

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Correlación de Mastocitos Abomasales y Subpoblaciones Linfocitarias en Ovinos Blackbelly y Columbia Inoculados Experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

T E S I S

Para obtener el título de **Médico Veterinario Zootecnista**.

P R E S E N T A
RÓMULO DOMINGUEZ MARTINEZ

ASESOR: M.C. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMAN
COASESOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.

2007



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.

INDICE

Resumen.....	3
Abreviaturas	5
Introducción.....	6
Clasificación taxonómica	7
Morfología	7
Ciclo Biológico.....	8
Epidemiología.....	10
Patogenía	12
Signos clínicos	13
Lesiones.....	14
Respuesta inmunológica.....	15
Diagnóstico.....	17
Control de la hemoncosis ovina	17
Resistencia a la hemoncosis	19
Resistencia a los antihelmínticos.....	20
Razas ovinas	21
Justificación	22
Objetivos.....	24
Hipótesis.....	25
Material y métodos.....	26
Resultados.....	32
Discusión.....	44
Conclusiones.....	48
Bibliografía.....	50

RESUMEN

En la actualidad se realizan trabajos para encontrar razas o líneas de ovinos que presenten resistencia natural a los nematodos gastrointestinales (**NGI**) para su control y eliminación, buscando sistemas menos dependientes de los antihelmínticos. En el presente trabajo se evaluó la correlación de la resistencia a la hemoncosis con el número de mastocitos tisulares y las subpoblaciones linfocitarias ($CD4^+$, $CD8^+$ y gamma-delta ($\gamma\delta^+$), presentes en el abomaso y el nódulo linfático de corderos de las razas Blackbelly (**Bb**) y Columbia (**Cb**) infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron 30 corderos de 6 a 8 meses de edad que se dividieron en cuatro grupos. El grupo 1 (n=10) y 2 (n=5) estuvieron formados por corderos de la raza Bb. El grupo 3 (n=10) y 4 (n=5) se formó con los corderos Cb. Los corderos de los grupos 1 y 3 semanalmente se inocularon con 1000 L3 de *H. contortus* durante seis semanas, y los corderos de los grupos 2 y 4 se utilizaron como grupos control.

Por 15 semanas se tomaron muestras de materia fecal para evaluar la eliminación de huevos, posteriormente todos los animales fueron sacrificados. Se tomaron muestras de las regiones fúndica, pilórica y linfonodo abomasal para la elaboración de los cortes histológicos. Para el conteo de mastocitos se realizaron cortes en parafina teñidos con azul de toluidina. Para la determinación de los linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$ y $WC1^+$ ($\gamma\delta$), se realizaron cortes en congelación procesados para inmunohistoquímica con el sistema biotina avidina peroxidada, y para la detección de cada marcador se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- $CD4^+$, anti- $CD8^+$ y anti- $WC1^+$. Para los mastocitos como para los linfocitos T se elaboró un registro del número de células en cada uno de los campos, así como el área del tejido analizado en μm^2 y las cuentas expresadas en cantidades totales de células por cm^2 de tejido.

Los resultados mostraron correlaciones positivas significativas entre los linfocitos $CD4^+$ y los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) en la región pilórica. El mayor número de estas

subpoblaciones, se presentaron en los grupos infectados en relación con su grupo control. Sin embargo la raza Bb mostró un mayor número de estas subpoblaciones en comparación con la raza Cb y entre región y región hubo mayor presencia celular de estas subpoblaciones en la región pilórica en relación con la región fúndica.

Las correlaciones negativas significativas se presentaron a nivel de la región pilórica entre: los linfocitos $CD4^+$ y huevos por gramo de heces (**hgh**), entre $CD4^+$ y fases adultas (**FA**) y entre los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) y hgh. Estos resultados sugieren que estas subpoblaciones están directamente relacionadas con la resistencia a NGI.

ABREVIATURAS:

Bb	Blackbelly
Cb	Columbia
hgh	Huevos por gramo de heces.
Fa	Fases adultas
NGE	Nemátodos gastroentéricos
FAMACHA ..	Clinical identification of developing anemia
RFA	Región fúndica abomasal
RPA	Región pilórica abomasal
LA	Linfonodo abomasal
PI	Posinfección
pH	Potencial de hidrogeniones

INTRODUCCIÓN

La verminosis gastroentérica es el principal problema sanitario de los pequeños rumiantes, repercute en la producción y ocasiona pérdidas económicas relevantes en todo el mundo (Chandrawathani *et al.*, 1999; Vázquez, 2000). El mayor impacto económico se observa en los sistemas de producción en pastoreo especialmente en los países tropicales (George & Quiróz, 1993) y de climas cálidos, (Gaxiola *et al.*, 1996) en los que existen abundantes lluvias durante el verano (Radostits *et al.*, 2002). Esta enfermedad, es producida por nematodos de varios géneros que interaccionan en el tracto digestivo de los rumiantes y traen como consecuencia importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Los nematodos gastroentéricos NGE más frecuentes en los ovinos de México, son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia spp.*, *Strongyloides papillosus.*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, y *Trichuris ovis*. (Quiroz, 1986).

En México se han descrito prácticamente todos los géneros de NGE que afectan al abomaso, intestino delgado, ciego y colon de los rumiantes. No obstante eso, el género más frecuente y abundante en casi todos los ecosistemas del país es *H. contortus* (Cuéllar, 2003). Este parásito se localiza en abomaso y está ampliamente distribuido en México y está presente todo el año en las pasturas (Liébano *et al.*, 1992). *H. contortus* es uno de los NGE más virulentos, causa alta mortalidad y reduce la producción y rentabilidad de las explotaciones (Morteo *et al.*, 2004). Las pérdidas más importantes se producen en los corderos, especialmente en aquellos recién destetados (Radostits *et al.*, 2002).

CLASIFICACIÓN TAXONOMICA DE *Haemonchus contortus* (Urquhart *et al.*, 2001)

Reino: Animalia

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Strongylida

Superfamilia: Trichostrongyloidea

Familia: Trichostrongylidae

Género: *Haemonchus*

Especie: *contortus*

Son sinónimos de *Haemonchus contortus* el gran gusano del estómago de los rumiantes, gusano del cuajar de los rumiantes (Soulsby, 1987) y gusano poste de barbero (Lapage, 1981, Donald y Willians, 2001).

Morfología

La parte anterior es muy delgada y presentan un orificio bucal y una lanceta que se origina en el lado dorsal de la base (Quiroz, 2003). La lanceta permite a estos parásitos erosionar la mucosa del abomaso (Lapage, 1981). Los machos adultos tienen un color rojo uniforme en todo el cuerpo, miden de 10 a 20 mm., tienen un rayo dorsal asimétrico en la bursa copuladora en forma de Y invertida (Quiroz, 2003). Las espículas tienen forma de cuna y miden de 0.46 a 0.506 mm de longitud (Soulsby, 1987). Las hembras son más grandes, miden de 18 hasta 30 mm. de longitud, la vulva está localizada a una distancia de la cola equivalente a un cuarto de la longitud del cuerpo y está cubierta por una protuberancia llamada labio vulvar. El útero es blanco y está lleno de huevos. El útero está enrollado alrededor del intestino, lo que le da la apariencia de un palo de barbería. Los huevos son ovales e incoloros, tienen un cascarón delgado, miden de 70 a 85 μm de largo y de 41 a 48 μm de ancho, cuando son eliminados presentan de 8 a 16 blastómeros (Soulsby, 1987).

Ciclo biológico

El ciclo biológico siempre es directo y el huésped se infecta al ingerir larvas 3 junto con el pasto. El ciclo se divide en una fase no parásita fuera del huésped y otra parásita en el interior. En el abomaso del huésped los machos y las hembras copulan. Las hembras fecundadas producen de 5,000 a 10,000 huevos al día. Los huevos son eliminados en la materia fecal contaminando los pastizales, en los cuales se desarrollan tres etapas larvianas no parásitas (Dwight, 2004; Lapage, 1981; Quiroz, 2003). Las larvas en fase L1 se desarrollan y eclosionan del huevo uno o dos días después de que fueron eliminadas. Al completar su crecimiento muda de epidermis (primera ecdisis) para convertirse en una larva de fase L2. Tanto la L1 como la L2 permanecen cerca de las heces donde se alimentan de bacterias y esporas de hongos del medio donde se encuentran (Cordero *et al.*, 2000; Lapage, 1976).

En la segunda muda (segunda ecdisis) se conserva temporalmente la cutícula de la fase L2 como una vaina protectora sobre la larva de fase L3 infestante y no se desprende de ella hasta que encuentra al hospedador adecuado (Dwight, 2004). Por lo tanto esta L3 no puede alimentarse y se mantiene de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1981).

El desarrollo y supervivencia de las larvas en los pastos depende de las condiciones climáticas y micrometeorológicas, tipo de suelo, terreno, naturaleza y cantidad de vegetación (Norman, 1978). Las L3 de *H. contortus* no resisten la desecación ni las bajas temperaturas (Soulsby, 1988). En condiciones adecuadas el desarrollo de la L3 se alcanza de 4 a 7 días después de la eliminación en materia fecal (Lapage, 1976). Esta tercera larva es la fase infestante. La primera y segunda larva no pueden infestar a un nuevo huésped y si son ingeridas por algún animal serán digeridas (Lapage, 1981).

La infección se produce cuando estas larvas envainadas son ingeridas por los ovinos al pastar (Bowman, 2004). En el rumen, la larva emerge de la cubierta para transformarse en la larva tres (L3) infestante y se vuelve parásita en el abomaso del huésped.

Una vez que la larva infestante se ha liberado, pasa hacia el abomaso y entra en una fase del ciclo biológico llamada fase tisular o histotrópica, durante la cual, la L3 penetra a las criptas glandulares gástricas. *H. contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Maena y Rojo, 1999). La L3 en la mucosa se alimenta de sangre, crece y muda a L4, esta también crece e ingiere sangre, sale de la mucosa a la luz abomasal y muda a larva L5 o preadulto (Norman, 1978; Maena y Rojo, 1999). Esta quinta larva se desarrolla directamente, sin ecdisis hasta transformarse en el gusano adulto, macho o hembra (Lapage, 1981). Después de la cópula las hembras comienzan a producir huevos cerrando el ciclo (Maena y Rojo, 1999).

Durante el ciclo de vida de *H. contortus* se puede producir un fenómeno de adaptación denominado hipobiosis, consistente en la suspensión temporal y facultativa de su desarrollo (Cordero *et al.*, 2000). Influenciadas por situaciones climáticas o ecológicas adversas, como los inviernos de las regiones templadas o la estación seca en algunos climas tropicales, algunas larvas de *H. contortus* entran en hipobiosis (Radostits *et al.*, 2002). El periodo de hipobiosis o desarrollo larvario tisular en letargo temporal, tiene un papel muy importante en la epidemiología, ya que permite al parásito sobrevivir en la mucosa abomasal del hospedador como L4 inhibida o hipobiótica, durante el periodo o la estación en las que las condiciones climáticas o ambientales no son favorables para el desarrollo de los estados evolutivos fuera del huésped. Reiniciando su desarrollo hasta que algún estímulo relacionado con la llegada de la primavera, el ciclo reproductor (por la relajación de la respuesta inmune alrededor del parto) o el inicio de las estaciones lluviosas presenten condiciones favorables para completar su ciclo (Armour, 1980; Quiroz, 2003; Bowman, 2004). En ausencia de hipobiosis el periodo de prepatencia es de 15 a 20 días (Soulsby, 1988 y Maena y Rojo 1999).

Epidemiología.

La epidemiología de *H. contortus* va a ser diferente dependiendo de que se presente en áreas tropicales y subtropicales o en zonas templadas (Urguhart *et al.*, 2001). La epidemiología de la hemoncosis está condicionada principalmente por la elevada fecundidad de las hembras y por la velocidad a la que las larvas infestantes pueden desarrollarse en condiciones cálidas y de humedad, por lo tanto, cuando las condiciones son favorables, se pueden acumular una gran cantidad de larvas infestantes 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 *et al.*, 2002)

El desarrollo larvario óptimo de *H. contortus* se produce a temperaturas relativamente elevadas por lo que la hemoncosis es una enfermedad del ganado ovino en climas templados y cálidos. Sin embargo, la humedad que se mantiene en el interior de las heces y la vegetación es también esencial para la supervivencia de las larvas y su desarrollo, por lo que la frecuencia y la gravedad de los brotes de la enfermedad están muy ligados a las lluvias en una zona concreta (Urguhart *et al.*, 2001). En algunas áreas tropicales y subtropicales, la supervivencia de los parásitos está también asociada con la capacidad de hipobiosis de las larvas de *H. contortus*.

