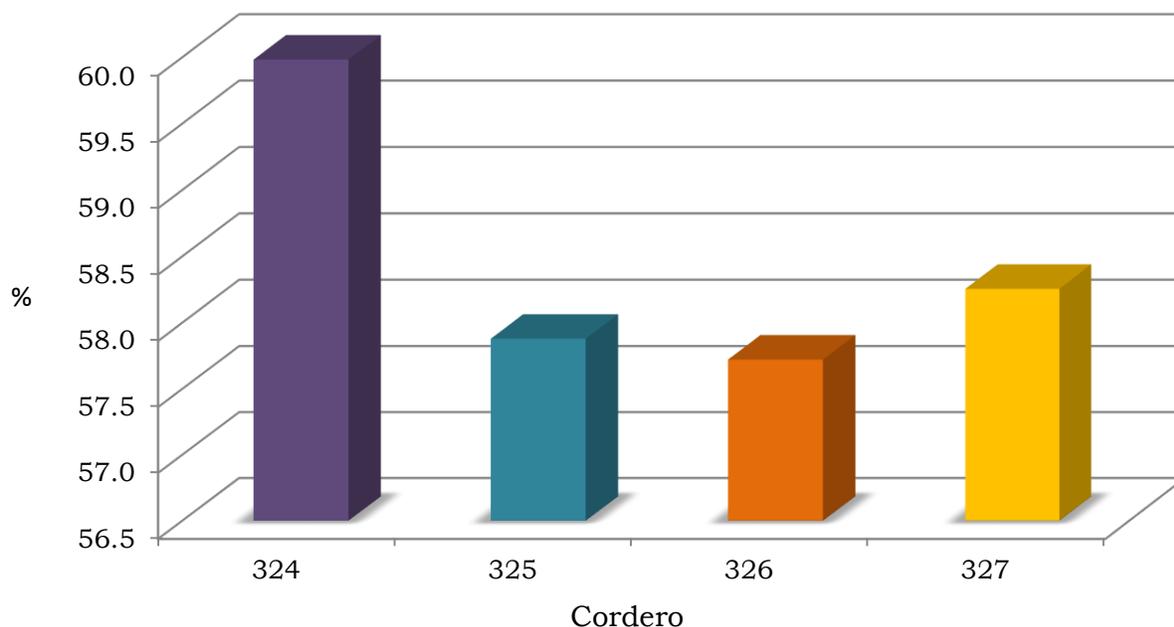
PTL= Población total de larvas, es decir, (número de larvas en enjuague + número de larvas en el lavado + número de larvas en el digerido).

Los resultados se procesaron estadísticamente para la comparación de medias, empleando ANOVA con la prueba de Tukey, por medio de los programas estadísticos Excel y R Statistics (versión 2.15.0, Análisis estadístico para estudios biomédicos y bioinformáticos, 2012).

Resultados.

El porcentaje de larvas de *Haemonchus contortus* que penetraron el tejido abomasal en los explantes fue muy parecido en los cuatro animales y en las tres regiones evaluadas, el PAT osciló entre 55.2 y 60.7% (fig. 1).

Figura 1. Promedio de los porcentaje de asociacion al tejido abomasal por larvas de *Haemonchus contortus* en ovinos.



En el cuadro 1 se exponen los resultados del PAT obtenidos en los ovinos estudiados de acuerdo a las regiones del abomaso en los explantes desafiados con larvas de *H. contortus*. El mayor PAT se observó en la región fúndica con un promedio de 60.1%.

