



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Patrones de interleucinas producidas por linfocitos abomasales
asociados a la resistencia en la hemoncosis experimental ovina**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Javier Alejandro Buendía Jiménez

TUTOR

Dr. Fernando Alba Hurtado (UNAM-FESC)

COMITÉ TUTOR

Dra. Ma. Eugenia López Arellano (CENID/PAVET-INIFAP)

Dr. Marco Antonio Vega López (CINVESTAV-IPN)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Para poder llevar a término este proyecto se requirió de la ayuda de muchas personas, algunas tuvieron una participación activa durante el desarrollo de la parte experimental de trabajo y otras me brindaron apoyo de diferente manera, espero que estas palabras de agradecimiento retribuyan su esfuerzo y el apoyo que tan desinteresadamente me ofrecieron.

A los entonces estudiantes Habid Ortiz, Alejandro Juárez, Rogelio Catalán y Valente Peláez por la enorme ayuda prestada durante la parte experimental de este trabajo.

A la entonces estudiante y ahora MVZ Perla María Suzan Rivera por su valioso apoyo en la realización de este trabajo, pero en particular por haberme permitido compartir seis maravillosos años de su vida.

A todos mis compañeros de laboratorio: a la Dra. Guadalupe Prado, a la M. en C. Lorena Chávez, a la M. en C. Sandra Iturbe, al MVZ Ricardo Amezcua y a todos los estudiantes de licenciatura que hicieron su servicio social o su trabajo de tesis por haber hecho de la estancia en el laboratorio toda una experiencia.

Al MVZ Iván Pérez Luna por su ayuda en la realización de la parte experimental de este trabajo, por compartir días y noches de trabajo con nuestros respectivos proyectos de Posgrado, por ser una excelente mancuerna en el trabajo académico, en los laboratorios de la materia de Bacteriología y Micología, pero sobre todo en el laboratorio de la materia de Parasitología, se te recuerda siempre con mucho afecto y se te extraña.

Al M. en C. Pablo Martínez Labat por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al M. en C. César Cuenca Verde por su valioso aporte y colaboración tanto en el manejo y mantenimiento de los animales experimentales, así como su apoyo en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Martínez Rodríguez por brindarme su amistad, por sus enseñanzas y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo y durante todo el tiempo que tengo de conocerlo.

A la MVZ Gloria Ortiz Gasca por su amistad y ser un pilar durante la odisea de mis estudios de Posgrado.

A la M. en E. Susana E. García Vázquez por brindarme su amistad, y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gerardo García Tovar por su amistad y apoyo durante mi formación académica.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por el apoyo y amistad brindados para la realización de este trabajo. Gracias Marco no hubiera sido posible este logro sin tu apoyo.

A los integrantes del Comité Tutoral: a la Dra. María Eugenia López Arellano por su asesoría, consejos y amistad a lo largo de la realización de este trabajo y en particular al Dr. Marco Antonio Vega López por su amistad y por ser una base fundamental en mi formación académica desde mi estancia en el CINVESTAV hasta la culminación de mis estudios de doctorado.

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

- Dra. Laura Cobos Marín.
- Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo.
- Dr. Pedro Mendoza de Gives.
- Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez.
- Dr. Fernando Alba Hurtado.

A los proyectos PAPIIT/UNAM con número IN216913 e IN215314 por el financiamiento para la realización de este proyecto.

Especialmente quiero agradecer a mi Tutor y amigo, al Dr. Fernando Alba Hurtado, quien a lo largo de 18 años ha influido en mi formación tanto personal como profesional, muchísimas gracias por haberme permitido trabajar una vez más a su lado, por la confianza y por el apoyo brindado. Sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este proyecto.

“Nunca es demasiado el agradecimiento, a quien no te abandonó en tus peores momentos.”

A todos aquellos que saben cuál fue mi situación durante la realización de este trabajo y que me apoyaron.

“GRACIAS POR NO ABANDONARME”

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre Juan Buendía y muy en especial a la de mi madre Amparo Jiménez por todo su amor y apoyo en cada una de mis decisiones.

A mis hermanos Isidro, Jesús, José, Mario y a mi hermana P. Rocío por el apoyo que me brindaron durante alguna etapa de mi vida.

A tí Jesús por ser mi mejor hermano, y más por ser el mejor Padre que pude haber tenido.

A tí Joc por ser más que mi hermano, mi amigo, gracias por estar cuando más lo he necesitado.

A todos aquellos que aceptaron ser los hermanos que elegí: Hugo Arellano e Iván Pérez algún día nos volveremos a encontrar. Jorge Bustamante, Rogelio Catalán, Cesar Cuenca, Luis Calderilla, Gabriel Garduño, Fernando Salazar, Miguel Cárdenas, J. Carlos Uribe.

ÍNDICE

Introducción	1
Morfología de <i>Haemonchus contortus</i>	1
Ciclo biológico	3
Epidemiología	6
a) Contaminación ambiental con huevos de <i>H. contortus</i>	6
b) Desarrollo y supervivencia del estadio infectante.....	6
c) Resistencia del hospedador.....	7
Acción patógena de <i>Haemonchus contortus</i>	8
Respuesta inmune contra <i>H. contortus</i>	11
1. Respuesta inmune innata contra <i>H. contortus</i>	12
2. Respuesta inmune adquirida contra <i>H. contortus</i>	15
2a. Elementos humorales de la respuesta inmune adquirida contra <i>H. contortus</i>	16
2b. Elementos celulares de la respuesta inmune adquirida contra <i>H. contortus</i>	17
Citocinas asociadas a la hemoncosis.....	20
Expulsión del parásito.....	21
Control de la hemoncosis ovina	22
Vacunación contra nematodos gastroentéricos	23
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivos	27
Material y Métodos	28
Ubicación.....	28
Animales.....	28
Parásitos.....	28
Obtención de Extracto de metacestodos de <i>Taenia hydatigena</i>	29
Diseño experimental.....	29
Exámenes parasitológicos.....	30
Conteo de eosinófilos sanguíneos.....	31
Conteo de las subpoblaciones celulares tisulares.....	31
Anticuerpos.....	32
Tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina).....	33
Análisis estadístico.....	34
Resultados	35
Discusión	59
Conclusiones	63
Referencias	65

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1	A) Mucosa abomasal con fases adultas de <i>Haemonchus contortus</i> machos (♂) y hembras (♀). B) Palo de barbero al que hace homología la forma de las hembras adultas.	2
Figura 2	A) Microfotografía electrónica de barrido del extremo anterior de <i>H. contortus</i> en donde se observa la lanceta dorsal. B) Microfotografía del extremo anterior de <i>H. contortus</i> en donde se observan las papilas cervicales. C) Microfotografía del extremo posterior en donde se observan los lóbulos de la bolsa copulatriz y las espículas. D) Extremo posterior de una hembra en donde se observa el labio vulvar. Foto A, tomada de Bowman 2014. Fotos B, C y D son originales.	3
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	5
Figura 4	A) Abomaso con infección masiva por <i>H. contortus</i> . B) Hemorragias petequiales en mucosa abomasal ocasionadas por la infección con <i>H. contortus</i> . C) Hiperplasia de la mucosa abomasal producida por la infección de <i>H. contortus</i>	9
Figura 5	A) Microhematocrito disminuido de un cordero anémico por la infección por <i>H. contortus</i> (flecha continua) comparado con el microhematocrito de un cordero no infectado (flecha punteada). B) Mucosa palpebral pálida, signo característico de la hemoncosis. C) Edema submandibular debido a la hipoproteïnemia por la pérdida de sangre ocasionada por <i>H. contortus</i>	10
Figura 6	Promedio ± EE del número de huevos eliminados en materia fecal de corderos de la raza Columbia infectados experimentalmente con L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> . Grupo 5. Corderos con administración parenteral de un extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> e infectados con <i>H. contortus</i> (n=5). Grupo 6. Corderos infectados únicamente con <i>H. contortus</i> (n=5). * Indica diferencia significativa entre grupos p< 0.05. Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto. La flecha solida indica el día de inoculación con <i>H. contortus</i>	45
Figura 7	Promedio ± EE del hematocrito de grupos de corderos de la raza Columbia del experimento a los cuales se les dio diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49 Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto. La flecha solida indica el día de inoculación con <i>H. contortus</i>	46
Figura 8	A) Corte histológico de mucosa pilórica abomasal teñido con cromotropo 2R, se observan numerosos eosinófilos de color rojo (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa fúndica abomasal teñido con azul de toluidina, se observan células cebadas teñidas de color morado (200X). D) Aumento de la microfotografía anterior, se observan células con gránulos de color morado (400X).	47
Figura 9	A) Corte histológico de mucosa fúndica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ , se observan células IFN- γ ⁺ de color café entre el tejido epitelial teñido de color azul (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2, se observan células IL-2 ⁺ de color café entre el tejido epitelial teñido de color azul (200X). D) Aumento de la microfotografía anterior (400X).	48
Figura 10	A) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-4, se observan células IL-4 ⁺ de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo policlonal anti-IL-6, se observan células IL-6 ⁺ de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). D) Aumento de la microfotografía anterior (400X).	49
Figura 11	A) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-10, se observan células IL-10 ⁺ teñidas de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X).	50

Figura 12	Cinética de los promedios \pm EE de eosinófilos sanguíneos de grupos de corderos de la raza Columbia con diferentes tratamientos. Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto. La flecha solida indica el día de inoculación con <i>H. contortus</i>	51
Figura 13	Promedio \pm EE de eosinófilos presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.001$. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa en la misma región de diferentes grupos $p < 0.05$. * Indica la región con mayor número de células $p < 0.001$	52
Figura 14	Promedio \pm EE de células cebadas presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.001$. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.01$. Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.01$	53
Figura 15	Promedio \pm EE de células IFN- γ^+ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$. * Indica la región abomasal con mayor número de células $p < 0.05$	54
Figura 16	Promedio \pm EE de células IL-2 ⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$. Letras griegas omega diferentes indican diferencia significativa entre subregiones de la región fúndica abomasal $p < 0.05$. * Indica la región abomasal con mayor número de células $p < 0.05$	55
Figura 17	Promedio \pm EE de células IL-4 ⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$. Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones $p < 0.05$	56
Figura 18	Promedio \pm EE de células IL-6 ⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$	57

Figura 19	Promedio ± EE de células IL-10 ⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.05. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p< 0.05. Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones p< 0.05.	58
Cuadro 1	Tratamientos de los grupos de corderos Columbia: ^a Inoculación con extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i> (ExmTh) ^b Infección por sonda gástrica. i.m. Inyección intramuscular. i.p. Inyección intraperitoneal.	30
Cuadro 2	Cuadro 2. Especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios.....	32
Cuadro 3	Promedio ± EE de los conteos de huevos eliminados por gramo de heces en corderos Columbia inoculados con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> y que recibieron un ExmTh, y de corderos únicamente infectados con <i>H. contortus</i> . Grupo 5. Corderos Columbia infectados experimentalmente con <i>H. contortus</i> y que recibieron ExmTh. Grupo 6. Corderos Columbia únicamente infectados experimentalmente con <i>H. contortus</i> . Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.05.	38
Cuadro 4	Promedio ± EE del total de fases adultas recuperadas y porcentaje de establecimiento de <i>H. contortus</i> , en corderos Columbia inoculados con 5000 L ₃ y que recibieron un ExmTh, y de corderos únicamente infectados con <i>H. contortus</i> . Grupo 5. Corderos Columbia infectados experimentalmente con <i>H. contortus</i> y que recibieron ExmTh. Grupo 6. Corderos Columbia únicamente infectados experimentalmente con <i>H. contortus</i> . Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.05.	39
Cuadro 5	Promedio ± EE de los eosinófilos sanguíneos de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.001.	40
Cuadro 6	Promedio ± EE de eosinófilos por cm ² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.001. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa en la misma región de diferentes grupos p< 0.05. * Indica la región con mayor número de células p< 0.001.	41
Cuadro 7	Promedio ± EE de células cebadas por cm ² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.001. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p< 0.01. Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p< 0.01.	42
Cuadro 8	Promedio ± EE de células IL-2 e IFN-γ positivas por cm ² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento: Grupo 1. Testigo sin tratamiento. Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0. Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3. Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49. Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p< 0.05. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p< 0.05. Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p< 0.05.	