En las áreas templadas la epidemiología de *H. contortus* es diferente a la de las zonas tropicales. En zonas templadas las infecciones se desarrollan en dos sentidos, posiblemente el más común es el ciclo sencillo anual. Las larvas infestantes que se han desarrollado de los huevos depositados en la primavera son ingeridas por las ovejas y los corderos al principio del verano. La mayoría de ellas se inhiben en el abomaso como L4 y no completan su desarrollo hasta la primavera siguiente. Los signos clínicos de la hemoncosis aguda se producen durante el periodo de maduración de las larvas hipobióticas y en las ovejas suelen coincidir con los partos (Urguhart *et al.*, 2001).

La infestación ocurre por la ingestión de las larvas por los animales susceptibles y la enfermedad se puede presentar de forma hiperaguda, aguda y crónica dependiendo de la inmunidad del hospedador, su resistencia natural, número de larvas ingeridas, condición de

macro y microclima, tipo de suelo, naturaleza de la vegetación, grado de población, número de rumiantes silvestres y otros huéspedes que pastorean en el mismo potrero. La fuente de infestación está representada por los animales parasitados que eliminan huevos en las heces. (Norman, 1978)

Las causas predisponentes de la enfermedad son la sobrecarga de pastoreo, pastos suculentos, climas húmedos y cálidos. Además existen otros factores propios del hospedador, entre los que se encuentran: raza, estado nutricional y el estado fisiológico (Bowman *et al.*, 2004). Otro aspecto importante entre los factores ambientales es la hora del día en que pastorean, siendo más peligroso el pastoreo por las mañanas ya que la presencia de rocío facilita que se ingieran cantidades masivas de larvas que desarrollan cuadros clínicos de nematodiasis gastroentérica (Cuéllar, 1992).

El factor racial es determinante en la severidad de la hemoncosis, los animales nativos o genéricamente llamados criollos, resisten más las infecciones parasitarias en comparación con los animales de razas puras o exóticas (Cuéllar, 1992). Existen razas de ovinos que han demostrado resistencia natural a la hemoncosis, entre estas se encuentran: la Blackbelly (Yazwinki *et al.*, 1976), Florida (Torres *et al.*, 1994), Red masai (Mugambi *et al.*, 1996), Nali (Singh *et al.*, 1997).

El estado nutricional del hospedador puede determinar el establecimiento y desarrollo de los parásitos además del curso de la infección (Cordero, 2000). Los animales subnutridos que consumen raciones muy bajas en proteína cruda, de menos del 3% son más susceptibles a infestaciones masivas, en relación con aquellos que mantienen óptimas condiciones nutricionales, cuya base está en la cantidad y calidad del alimento consumido, en especial en lo referente a proteína. (Cuellar, 1992, Radostits *et al.*, 2002).

Existe un aumento considerable en el número de huevos eliminados por las ovejas entre las cuatro y ocho semanas después del parto, a este fenómeno se le ha denominado, alza posparto o alza lactacional. En realidad existen dos aumentos que en general coinciden el tiempo, uno el lactacional en las hembras en tiempo de secas y el de primavera que se

presenta en menor intensidad. Las causas del aumento lactacional y de primavera son el aumento de la fertilidad del gusano y su número en el tracto digestivo (Soulsby, 1984).

Patogenia

El parásito afecta principalmente la mucosa del abomaso causando importantes cambios estructurales, en las glándulas gástricas, distensión local, histólisis y pérdida de células parietales (Martín y Artken, 2000). Las células parietales (productoras de ácido clorhídrico) y las cimogénicas o principales (productoras de pepsinógeno) son remplazadas por células no diferenciadas y no funcionales dando lugar a una disminución en su secreción. El incremento del pH abomasal está relacionado con la reducción en el número de células parietales fúndicas, repercutiendo negativamente en la digestión al disminuir la conversión de la proenzima pepsinógeno a su forma activa pepsina, que resulta en una incompleta digestión de las proteínas. Se pierde el efecto bacteriostático del pH. bajo, por lo que aumenta el número de bacterias. También aumenta la síntesis de gastrina que va asociada al aumento de la contractibilidad del cuajar y del peristaltismo intestinal. El resultado final es que el proceso digestivo se altera considerablemente (Kassai, 2002). Por otro lado, se altera la unión entre las células, que permite la salida de proteínas endógena a la luz abomasal y posteriormente a la luz intestinal (Soulby, 1987).

La anemia de la hemoncosis aguda se desarrolla en tres etapas, en la primera (las tres primeras semanas iniciales de la infección) hay una baja progresiva del volumen celular que se debe a que el sistema hematopoyético del animal tarda en reaccionar, pero el nivel del hierro sérico se mantiene normal. En la etapa intermedia: el volumen de las células empacadas disminuye y la hemorragia profusa del abomaso más la eritropoyesis compensatoria, baja los niveles del hierro sérico en forma alarmante. En la tercera y última etapa, el volumen celular y los niveles de hierro sérico decrecen en forma espectacular, debido a la pérdida continua de hierro, proteínas al interior del tracto gastrointestinal y a la anorexia, la médula se agota produciendo nuevos descensos del hematocrito al detenerse la eritropoyesis. (Dunn, 1983).

Los signos clínicos de la infección no son característicos y suelen pasar inadvertidos, sin embargo, cuando la carga parasitaria es alta se caracteriza por producir un síndrome de mala absorción, anemia, con palidez de las membranas mucosas, hiperpnea y taquicardia (Martín y Artken, 2000 Schallig, 2000). La pérdida de proteína plasmática provoca anasarca, que se manifiesta en forma de edema submandibular (Dwight, 2004).

El gusano adulto se alimenta de sangre pudiendo causar anemias muy severas, un pobre desarrollo, pérdida de peso y en una infección severa puede ocurrir la muerte (Schallig, 2000). Por cada gusano en el abomaso se pierden aproximadamente 0.05 ml. de sangre al día, tanto por lo que ingiere el parásito, como por lo que se pierde al sangrar la herida (Urguhart *et al.*, 2001).

Signos clínicos

La enfermedad se puede presentar en tres formas: hiperaguda, aguda y crónica.

La hemoncosis hiperaguda: se presenta muy rara vez, se debe a la ingestión de grandes cantidades de larvas, decenas de miles de parásitos atacan simultáneamente y el animal pierde tanta sangre, que puede morir en una semana. En muchos casos la muerte es repentina y no se observan signos preliminares. En otros, solo se aprecia una anemia extrema y las heces son de color casi negro con sangre. (Dunn, 1983).

Hemoncosis aguda: Se observa en animales de todas las edades muestran anemia a las dos semanas post-infección (**PI**) y se caracteriza por la progresiva y marcada caída del valor del hematocrito, edema submandibular, facial y abdominal, pérdida de la condición de la lana, heces oscuras, los corderos jóvenes muestran con rapidez debilidad y entran en estado de letargo. Se produce una hipoproteinemia, hipoalbuminemia y la morbilidad se eleva. Las hembras sufren de agalactia, por lo que los corderos mueren de desnutrición. (Dunn, 1983, Martín y Artken, 2000., Urguhart *et al.*, 2001).

En la **hemoncosis crónica** no aparecen los signos clínicos carenciales clásicos de la enfermedad, las ovejas se vuelven improductivas y muy delgadas, aparentando

una situación de malnutrición, con pérdida progresiva de peso y caída de la lana en los animales adultos y falta de crecimiento en los corderos, el sistema eritropoyético es capaz de compensar y mantener los efectos fuera de los límites letales. En casos intensos hay letargo, debilidad y anorexia (Dunn, 1983, Martin y Artken, 2000).

Lesiones

Entre los hallazgos macroscópicos a la necropsia se incluyen: anemia grave, atrofia serosa de los depósitos grasos, anasarca generalizada y la presencia de un gran número de *H. contortus* adultos, fácilmente visibles en el abomaso, los gusanos pueden estar aún adheridos o encontrarse libres en la ingesta. La pared del abomaso se encuentra hiperémica y en la mucosa pueden presentarse coágulos de sangre. El contenido suele tener un color café característico debido a la presencia de sangre digerida. Al salir las primeras larvas 17, 21 y 35 días PI se aprecian alteraciones en las glándulas circundantes a las parasitadas. La salida del parásito produce lisis en las células epiteliales del cuello de las glándulas, estimulando la rápida división celular con marcada hiperplasia, con engrosamiento de la mucosa, edema y aumento de células plasmáticas (Kassai, 2002). En la hemoncosis hiperaguda el abomaso presenta una gastritis hemorrágica con petequias y erosión, en toda la mucosa abomasal.

En la presentación aguda la canal se observa pálida, con ascitis e hidropericardio, la sangre es de consistencia acuosa y el hígado se observa pálido y friable. Generalmente se forma una gruesa capa de moco sobre la superficie del epitelio abomasal, así como erosiones o laceraciones locales con hemorragias de los capilares superficiales. Al corte de huesos largos se presenta expansión de la médula roja a toda la cavidad medular y en las fases finales de la enfermedad se extiende hasta la epifisis de los huesos largos (Dunn, 1983, Martin y Artken, 2000). Microscópicamente, hay hipertrofia de la mucosa.

En la hemoncosis crónica se presenta hemaciación y signos de desnutrición pero el número de parásitos es bajo. Las manifestaciones clínicas en las ovejas son la desnutrición, con pérdida progresiva de peso y caída de lana y en los corderos y falta de crecimiento. En este estado, el sistema eritropoyético del animal es hasta cierto punto capaz

de compensar y mantener los efectos de los parásitos fuera de los límites letales (Dunn, 1983).

Respuesta inmunológica.

Inmunidad.

La función primordial de la respuesta inmune es promover la expulsión de los vermes adultos y de sus larvas y prevenir las reinfecciones. El tamaño de los nematodos (adultos o larvas), impide que sean destruidos por la acción directa de los anticuerpos o de las células fagocitarias. (Cordero *et al.*, 2000). En las infecciones parasitarias de mucosas se presentan respuestas inmunes e inflamatorias locales exclusivas, esto significa que el sistema inmune de la mucosas actúa independientemente del sistema general. (Bautista, 1990). El principal mecanismo efector implica la actividad de células citotóxicas, cuya acción es mediada por anticuerpos que a su vez se unen a eosinófilos y otras células que destruyen a los parásitos con sus secreciones. El aumento de IgE se atribuye a la capacidad de los helmintos en general y de los nematodos en particular, para estimular específicamente linfocitos CD4⁺ Th2 que segregan IL-4 e IL-5. (Cordero *et al.*, 2000).

Experimentos *in vitro*, sugieren que la citotoxicidad dependiente de IgE mediada por eosinófilos, puede ser particularmente efectiva, ya que la proteína básica principal de los gránulos de los eosinófilos, puede ser más tóxica para los gusanos, que las enzimas proteolíticas y que los radicales libres producidos por neutrófilos y macrófagos (Cordero *et al.*, 2000).

Respuesta Mediada por Células

Los linfocitos T cumplen dos funciones efectoras: producción de citocinas reguladoras de la respuesta inmune y actividad citotóxica (James, 2004). Los linfocitos de las ovejas infestadas por *H. contortus* liberan citocinas y experimentan blastogénesis en respuesta a los antígenos del gusano.

Los linfocitos T sensibilizados deprimen las actividades de los helmintos por dos mecanismos: en primer lugar desarrollan una reacción inflamatoria del tipo de hipersensibilidad tipo I, la cual tiende a atraer a las células mononucleares y a los eosinófilos al lugar de la invasión larvaria, en el segundo mecanismo, los linfocitos citotóxicos pueden ser capaces de destruir a las larvas. (Tizard, 1996)

H. contortus en el abomaso secreta antígenos, los cuales actúan como alérgenos, teniendo como consecuencia una reacción de hipersensibilidad tipo I, aguda y local, específicamente en la región parasitada. La combinación de los antígenos con la IgE unida a las células cebadas hace que estas últimas se degranulen y que liberen agentes vasoactivos. Estos compuestos estimulan la contracción del músculo liso, y aumenta la permeabilidad vascular. Así, en la reacción autocurativa, se producen contracciones violentas de la musculatura intestinal y aumenta la permeabilidad de los capilares del órgano, lo cual permite que fluya líquido hacia la luz intestinal. Esta combinación hace que se desprenda y expulse la mayor parte de los parásitos (Urguhart, 2001; Tizard, 2002).