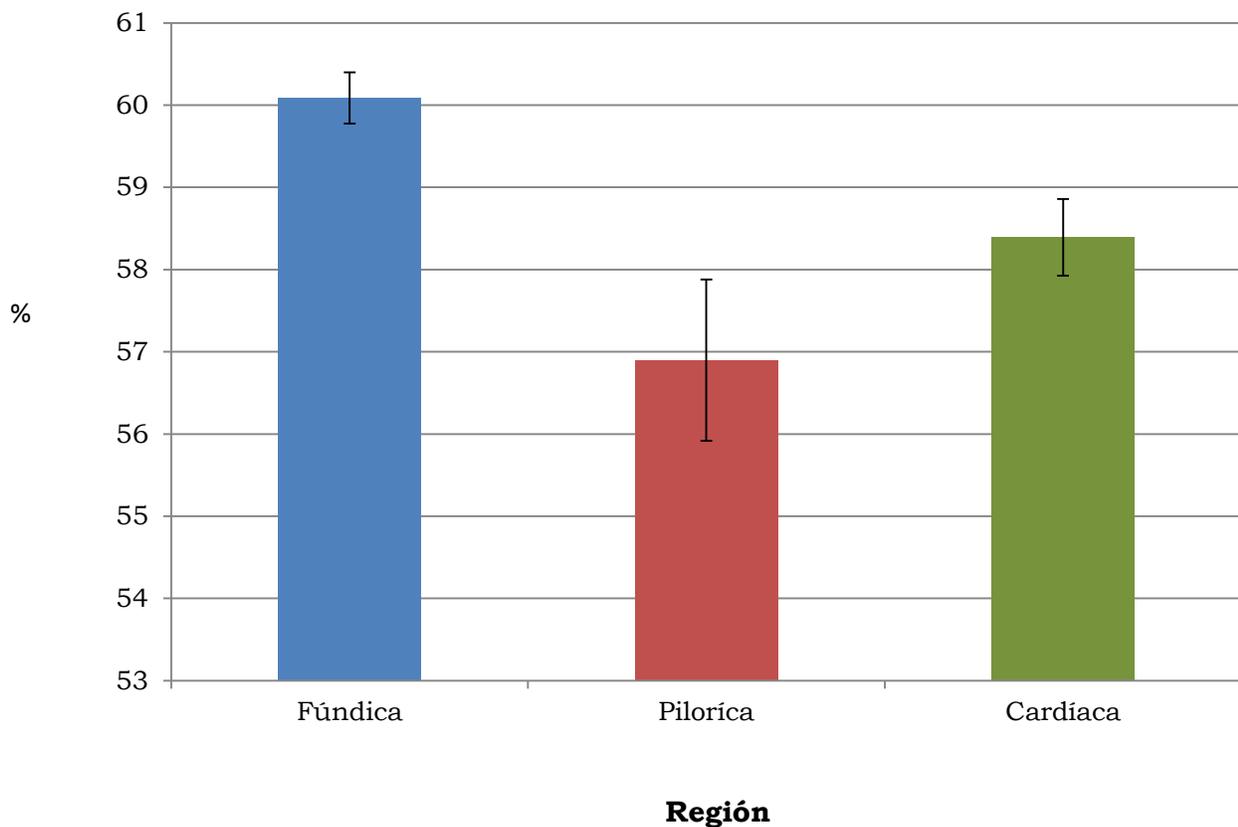
Cuadro 1. Porcentaje de asociación a tejido abomasal de larvas de *Haemonchus contortus* en ovinos.

Animal	Porcentaje de asociación al tejido (PAT)		
	Región cárdica	Región fúndica	Región pilórica
324	59.5%	60.7%	59.7%
325	57.5%	60.3%	55.9%
326	58.7%	59.2%	55.2%
327	57.8%	60.1%	56.8%
Promedio	58.3%	60.1%	56.9%

Existió un menor PAT en las regiones cárdica y pilórica con un promedio de 58.3 y 56.9%, respectivamente (fig. 2).

Sin embargo sólo se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) de PAT al hacer la comparación entre las regiones fúndica y pilórica, mientras que entre las regiones fúndica y cárdica y cárdica y pilórica no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$).

Figura 2. Porcentaje de asociación al tejido de larvas de *Haemonchus contortus* en las región abomasales de ovinos (media \pm error estandar, $p < 0.05$).



Discusión.