	Letras griegas omega diferentes indican diferencia significativa entre subregiones de la región fúndica abomasal $p < 0.05$.	
	* Indica la región abomasal con mayor número de células $p < 0.05$.	43
Cuadro 9	Promedio \pm EE de células IL-4, IL-6 e IL-10 positivas por cm^2 en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:	
	Grupo 1. Testigo sin tratamiento.	
	Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de <i>T. hydatigena</i> (ExmTh), sacrificado día 0.	
	Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L_3 de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 3.	
	Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.	
	Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L_3 de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49.	
	Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L_3 de <i>H. contortus</i> , sacrificado día 49.	
	Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.	
	Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$.	
	Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones $p < 0.05$.	44

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µm	Micrómetro
c/u	Cada uno
CuO	Óxido de Cu
CuSO ₄	Sulfato de cobre
<i>D. flagrans</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
DAB	Diaminobencidina
EE	Error estándar
ES	Eosinófilos sanguíneos
ExmTh	Extracto de metacestodo de <i>Taenia hydatigena</i>
FES	Facultad de Estudios Superiores
GL	Leucocitos globulares
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
H ₂ CO ₃	Ácido carbónico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
hgh	Huevos eliminados por gramo de heces
i.m.	Inyección intramuscular
i.p.	Inyección intraperitoneal
IFN-γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgE	Inmunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramo
L ₁	Larva de primer estadio
L ₂	Larva de segundo estadio
L ₃	Larva de tercer estadio
L ₄	Larva de cuarto estadio
L ₅	Larva de quinto estadio
MDD	Millones de dólares
mg	Miligramo
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad de inglés Major histocompatibility complex
mL	Mililitro
MM	Mastocitos mucosales
mm	Milimetro
Mm ²	Milimetro cuadrado
mm ³	Milimetro cubico

MTC	Mastocitos de tejido conectivo
NGE	Nematodos gastroentéricos
<i>O. ostertagi</i>	<i>Ostertagia ostertagi</i>
<i>O. ovis</i>	<i>Oestrus ovis</i>
PBS	Solución amortiguadora de fosfato del inglés phosphate buffered saline
pi	Post-inoculación
pv	Peso vivo
RFA	Región fúndica abomasal
RPA	Región pilórica abomasal
sp	Especie
<i>T. circumcineta</i>	<i>Teladorsagia circumcineta</i>
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria

RESUMEN

Se ha demostrado que la administración de un extracto del metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExmTh) induce cierto grado de protección en contra de la infección con *Haemonchus contortus* (Cuenca-Verde et al., 2011). Esta protección se ha asociado al reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ en la pared abomasal, pero no se sabe qué tipo de citocinas participan en dicha resistencia. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el número de eosinófilos, células cebadas y células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ por mm² de tejido en la mucosa y submucosa de las regiones fúndica y pilórica de la pared abomasal y su relación con la protección inducida contra la hemoncosis experimental ovina.

Los resultados mostraron que los corderos que sólo fueron infectados experimentalmente con larvas de *H. contortus* presentaron un mayor número de fases adultas y eliminaron una mayor cantidad de huevos en heces ($p < 0.05$) que los corderos que recibieron ExmTh antes de la infección, por otra parte los corderos que recibieron el ExmTh mostraron un mayor ($p < 0.05$) promedio de eosinófilos en sangre que los corderos que no recibieron el ExmTh. En general, los corderos que recibieron ExmTh antes de la infección tuvieron una mayor cantidad ($p < 0.05$) de eosinófilos, células cebadas y células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ en la pared del abomaso que los corderos que solo estaban infectados con *H. contortus* o que solo habían recibido ExmTh. Se observó una mayor expresión ($p < 0.05$) de IL-2 e IFN- γ en la submucosa que en la mucosa del abomaso, y una mayor expresión de IL-4 en la mucosa del abomaso que en la submucosa, esto sugiere que simultáneamente se presenta una respuesta tipo Th1 en la submucosa abomasal y una respuesta tipo Th2 en la mucosa abomasal. La cantidad de eosinófilos, células cebadas y la expresión *in situ* de IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ en las paredes abomasales se correlacionaron negativamente con la carga de gusanos adultos ($p < 0.05$). Estos resultados mostraron que el ExmTh es un inmunoestimulante no específico para la respuesta inmune del abomaso y probablemente la protección observada es el resultado de este efecto.

INTRODUCCIÓN

La verminosis gastroentérica es una enfermedad producida por varios géneros de nematodos gastroentéricos (NGE) que afecta a rumiantes en general, siendo los más perjudicados los ovinos; clínicamente se caracteriza por producir una ineficiencia biológica que altera la producción y en consecuencia la economía de los productores de ovinos. Esta enfermedad representa uno de los principales problemas sanitarios a nivel mundial en los sistemas de producción en pastoreo, se presenta con mayor frecuencia en zonas húmedas incluyendo regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial (Tembely et al., 1997). Dentro de los diversos géneros de NGE que producen la enfermedad, tanto en México como en otros países, *Haemonchus contortus* es considerado el nematodo más importante de ellos, debido a su amplia distribución geográfica así como a las repercusiones en la salud y en la producción. La enfermedad producida por este nematodo recibe el nombre de “hemoncosis” y su severidad varía de acuerdo a la cantidad de parásitos presentes, la edad del hospedador y su estado nutricional entre muchos otros, pudiéndose observar diferentes manifestaciones de anemia, síndrome de mala digestión y por lo tanto pérdida de peso, así como, retraso en el desarrollo, disminución en la conversión alimenticia, y por lo tanto mala calidad de la canal (Liebano, 2011; Cuellar, 2014).

Las repercusiones económicas generadas por este parásito han podido ser estimadas en algunos países como Etiopía, en donde se han cuantificado pérdidas por 82 millones de dólares (MDD) anuales en pequeños rumiantes (Biffa et al., 2007), en Sudáfrica e India los costos por tratamiento anual se calcularon en el orden de 46 y 103 MDD respectivamente (McLeod, 2004; Waller and Chandrawathani, 2005) y en Australia, Sackett et al. (2006), valoraron en 369 MDD australianos las pérdidas ocasionadas por NGE.

Morfología de *Haemonchus contortus*

Al nematodo *H. contortus* también se le conoce como el gusano del estómago, gusano del cuajar y gusano palo de barbero o de barbería debido a que las hembras alimentadas alternan líneas diagonales de color rojo con blanco, ya que los ovarios de color blanco se encuentran enrollados en espiral alrededor del intestino de color rojo dándole un aspecto similar a los palos de barbero, mientras que los machos presentan un color rojo

uniforme cuando se han alimentado (figura 1). El gusano mide entre 10 y 30 mm de longitud siendo la hembra más grande que el macho (Soulsby, 1987; Bowman, 2014).

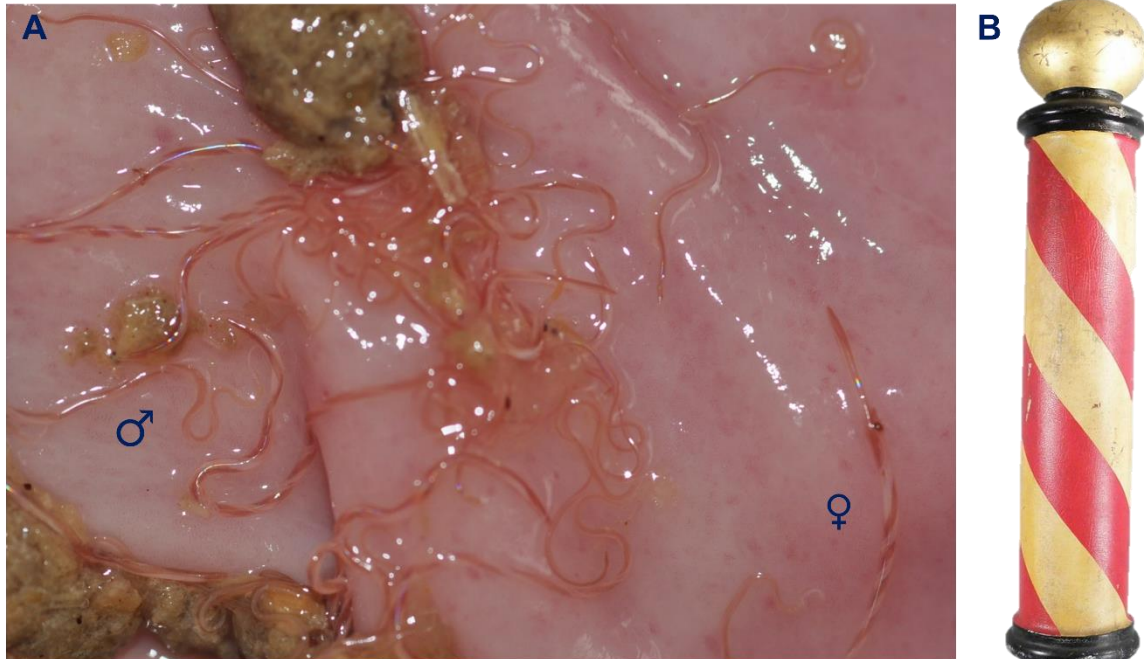


Figura 1. A) Mucosa abomasal con fases adultas de *Haemonchus contortus* machos (♂) y hembras (♀). B) Palo de barbero al que hace homología la forma de las hembras adultas.

En el extremo anterior los gusanos son delgados y poseen un pequeño orificio bucal con una lanceta en posición dorsal (figura 2A) que le permite perforar la mucosa del abomaso, poseen una papila cervical con forma de espina a cada lado del cuerpo (figura 2B) (Quiroz, 1986). En el extremo posterior el macho presenta una bolsa copulatriz con dos lóbulos laterales grandes y un lóbulo dorsal pequeño (figura 2C). En la hembra la vulva se encuentra en la parte posterior del cuerpo y está cubierta por una protuberancia llamada “labio vulvar” (figura 2D) y el extremo termina en punta roma. Los huevos son incoloros miden de 70-85 μm de largo por 41-48 μm de ancho, tienen una forma ovoide o elipsoidal con los polos ligeramente aplanados y en su interior presenta blastómeros que no llenan completamente la cavidad (Soulsby 1987; Alba, 2007; Bowman 2014).