Las células cebadas o mastocitos

Se han identificado dos clases de células cebadas: unas están asociadas a la mucosa en la lamina propia y las otras se encuentran en el tejido conectivo, tienen diferentes morfología y características bioquímicas y funcionales. Se originan de precursores hematopoyéticos y se desplazan a tejidos en los que su desarrollo es regulado por dos vías, en una de estas, una citocina llamada factor de células madre derivada de fibroblastos y de células estomacales de la médula ósea, regula la multiplicación de los mastocitos. En la otra vía se regula la producción de mastocitos a través de citocinas derivadas de linfocitos T (Tizard, 2002).

Las células cebadas del tejido conectivo son ricas en histamina y heparina. En contraste las intestinales contienen sulfato de condroitina en lugar de heparina. Presentan poca histamina y producen diferentes prostaglandinas, leucotrienos y proteasas, así como factor activador plaquetario. Se ha propuesto que los mastocitos de las mucosas reaccionan de manera específica a antígenos de helmintos (Tizard, 2002).

Diagnóstico.

El diagnóstico debe de realizarse sobre la base de datos clínicos, historial epidemiológico de la parasitosis y análisis de laboratorio. Aunque algunos signos son muy sugestivos, se debe comprobar enviando al laboratorio muestras de materia fecal colectadas directamente del recto de los animales, para detectar la presencia de huevos de los parásitos. Lo anterior debe hacerse en forma cuantitativa por medio de la Técnica de Mc Master y cualitativa por medio de cultivos larvarios.

Es de gran utilidad efectuar una biometría hemática para conocer el estado general del animal y evaluar el efecto parasitario (Cuéllar, 1986). El diagnóstico de la hemoncosis crónica es mas difícil porque se puede confundir con una nutrición deficiente e incluso con una fasciolosis crónica (Urguhart, 2001).

Control de la hemoncosis ovina.

Tradicionalmente el control de NGE se ha hecho mediante antihelmínticos Benzimidazoles, Probenzimidazoles, Lactonas Macroyclicas (Vázquez *et al.*, 1984). 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 explotación y las condiciones climáticas. (Cordero *et al.*, 2000). El control estará dirigido a la elaboración de un calendario de desparasitación específico para cada región (Cuéllar, 1986).

El uso de la rotación de potreros puede ser utilizado en el control de nematodos (Cuéllar, 1986). Utilización racional de la pradera, como el descanso del potrero. La separación por edades permite utilizar los potreros con mayor carga de larvas por kg de pasto para los animales adultos debido al grado de inmunidad que tienen y a los animales jóvenes introducirlos o permitir el acceso a pastos nuevos con menor carga de larvas (Quiroz, 2003).

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

Actualmente el empleo del sistema FAMACHA diseñado por Van Wyk. (1998). Es un sistema que tiene como objetivo identificar clínicamente el desarrollo de la anemia de los animales parasitados con *H. contortus*. Este se basa en la coloración de la conjuntiva y es representado con números (1,2,3,4,y 5) donde 1 y 2, son animales con infecciones leves, mientras que animales clasificados con los números 3, 4 y 5 son animales con infecciones masivas. Este método puede ser complementado con otras técnicas como el porcentaje de hematocrito y el conteo de huevos en heces.

La utilización masiva y reiterada de antihelmínticos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes a ellos, por lo que estos problemas han dado pauta para desarrollar métodos de control de parásitos internos que sean menos dependientes de los antihelmínticos tales como la cría de ovinos genéticamente resistentes (Bisset y Morris, 1996; Miller *et al.*, 1998).

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

Resistencia a la hemoncosis

El término "resistencia a nematodos" ha sido definido como la habilidad de un huésped para iniciar y mantener una respuesta que evite o reduzca el establecimiento de los parásitos o elimine la carga parasitaria (Albers y Gray, 1987). Los tipos de resistencia frente a las enfermedades parasitarias se clasifican en dos categorías. La primera, también llamada resistencia innata, esta asociada a la especie, la edad y la raza. La segunda categoría, la inmunidad adquirida, depende de los estímulos antigénicos y de la posterior respuesta humoral y celular (Urguhart, 2001).

Los mecanismos de la resistencia a la infección por *H. contortus* no son totalmente conocidos. Varios autores han sugerido que estos pueden tener una base inmunológica (Gómez *et al.*, 1999). Y que esta pueda depender directamente de la respuesta celular de linfocitos T. (Cordero *et al.*, 2000). Otros factores asociados a la resistencia son el estado nutricional, edad, sexo, raza, tipo de hemoglobina, respuesta eosinofílica, presencia de ciertos antígenos leucocitarios o de algunos genes (Hohenhaus y Outteridge, 1995).

Para valorar el grado de resistencia, se ha adoptado como una medida indirecta el conteo del número de huevos por gramo en las heces (Bisset *et al.*, 1996), también se ha valorado a través de la carga parasitaria del huésped (Albers y Gray, 1987) y su índice de herencia se ha determinado en varias razas de ovinos (Woolaston *et al.*, 1991).

La resistencia a los nematodos adultos se puede manifestar de tres formas: La primera es la eliminación de la población de nematodos adultos, la segunda son cambios en la morfología de los nematodos adultos y la tercera por una disminución en la fecundidad de las hembras parásitos (Balic *et al.*, 2000).

La variación genética de la resistencia a *H. contortus* entre y dentro de razas y su utilización para seleccionar razas o líneas de ovinos resistentes, se está utilizando en programas de mejoramiento genético principalmente en Australia y Nueva Zelanda (Gray, 1997, Hooda *et al.*, 1999).

La forma mas confiable, para evaluar la resistencia genética, es conocer la cantidad de parásitos (larvas y adultos) presentes en el tracto gastrointestinal de los animales evaluados (Hooda., 1999., Gray., 1992 Balic., 2000).

Resistencia a los antihelmínticos

Por muchos años se ha utilizado procedimientos químicos para el control de los parásitos gastrointestinales con buenos resultados (Vázquez *et al.*, 1984); sin embargo existen poblaciones de nemátodos resistentes a los antiparasitarios, por lo que su uso ha traído como consecuencia una disminución de la eficacia y un avance significativo en el camino de la resistencia parasitaria (Prichard *et al.*, 1998; González *et al.*, 2003). El problema se agrava cuando se emplean indiscriminadamente las distintas familias de antihelmínticos, convirtiendo la resistencia lateral en múltiple (Prichard *et al.*, 1998, Campos *et al.*, 1997). Por otra parte los residuos de los químicos que se acumulan en los tejidos de los animales, pueden ocasionar consecuencias adversas para la salud humana (Woolaston y Baker, 1996). En México, los primeros casos de cepas de *H. contortus* con resistencia al albendazol se encontraron en explotaciones ovinas en Puebla (Campos *et al.*, 1990). A últimas fechas hay evidencia de resistencia al albendazol e ivermectina en Veracruz, Campeche y Estado de México (Campos *et al.*, 1992). Estos problemas han dado pauta a desarrollar métodos de control de parásitos internos que sean menos dependientes de los antihelmínticos.

Razas ovinas

A continuación se mencionan algunas características de las razas ovinas Blackbelly y Columbia utilizadas para la realización de este trabajo.

La raza Blackbelly también es conocida como oveja de Barbados o panza negra es originaria de Africa, y Barbados de donde se ha distribuido a las islas del Caribe, Centro América, Estados Unidos y México. En México se ha difundido en todos los climas, desde el trópico hasta las áreas templadas. Son animales de talla pequeña, cuerpo estrecho, los machos pesan de 48 a 70 kg. y las hembra de 32 a 45 kg. El pelo es de color rojizo oscuro o claro, el vientre es negro al igual que las franjas que se proyectan sobre la parte interior de

las patas y otra que va del encuentro sobre el cuello hasta la quijada, son acornes tanto machos como hembras. Su comportamiento reproductivo, es uno de los aspectos más sobresalientes, no es estacional lo que permite más de un empadre por año, y tiene una alta tasa reproductiva, su prolificidad es muy alta de 2.8 corderos por parto, de buen comportamiento materno, se adapta bien al trópico seco (De Lucas, 2001).

La raza Columbia es el resultado de la cruce de carneros Lincoln con ovejas Rambouillet. Desarrollada por el departamento de agricultura de EUA. Se considera como la primera raza creada en Estados Unidos Su presencia en México data desde 1941. Los animales de esta raza tienen un doble propósito y se caracteriza por su gran tamaño y peso. Los machos alcanzan los 160 kg. y las hembras hasta 110 kg. Presentan cara blanca, recubierta de pelo, son acornes y carecen de arrugas en la piel y el cuello. Los corderos al destete tienen un peso promedio de 35 kg. Su tasa reproductiva se considera buena, con fertilidades superiores al 90% y prolificidad moderada de 140% o más, es considerada buena madre y gregaria. Los corderos tienen buena velocidad de crecimiento y canales aceptables y su influencia se expande a través de machos utilizados como sementales en el altiplano central de Tlaxcala, Puebla, Veracruz e Hidalgo y como raza paterna en cruzamientos para producción de corderos (De Lucas, 2001).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el control de los nematodos gastroentéricos de los rumiantes mediante el empleo de antihelmínticos es cada vez menos efectivo, debido a la aparición de cepas resistentes a los mismos en varias partes del mundo, incluyendo México (Cuéllar, 2003, Figueroa *et al.*,2000).

La existencia de distintos grados en la resistencia a la hemoncosis ovina entre razas y aun dentro de animales de la misma raza (Schallig, 2000), ha propiciado la selección de animales con resistencia natural como una alternativa para el control no farmacológico de la hemoncosis. Se ha determinado que la resistencia es una característica altamente heredable (Stear y Murray, 1994), por lo que día con día surgen nuevas líneas de investigación enfocadas en buscar características genéticas y fenotípicas que estén asociados a la resistencia, a fin de generar herramientas de selección de animales (Gill, 1994).

El presente trabajo, forma parte de una línea de investigación dedicada a estudiar la diferencia inmunológica entre ovinos de alta y baja susceptibilidad a la hemoncosis ovina. En este estudio se midió la respuesta celular, cuantificando los mastocitos y las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺, CD8⁺, gamma-delta ($\gamma\delta^+$) presentes en la mucosa y linfonodo abomasal, utilizando un modelo de infección lenta controlada con *H. contortus* en las razas Bb y Cb, anteriormente caracterizadas como de alta y baja resistencia a la hemoncosis (Cuenca y Cuenca, 2005). La hemoncosis ovina es una enfermedad de gran importancia, principalmente en aquellos lugares donde se practica el pastoreo, ocasionando una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios del país, disminuyendo la producción de los animales y ocasionando bajas utilidades al productor. Por lo que es necesario buscar estrategias para el control de la hemoncosis utilizando razas más resistentes y con una alta capacidad de recuperación a la infestación por *H. contortus*. Ya que se ha demostrado que la resistencia a NGE es una característica heredable y esta asociada a ciertos tipos raciales.

Se ha sugerido que la respuesta inmunológica esta asociada a la resistencia (Schallig, 2000). En la respuesta inmune están involucrados tanto componentes específicos

(respuesta celular y humoral), como inespecíficos (respuesta inflamatoria). La inmunidad frente a los NGE se ha sugerido que es dependiente de la respuesta celular de linfocitos T, (Cordero *et al.*, 1999). Los estudios realizados hasta el momento, sobre la respuesta inmune local son el resultado de infecciones aisladas, no existen reportes que comparen las subpoblaciones linfocitarias abomasales en razas con diferentes grados de resistencia a la hemoncosis experimental.

Por lo anterior, en el presente trabajo se comparó el número de mastocitos y el tipo de linfocitos T, presentes en las regiones fúndica, pilórica y linfonodo abomasal de las razas Bb identificada como resistente y de la raza Cb identificada como susceptible infestados de manera experimental con *H. contortus*. (Cuéllar *et al.*, 2004).

OBJETIVOS.

Objetivo general. Contribuir al estudio de la inmunología y patología de la hemoncosis experimental ovina.

Objetivos particulares:

Comparar el número de mastocitos tisulares en la región fúndica y pilórica del abomaso entre corderos de la raza Blackbelly (Bb) y corderos de la raza Columbia (Cb) inoculados experimentalmente con L3 de *H. contortus*.

Comparar el número de linfocitos de diferentes subpoblaciones (CD4⁺, CD8⁺, y gamma-delta ($\gamma\delta^+$) en la región fúndica, región pilórica y linfonodo abomasal entre corderos de la raza Bb y corderos de la raza Cb inoculados experimentalmente con L3 de *H. contortus*.