En el presente trabajo, la aplicación de la técnica de explantes abomasales, se efectuó de acuerdo a la metodología desarrollada por Jackson y col. (2004) para estudios *in vitro* con nematodos gastroentéricos (NGE) de pequeños rumiantes. En términos generales, los resultados obtenidos en este ensayo fueron coincidentes en algunos puntos con los del trabajo realizado por Jackson y col.

Cuando ocurre una infección natural por las larvas de *H. contortus*, éstas se establecen primordialmente en la mucosa de la región fúndica del abomaso y en menor cantidad en la región pilórica (Dash, 1985; Meana y Rojo, 1999), esto coincide con los resultados obtenidos en esta prueba *in vitro*, donde se observó que el mayor porcentaje de asociación al tejido (PAT) ocurrió en la región fúndica, seguida de la cárdica; la región pilórica fue donde penetró un menor proporción de larvas ($p < 0.05$). En contraste, Jackson y col. (2004), detectaron un mayor porcentaje de asociación en la región pilórica, en relación a la fúndica, sin embargo, ellos efectuaron sus ensayos con *Teladorsagia circumcincta*, nematodo que en una infección natural tiene predilección por alojarse en el área antropilórica del abomaso de los ovinos (Meana y Rojo, 1999).

La técnica resultó eficaz para evaluar la asociación de las larvas de *H. contortus* al tejido abomasal de los ovinos, lo cual era el propósito de este trabajo, pero puede emplearse para otro tipo de ensayos, se ha utilizado para la evaluación de toxinas, por ejemplo, lo realizado por Brunet y col. (2008) quienes estudiaron el efecto de los taninos condensados de vegetales sobre la asociación de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* y *H. contortus* a explantes abomasales.

Una ventaja adicional que ofrece el uso de explantes, es que se pueden realizar experimentaciones con los tejidos de un sólo animal, en contraste a los ensayos *in vivo* donde se utilizan varios animales. De un abomaso se pueden obtener varios explantes, sin embargo, no debe olvidarse que siempre se puede encontrar variación entre animales (Brunet y col., 2008). De igual forma, se ha demostrado que el tiempo en que ocurre la implantación de las larvas se reduce en comparación a la inoculación *in vivo* mediante cánula (Jackson y col., 2004).

Una limitante de la técnica de explantes es que sólo puede ser evaluada para las fases larvarias que penetran a la mucosa abomasal, sin embargo, por su escaso tiempo de viabilidad, resulta dificultosa para las fases evolutivas subsecuentes. En ese sentido, Rosberg y col. (1991), que trabajaron con explantes de estomago de cerdo, demostraron que los explantes cuentan con una viabilidad de tan sólo 72 horas, tiempo insuficiente, de acuerdo al ciclo biológico de *H. contortus*, para lograr el desarrollo de larva L₃ infectante a adulto que dura unos 20 días *in vivo* (Meana y Rojo, 1999).

Es importante mencionar que la raza de los animales utilizados, la Blackbelly, ha demostrado ser resistente a la infección por *H. contortus*, y se ha demostrado que después de un desafío con 6,000 larvas infectantes de ese nematodo ocurre una muy baja implantación de fases adultas (0.9%), en comparación con una raza susceptible como la Columbia, donde se implantan hasta el 39.5% de adultos (Cuenca y Cuenca, 2005), esto hace suponer que en las razas resistentes existen mecanismos activos o inmunes que afectan el desarrollo entre las larvas de tercer estadio y los adultos. Los mecanismos de resistencia dependen de las respuestas inmunitarias adquiridas tras el contacto con los parásitos y de la capacidad fisiológica innata de los animales para adaptarse a la infección. La inmunidad frente a los nematodos gastrointestinales es dependiente directamente de la respuesta celular de linfocitos T, incluye importantes alteraciones inflamatorias en la mucosa, y también se ve facilitada por la presencia de anticuerpos específicos frente a los parásitos (Meana y Rojo, 1999), este es otro de los puntos importantes que pueden ser investigados con mayor profundidad auxiliados por esta técnica, ya que aún existen puntos desconocidos en cuanto a la respuesta inmune y resistencia de algunas razas contra este tipo de parásitos hay evidencia de que en los explantes aun se puede observar respuesta celular hacia los parásitos (Jackson y col., 2004).