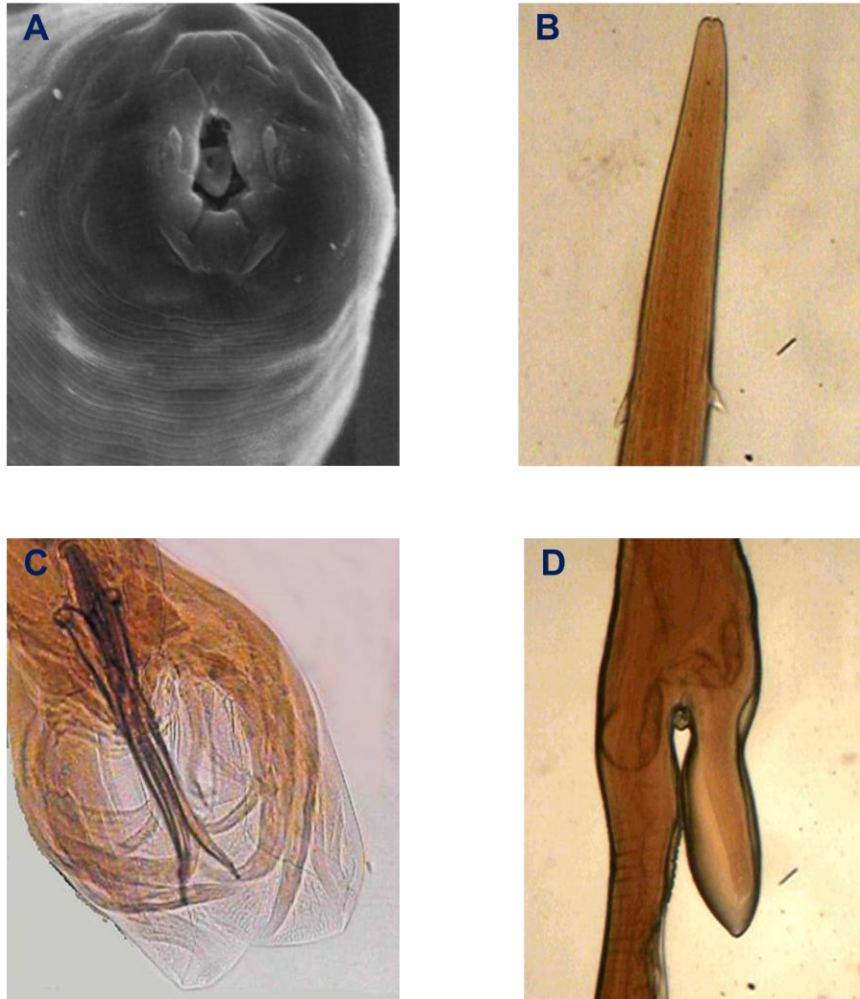


Figura 2. A) Microfotografía electrónica de barrido del extremo anterior de *H. contortus* en donde se observa la lanceta dorsal. B) Microfotografía del extremo anterior de *H. contortus* en donde se observan las papilas cervicales. C) Microfotografía del extremo posterior en donde se observan los lóbulos de la bolsa copulatriz y las espículas. D) Extremo posterior de una hembra en donde se observa el labio vulvar. Foto A, tomada de Bowman 2014. Fotos B, C y D son originales.

Ciclo biológico

Las hembras adultas localizadas en el abomaso, después de ser fecundadas ovipositan huevos embrionados (16-32 blastómeros), que salen del hospedador junto con la materia fecal (Soulsby, 1987). En condiciones adecuadas, el embrión se desarrolla hasta el primer estadio evolutivo o larva de primer estadio (L₁) en 24 o 30 horas y después tiene lugar la eclosión, que implica un aumento en la permeabilidad de la cáscara del huevo, lo que permite la salida de trehalosa y el ingreso de agua, incrementando el grado de hidratación de la L₁ para que desarrolle de mejor manera su actividad muscular. Por otro lado, la L₁ es asistida por la secreción de varias enzimas como la lipasa, quitinasa y

metaloproteasas que ablandan la cascara del huevo permitiendo que la actividad muscular del extremo anterior o posterior de la larva force una apertura (Sutherland and Scott 2010).

Una vez liberada la L₁, esta se alimenta y se desarrolla para posteriormente realizar la primera muda de la fase pre-parásita, en la cual su cutícula se separa de la epidermis (apólisis) y luego es secretada una nueva cutícula; posteriormente tiene lugar la ruptura y liberación de la cutícula vieja (ecdisis) y es seguida de la aparición del siguiente estadio evolutivo, la larva de segundo estadio o larva 2 (L₂). Pasados dos o tres días la L₂ sufre una nueva muda, durante esta la apólisis se lleva a cabo pero la ecdisis se retrasa y la larva de tercer estadio o larva 3 (L₃) retiene la cutícula de la L₂; por lo que la L₃ no se puede alimentar. Esto representa un punto de detención en el desarrollo del ciclo de vida del nematodo. Sin embargo, la L₃ es activa y capaz de migrar de la materia fecal a los pastos que sirven de alimento a los hospederos, de esta manera se favorece su ingestión constituyendo la última etapa del ciclo biológico fuera del hospedador, la cual puede durar de 7 a 90 días dependiendo de las condiciones climatológicas de la región (Liebano, 2011; Sutherland and Scott, 2010).

Una vez ingerida por el hospedero, el primer paso en la transición a la fase parasitaria es la terminación de la segunda ecdisis, que se desencadena por las condiciones químicas presentes en el rumen como el equilibrio entre bicarbonato (HCO₃⁻) y el ácido carbónico (H₂CO₃) del líquido ruminal, y los niveles relativamente altos de dióxido de carbono. El desvainamiento es un proceso activo que implica actividad física larvaria y la secreción de un líquido que contiene enzimas con actividad sobre la cutícula, eicosanoides y sustancias lubricantes (Meana y Rojo, 1999).

Al llegar las L₃ al abomaso, penetran inmediatamente en las criptas y glándulas de la mucosa tanto en la región fúndica como en la pilórica, aunque de manera general se ubican con mayor frecuencia en la mucosa de la región fúndica. La siguiente muda a larva 4 (L₄) se realiza en este sitio de la mucosa, para posteriormente emerger de las criptas y las glándulas abomasales sobre la superficie de la mucosa mudando una vez más a larva de quinto estadio (L₅) o preadulto. Finalmente se desarrollan hasta madurar sexualmente y transformarse en gusanos adultos o fases adultas, como se observa en la figura 3 (Meana y Rojo, 1999).

Bajo ciertas circunstancias el desarrollo larvario se detiene inmediatamente después de formada la L₄ para sincronizar su desarrollo con las condiciones del hospedador y del ambiente (Soulsby, 1987). Este estado denominado hipobiosis o inhibición larvaria puede durar hasta 6 meses. Al parecer es una característica genéticamente predeterminada y está asociada a la adaptación de las poblaciones parasitarias, a la resistencia del hospedador y a variaciones estacionales de las condiciones climáticas de cada región. Permite que la expresión del potencial reproductivo de una generación se postergue hasta 6 meses, lo que mejora las expectativas de éxito para sobrevivir y alcanzar un nuevo hospedador (Vignau, 2005; Bowman, 2014).

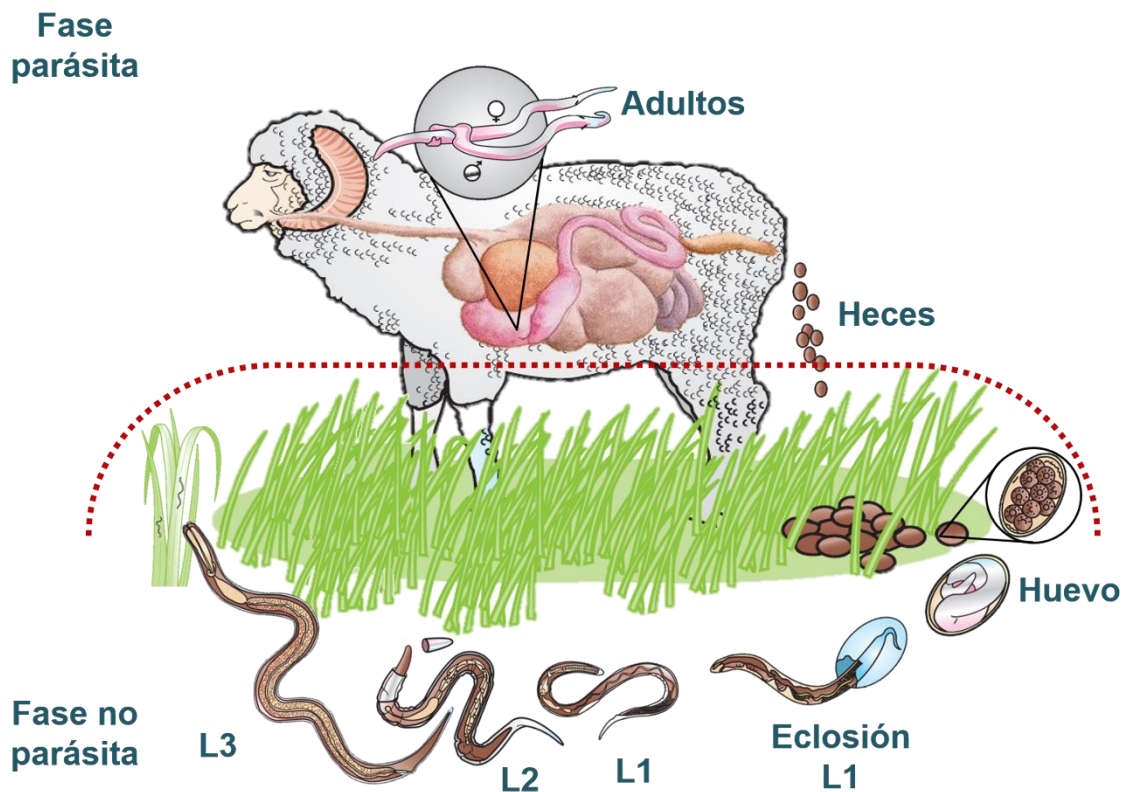


Figura 3. Ciclo de vida de *H. contortus*. Huevos embrionados son eliminados en heces. La larva uno se desarrolla, eclosiona en uno o dos días y muda a larva dos. La segunda muda se inicia pero no se completa en el ambiente, por lo que la larva tres (fase infectante) queda dentro de la cutícula de la larva dos hasta que es ingerida por un ovino. La cutícula es eliminada en el rumen, y la larva tres (fase parasita) muda a larva cuatro. Esta fase muda a larva cinco y posteriormente a adulto, dependiendo de si se entra en hipobiosis o no.

Epidemiología

La magnitud de la hemoncosis en un rebaño está determinada por varios aspectos como: a) la tasa de contaminación ambiental con huevos de *H. contortus*, que es directamente proporcional a la población de fases adultas, b) el desarrollo y la supervivencia del estadio infectante y c) la resistencia del hospedador que varía en función de la edad, la constitución genética, presencia o ausencia de una infección ya establecida, y en algunos casos, la inmunidad adquirida y por la maduración de las larvas hipobióticas (Vignau et al., 2005; Sutherland and Scott, 2010; Bowman, 2014).

a) **Contaminación ambiental con huevos de *H. contortus*.** Aunque las larvas infectantes pueden sobrevivir en condiciones ambientales adecuadas, el hospedador es quien perpetúa la infección año tras año. La infección puede mantenerse como una carga parasitaria baja o como una población latente de larvas hipobióticas, o como ambos. En la primavera se observa un aumento sustancial en la eliminación de huevos en materia fecal llamado "alza de primavera", y un aumento más pronunciado ocurre comúnmente en ovejas gestantes dos semanas antes del parto y hasta ocho semanas después, en cualquier época del año fenómeno llamado "alza periparto". En ambos fenómenos el número de huevos eliminados por gramo de heces (hgh) está relacionado principalmente con la maduración de las larvas hipobióticas arrestadas en ovejas adultas, lo que asegura que nuevas generaciones de L₃ estén disponibles en grandes cantidades al momento en que los hospederos estén pastando (Taylor et al., 2007; Bowman, 2014).

b) **Desarrollo y supervivencia del estadio infectante.** Con una parte del ciclo de vida desarrollado fuera del hospedador, los factores ambientales juegan un papel muy importante en el éxito del desarrollo embrionario y en la supervivencia de las fases larvianas de vida libre.