Correlacionar las subpoblaciones linfocitarias y los mastocitos tisulares con número de huevos eliminados en materia fecal y el número de fases adultas en corderos de la raza Bb y corderos de la raza Cb inoculados experimentalmente con L3 de *H. contortus*.

HIPOTESIS.

Existen diferencias entre los ovinos Blackbelly y Columbia en la respuesta de mastocitos y las diferentes subpoblaciones linfocitarias en la hemoncosis experimental.

MATERIAL Y METODOS

Lugar de realización

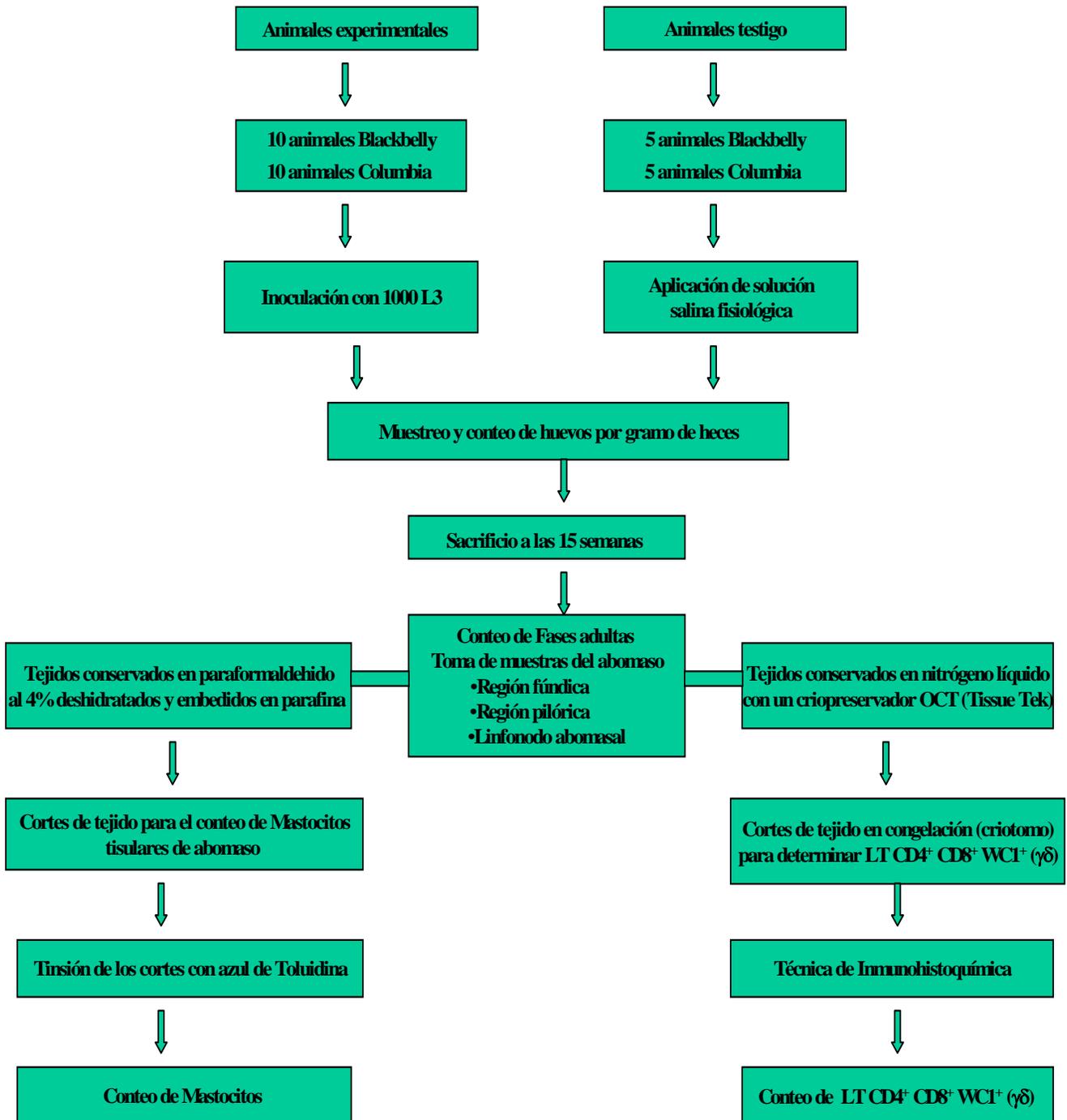
El presente trabajo, se efectuó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la unidad de posgrado de la misma Facultad. Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucán, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Animales

Se emplearon 30 corderos machos, libres de NGE de 6 a 8 meses de edad, con una condición corporal muy similar. Quince corderos fueron de la raza Bb y quince de la raza Cb, estos animales procedieron de explotaciones ovinas orientadas hacia la producción de pie de cría, lo que garantizó la pureza racial. Todos los animales se mantuvieron en estabulación total en corrales para cinco animales. La alimentación consistió en partes iguales de alimento comercial para ovino con un 14% de proteína cruda y forraje molido (alfalfa achicalada) en porciones calculadas al 4% de su peso corporal por día. El agua se les ofreció *ad libitum*.

Antes de ingresar a los corrales a cada uno de los corderos se les realizó un examen clínico y coproparasitoscópico para constatar que estuvieran clínicamente sanos y libres de parásitos gastroentéricos.

DISEÑO EXPERIMENTAL



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

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

Obtención y mantenimiento de las muestras de los tejidos.

En la semana 15 todos los animales fueron sacrificados humanitariamente utilizando una pistola de embolo cautivo y se contó el número de fases adultas (**Fa**). Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se tomaron 2 muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado de la mucosa de las regiones fúndica (RFA) y pilórica abomasal (**RPA**), así como de linfonodo abomasal (**LA**) completo, de cada uno de los animales. Una muestra de cada región fue conservada en paraformaldehído al 4%, deshidratada, embebida en parafina y procesada para cortes histológicos teñidos con azul de Toluidina. A la otra parte de la muestras se les incluyó en un criopreservador OCT (Tissue Tek) y se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser procesadas para inmunohistoquímica de células CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺ ($\gamma\delta$).

Los corderos fueron ordenados de acuerdo al promedio del número de huevos por gramo de heces, los cinco animales que más eliminaron huevos y los cinco corderos que menos eliminaron huevos, correspondieron a la raza Cb y Bb respectivamente. Las correlaciones estadísticas, los conteos de subpoblaciones linfocitarias y de mastocitos fueron realizados a partir de estos animales.

Inóculo

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica de *H. contortus*, aislada a partir de un rebaño ovino comercial de Jilotepec, Estado de México, la cual fue mantenida por pases sucesivos en corderos criados bajo condiciones de estabulación total y con alimentación basada en forraje henificado y con un alimento balanceado comercial. A partir de la materia fecal de los corderos receptores de la cepa de *H. contortus*, se realizaron cultivos larvarios por la técnica de Corticely-Lai (Alba, 2007) y se incubaron por 7 días a 28-30 °C. Las larvas 3 obtenidas fueron contabilizadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Determinación de la carga parasitaria

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

Tinción de azul de toluidina para la determinación de mastocitos .

Los tejidos fijados en paraformaldehído se deshidrataron con etanol en grado ascendente 60°, 70°, 80°, 90°, 96° y finalmente con etanol absoluto. Se embebieron en parafina y con los bloques obtenidos se realizaron cortes histológicos de 5µm de grueso con un microtomo. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados, posteriormente fueron sumergidos en el colorante azul de toluidina al 0.5 % por 40 minutos. Los cortes teñidos se lavaron con agua destilada, posteriormente se deshidrataron con alcoholes de grado ascendentes y se sumergieron en Xileno. Los cortes obtenidos se montaron en resina para su conservación.

Determinación de Linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, Gama-deltas ($\gamma\delta^+$) por medio de la técnica de inmunohistoquímica

Con un criotomo se realizaron cortes de 5 μm de cada una de las muestras conservadas en nitrógeno líquido. Los cortes obtenidos fueron adheridos a portaobjetos con poli-L-lisina (SIGMA LABS) para evitar el desprendimiento del tejido. Los cortes fueron fijados en acetona durante 10 minutos, los cortes fijados y adheridos al portaobjetos se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su utilización para la técnica inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica fue estandarizada y se realizó con un kit comercial (ZYMED LABS) bajo el siguiente protocolo:

- * Hidratación de las muestras. Se colocan las laminillas durante 10 minutos en PBS para eliminar la solución crioprotectora y rehidrar los tejidos.
- * Bloqueo de peroxidasa endógena. Los cortes se incubaron por 45 segundos en una solución bloqueadora (Perox Block) a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 minutos c/u con PBS.
- * Bloqueo de Biotina Endógena. Las laminillas se incubaron con una solución de avidina (Avidin Solution, Reagent "A") por 30 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Al finalizar se lavaron 3 veces las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.
- * Bloqueo de Avidina Endógena. Las laminillas se incubaron en una solución de Biotina (d-Biotin Solution, Reagent "B") por 10 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Al finalizar se lavaron 3 veces las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.
- * Aplicación del suero de bloqueo: Se incubaron con suero de cabra al 10% y albúmina serica bovina al 2% dentro de una cámara húmeda a 4°C por 24 horas y al finalizar se lavan 3 veces las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.
- * Aplicación del anticuerpo primario. Las laminillas se incubaron con alguno de los conjugados para la detección de cada marcador (anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti- CD8 (VMRDinc.) y anti-WC1 de la marca SEROTEC) a temperatura ambiente por 2 horas. Al finalizar se lavaron las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.

- * Aplicación del anticuerpo secundario. Se incubaron las laminillas con un suero de cabra anti-IgG de ratón biotinilado (ZYMED LAB) por 60 minutos dentro de una cámara húmeda a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron 3 veces las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.
- * Aplicación de Streptavidina peroxidasa. Las laminillas se incubaron una solución streptavidina peroxidasa del KIT (HRP_Streptavidin) por 10 minutos a temperatura ambiente, al finalizar se lavaron 3 veces las laminillas por 5 minutos c/u con PBS.
- * Revelado. Las laminillas se incuban con una solución de DAB (diaminobencidina) del KIT, se espera a que se observe la reacción al microscopio óptico (un promedio de 20 a 30 segundos) y se lavan las muestras por inmersión en PBS 3 veces por 5 minutos c/u.
- * Contraste. Las laminillas se sumergieron en una solución de hematoxilina durante 3 a 4 segundos. Posteriormente se lavó con agua corriente y se sumergieron tres o cuatro veces en una solución de carbonato de litio al 1% y se lavó con agua corriente. A continuación se realizó la deshidratación de las muestras con alcohol al 90, 96 y 100%. La laminilla se aclaró con una solución de alcohol-xilol y otra de xilol. Las muestras se montan en resina sintética y se observaron al microscopio.

Conteo celular de mastocitos y linfocitos CD4⁺, CD8⁺, y WC1⁺ ($\gamma\delta$)

El conteo de los mastocitos y de los linfocitos T se realizó auxiliado de una cámara con un software de análisis de imágenes (Image Pro Plus) con un lente objetivo de 40X y un lente ocular de 10X. Se contó el número de mastocitos de las regiones RFA Y RPA, se tomaron en cuenta 30 campos para hacer el conteo, 15 campos fueron tomados de la lámina propia y 15 campos de la mucosa. El conteo de los linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y WC1⁺ ($\gamma\delta$) se realizó en las tres regiones (RFA, RPA y LNA). Para cada subpoblación linfocitaria se hizo un conteo de 20 campos continuos. Se registró el número de mastocitos como de las células linfocitarias marcadas y el área de tejido analizado en μm^2 . Las cuentas fueron expresadas en cantidades totales de células por cm^2 de tejido (Bricarello *et al.*, 2003).

Análisis de resultados

Los datos del hgh fueron transformados por la fórmula $\log_{10}(\text{hgh}+1)$ para estabilizar las varianzas y fueron analizados por medio del procedimiento GLM para muestras repetidas utilizando el software Statistica. Los conteos de linfocitos y mastocitos tisulares fueron analizados por medio de ANOVA factorial del mismo programa. Todas las variables (hgh, Fa, Mastocitos, CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺) fueron correlacionadas utilizando la fórmula de Pearson.