Conclusiones.

La técnica de explantes abomasales mostró ser eficaz para evaluar la asociación de larvas L-3 infectantes de *Haemonchus contortus* sobre el tejido abomasal de ovinos de la raza Blackbelly, los resultados demostraron un alto porcentaje (cerca del 60%) de larvas asociadas en el tejido.

El mayor porcentaje de asociación al tejido ocurrió en la región fúndica, seguida de la cárdica; en la región pilórica fue donde penetró una menor proporción de larvas.

La técnica de explantes abomasales tiene un gran potencial para investigaciones que expliquen o modifiquen el establecimiento de las larvas de *H. contortus* en la mucosa abomasal de ovinos.

Bibliografía.

- Alba HF.** Parasitología veterinaria. Manual de Laboratorio. UNAM. 2007.
- Bang KS, Familton AS, Sykes AR.** Effect of copper particles treatment on establishment of major gastrointestinal nematodes in lambs. Res. Vet. Sci. 49: 132-137. 1990
- Blitz NM, Gibbs HC.** An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep. Can J. Comp, Med, 35: 178-180. 1971.
- Blood DC, Radostitis OM, Henderson JA, Arundel IH, Gay CC.** Medicina Veterinaria, Nueva Editorial Interamericana 7^a edición. México. 1986.
- Borke JM, Miller JE, Olcott DD, Olcott BM, Terril TH.** Effect of copper oxide were particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* control infection in lambs. Vet. Parasitol. 123: 235-243. 2004.
- Bowman D.** Parasitología para veterinarios 8^a edición. Saunders Elsevier España. 2004.
- Brunet S, Jackson F, Hoste H.** Effects of Sainfoin (*Onobrychis Viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. Int. J. Parasitol, 38:783-90 2008.
- Campos R, Herrera RD, Quiróz RH.** Diagnostico *in vivo* de *Haemonchus contortus* resistente a Alvendazol, Febendazol y Febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. Vet. Mex. 23:51-56; 1992.
- Coop RL, Sykes RL.** Interactions between gastrointestinal parasites and nutrition. In Freer m: Dove H. (Eds) heep nutrition, Willingford: CABI International, 2002.

Cuéllar OJA. Nematodiasis gastroenterica, principales enfermedades de ovinos y caprinos. Editoriales Pijan A.C. Tortora PJ, UNAM. México, 112-118, 1986.

Cuéllar OJA. Epidemiología de la helmintiasis del aparato digestivo y respiratorio en ovinos y caprinos. Memorias del curso: Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo Morelia (Michoacn). 1992.

Cuéllar OJA. La resistencia a antihelminticos y métodos para reducir su presencia en los sistemas ovinos tropicales. Memorias del segundo seminario de producción intensiva de ovinos. Universidad Autonoma de Tabasco Villahermosa, Tabasco. 2003.

Cuenca VC, Cuenca VNM. Comparación de la cantidad, tamaño, y prolificidad de fases adultas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Blackbelly (Tesis licenciatura). México: UNAM, 2005.

Cultek (Tecnología para cultivos celulares). 100 años de cultivos celulares. Grupo Cultek, S.L. 2007. (http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf).

Dash, KM. Distribution of trichostrongylid nematodes in the abomasum of sheep. Int. J. Parasitol. 15 51: 505-510. 1985.

Datta FU, Nolan JV, Rowe JB, Grey GD. Long-Term of short-term provision of protein enriched diets or resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. Int. J. Parasitol. 23 : 479-488; 1989.

Dunn MA. Helminotlogía Veterinaria. Editorial El Manial Moderno, México, 1983.