El desarrollo de los huevos embrionados tiene como factores limitantes la temperatura y la humedad. En cuanto a la temperatura, se estima que los huevos embrionados no son capaces de desarrollarse por debajo de 12°C, siendo la temperatura óptima para su desarrollo 27°C. Por otra parte la humedad, es el factor más importante para la supervivencia de los huevos y las larvas, una humedad relativa por debajo del 96% retarda el desarrollo larvario (Meana y Rojo, 1999), y aunque las larvas son capaces de resistir fluctuaciones de humedad relativa a lo largo del día (70-100%), son incapaces de

sobrevivir cuando esta se mantiene en un nivel constante del 85% (Soulsby, 1987). La materia fecal bien conformada retiene la humedad, incluso cuando el pasto adyacente está relativamente seco, por lo que su conformación juega un papel importante en facilitar la supervivencia de las larvas durante el período de secas.

Por otro lado el oxígeno es necesario para incubar al embrión y para el desarrollo larvario. En la materia fecal sólida, los niveles de oxígeno en el centro son bajos, lo que retarda el desarrollo embrionario, mientras que la ruptura del bolo fecal aumenta la disponibilidad de oxígeno acelerando el desarrollo embrionario en condiciones de temperatura y humedad adecuadas (Sutherland and Scott, 2010).

c) **Resistencia del hospedador.** En condiciones climáticas adecuadas el número de fases infectantes en la pradera aumenta exponencialmente, por lo menos al inicio de la temporada de pastoreo. Sin embargo, los hospederos comienzan a desarrollar resistencia a *H. contortus* con cada reinfección, produciendo un descenso drástico en la eliminación de hgh en animales expuestos a infecciones y reinfecciones, debido a la expulsión masiva de adultos. Este fenómeno depende de una reacción similar a la de la hipersensibilidad de tipo I en la mucosa gástrica en respuesta al estímulo larvario, pero no parece estar inmunológicamente mediada, pues aparece en animales adultos y jóvenes con cargas parasitarias tanto altas como bajas (Meana y Rojo, 1999). El principal componente de esta resistencia es un fenómeno denominado premunidad, definido como: el estado de resistencia a la infección que se estableció después de que una infección aguda se volvió crónica, y que puede durar tanto tiempo como los parásitos permanezcan en el cuerpo del hospedador, lo que ocasiona que los hospedadores entren al invierno con una población de fases adultas sustancialmente reducida (Sutherland and Scott 2010).

La edad de los hospederos juega un papel importante en la resistencia ya que los animales jóvenes son más propensos a padecer hemoncosis debido a que su sistema inmune tarda en montar una respuesta efectiva contra los nematodos, mientras que ovinos mayores a un año son más resistentes debido al contacto previo con los parásitos, además de que su sistema inmune ya ha madurado; actúan como portadores sanos eliminando huevos y contaminando las praderas con el desarrollo posterior de las larvas infectantes, lo cual resulta más eficiente si las L₃ proceden de huevos derivados de corderos; pues se ha observado que los huevos liberados por ovejas adultas tardan más tiempo en desarrollarse,

lo que podría sugerir que hay influencia de un mecanismo inmune en el desarrollo de las etapas de vida libre y a su vez está relacionado con la contaminación de la pastura (Vignau, et al., 2005; Sutherland and Scott, 2010).

Por otro lado la comparación de la respuesta de diferentes razas de ovinos frente a *H. contortus* ha demostrado que algunas son mucho más resistentes que otras. Estas suelen ser razas autóctonas y rústicas, de regiones tropicales o subtropicales, capaces de tolerar o resistir las enfermedades más habituales en su ambiente. Probablemente esto refleja que estas razas han estado sometidas durante siglos a un proceso de selección natural para la resistencia frente a los parásitos en ausencia de tratamientos antihelmínticos (Baker and Gray, 2004). Algunas de las razas en las que se ha demostrado esta resistencia son: Blackbelly (Muñoz et al., 2005; Muñoz et al., 2006), Florida (Torres et al., 1994), St. Croix, Katahdin (Parker et al., 1993), Red maasai (Mugambi et al., 1996), Nali (Singh et al., 1997), Polaca de lana larga (Bouix et al., 1998), Nativa de Louisiana (Miller et al., 1998), Florida y sus cruza (Amarante et al., 1999), Castellana (Gómez-Muñoz et al., 1999) y borregos criollos del altiplano central mexicano (Alba-Hurtado et al., 2010).

Acción patógena de *Haemonchus contortus*

El daño ocasionado por este parásito a sus hospedadores varía dependiendo de ciertos factores como: la carga parasitaria (figura 4A), el estado metabólico del hospedador, y el estado evolutivo del parásito; ya que se puede encontrar en el hospedador como L₃, L₄ tisular en estado de desarrollo, L₄ en estado de hipobiosis, como L₅ y como fase adulta en la luz abomasal (Radostits et al., 2002). Las larvas de tercer estadio ejercen una acción traumática al perforar la mucosa abomasal, para penetrar en las glándulas de las criptas ocasionado la formación de hemorragias petequiales (figura 4B), seguido por la

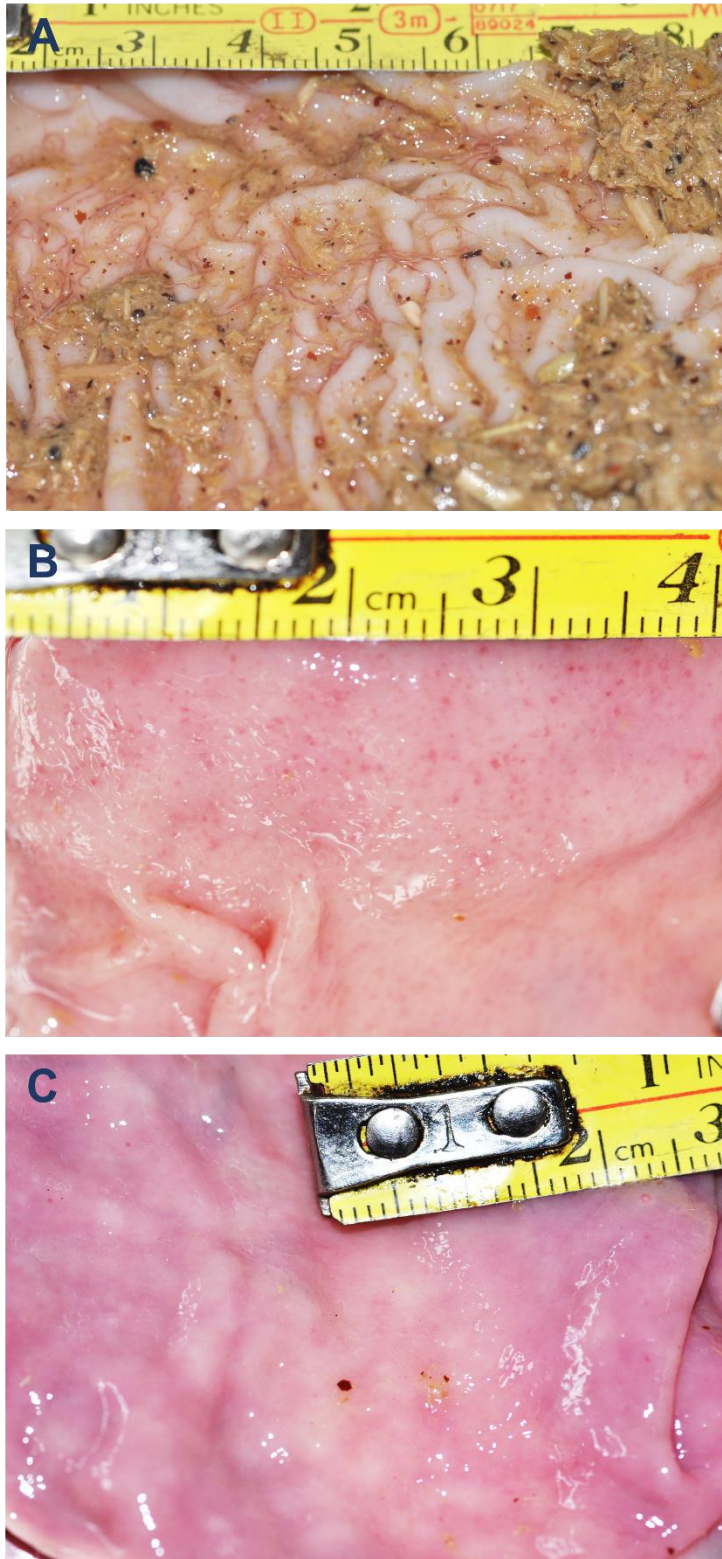


Figura 4. A) Abomaso con infección masiva por *H. contortus*. B) Hemorragias petequiales en mucosa abomasal ocasionadas por la infección con *H. contortus*. C) Hiperplasia de la mucosa abomasal producida por la infección de *H. contortus*.

aparición de pequeñas úlceras; también realizan una acción patógena tóxica al secretar enzimas como una cisteín-proteasa que degrada las uniones intercelulares del epitelio para establecerse en las glándulas de las criptas abomasales, además las larvas ocupan un espacio en el tejido y por lo tanto una acción patógena mecánica por compresión, lo que ocasiona una hiperplasia de la mucosa (figura 4C), infiltración de células inflamatorias y sustitución de células parietales productoras de ácido clorhídrico por células indiferenciadas no secretoras (Meana y Rojo, 1999; Vignau, et al., 2005; Sutherland and Scott, 2010).

Las fases adultas de *H. contortus* ejercen una acción patógena traumática con la lanceta al momento de perforar la mucosa del abomaso generando una herida que le permite alimentarse. Los gusanos adultos realizan

una acción patógena expoliatriz hematófaga y son los responsables de los cuadros clínicos, ya que se ha estimado que estas fases pueden ingerir hasta 0.05 mL de sangre al día, lo que conduce al desarrollo de anemia por pérdida de sangre la cual puede ser evidenciada mediante la determinación del hematocrito como se observa en la figura 5A (Soulsby, 1987; Urquhart et al., 2001). Las fases adultas al alimentarse también desarrollan una acción patógena tóxica al secretar sustancias anticoagulantes lo que permite que la herida de alimentación siga sangrando, favoreciendo la pérdida de sangre. La anemia por pérdida de sangre es por lo tanto, la principal manifestación clínica de la hemoncosis, y se hace manifiesta por la palidez de las mucosas (figura 5B) y llega a ser incompatible con la vida en casos muy severos (Soulsby, 1987). Esta pérdida