RESULTADOS

Los resultados semanales de la eliminación de hgh por las razas experimentales se ilustran en la figura 1 (El conteo de hgh y de Fa al sacrificio fue realizado y presentado como parte de la tesis de licenciatura de Cuenca y Cuenca en 2005). En la tercera semana del experimento los animales de ambas razas comenzaron a eliminar huevos de *H. contortus* en la materia fecal. A partir de la semana 4 y hasta el final del experimento, los animales inoculados de la raza Cb eliminaron mayores cantidades de hgh ($p < 0.05$) que los animales de la Bb siendo los promedios finales de 2402 y 124.3 respectivamente. Los animales no infectados no eliminaron huevos durante el experimento. El número de fases adultas en el abomaso fue significativamente más alto ($p < 0.05$) en los animales de la raza Cb con respecto a los Bb siendo de 2368 (+/- 780) y 57 (+/- 20.8) respectivamente.

Conteo de Mastocitos abomasales.

El azul de toluidina, empleado para la tinción de las células cebadas mostró una clara reacción metacromática y dio un contraste bien definido con el resto de las células presentes en cada uno de los campos (figura 2). En la mayoría de los cortes histológicos se pudo observar la presencia de un menor número de mastocitos en la lámina propia en relación con la mucosa que presentó la mayoría de las células registradas. Los animales infectados de ambas razas mostraron cuentas de mastocitos por cm^2 significativamente más elevadas ($p < .004$), que sus respectivos grupos control, en ambas regiones del abomaso. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los grupos de corderos Bb y Cb infectados (figura 3, Cuadro1)

Conteo de subpoblaciones linfocitarias:

La inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales específicos para los marcadores CD4^+ , CD8^+ y $\text{WCI}^+(\gamma\delta)$ permitió identificar y contar subpoblaciones linfocitarias (figuras 4, 5 y 6).

En la RFA los corderos de ambas razas mostraron estadísticamente un mayor número ($p < 0.05$) de linfocitos $CD4^+$ y de linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) ($p < 0.02$), en relación a los $CD8^+$. No se encontraron diferencias significativas en ninguna población estudiada entre los grupos infectados y no infectados de ambas razas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas en el número de linfocitos de ninguna de las subpoblación estudiadas entre los grupos Bb y Cb infectados (Cuadro 1, figura 7).

En el análisis de la RPA, los datos muestran la presencia de un mayor número de linfocitos $CD4^+$ en los corderos de los grupos infectados de las razas Bb ($p < 0.001$) y Cb ($p < 0.023$) en relación con sus respectivos grupos control. En el contraste entre grupos infectados se observó un mayor número de linfocitos $CD4^+$ ($p < 0.001$) en los corderos Bb en comparación con los animales Cb. En esta región los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) se presentan significativamente en mayor número en los animales Bb ($p < 0.000136$) infectados, en relación con su grupo control. La raza Cb solo muestra diferencias numéricas siendo mayor ésta en el grupo infectado. Los corderos de la raza Bb muestran mayor número de linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) ($p < 0.002512$) en comparación con los Cb en la RPA. El análisis de los linfocitos $CD8^+$ no muestran diferencias estadísticas entre los grupos infectados y no infectados en ambas razas (Cuadro 1, figura 8).

En el análisis de resultados de las subpoblaciones linfocitarias del linfonodo abomasal, en ninguna de estas se observó diferencia estadística ($p > 0.776$) entre los grupos infectados y no infectados de las dos razas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.225$) en el número de linfocitos de ninguna subpoblación entre los grupos Bb y Cb infectados (Cuadro 1, figura 9).

Los coeficientes de correlación entre las variables se muestran en el Cuadro 2. Las principales correlaciones positivas fueron : Entre los linfocitos gamma-delta($\gamma\delta^+$) de la RPA y los linfocitos $CD4^+$ de la RPA (0.85), entre los linfocitos gamma-delta($\gamma\delta^+$) de la RFA y los linfocitos $CD4^+$ del LA (0.82), entre los mastocitos de la RPA y los mastocitos de la RFA (0.78), entre los linfocitos $CD8^+$ del LA y los mastocitos de la RFA (0.76), entre los linfocitos $CD8^+$ de la RPA y las FA (0.76), entre los linfocitos $CD8^+$ del LA y los

mastocitos de la RPA (0.72) y entre los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) del LA y los linfocitos CD8⁺ del LA (0.65). (Cuadro 2)

Los principales correlaciones negativas ocurrieron: Entre los linfocitos gamma delta de la RPA y los hgh (-0.91), entre los linfocitos CD4⁺ de la RPA contra los hgh (-0.88), entre los linfocitos CD4⁺ de la RPA y FA (-0.78) y de entre los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) WC1⁺ de el LA de la RPA (-0.66).

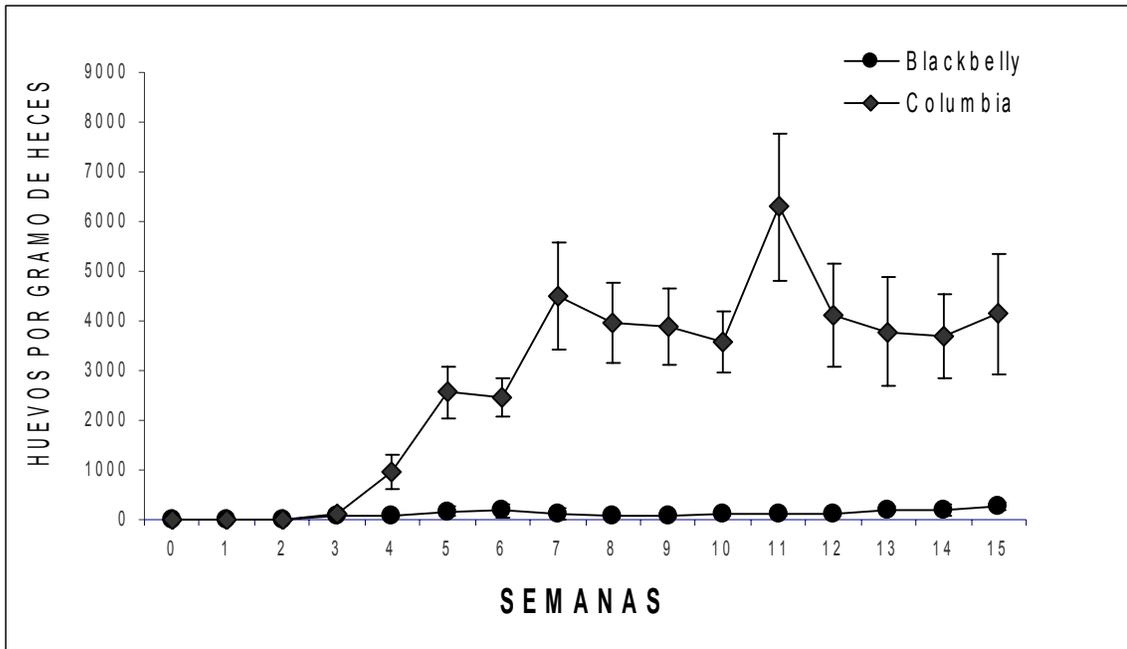


Figura 1 Promedio + desviación estándar de la eliminación semanal de hgh de *Haemonchus contortus* en corderos Blackbelly y Columbia inoculados experimentalmente, la gráfica muestra la tendencia a partir de la semana número tres y se aprecia el comportamiento de eliminación entre los ovinos Blackbelly y Columbia. (Grafica presentada como parte de la tesis de Cuenca y Cuenca, 2005)

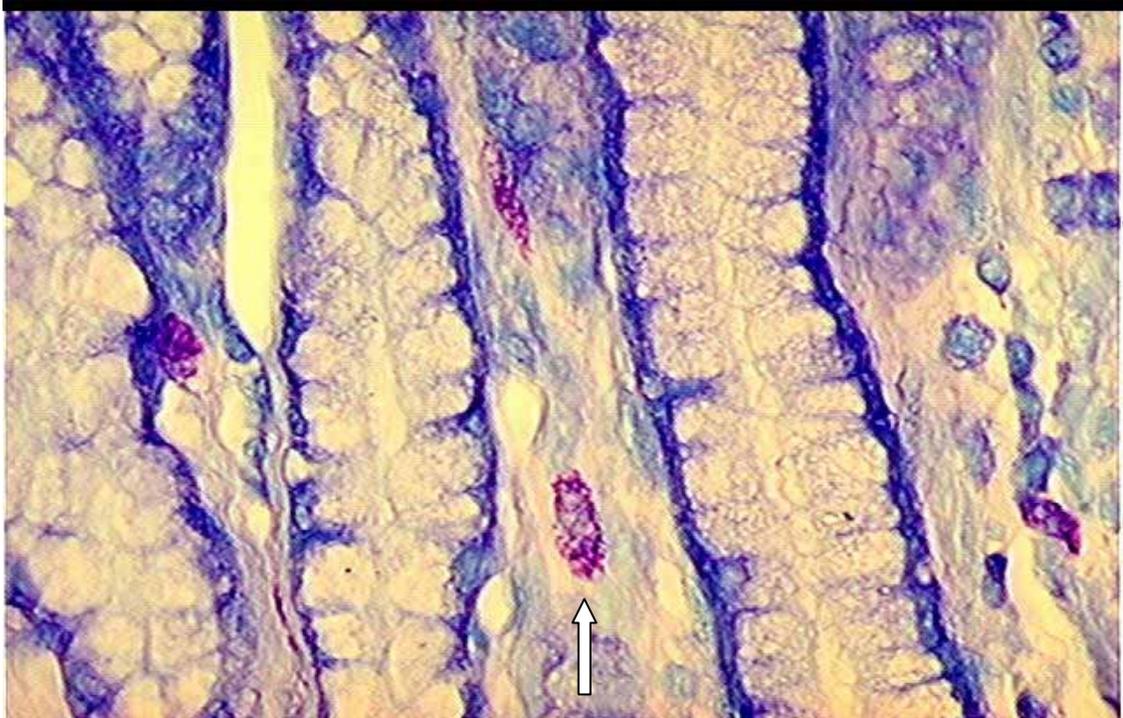


Figura 2 Mastocitos evidenciados mediante tinción azul de toluidina presentes en la mucosa abomasal de un cordero Blackbelly inoculado con *Haemonchus contortus*, la flecha señala un mastocito con reacción metacromática positiva a la tinción

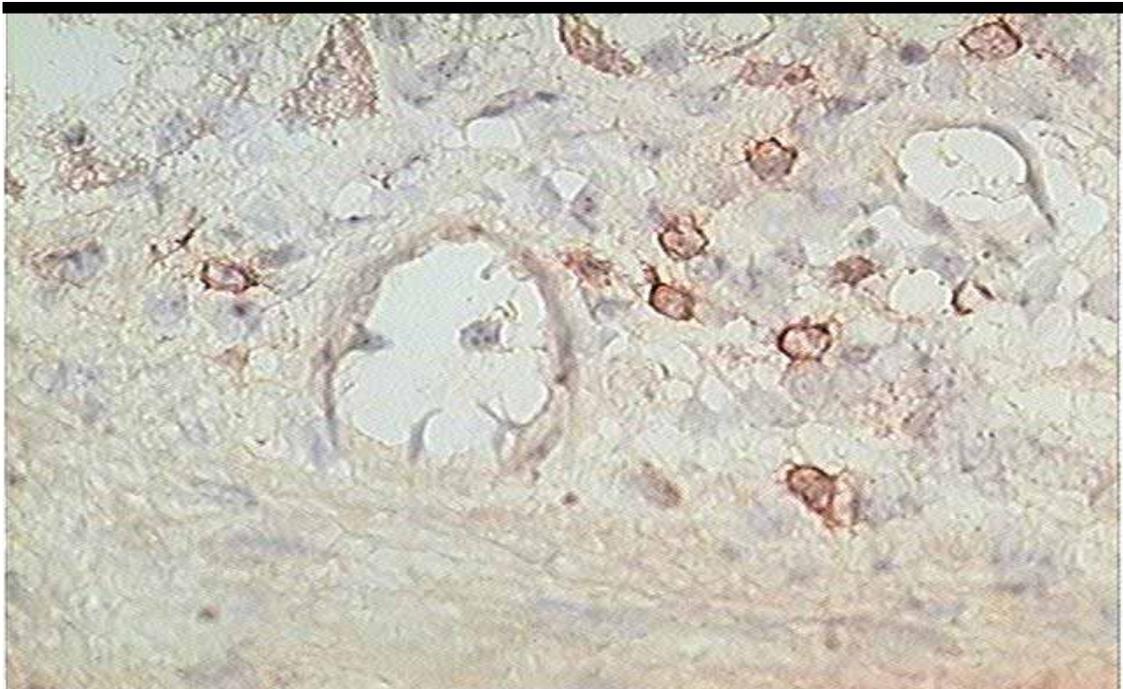


Figura 3 Linfocito T CD4+ marcados por un anticuerpo monoclonal antiCD4 por medio de inmunohistoquímica presentes en la mucosa de la región fúndica de un cordero Blackbelly infectado experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*.