Figuroa CJA, Mendez MRD, Berruecos VJM, Álvarez LJA. Detección de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfoxido de Albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. Vet. Mex. 31: 309-313; 2000.

Fox, MT. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Rec. Dev. Vet. Parasitol. 72: 285-308; 1997.

Gómez MMT, Cuquerella M, Gómez ILA, Méndez S, Fernández PFJ, De la Fuente C, Alunda JM. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. Vet. Parasitol. 81: 281-293; 1999.

Jackson F, Greer A.W, Huntley J, McAnulty R.W, Bartley D.J, Stanley A, Stenhouse L, Stankiewicz M. and Sykes A.R. Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an *in vitro* direct challenge method using abomasal tissue explant, *Vet. Parasitol.* 124:73-89. 2004

Jubb KVF, Kennedy CP. Patología de los animales domesticos, Vol. 3. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 1990.

Kaplan RM. Drug resistant in nematode of veterinary importance: a status report. Trends Parasitology 20: 477-481; 2004.

Knox MR. Effects of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. Aust. Vet. J. 80 (4): 224-227; 2002.

Lapage, G. Parasitología Veterinaria, 5ª edición. Compañía Editorial Continental. Londres Inglaterra. 1979.

Le Jambre LF. Relationship of blood loss to worm's number, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. Int. J Parasitol. 25:269-273; 2000.

Martin WB, Aitken ID. Enfermedades de la oveja. Acribia. España. 2000.

Mc Gavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 5ª edición. St. Louis, Missouri, USA. 2012.

Meana MA, Rojo UFA. Parasitología veterinaria. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. 1999.

Miller JE, Bahirathan M, Lemaria SL, Hembry FG, Kearney MT, Barras SR. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and golf coast native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 74: 55-74; 1998.

Norman DL. Tratado de parasitología veterinaria. Acribia. Zaragoza, España. 1978.

Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domesticos. Limusa. México. 2003.

Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KOV. Enfermedades causadas por parasitos helmintos. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª edición. McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. 2002.

Ramírez L, Hernández F, Silva R, Valdivia G, Cuéllar A. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino en México. Memorias del XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 2006 septiembre 6-8; Santiago, Chile. Colegio Médico Veterinario de Chile y Asociación de Facultades y Escuelas de Medicina Veterinaria de Chile, 2006.

Rosberg K, Hubinette R, Nygard G, Berglindh T, Rolfsen W. Studies of Helicobacter Pylori in a gastric-mucosae *in vitro* animal-model, Scand J. Gastroenterol. 26:43-8, 1991

Simpson A, Lawton O.E, Effects of adults and larval *Haemonchus contortus* in abomasal secretion. Int. J. Parasitol. 27: 825-831. 1997.

Soulsby E.JL. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domesticos, 7ª edición. Editorial Interamericana. México, 1988.

Suttle NF, Knox KW, Angos K, Jackson F, Cooper RL. Effects of dietary molybdenum on nematode and host during *Haemonchus contortus* infection in lambs. Res. Vet. Sc. 52: 230-235. 1992.

Torres AJFJ, Aguilar CA. Nematodos gastrointestinales de caprinos y ovinos en el tropico: Control integral. Notas del curso “Medicina y enfermedades infecciosas de pequeños rumiantes en el tropico”, México, 2000.

Urquhart GM, Amour J, Duncan JL, Dunn MM, Jennings FW. Parasitología Veterinaria. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. 2001.

Van Wyk JA, Van der Merwe JS, Vorster RJ, Viljoen PG. Anthelmintic resistance in South Africa; surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. Onderstepoort J. Vet. Res. 66: 273-284. 2002.

Velázquez PVM. Agentes etiológicos y ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales. Primer curso internacional “nuevas perspectivas en el diagnostico y control de la nematodiasis gastrointestinales en pequeños rumiantes”. Universidad Autonoma de Yucatan. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Merida Yucatan. 2000.