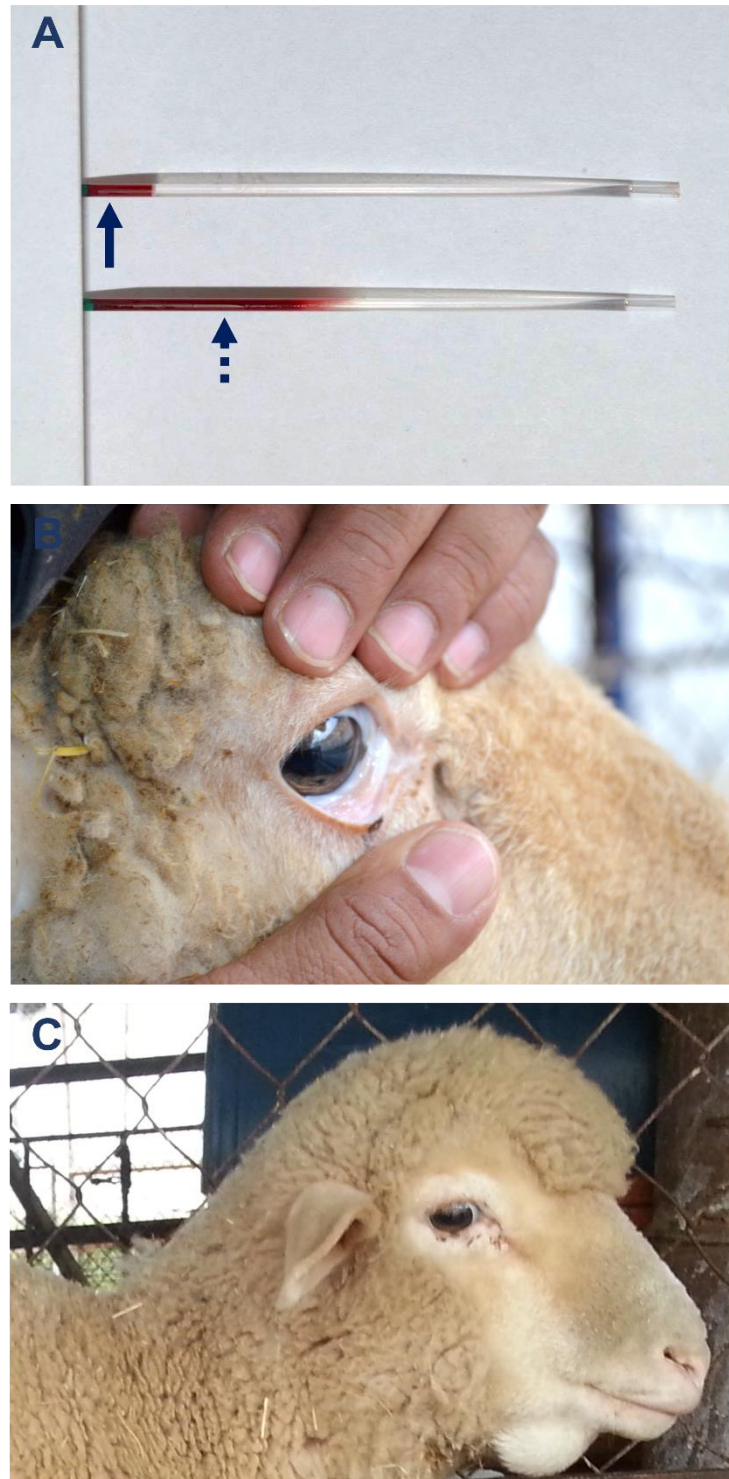


Figura 5. A) Microhematocrito de un cordero anémico por la infección por *H. contortus* (flecha continua) comparado con el microhematocrito de un cordero no infectado (flecha punteada). B) Mucosa palpebral pálida asociada a la hemoncosis. C) Edema submandibular debido a la hipoproteïnemia por la pérdida de sangre producida por *H. contortus*.

de sangre implica también la pérdida de una gran cantidad de proteína principalmente la albumina, lo que genera salida de líquido de los vasos sanguíneos y su extravasación en el intersticio y cavidades corporales con la consecuente formación de edema (figura 5C) (Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999; Vignau et al., 2005).

Por otro lado, se ha demostrado un incremento de pH en los momentos posteriores a la ingestión de L₃ de *H. contortus*, probablemente como consecuencia de una alteración de la permeabilidad del epitelio, lo que produce modificación del potencial eléctrico a ambos lados de la pared digestiva, con un aumento de iones HCO₃⁻ en la luz, lo que eleva el pH dificultando la transformación del pepsinógeno en pepsina y altera la digestión proteica, agravándose el déficit proteico (Meana y Rojo, 1999). Esta modificación del pH abomasal parece ser esencial para la supervivencia de *H. contortus*, dado que parece ser incapaz de sobrevivir a pH 2,8, valor habitual en el abomaso de animales sanos (Haag, 1995). Sin embargo, con un pH entre 4 y 4,5 no sólo tiene asegurada su supervivencia, sino que además su fecundidad es máxima (Honde and Bueno, 1982).

Los cambios fisiológicos descritos anteriormente se han asociado con la entrada de las L₃ a la mucosa, su muda y su salida a la luz intestinal a los cuatro días post-infección (PI), debido a las lesiones físicas producidas en el epitelio. Sin embargo, Simpson et al. (1997), mostraron que la inoculación de fases adultas de *H. contortus* en el abomaso produce un incremento del pH, por lo que es posible que algunos antígenos de secreción-excreción sean los responsables de modificar la actividad de las células epiteliales. De hecho, los tratamientos antihelmínticos recuperan el pH mucho antes de que las células puedan recuperarse (Meana y Rojo, 1999). Por otro, lado también se ha asociado a la presencia de fases adultas en abomaso el aumento en los niveles séricos de gastrina y pepsinógeno (Simpson et al., 1997). Finalmente, la anorexia aparece como una consecuencia directa de la parasitosis (Fox et al., 1989).

Respuesta inmune contra *H. contortus*

La respuesta inmune contra los nematodos intestinales se ha estudiado ampliamente en humanos y modelos murinos (Miller 1996; Cox and Liew, 1992; Sher and Coffman, 1992). Una característica importante de la respuesta inmune a las infecciones parasitarias es que inducen respuestas de células T CD4⁺ polarizadas Th1 o Th2 en función del perfil de

citocinas producido. Este fenómeno es particularmente notable en el caso de las infecciones por helmintos, ya que, en contraste con otros patógenos, desencadenan rutinariamente fuertes respuestas Th2 que conducen a niveles altos de inmunoglobulina E (IgE), eosinofilia, y aumento de células cebadas. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos a través de los cuales los ovinos tienen o adquieren resistencia a la hemoncosis no son claros (Saddiqui et al., 2011; Shakya et al., 2011; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2014).

En la protección de la hemoncosis, participan e interactúan tanto factores inespecíficos como factores específicos del sistema inmune del hospedero. El proceso de expulsión del nematodo por los ovinos inmunizados, es la culminación de varios eventos que incluyen: la activación de mecanismos inespecíficos de defensa, el reconocimiento de moléculas del parásito (antígenos somáticos y antígenos de secreción-excreción) y la inducción del tipo de respuesta adquirida adecuada (Meeusen et al., 2005; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2014).

1. Respuesta inmune innata contra *H. contortus*

Los elementos de la respuesta inmune innata incluyen barreras anatómicas, moléculas secretoras y componentes celulares, quienes en conjunto proporcionan una defensa inmediata en contra de *H. contortus*. La resistencia innata contra la infección parasitaria está mediada en parte por factores solubles preexistentes que reconocen y destruyen diferentes fases evolutivas de parásitos, por ejemplo, el sistema del complemento mediante su activación por la vía alterna produce una rápida eliminación de parásitos gastrointestinales cuando se utilizan modelos experimentales murinos. Esta eliminación se encuentra asociada a una actividad inflamatoria innata, inducida principalmente por la activación de la vía alterna del complemento y mediada por células cebadas y eosinófilos (Meeusen and Balic, 2000). Una vez activado el complemento conduce a un incremento de la permeabilidad vascular, a la formación del complejo de ataque a la membrana y a la opsonización. A través de la producción de péptidos vasoactivos y quimiotácticos, se movilizan principalmente eosinófilos a la zona de infección de manera independiente de mecanismos específicos como las células CD4⁺ y la citocina IL-5, por lo que a este fenómeno se le denomina eosinofilia tisular timo-independiente (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2014).

Otro elemento que forma parte de la respuesta inmune innata, es la capa de gel mucoso suprayacente compuesta en su mayor parte de las glicoproteínas de mucina que cubre la superficie del tracto gastroentérico y que es producido por las células epiteliales caliciformes, también contiene una matriz de moléculas bioactivas llamados péptidos antimicrobianos muchas de las cuales se sabe que tienen efecto anti-microbiano, tales como las defensinas, otras moléculas como las catelicidinas que tienen papeles quimiotácticos que estimulan la inflamación y pueden contribuir a la respuesta adquirida posterior (Deplancke and Gaskins, 2001, Tjabringa et al., 2005). Douch et al. (1984), analizaron el moco derivado de ovejas seleccionadas por su elevada o baja eliminación hgh de NGE y lo relacionaron con el efecto sobre la movilidad de las L₃ *in vitro*, observando que las ovejas con menor eliminación de huevos *in vivo* producían moco que inhibía el movimiento de las larvas *in vitro*.

Por otro lado se ha observado que compuestos como las lectinas, también son liberadas junto con la mucina después de la infección con *H. contortus*, y su pico de secreción puede estar asociado con la expulsión del parásito. Se ha propuesto que las lectinas pueden reconocer y unirse a los epítomos de la superficie del parásito, y que pueden participar en su expulsión, ya sea por la unión a mucinas (aumentando la viscosidad del moco, que se sabe está asociada con la expulsión de nematodos), o mediante la formación de un puente entre mucinas y parásitos, lo que conduce a la reducción de movilidad y/o expulsión (Sutherland and Scott 2010). Una de estas proteínas es la galectina-14 que es producida y liberada por eosinófilos, sus niveles en el moco aparecen aumentados en animales parasitados en comparación con aquellos que no lo están, así como en animales sometidos a un protocolo de inoculaciones repetidas en comparación con los que reciben una sola inoculación (Kemp et al., 2009; Robinson et al., 2011).

De los elementos celulares que forman parte de la repuesta inmune innata, son las células cebadas y los eosinófilos quienes se han asociado a las infecciones por nematodos en el tracto gastrointestinal (Buddle et al., 1992; Henderson and Stear, 2006; Kanobana et al., 2002). Las células cebadas o mastocitos son consideras células centinelas cuya función principal es reconocer y responder a la invasión de microorganismos, en este caso a las infecciones por helmintos. Los mastocitos se han estudiado más ampliamente durante las infecciones por helmintos y consisten en una población heterogénea,

inicialmente clasificados como mastocitos de tejido conectivo (MTC) y mastocitos mucosales (MM). Dentro del compartimiento de MM las células pueden residir en la lámina propia o en el epitelio. Los gránulos de MM intraepiteliales son generalmente más grandes que los MTC, sobre todo en los rumiantes, donde se les conoce como leucocitos glóbulares (LG). Los MM intraepiteliales son generalmente considerados como células efectoras, con una ubicación ideal para descargar sus productos tanto en el lumen de los órganos como en el compartimiento epitelial en el que puedan afectar el microambiente del parásito con un efecto mínimo sobre la arquitectura del tejido subyacente. Los LG también se han recuperado de la luz del tracto gastrointestinal en ovinos parasitados (Stankiewicz, 1993) Los efectos de los mediadores de los mastocitos en el hospedador incluyen: contracción del músculo liso (histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos y el factor activador plaquetario), aumento de la permeabilidad vascular (histamina, serotonina y leucotrienos), aumento de la secreción de moco (histamina, leucotrienos y proteasas) y la degradación de los vasos sanguíneos y las membranas basales de células epiteliales (proteasas). Los efectos fisiológicos generales de estos mediadores son similares a los descritos para las respuestas de hipersensibilidad inmediata (Crowe and Perdue, 1992; McKay and Bienenstock, 1994).

Otra consideración importante respecto a los mecanismos efectores iniciados por las células cebadas durante la eliminación del parásito, es su estrecha asociación con el sistema nervioso a nivel gastrointestinal. La degranulación de células cebadas inducida por antígenos parasitarios ha demostrado un aumento en la estimulación eléctrica de los nervios entéricos y liberación de acetilcolina, resultando en un aumento de la secreción de agua y una fuerza de propulsión, creando un mecanismo semejante al de una "lavadora/barredora" lo que contribuye a la eliminación de los parásitos de la luz y de las superficies epiteliales del tracto gastroentérico (McKay and Bienenstock, 1994).