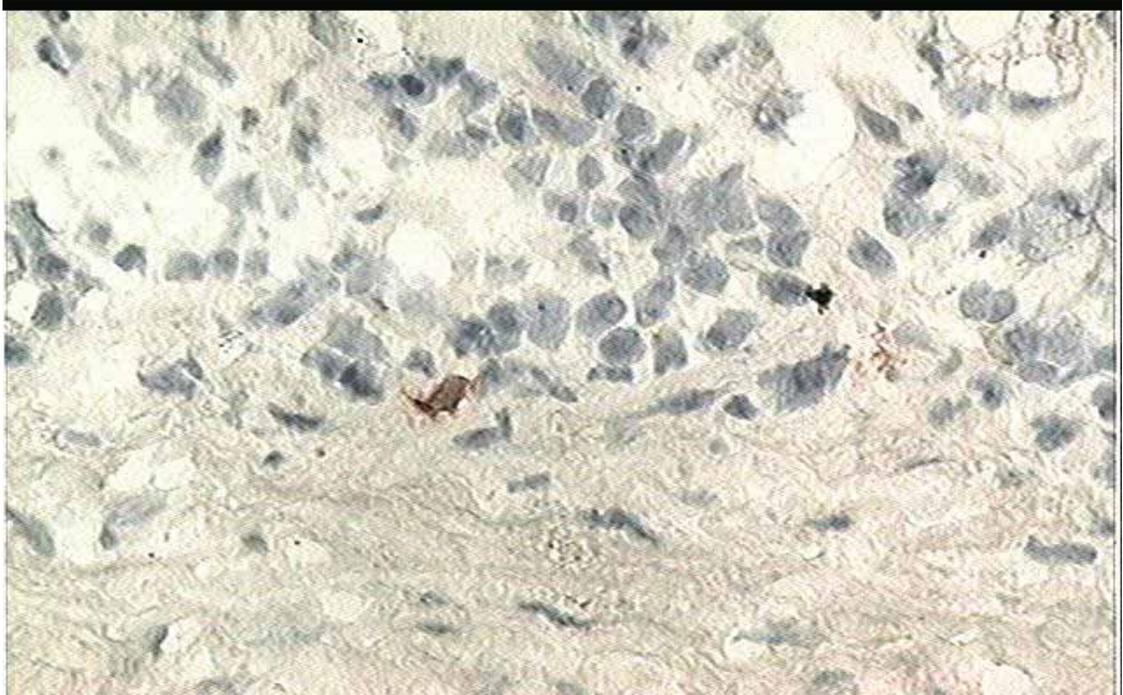


Figura 4 Linfocito marcado con un anticuerpo monoclonal antiCD8 por medio de inmunohistoquímica en la mucosa abomasal de la región pilórica de un cordero Columbia infectado experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*.

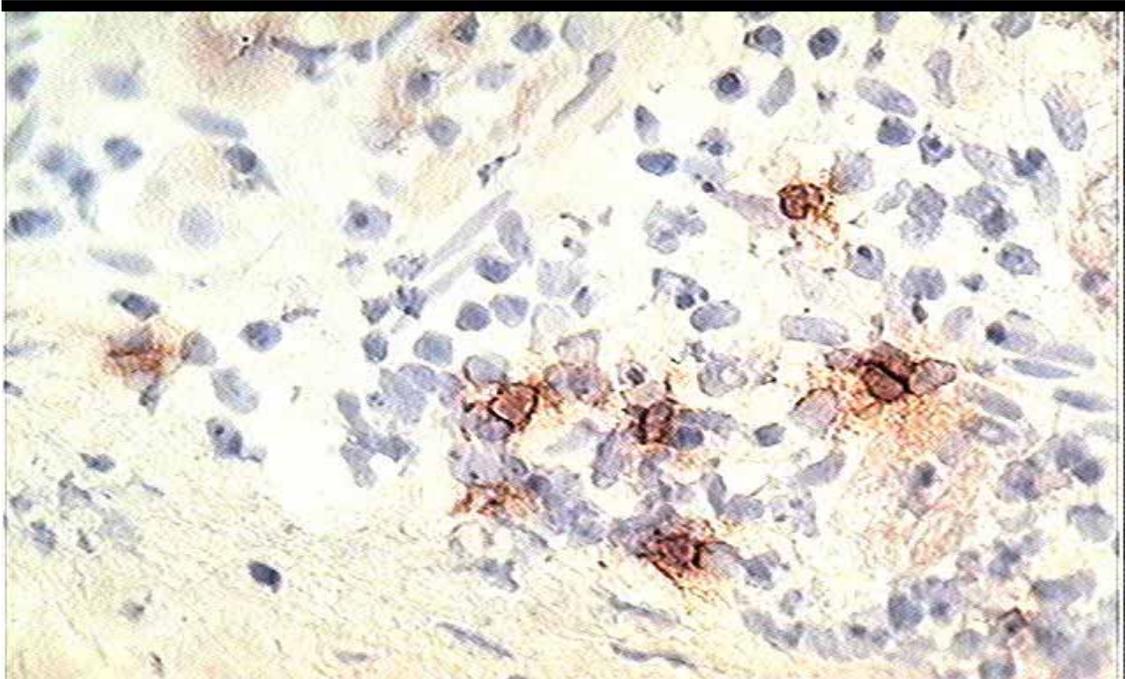


Figura 5 Linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) marcados por un anticuerpo monoclonal antiWC1 por medio de inmunohistoquímica presentes en la mucosa abomasal de la región pilórica de un cordero columbia inoculado experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*.

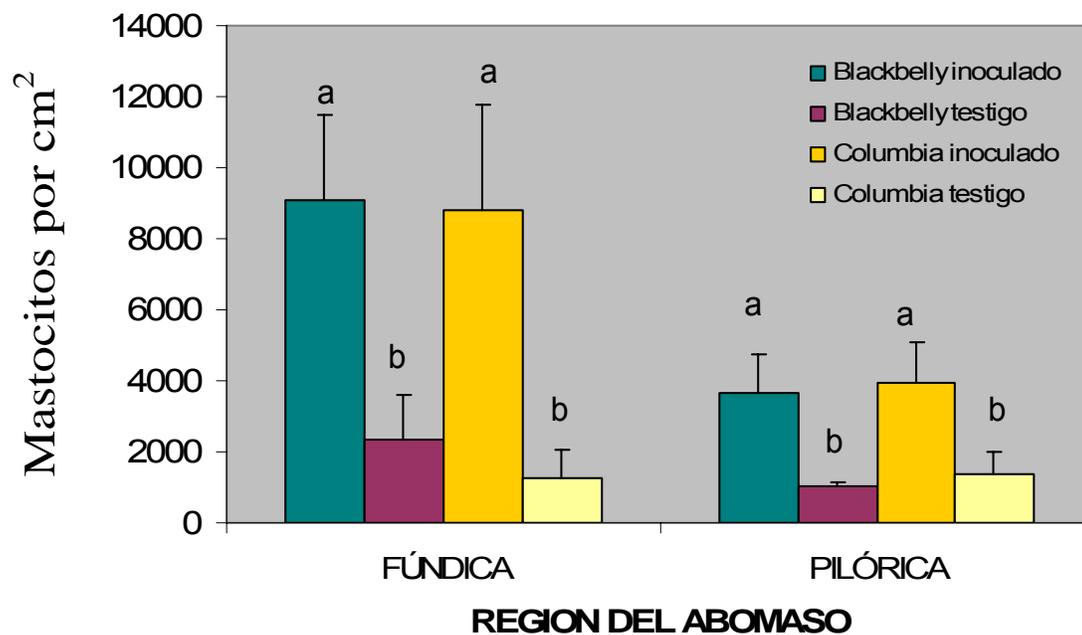


Figura 6.- Promedio + desviación estandar del número de mastocitos por cm², en cortes histológicos de la mucosa de las regiones fúndica y pilórica del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y corderos de la raza Columbia inoculados experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (p<0.05) entre los grupos.

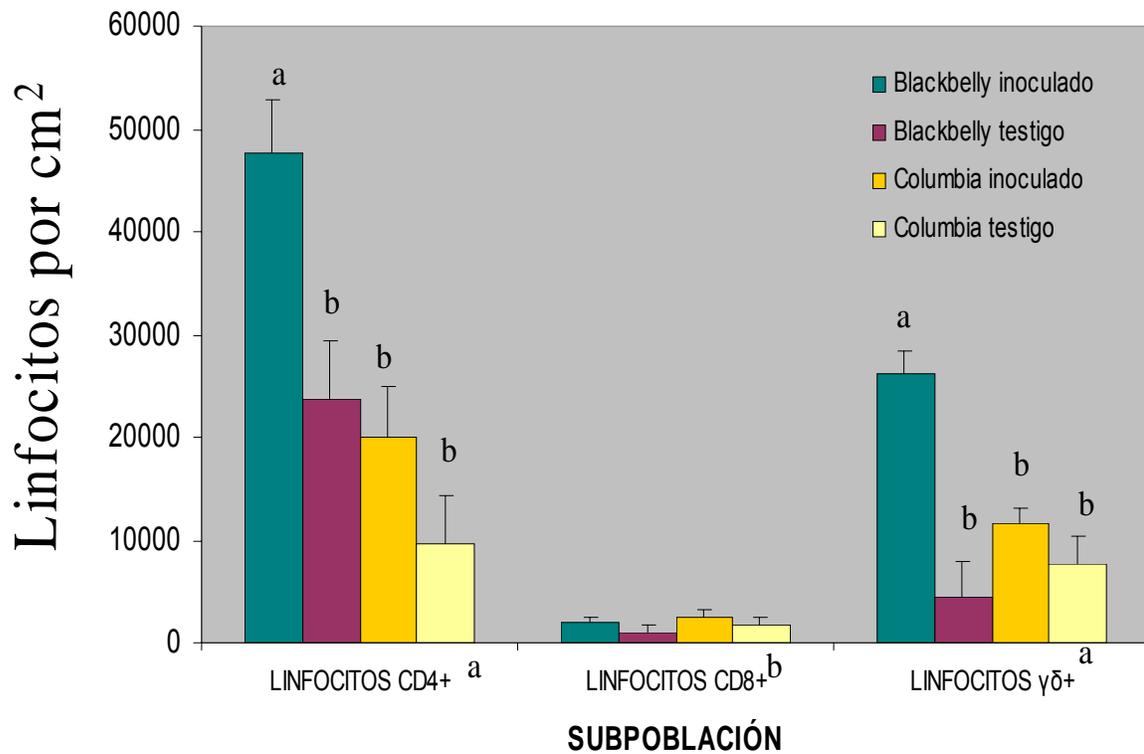


Figura 7 - Promedio +/- desviación estándar del número de linfocitos T de diferentes subpoblaciones linfocitarias por cm^2 en cortes histológicos de la mucosa de la región pilórica abomasal de corderos de las raza Blackbelly y corderos de la raza Columbia inoculados experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los grupos.