En el caso de las infecciones por helmintos como *H. contortus* grandes cantidades de eosinófilos han sido observados tanto en sangre periférica (eosinofilia) como infiltrados en los tejidos a nivel local. Si bien las infecciones por parásitos se han asociado clásicamente con eosinofilia, algunos autores como Sutherland et al., (1999) observaron que el número de eosinófilos periféricos durante la infección primaria con *Teladorsagia circumcincta* en corderos, resultó ser significativamente menor durante el periodo de la

infección primaria y propuso que podía ser debido al reclutamiento de eosinófilos en el epitelio intestinal. La eosinofilia también se ha observado asociada con inflamación y protección contra la infección con *H. contortus* (Balic et al. 2006; Rainbird et al. 1998), *T. circumcincta* (Henderson and Stear, 2006) y *Nematodirus battus* (Winter et al. 1997). Así mismo se ha demostrado que la inducción de eosinofilia por la infección con *Oestrus ovis* o por la aplicación de componentes de otros parásitos tales como: extracto de larvas de *Taenia hydatigena* en ovinos, provoca un aumento de eosinófilos a nivel abomasal que inducen una resistencia parcial a la hemoncosis (Dorchies et al., 1997; Terefe et al., 2005; Yacob et al., 2008; Cuenca-Verde et al., 2011).

El principal papel de los eosinófilos durante las infecciones por nematodos radica en el efecto citotóxico que ejercen de manera directa sobre los helmintos, ya que durante la degranulación se liberan moléculas como la proteína básica principal, proteínas catiónicas y peroxidasas, las cuales tienen acción tóxica directa contra helmintos. Además, también secretan mediadores lipídicos como: leucotrienos, prostaglandina E2, factor de agregación plaquetaria y lipoxinas, que promueven el aumento de la permeabilidad, la secreción de moco, la quimiotaxis y la coagulación. La capacidad de los eosinófilos para producir algunas citocinas como IL4 o IL-10, sugieren una función reguladora de la respuesta inmune (Behm and Ovington, 2000).

2. Respuesta inmune adquirida contra *H. contortus*.

Dentro de su hospedador *H. contortus* pasa por diferentes estadios evolutivos (L₃, L₄, L₅ y fases adultas), cada uno de estos, presenta diferencias en sus moléculas de superficie; por ejemplo se han logrado identificar antígenos de superficie estadio-específicos para la L₃ y L₄ que no están expresados en la superficie de las fases adultas (Bowles et al., 1995). Los cambios rápidos en los antígenos de superficie, dificultan la respuesta del hospedero en las etapas iniciales de la infección, por lo que cada estadio evolutivo, es considerado inmunológicamente un organismo antigénico diferente (Meeusen et al., 2005). Debido a lo anterior la respuesta inmune mediada por anticuerpos que inducen los antígenos de los diferentes estadios larvarios, no reconoce a las fases adultas.

Se ha demostrado que algunas células dendríticas pueden internalizar antígenos homólogos a los de *H. contortus* (Vervelde et al., 2003), por lo que es posible que la

inducción de la respuesta específica a la hemoncosis esté mediada por estas células que interactúan presentando los antígenos de *H. contortus* a los linfocitos T cooperadores o CD4⁺. También se ha demostrado la capacidad de los eosinófilos como células presentadoras de antígenos, particularmente en el caso de las infecciones por helmintos. Así mismo se ha observado un incremento en la expresión de los marcadores CD69, CD86 y MHC clase II en eosinófilos expuestos a antígenos de *Strongyloides stercoralis*, los cuales fueron capaces de transformar *in vitro* linfocitos CD4⁺ precursores a la subpoblación CD4⁺ Th2, con producción de IL-5, de la misma forma que lo hicieron células dendríticas utilizadas como referencia (Padigel et al., 2006).

2a) Elementos humorales de la respuesta inmune adquirida contra *H. contortus*.

Las infecciones por *H. contortus* ya sean naturales o experimentales inducen la producción de anticuerpos específicos. La respuesta por anticuerpos séricos ha sido ampliamente estudiada y los resultados obtenidos han sido variables. Mientras que algunos estudios muestran asociación entre los niveles de anticuerpos séricos del isotipo IgG con la resistencia (Muñoz-Guzmán et al., 2006), otros trabajos solamente han encontrado una asociación con la infección pero no con la resistencia (Gómez-Muñoz et al., 1999; Amarante et al., 2005). Se ha demostrado que niveles elevados de IgA específica en moco abomasal, disminuyen la fertilidad y la longitud promedio de *T. circumcincta* otro nematodo abomasal de los ovinos (Martínez-Valladares et al., 2005). También se ha observado una correlación negativa entre la cantidad de IgA específica en moco abomasal y la carga parasitaria en infecciones con *H. contortus* (Amarante et al., 2005). Por lo que los anticuerpos abomasaes posiblemente sean más importantes para la protección contra nematodos gastroentéricos que los anticuerpos séricos (Muñoz-Guzmán et al., 2006).

Se han observado incrementos séricos en los niveles de IgG1 específicas frente a antígenos somáticos de los estadios L₄, L₅ y fases adultas; así como a antígenos de secreción-excreción de L₄ de *Ostertagia ostertagi*. Algo similar ocurre en ovinos inoculados con *H. contortus*; en general, se produce un incremento en los niveles de IgG1 en animales primoinfectados e inmunizados cuando se utilizan antígenos larvarios, siendo únicamente los animales sensibilizados los que muestran una respuesta de IgG1 similar frente a las fases adultas (Schallig et al., 1995; Gill et al., 2000). Los niveles de IgG2

específicas aparecen especialmente elevados en ovinos parasitados con *T. circumcincta* (Yong et al., 1991) y también en bovinos parasitados con *O. ostertagi* (Frankena, 1987). Gill et al., 2000, por su parte, asocian la producción de IgG1 e IgE a la resistencia frente a *H. contortus* al observar diferencias en los niveles de estas inmunoglobulinas entre ovinos resistentes y susceptibles, 28 días después de una inoculación primaria.

Una característica típica de las infecciones por helmintos es la inducción de IgE específica, lo cual es el resultado directo de una respuesta tipo Th2. Entre las funciones de la IgE está su participación en la citotoxicidad mediada por anticuerpos de eosinófilos y macrófagos. En ensayos *in vitro*, se ha demostrado su capacidad para reconocer alérgenos en la superficie de nematodos y de mediar el ataque de eosinófilos directo a la cutícula del parásito. Esto se lleva a cabo a través de un receptor de alta afinidad para IgE presente en la superficie de estas células (FcεRI). En la superficie de *H. contortus* existe un epítipo con un dominio $\alpha 1 \rightarrow 3$ -fuc que ha sido encontrado con anterioridad en otros helmintos, plantas y algunos artrópodos; el cual es reconocido por IgE y que se ha visto relacionado con la inducción de respuestas tipo Th2 y de procesos alérgicos. (Van Die et al., 1999).

2b) Elementos celulares de la respuesta inmune adquirida contra *H. contortus*.

La inoculación de larvas de *H. contortus* produce agrandamiento de nódulos linfáticos del abomaso debido a la proliferación de linfocitos T, un incremento de linfocitos CD4⁺ en pared abomasal y en sangre periférica (Gill, 1994; Jacobs et al., 1995; Muñoz-Guzmán, 2007).

Se ha establecido en infecciones experimentales, que los linfocitos CD4⁺ son requeridos para la inducción de inmunidad en la hemoncosis ovina. La reducción de linfocitos CD4⁺ a través de anticuerpos monoclonales, abate el estado de inmunidad frente a *H. contortus* e incrementa la carga parasitaria en ovinos resistentes a la infección. También suprime la hiperplasia de los MM, el infiltrado eosinófilico abomasal y el desarrollo de la respuesta humoral de memoria (Gill et al., 1993; Karanu et al., 1997; Peña et al., 2006). Por el contrario, la disminución o la presencia de linfocitos CD8⁺ parece no tener ningún efecto sobre el estado de resistencia en los animales (Balic et al., 2002; Muñoz-Guzmán et al., 2012).

Estudios realizados en roedores demostraron que los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en dos subpoblaciones, denominadas células T CD4⁺ Th1 y Th2 las cuales juegan un papel fundamental en la protección contra infecciones por parásitos (Urban et al., 1992). Estas subpoblaciones se distinguen fundamentalmente por producir diferentes perfiles de citocinas, las cuales orientan la respuesta inmune hacia mecanismos efectores que determinan el control de patógenos, denominándose comúnmente respuestas de linfocitos T tipo 1 o tipo 2 (Th1 o Th2). La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de IFN- γ e IL-2 entre otras, se considera la base de la respuesta celular y es responsable de la protección contra parásitos intracelulares como *Leishmania* sp. y *Toxoplasma gondii*. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, se considera la base de la respuesta humoral y se ha asociado a la presencia de helmintos que tienen fases evolutivas que realizan migraciones hacia los tejidos (Urban et al., 1992). Existe un efecto antagónico entre estas respuestas ya que la Th1 es capaz de inhibir a la Th2 a través de la producción de INF- γ y viceversa, la respuesta Th2 puede inhibir a la respuesta Th1 por medio de la producción de IL-10 (Tizard, 2009).

Actualmente se conoce que los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en otros tipos de subpoblaciones denominadas células T CD4⁺ Th9, Th17, Th22 y Treg con funciones particulares encargadas de coordinar la respuesta inicial frente a patógenos, como en el caso de la respuesta Th9 en la que se secretan niveles elevados de IL-9, las células T CD4⁺ Th9 se encuentra estrechamente relacionada con las de la respuesta Th2, sin embargo, no expresan IL-4, IL-5 o IL-13 y se piensa que pueden participar en la defensa contra infecciones ocasionadas por helmintos. En la respuesta Th17 se secretan niveles altos de IL-17 y se sabe que estas células desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos (Serrano Hernández, 2009). La respuesta Th22 se caracteriza por secretar principalmente IL-22, además de IL-13 y TNF- α similar a las células Th17 y pueden contribuir a la defensa del hospedador contra patógenos microbianos además de promover la reparación o el remodelamiento de los tejidos (Fujita, 2013). La respuesta Treg juega un papel indispensable en el sistema inmunológico ya que está involucrada en la prevención de las enfermedades autoinmunes, alergias, patología orgánica inducida por infección y rechazo de trasplantes, debido a la supresión de las células T efectoras y otras células inmunes (Schmidt et al., 2012). A pesar

de los conocimientos desarrollados, en el área de medicina veterinaria los estudios asociados a estas respuestas son escasos e incluso son pocos los estudios de las respuestas de células T CD4⁺ Th1 y Th2 en algunas áreas de medicina veterinaria.

Aunque en los rumiantes no está plenamente demostrada la existencia de la polarización de respuestas Th1/Th2 como sucede en roedores o humanos en respuesta a la infección en contra de helmintos, si se ha podido establecer la existencia de una respuesta diferenciada asociada a la producción de IL-5, eosinófilos, aumento en el número de células cebadas, IgG1 e IgE en ovinos resistentes a la hemoncosis (Gill et al., 2000). En otros estudios se han obtenido evidencias de que los mecanismos efectores de la respuesta inmune contra la hemoncosis depende de una respuesta tipo Th2 (Muñoz-Guzmán et al., 2012; Shakya et al., 2011).

Otros estudios han reforzado la idea de la existencia de la dicotomía Th1/Th2 en ovinos infectados con NGE. Gill et al. (2000), estudiaron los niveles de INF- γ e IL-5 producidos *in vitro* por linfocitos abomasales estimulados con antígenos de *H. contortus*. Ellos observaron que cuando estos linfocitos fueron obtenidos de ovinos resistentes no infectados, produjeron cantidades similares de ambas citocinas que los linfocitos obtenidos de ovinos susceptibles, en cambio, cuando los linfocitos se obtuvieron de ovinos resistentes infectados con el parásito, estos produjeron menos INF- γ y más IL-5 que los linfocitos obtenidos de ovinos susceptibles, en contraste, los linfocitos obtenidos de ovinos susceptibles produjeron más INF- γ y menos IL-5 que los ovinos resistentes. Pernthaner et al. (2005), demostraron que los ovinos resistentes expresan los genes para las citocinas IL-5, IL-13, y TNF- α y no expresan los genes para IL-4, IL-10 e IFN- γ .

Un factor esencial que modula el tipo de respuesta producida es la edad a la que ocurre la infección. Los corderos de tres a seis meses de edad tienen una menor cantidad de linfocitos CD4⁺ en la pared abomasal (Watson et al., 1994), lo que se relaciona con una baja respuesta inmune contra *H. contortus*. En contraste, se ha observado una mayor cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ en pared abomasal de ovinos jóvenes (Hein and Mackay, 1991). En bovinos se demostró que los linfocitos T $\gamma\delta$ de bovinos estimulados con concanavalina A producen IL-2, IFN- γ y TNF- α (Wood and Seow, 1996). Si este mismo patrón de citocinas fuera producido por linfocitos T $\gamma\delta$ de ovinos jóvenes, el tipo de respuesta que montarían

sería tipo Th1, lo que podría explicar la alta susceptibilidad de los corderos jóvenes a la infección.

Citocinas asociadas a la hemoncosis

Mientras que la dicotomía Th1/Th2 aún no se ha demostrado que exista en ovinos, numerosos componentes de lo que podría ser descrito como típicos de una respuesta de tipo Th2 se han implicado en la respuesta inmune adquirida a la infección NGE. La inmunidad se asocia con aumento del número de células cebadas gastrointestinales, eosinofilia e infiltrado eosinofílico local, la producción de citocinas asociadas a Th2 y la producción elevada de isotipos de anticuerpos (Gill et al., 2000; Muñoz-Guzmán 2007).

Mientras que en la inoculación primaria con diferentes especies de helmintos que afectan al ratón se observa una gran producción de citocinas de perfil Th2, en ovinos la respuesta de citocinas frente a la inoculación primaria con *H. contortus* es escasa (Meeusen et al., 2005). Si bien los resultados difieren en los distintos estudios, en general, el patrón de citocinas liberadas no corresponde con el propio de una respuesta Th2, al observarse que los niveles de IFN- γ se mantienen o incluso aumentan, hecho que no sólo se ha observado en infecciones por *H. contortus* sino que también ha podido observarse en inoculaciones con otras especies, como *O. ostertagi* en bovinos (Almería et al., 1997; Canals et al., 1997) y *Trichostrongylus colubriformis* en ovinos (Pernthaner et al., 2006).

Gill et al. (2000), al estudiar la respuesta producida por la estimulación con antígeno larvario en células obtenidas de nódulos linfáticos abomasales y mesentéricos de corderos que recibieron una inoculación primaria con 20,000 L₃ de *H. contortus*, observaron que la producción de IFN- γ era similar o menor en los corderos inoculados que en los controles no infectados. En cambio, la producción de IL-5 fue significativamente mayor en los animales infectados que en los controles no infectados a los 5 días PI y a los 28 días PI. Además, los niveles de IL-5 se mostraron más elevados en corderos seleccionados por su resistencia en relación con animales susceptibles. Dado que estos datos se encuentran asociados a mayores recuentos de células cebadas y eosinófilos en la mucosa abomasal en los animales resistentes, estos autores sugirieron una respuesta Th2 relacionada con la resistencia a la infección. De modo similar, Terefe et al., (2009), encontraron aumentados los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 en animales sometidos a una

inoculación primaria con 10,000 L₃ de *H. contortus*, en comparación con los animales del grupo control.

Los estudios de Balic et al., (2000b), mostraron como ovinos con una inoculación primaria con *H. contortus* produjeron un aumento pasajero de IFN- γ e IL-10 en los nódulos linfáticos a los 3 días PI, descendiendo los niveles a valores basales a partir de los 5 días PI. La IL-2 mostró, a lo largo de los 36 días que duró este estudio, niveles más bajos en los ovinos infectados que en los controles, mientras que los niveles de IL-10 e IL-4 fueron similares en los animales infectados y controles, tanto en la mucosa abomasal como en los nódulos linfáticos locales. Finalmente, la expresión de IL-5 llegó a reducirse en los animales que albergaban fases adultas.

Se han realizado también distintos estudios sobre los perfiles de citocinas en la respuesta inmune frente a inoculaciones secundarias por *H. contortus*. Meeusen et al. (2005), observaron un aumento de IL-5, IL-13 e IFN- γ a los 3 días PI, y de IL-4 a los 5 días PI en animales en los que las larvas alcanzaron la mucosa abomasal. Sin embargo, en animales en los que las larvas fueron expulsadas sin que pudieran penetrar en la mucosa, sólo se observaron niveles elevados de IL-4, tanto antes como después de la inoculación, mientras que las concentraciones de IL-5 y IL-13 no mostraron cambios relevantes.

Expulsión del parásito

Informes de la exposición de ovinos a *H. contortus* y *T. colubriformis* han indicado que, ante el desafío, estos animales muestran poco aumento en el reclutamiento de linfocitos en el tejido de la mucosa gastrointestinal y la mayoría de las larvas del desafío son expulsadas antes de que lleguen a la glándula abomasal (expulsión rápida), esta expulsión se ha asociado a la presencia de leucocitos globulares (Balic et al., 2000a). Se ha sugerido que la presencia de estas células en la mucosa trae como consecuencia una reacción similar a la hipersensibilidad de tipo I. Otros mecanismos involucrados en la expulsión inmediata, de manera similar a lo que ocurre en los modelos murinos son: la hipermotilidad, la hipersecreción gástrica y la hiperplasia de células caliciformes con el consecuente aumento en la secreción de moco (Miller et al., 1996; Balic et al., 2002; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2014).

La expulsión inmediata del parásito, también está asociada a la presencia en el moco abomasal de histamina y leucotrienos, que inhiben la motilidad de las larvas *in vitro*. La histamina ha sido encontrada en mayor concentración en el moco abomasal de ovinos resistentes a la hemoncosis, coadyuva directamente a la expulsión del parásito promoviendo la hipersecreción e hipermotilidad del abomaso, afecta negativamente la fecundidad del parásito y su actividad motriz (Hohenhaus and Outteridge, 1995). Además de que facilita la traslocación de proteínas plasmáticas, incluyendo anticuerpos humorales a la luz del abomaso (Miller et al., 1996).

La expulsión tardía de larvas de *H. contortus*, es producida cuando se monta una respuesta inmune específica que ataca a la larva en las glándulas abomasales. Esta acción es regulada por linfocitos T CD4⁺, por anticuerpos de los isotipos IgA e IgE principalmente, por la citotoxicidad de eosinófilos dependiente de anticuerpos y activación de la vía clásica del complemento (Schallig et al., 1995; Gill et al., 2000; Balic et al., 2002).

Control de la hemoncosis ovina

Con la finalidad de contrarrestar los efectos de la hemoncosis, el uso de los antihelmínticos se ha incrementado, utilizado una gran variedad de productos, ya que su uso representa una de las herramientas más eficaces para el control del parasitismo en los animales en las unidades productivas. Debido a la eficacia de los antihelmínticos disponibles en el mercado y a la complejidad de utilizar otros métodos de control, los productores han basado su estrategia en el uso indiscriminado y continuo de este recurso químico, teniendo como resultado el desarrollo de resistencia a los mismos (Van Wyk, 2001; Waller, 1997; Van Wyk et al., 2006). Debido al desarrollo de resistencia, a la demanda del consumidor por contar con productos orgánicos, o porque los productores quieren evitar la aparición de NGE resistentes a los antihelmínticos, se han desarrollado estrategias alternativas para el control de *H. contortus* y otros NGE, entre las que destacan: el consumo de alimentos con efecto antiparasitario directo como la suplementación con partículas de cobre (Knox, 2002), uso de forrajes con compuestos secundarios y plantas bioactivas (Rochfort et al., 2008; Alonso-Díaz et al., 2008; Brunet et al., 2008); mejoramiento del nivel nutricional de los hospederos (Strain y Stear, 2001; Aguilar-Caballero et al., 2005; Hoste et al., 2005; Ketzis et al., 2006;

Valderrábano et al., 2006; Stear et al., 2007); selección genética de ovinos resistentes (Eady et al., 1996; Pernthaner et al., 1995; Pfeffer et al., 1996; Hooda et al., 1999; Stear et al., 2001; Figueroa et al., 2010); manejo de praderas (Torres-Acosta y Agilar, 2000; Torres-Acosta et al., 2006) y control biológico con enemigos naturales de los NGE como nematodos depredadores de nematodos (Bilgrami and Brey, 2008), las bacterias *Pasteuria penetrans* (Mendoza de Gives et al., 1999) y *Bacillus thuringiensis* (López Arellano et al., 2014), y el hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* (Mendoza de Gives y Valero-Coss, 2009).

Vacunación contra nematodos gastroentéricos

Las investigaciones para el desarrollo de vacunas que protejan contra infecciones ocasionadas por *H. contortus* se han concentrado básicamente en dos estrategias. En primer lugar, el uso de antígenos “naturales”, contra los cuales el hospedador responde durante la infección y segundo, mediante la utilización de antígenos "ocultos", en los que una molécula que no es presentada al sistema inmune se utiliza para estimular una respuesta protectora.

- Antígenos naturales. El uso de estos ha demostrado ser útil contra algunas especies de parásitos, en particular el gusano pulmonar *Dictyocaulus viviparus* (Peacock and Poynter, 1980) y *Taenia ovis* (Harrison et al., 1996). En el caso de la primera, la inmunidad es inducida por la administración de las larvas irradiadas, mientras que el segundo emplea antígenos de oncosfera. Sin embargo, a pesar de muchos intentos de utilizar ya sea larvas irradiadas, antígenos crudos o purificados de varias especies de NGE como vacunas, pocos han inducido un nivel de protección suficiente para ser candidatos a productos comerciales. Se han conseguido buenas inmunizaciones con la proteína somática de L₃ (Hc-sL₃) de 70-83 kDa (Jacobs et al., 1995), y con productos de secreción-excreción de los estadios de L₄ y adultos que contenían proteínas de 15 y 24 kDa (Schallig et al., 1997). No se sabe si alguno de estos antígenos ha sido considerado como candidato para la comercialización; pero en cualquier caso, pese a identificarse gran cantidad de estos productos somáticos o de antígenos de secreciones y excreciones, no se ha logrado encontrar ninguna proteína que, de forma aislada, sea capaz de inducir una respuesta inmune protectora (Yatsuda et al., 2003).

- Antígenos ocultos. La utilización de estos en el desarrollo de vacunas frente a NGE resulta muy atractiva, porque se trata de moléculas que no han estado sometidas a una presión selectiva previa. Estas moléculas no son reconocidas por el sistema inmune del hospedador durante la infección natural, ya que no son accesibles al sistema inmune, y parecen ser antígenos muy adecuados en inmunizaciones frente a parásitos hematófagos como *H. contortus*. Esta difícil accesibilidad al sistema inmune hace que se requieran sucesivas revacunaciones para mantener el nivel de protección (Miller and Horohov, 2006; Taylor et al., 2007). En cualquier caso, se han obtenido buenos resultados en corderos utilizando algunos antígenos ocultos, tales como las glicoproteínas H11 y H-gal-GP (Knox et al., 2003). Sin embargo, estos niveles de protección no se mantienen al repetir la vacunación con una proteína recombinante por lo que es necesario emplear antígenos nativos para obtener una buena protección (Newton and Meeusen, 2003; Redmond and Knox, 2004; Stear et al., 2007).