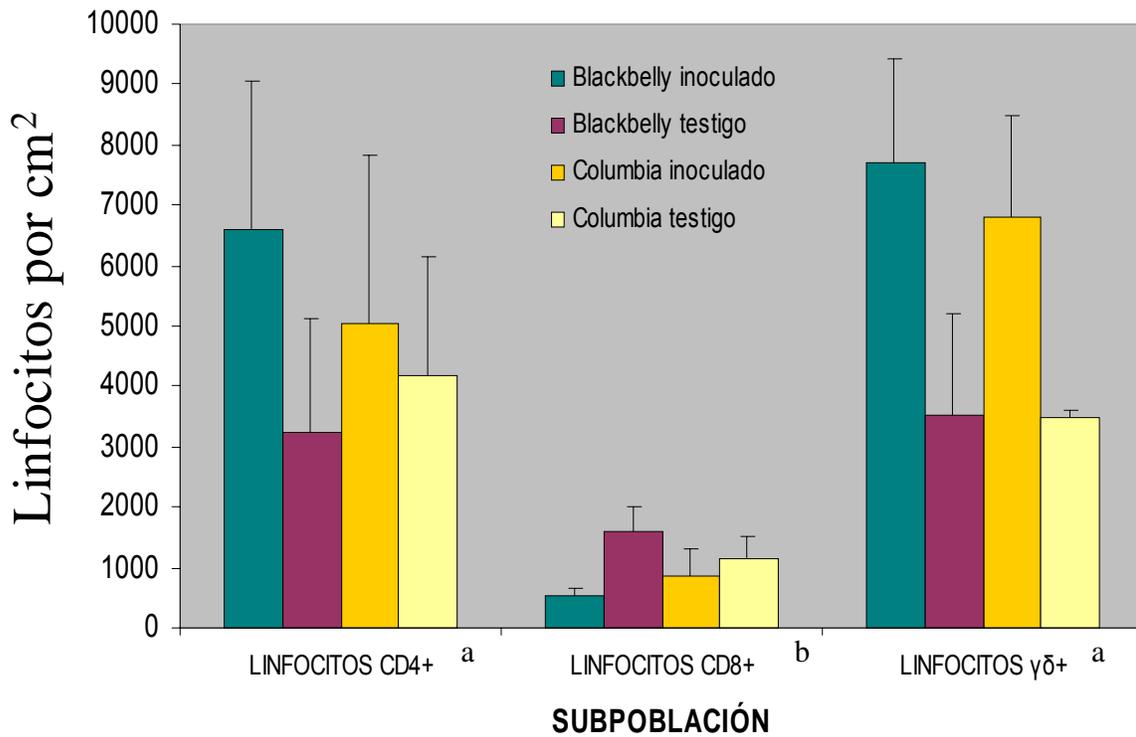


Figura 8 - Promedio +/- desviación estándar del número de linfocitos T de diferentes subpoblaciones linfocitarias por cm^2 en cortes histológicos de la mucosa de la región fúndica abomasal de corderos de las raza Blackbelly y corderos de la raza Columbia inoculados experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los grupos.

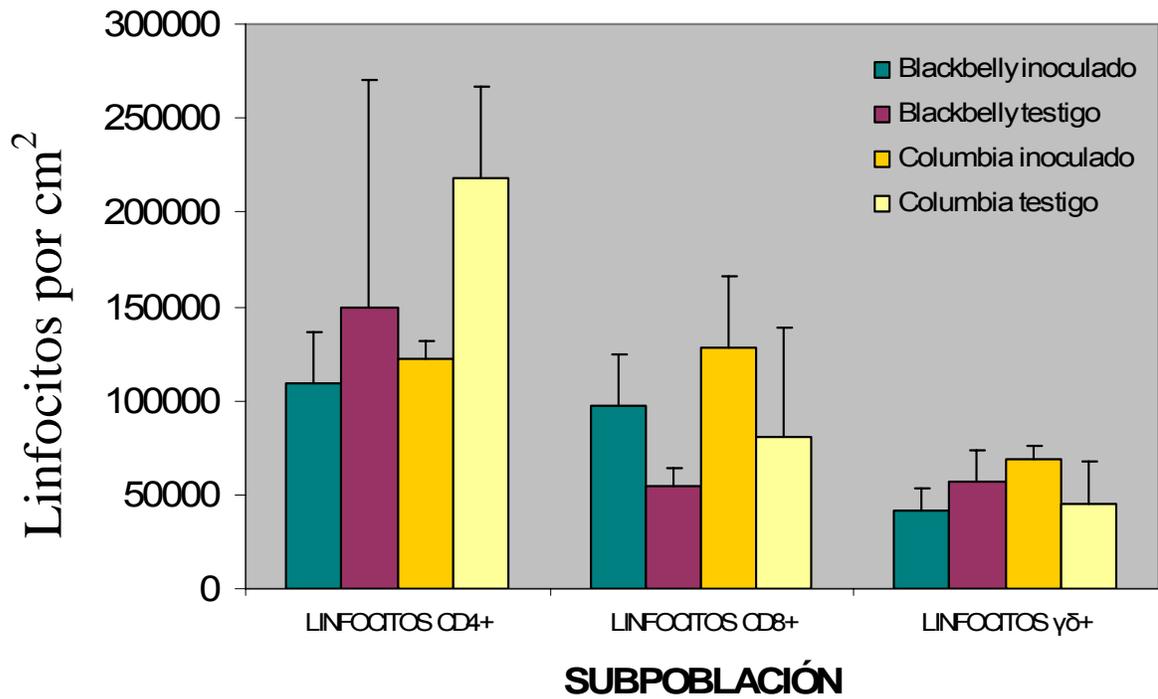


Figura 9.- Promedio +/- desviación estándar del número de linfocitos T de diferentes subpoblaciones linfocitarias por cm^2 en cortes histológicos de linfonodo abomasal de corderos de las raza Blackbelly y corderos de la raza Columbia inoculados experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*.

RAZA	CÉLULA/SUB POBLACION	RFA Testigo	RFA Inoculados	RPA Testigo	RPA Inoculados	LNA Testigo	LNA Inoculados
Blackbelly	Mastocitos	2343±1781.55	9060±7215.5	1011±210.84	3635±3109.0		
	CD4+	3246±3774.39	6594 ± 5524.2	23611±9863.01	47700±10095.1	149279±171850.20	108755±66841.7
	CD8+	1577±889.80	933 ± 960.3	1061±977.09	1915±1265.6	54034±13799.65	97419 ±67418.7
	Gamma-delta	3529.±3384.73	7703± 3861	4411±5854.84	26074±4432.3	56551±24237.67	41996±27753.7
Columbia	Mastocitos	1266±1581.19	8788± 8451.6	1398±1238.33	3945±3274.8		
	CD4+	6684±6357.96	5050± 6246.3	9567±9624.47	19891±11509.6	217748±69071.04	122370±19151.2
	CD8+	1131±553.91	876± 972.5	1671±977.09	2560±1215.1	80984±81892.09	127986±75050.9
	Gamma-delta	3467±183.15	6791±3749.2	7724±5297.90	11595±3452.3	44862±31425.57	69065±14205.4

Cuadro 1.- Número de mastocitos y subpoblaciones de linfocitos por cm² presentes en cortes histológicos de la mucosa del las regiones fúndica (RFA) y pilórica (RPA) del abomaso de corderos de la raza Blackbelly y Columbia inoculados con larvas de *Haemonchus contortus*.

	hgh	Fa	MASTOCITOS		CD4+			CD8+			GAMMA-DELTAS		
			RFA	RPA	RFA	RPA	LA	RFA	RPA	LA	RFA	RPA	LA
hgh	1.00												
Fa	0.64	1.00											
MASTOCITOS													
RFA	0.13	0.10	1.00										
RPA	0.19	0.24	0.78	1.00									
CD4+													
RFA	-0.03	0.45	-0.25	-0.07	1.00								
RPA	-0.88	-0.78	-0.04	-0.36	-0.31	1.00							
LA	0.13	0.11	0.22	0.62	0.45	-0.29	1.00						
CD8+													
RFA	-0.02	-0.17	-0.14	-0.10	0.27	0.23	0.42	1.00					
RPA	0.43	0.76	0.44	0.41	0.04	-0.53	-0.06	-0.19	1.00				
LA	0.24	0.17	0.77	0.72	-0.10	-0.19	0.29	-0.22	0.14	1.00			
GAMMA-DELTA													
RFA	-0.15	-0.31	-0.20	-0.30	0.24	0.25	0.82	0.46	-0.42	0.13	1.00		
RPA	-0.92	-0.50	-0.26	-0.40	0.03	0.85	-0.24	0.17	-0.42	-0.45	0.13	1.00	
LA	0.53	0.45	0.64	0.15	0.13	-0.31	0.40	0.07	0.28	0.66	0.41	-0.66	1.00

Cuadro 2 Coeficientes de correlación entre el número de huevos por gramo de heces (hgh), fases adultas (Fa), el número de mastocitos, las subpoblaciones linfocitarias (CD4+,CD8+, gamma delta) de las regiones fúndica (RFA), pilórica (RPA) y linfonodo (LA) abomasal de corderos de las razas Blackbelly y corderos de la raza Columbia, inoculados experimentalmente con L3 de *Haemonchus contortus*.

DISCUSIÓN

Usando los mismos animales de este trabajo, Cuenca y Cuenca en 2005 evaluaron la cinética de eliminación de huevos hgh y el número de gusanos adultos en abomaso, estos datos se utilizaron para realizar las correlaciones con las subpoblaciones celulares. Ellos reportaron que a partir de la semana cuatro y hasta el final del experimento, los corderos inoculados de la raza Cb eliminaron mayor cantidad de hgh que los corderos de la raza Bb, alcanzando los picos de eliminación más altos en la semana once con un conteo de 6,295 hgh y mientras que el pico más alto de eliminación de hgh en los corderos Bb se presentó en la semana 18 con un conteo de 440 hgh, siendo los promedios finales de 2402 y 124.3 respectivamente. El número de Fa también fue significativamente más alto en los corderos de la raza Cb con respecto a los Bb, de 2369 y 58 respectivamente. Lo que demuestra que los corderos Bb son parcialmente resistentes a la infección (raza resistente) y los corderos Cb son muy susceptibles a la infección (raza susceptible).

Se ha reportado que existe un incremento de mastocitos en animales parasitados a nivel intestinal y se ha propuesto que los mastocitos de la mucosa reaccionan de manera específica a antígenos de helmintos (Tizard, 1996). Durante la infección por helmintos, los mastocitos proliferan y persisten en el tejido (Falcone *et al.*, 2001) relacionando esta proliferación con una protección local contra los nematodos gastroentéricos.

En el presente estudio, se correlacionaron los mastocitos con los indicadores de resistencia a nematodos gastroentéricos (hgh y Fa), siendo esta correlación baja tanto en la región fúndica como en la región pilórica abomasal. Los corderos infectados de ambas razas mostraron estadísticamente mayor cantidad de mastocitos por cm^2 ($p < .004$) que sus respectivos grupos testigo. Sin embargo no se encontraron diferencias entre los grupos infectados Bb y Cb por lo que se deduce que la infección por *H. contortus* inducen una respuesta por mastocitos, sin que este incremento este relacionado con la resistencia.

Resultados similares han sido reportados anteriormente, Bricarello *et al.*, (2003) señalaron que corderos de la raza Corriedale infectados de manera natural con *H. contortus* tuvieron un mayor número de gusanos adultos en el abomaso, que un grupo de corderos de

la raza criolla de lana, con un incremento significativo de mastocitos a las nueve semanas PI en la mucosa abomasal, siendo este incremento muy similar entre las dos razas, por lo que igual que en este trabajo no lo pueden asociar a resistencia. En lo que se refiere a las fases adultas, la raza Corriedale tuvo una carga significativamente mayor en relación con la raza criolla de lana. Amarante *et al.*, (2005) realizaron otro trabajo donde utilizaron tres razas diferentes, Santa Ines, Suffolk y Ile de France, del cual solo reportan la existencia de una diferencia numérica de mastocitos tisulares presentes en la mucosa abomasal. En contraste, Amarante *et al.* (1999) realizaron un estudio con las razas de corderos Nativa de Florida y Rambouillet, así como con sus F1 y F2 producto de la cruce de estas razas. La infección se llevo de manera natural y posteriormente de manera artificial con larvas de *H. contortus*, los resultados mostraron una mayor cantidad de fases adultas ($p < 0.05$) en la raza Rambouillet y su F1 que en la raza Nativa de Florida y la F2, en lo concerniente a los resultados en la cuantificación de las células cebadas los resultados no son significativos ya que estos se asemejan en los cuatro grupos.

Los resultados obtenidos de las correlaciones de las variables en este estudio (tabla 2) muestran correlaciones positivas de significancia entre los linfocitos $CD4^+$ y los linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) en la región pilórica. El mayor número de estas subpoblaciones, se presentaron en los grupos infectados en relación con su grupo control. Sin embargo la raza Bb mostró un mayor número de estas subpoblaciones en comparación con la raza Cb y entre región y región hubo mayor presencia celular de estas subpoblaciones en la región pilórica en relación con la región fúndica.

Las correlaciones negativas significativas se presentaron a nivel de la región pilórica entre: los linfocitos $CD4^+$ y hgh, entre $CD4^+$ y Fa y entre los linfocitos gamma-delta y hgh. Por estos resultados se puede afirmar que estas subpoblaciones están directamente relacionadas con la resistencia.

La cantidad de los linfocitos $CD8^+$ registrados no fueron significativos en los grupos infectados y no infectados, ni en ninguna de las regiones en ambas razas, datos similares son reportados por Balic *et al.*, (2002) donde esta subpoblación no se vió incrementada por

efecto de la infección. Lo anterior parece demostrar que este tipo de linfocitos no está involucrado en los procesos de resistencia a la hemoncosis. Otros trabajos confirman este hecho, por ejemplo Gill *et al.*, (1993) demostró que la depresión de linfocitos CD4⁺ abate el estado de inmunidad a *H. contortus* en ovinos resistentes a la infección.

En el linfonodo abomasal no existió diferencia entre los grupos infectados y no infectados tampoco entre raza y raza, en esta región solo hay un mayor número de linfocitos CD4⁺ estadísticamente significativo en relación con los gamma-delta ($\gamma\delta^+$).

Algunos trabajos anteriores, han estudiado estas subpoblaciones. Balic *et al.*, (2000) reportaron un incremento sanguíneo de linfocitos CD4⁺ y gamma-delta ($\gamma\delta^+$), así como de células cebadas en una infección primaria de manera experimental en corderos de la raza Merino a los cuales se les fueron inoculados 50000 larvas de *H. contortus*. En este estudio se realizó el conteo celular a los 3, 5, 27 y 36 días PI por la técnica de citometría de flujo, también en este trabajo ellos reportan que la población de CD8⁺ se mantiene sin cambios a raíz de la infección. En otro trabajo realizado por Balic *et al.* (2002) reportaron que una infección secundaria provocó un incremento significativo de linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) en el linfonodo abomasal y a nivel de la mucosa del abomaso el incremento de linfocitos CD4⁺ y gamma-delta ($\gamma\delta^+$) en animales infectados con 50000 larvas tres de *H. contortus* a los 3 y 5 días PI.

Los resultados del presente estudio demuestran que existen diferencias en las subpoblaciones celulares presentes en el abomaso entre ovinos de alta y baja resistencia a la hemoncosis experimental. Sin embargo, no se sabe el grado de activación de estos tipos celulares, el tipo de citocinas que están produciendo y el efecto de estas en la modulación de la respuesta inmune. Estudios posteriores con otro tipo de técnicas como las de hibridación *in situ* probablemente despejen estas incógnitas.

CONCLUSIONES.

- * Los corderos infectados de ambas razas mostraron un mayor número de mastocitos por cm^2 ($p < .004$) que sus respectivos grupos control en la mucosa de ambas regiones del abomaso.
- * No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el número de mastocitos por cm^2 de mucosa abomasal entre los grupos de corderos Bb y Cb inoculados con larvas de *H. contortus*.
- * En la región fúndica abomasal los corderos de ambas razas mostraron estadísticamente un mayor número ($p < 0.05$) de linfocitos CD4^+ y de linfocitos gamma-deltas ($\gamma\delta^+$) ($p < 0.02$) en relación a los CD8^+ .
- * En la región fúndica abomasal no se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos CD4^+ , CD8^+ y gamma-delta ($\gamma\delta^+$) por cm^2 entre los grupos infectados y no infectados de ambas razas estudiadas.
- * En la región pilórica abomasal se encontró un mayor número de linfocitos CD4^+ en los corderos de los grupos infectados de las razas Bb ($p < 0.001$) y Cb ($p < 0.023$) en relación con sus respectivos grupos control. El contraste entre grupos infectados se encontró un mayor número de linfocitos CD4^+ ($P < .001$) en los corderos Bb en comparación con los animales Cb.
- * En la región pilórica abomasal el número de linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) es mayor en los animales Bb ($p < .000136$) infectados en relación con su grupo control. La raza Cb solo mostró diferencias numéricas siendo mayor ésta en el grupo infectado.
- * En la región pilórica abomasal los corderos de la raza Bb muestran mayor número de linfocitos gamma-delta ($\gamma\delta^+$) ($p < .002512$) en la mucosa abomasal que los corderos Cb.

- * En la región pilórica abomasal no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el número de los linfocitos $CD8^+$ entre los grupos infectados y no infectados en ambas razas.
- * En el linfonodo abomasal no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.225$) en el número de linfocitos de las subpoblaciones entre los diferentes grupos.
- * La resistencia de los corderos Bb estuvo correlacionada con la presencia de mayor número de linfocitos $CD4^+$ y gamma-delta ($\gamma\delta^+$) de la mucosa abomasal.

BIBLIOGRAFIA

Alba – Hurtado F. 2007. Parasitología veterinaria. Manual de laboratorio. UNAM.

Albers, G.A.A., Gray, G.D., 1987. Breeding for worm resistance: a perspective. Int. J. Parasitol. 17:559-566.

Armour J. 1980: The epidemiology of helminth disease in farm animals. Vet. Parasitol. 6: 7-47.

Balic, A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T. 2000. The immunobiology of gastro intestinal nematode infection in ruminants. Adv. Parasitol 45: 182-227.

Bautista, C. 1990. Aspectos evolutivos y perspectivas sobre el control biológico de nemátodos parásitos de mamíferos. Topics de parasitología animal. Universidad del Estado de Morelos. México.

Bisset S. A. And C.A. Morris 1996. Feasibility and implications of breeding of cheep for increased natural resistance to infection with nematode parasites N.Z.J. Zoology !8: 85-86.

Blood, D.C., Radostis, O. M., Henderson, J.A., Arrundel, J.H., Gay, C.C., 1986. Medicina veterinaria 7ª Ed. Interamericana México.

Bowman D. Dwight., Lynn R.C., Eberhard M.L. 2004. Parasitología para Veterinarios 8ª Ed. Saunders Elsevier, España.

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

Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H., 1990. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Téc. Pec. Méx.* 28 (1):30-34.

Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H., 1992. Diagnóstico in vivo de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Peleibuey. *Vet. Méx.* 23 (1): 51- 56

Campos, R R., Limón N. E y Saéñz F. M. A. 1997. Efectividad en ovinos del albendazol y oxfendazol administrados solos o combinados contra nemátodos resistentes y susceptibles al tiabendazol; *Técnica Pecuaria en México.* 35 (1): 47-51.

Chandrawathani P, Adnan M and Waller P J 1999. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on peninsular Malaysia; *Veterinary Parasitology* 82: 305-310.

Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Martínez, F.A.R., Sánchez, A.M.C., Hernández, R.S., Navarrete, L.C.I., Díez, B.P., Quiroz, R.H., Carvalho.V.H. 2000. *Parasitología Veterinaria.* Mac Graw Hill Interamericana. Madrid España.

Courtney,C.H., C.F. Parker, K.E. McClure, and R.P. Herd. 1985. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int. J.Parasitology* 15: 101-109.

Cuéllar O.J.A. 1986 P.Pi Joan J. Tortora Principales enfermedades de los ovinos y caprinos (Parasitosis del Aparato Digestivo) Ed. P.PIOJAN., J. TORTORA Coordinación de posgrado FESC México.

Cuéllar, O.J.A. 1992. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo en ovinos y caprinos. Mem. Curso: principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Cuéllar O. J. A. 2003. Agentes etiológicos de la nematodiasis gastrointestinal en los diversos ecosistemas de México. Laboratorio de Parasitología . Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Cuéllar-Ordaz J.A., Muñoz-Guzmán M.A., Valdivia_Anda G., Buendía-Jiménez J.A., Alba-Hurtado F., 2004.Cuantificación de los eosinófilos sanguíneos y su relación con la resistencia a la hemoncosis ovina. Memorias del XVI Congreso Nacional de Parasitología La Trinidad Tlaxcala México,

Cuenca V C., Cuenca V. N. 2005. Comparación de la cantidad, tamaño y prolificidad de fases adultas de *H. contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Blackbelly. Tesis de Licenciatura FES Cuautitlán-UNAM.

Díaz R P, Torres H G, Osorio A M M, Pérez H P, Pulido A A R, Becerril P A M y Herrera H J G 2000. Resistencia genética a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, Pelibuey y sus cruza en el trópico Mexicano; Agrociencia. 34(1) 13-20.

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

Falcone H. Franco, Pritchard I. David and Gibbs F.Bernhard 2001. ¿Do basophils play a role in immunity against parasites?. Trends in Parasitology Vol. 17 No 3

Figuroa, C.J.A. Méndez, M.R.D., Berruecos, U.J.M., Alvarez, L.J.A. 2000 Detección de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos de ganado ovino Vet.Mex. 31(4): 309-313.

Donald M. Mc. Gavin, Willians W. Carton. 2001 Special Veterinary pathology Ed. Mosby St. Lous Missouri United States of America pp. 29.

Dunn, Angus M. 1983. Helminología Veterinaria Ed. El Manual Moderno Méx. D.F.

George S., H. Quiróz, 1993. Frecuencia de parásitos intestinales pulmonares y hepáticos en ovinos de la Magdalena Soltepec, Tlaxcala México. *Vet. Méx.* 24: 195-198.

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

Gill HS. Cell-mediated Immunity in Merino Lambs with Genetic Resistance to *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 24 (5). 1994, 749-756.

Gómez, A.P., Araujo, J.V., Ribeiro, R.C. 1999. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Manocrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1): 79-83.

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

González R Garduño, G Torres-Hernández, MGJ Nuncio- Ochoa, J.A. Cuéllar-Ordaz y M.E. Zermeño- Garcia 2003. Detection of anthelmintic efficiency in nematodes of hair sheep using the fecal egg reduction test *Livestock Research for Rural Development* 15 (12) 2003.

Gray G.D. 1997. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. *Vet. Parasitology.* 72: 345-36.

Gray G.D., Barger I.A., Lejambre L.F., Douch P.G.C. 1992. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22 (4): 417-425.

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

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

James A. Roth 2004). Clínicas Veterinarias de Norteamérica Inmunología Ed. Inter-Médica S.A. I.C.I. Buenos Aires Argentina

Kassai, T. 2002. Helminología Veterinaria. Editorial, Acribia, Zaragoza España;

Koyman, F.N.J., Shalling, H.D.F.H., Van Leeuwen, M.A.W., Mackellar, A., Huntley, J.F., Cornelissen, A.W.C.A. Valverde. L. 2000 Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is related, and correlates with IgE rather than IgG antibody. Parasite immunol. 22, 13-20.

Lapage Geoffrey 1981. Parasitología Veterinaria sexta edición Continental S.A. México.

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

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

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

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

Martín W B. DVSM pH D. ID Artken 2000. Enfermedades de la oveja Segunda edición Acribia S.A. Zaragoza España. pp 191-192.

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

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

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

Norman D. Lavine.1978. Tratado de Parasitología Veterinaria Ed. Acriba Zaragoza España.

Parker, C.F., Mc Clure,K.F., Herd, R.P. 1993. Hair sheep potential for specific environmental condition and production systems in North America. Memoria Sexto Congreso Nacional de producción ovina. Cd. Valles San Luis Potosí.

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

Prichard R., Blackhall W., Liu H. Y., Sharma S.R., and Beech R. N. 1998. Alterations in genetic variability of *Haemonchus contortus* (Nematoda)genes following selection with anthelmintics; Parasitology International. 47 (Suppl.) 105-131.

Quiroz, Romero 2003 Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos Limusa México.

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

Read C. P. 1978 Parasitismo Animal Editorial, Continental, México

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

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

Soulsby, E.J.L. 1998. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos 7ª edición Interamericana México.

Stear M J. Murray M. 1994 Genetic resistance to parasitic disease: partycularly of resistance in rumians to gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol; 54:162-176.

Tizard Ian R. 2002 Inmunología Veterinaria McGraw-Hill Interamericana 6ª edición México D.F.

Torres, H.G., Castillo R.H., López L.R. (1994) Resultados preliminares con ovinos Florida en el trópico mexicano. Memorias del Séptimo Congreso Nacional de Producción Ovina. Toluca, México.

Urguhart G M., Armour J, Duncan, Dunn A.M., Jennings F.W. 2001. Parasitologia Veterinaria Acriba S.A. Zaragoza España.

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

Vázquez P.V M 2000. Agentes etiológicos y ciclo de vida de los nemátodos gastrointestinales. En 1er. Curso internacional "Nuevas perspectivas en el diagnóstico y control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes". Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yuc. P.1-5.

Vázquez P.V., Rodríguez J.M.A., Méndez B and Escutia S I 1984 Efectividad de cuatro antihelmínticos comerciales contra nemátodos gastroentéricos de ovinos Pelibuey; Técnica Pecuaria en México. 46:25-29.

Woolaston, R.R., and R. L. Baker 1996. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. Int. J. Parasitology 26: 845_855

Woolaston, R.R., R.G. Windon, and G.D. Gray. 1991. Genetic variation in resistance to internal parasites in Armidale experimental flocks in Breeding for Disease Resistance in Sheep Gray G.D., and R.R. Woolaston (eds). (Australian Wool Corporation Melbourne). pp. 1-9.

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