En este sentido a mediados de octubre del 2014 fue lanzada al mercado una vacuna para el control de *H. contortus* llamada Barbervax®. Esta vacuna contiene pequeñas cantidades de proteínas purificadas de la mucosa del intestino de *H. contortus*. Como todas las vacunas, estimula la respuesta inmune en el hospedador después de la aplicación. Los anticuerpos producidos circulan en la sangre de los ovinos, de modo que los parásitos ingieren anticuerpos contenidos en sangre. Estos anticuerpos se adhieren a la mucosa del intestino *H. contortus*, bloqueando la digestión ocasionando que el gusano produzca menos huevos y que posteriormente muera por falta de absorción de nutrientes.

JUSTIFICACIÓN

Existen razas de ovinos consideradas como resistentes o susceptibles a la infección por *H. contortus*. Se ha propuesto que esta diferencia de susceptibilidad puede ser debida al tipo de respuesta inmunológica que montan ambos tipos de razas. Sin embargo, no se conoce el tipo de respuesta inmunológica que es la responsable de esta protección.

En este contexto, previamente se demostró que corderos de la raza Columbia (considerada como susceptible) adquieren cierto grado de protección a la hemoncosis cuando se les administra parenteralmente un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* previo a la infección experimental. Esta protección se asoció al reclutamiento de eosinófilos y linfocitos T CD4⁺ en la pared abomasal (Cuenca-Verde et al., 2011), pero no se determinó qué tipo de citocinas eran las producidas por estas células y por tanto, el posible mecanismo de protección.

Por lo anterior, en este trabajo se reprodujo el modelo de protección inducida por la administración de un ExmTh y se evaluó *in situ* el número de eosinófilos, células cebadas y células que expresaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , en la mucosa abomasal y su relación con la protección inducida contra la haemonchosis experimental, a través de los conteos de huevos por gramo de heces y de fases adultas.

Determinar qué tipo de respuesta inmune es la responsable de la protección, nos servirá para proponer posibles tipos de moduladores de la respuesta inmune que se agreguen junto con antígenos de *H. contortus* en futuros protocolos de inmunización.

HIPÓTESIS

La administración parenteral de un ExmTh previo a la infección experimental con L₃ de *H. contortus* induce protección y modifica la expresión de citocinas asociadas a la protección inducida.

OBJETIVOS

General

Determinar el patrón de expresión de citocinas asociadas a la aplicación parenteral de un ExmTh en la protección de la hemoncosis experimental ovina.

Particulares

1. Determinar si la administración del ExmTh induce protección a la hemoncosis mediante la determinación del número de hgh y el conteo de las fases adultas en el abomaso de corderos infectados experimentalmente.

2. Establecer si hay diferencia en el número de eosinófilos sanguíneos (ES), así como de eosinófilos tisulares y células cebadas por mm² en la mucosa y submucosa de las regiones fúndica y pilórica de la pared abomasal, entre corderos infectados experimentalmente con *H. contortus*, con y sin ExmTh, corderos a los que únicamente se les administró ExmTh y corderos sin tratamiento.

3. Establecer si hay diferencia entre el número de células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ por mm² en la mucosa y submucosa de las regiones fúndica y pilórica de la pared abomasal entre corderos infectados experimentalmente con *H. contortus*, corderos infectados experimentalmente a los que se administró ExmTh, corderos a los que únicamente se les administró ExmTh y corderos sin tratamiento.

4. Determinar si la respuesta inmune montada en contra de *H. contortus* tiene relación con los perfiles de citocinas producidas (respuesta Th1 o Th2) en corderos infectados experimentalmente y protegidos por la aplicación de un ExmTh.

5. Correlacionar los patrones de citocinas expresadas con las variables estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ubicación

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos, ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, campo 4. Los animales se mantuvieron en los corrales de posgrado del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES-Cuautitlán.

Animales

Para evaluar el efecto protector del ExmTh sobre la implantación de larvas de *H. contortus* en el abomaso de ovinos, se requiere el uso de corderos de una raza considerada susceptible a la hemoncosis, para que la protección observada por la aplicación del ExmTh sea atribuible a este estímulo y no a la resistencia natural asociada a ciertas razas. En trabajos previos se demostró que los corderos de la raza Columbia son altamente susceptibles a la hemoncosis (Cuenca-Verde, 2005; Muñoz-Guzmán et al. 2006), por lo anterior, para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 30 corderos de la raza Columbia, de 3-4 meses de edad, con un peso promedio de 30 kg, mantenidos desde el nacimiento hasta el final del experimento en condiciones libres de nematodos y en confinamiento total. La alimentación consistió en una mezcla de 50% de alimento comercial para ovinos (proteína cruda 14%) y un 50% de alfalfa achicalada. El alimento ofrecido correspondió al 4% del peso vivo de cada grupo de corderos, la mezcla de alimento y el agua fue ofrecida *ad libitum* con bebederos automáticos de pivote. Antes de iniciar el experimento, los corderos se encontraban clínicamente sanos y no eliminaban huevos de helmintos en materia fecal, como medida preventiva los corderos fueron desparasitados (albendazol 10% 5 mg/kg pv). Una vez en las instalaciones los corderos tuvieron un periodo de 15 días para su adaptación a las nuevas condiciones de manejo.

Parásitos

Se utilizaron larvas de una cepa monoespecífica de *H. contortus*, aislada de un rebaño ovino ubicado en Jilotepec, Edo. de México que ha sido mantenida a través de

infecciones sucesivas en corderos libres de otros nematodos gastroentéricos criados bajo condiciones de estabulación total. Esta cepa ha sido utilizada en trabajos anteriores (Valdez-Ramírez, 2004; Muñoz-Guzmán et al., 2006; Alba-Hurtado et al., 2010; Cuenca-Verde et al., 2011; Muñoz-Guzmán et al., 2012). A partir de la materia fecal de los corderos infectados con la cepa de *H. contortus*, se realizaron cultivos larvarios mediante una modificación de la técnica de Corticely-Lai (Alba, 2007), se incubaron durante 7 días a 28-30°C. Las larvas de tercer estadio obtenidas fueron contabilizadas y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

Obtención de Extracto de metacestodos de *Taenia hydatigena*

Se colectaron metacestodos de *Taenia hydatigena* a partir de ovinos sacrificados en el rastro de Tlalnepantla, Edo. de México. Los metacestodos colectados fueron trasladados en refrigeración al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la UIM-FESC, donde se mantuvieron en congelación a -20°C. El líquido vesicular fue obtenido por punción del metacestodo, se adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg mL⁻¹, leupeptina 10 µg mL⁻¹, iodoacetamida 1.8 mg mL⁻¹ and PMSF 1mM, SIGMA Labs) y se filtró. Se adicionó (NH₄)₂SO₄, se centrifugó por 1 hora a 20,000 g a 4°C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y las proteínas fueron re-suspendidas en solución amortiguadora de fosfato (PBS del inglés phosphate buffered saline). Esta solución se filtró nuevamente con una membrana millipore de 0.22 µm, fue homogeneizada y se alicuotó para preservarse a -85°C hasta su uso. La cantidad de proteína fue medida por el método de Bradford (1976).

Diseño experimental

Treinta corderos de la raza Columbia de 3-4 meses de edad con un peso promedio de 30 kg fueron divididos en 6 grupos (n=5). Las características y tratamientos realizados en los grupos se muestran en el cuadro 1. Se colectaron muestras de sangre directamente de la yugular y muestras de heces directamente del recto cada 48 horas entre los días -14 y 14 PI y los días 21, 28, 35, 42 y 49 PI. En las muestras de sangre se contó el número de ES y se midió el hematocrito, en las muestras de heces se contaron por la técnica de McMaster, el número de hgh. Los corderos de los diferentes grupos fueron sacrificados

humanitariamente con una pistola de embolo oculto, el día del sacrificio de los corderos de cada grupo se presenta en el cuadro 1. Inmediatamente después del sacrificio se tomaron muestras de las regiones fúndica y pilórica de la pared abomasal, se contaron y midieron las fases adultas presentes en el abomaso. Las muestras de pared abomasal se procesaron para inmunohistoquímica o tinciones especiales y se contó el número de eosinófilos, células cebadas, células IL-2⁺, IL-4⁺, IL-6⁺, IL-10⁺ e INF- γ ⁺ por mm² de tejido.

Grupo (n=5)	Días pre-infección		Día de infección	Días post-infección	Día de sacrificio
	-6	-2	0	2	
1	---	---	---	---	49
2	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	---	---	0
3	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> ^b	600 μ g i.p. ^a	3
4	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	---	600 μ g i.p. ^a	49
5	600 μ g i.m. ^a 600 μ g i.p. ^a	600 μ g i.p. ^a	5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> ^b	600 μ g i.p. ^a	49
6	---	---	5000 L ₃ de <i>H. contortus</i> ^b	---	49

Cuadro 1. Tratamientos de los grupos de corderos Columbia:

^a Inoculación con extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* (ExnTh)

^b Infección por sonda gástrica.

i.m. Inyección intramuscular de ExnTh.

i.p. Inyección intraperitoneal ExnTh.

Exámenes parasitológicos

Para determinar el número de huevos en la materia fecal de cada animal, se colectaron muestras de heces directamente del recto empleando bolsas de polietileno cada 48 horas entre los días -14 y 14 PI y semanalmente a partir del día 14 PI y hasta el día 49 PI. Las muestras colectadas fueron procesadas mediante la técnica de McMaster modificada (Alba, 2007) para monitorear y cuantificar la eliminación de huevos en las heces. Los resultados se expresaron como el número de hgh.

Para los conteos de fases adultas presentes en abomaso, inmediatamente después al sacrificio se colectaron los abomasos, se les realizó una incisión longitudinal para exponer la luz y para recuperar las fases adultas se lavó la mucosa a chorro de agua. El contenido abomasal recuperado fue llevado a dos litros con agua destilada, se homogeneizó y se tomó

una muestra del 10%, todas las fases adultas se extrajeron con una aguja de disección para posteriormente contar de forma separada las hembras y los machos (Le Jambre, 1995), se contaron todos los parásitos y el número obtenido se multiplico por 10 para obtener el total de fases adultas de *H. contortus* en el abomaso. Posteriormente, se midió de forma individual su longitud para obtener el promedio de tamaño. El tamaño de las fases adultas fue determinado midiendo 100 machos y 100 hembras con un calibrador Vernier (Coadwell and Ward, 1981; Stear and Murray, 1994).

Conteo de eosinófilos sanguíneos

Para realizar el conteo de eosinófilos sanguíneos se realizaron muestreos de sangre cada 48 horas entre los días -14 y 14 PI y semanalmente a partir del día 14 PI y hasta el día 49 PI. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular y colectadas mediante el sistema vacutainer con EDTA como anticoagulante, posteriormente se diluyeron con solución de Carpentier (2 g eosina Y y 3 mL de formaldehído al 40% en 95 mL de agua destilada) utilizando una dilución 1:10; la sangre diluida se homogeneizó por agitación en la pipeta de Thoma para glóbulos blancos y después se eliminaron las primeras 2 o 3 gotas de la dilución, se llenó el hemocitómetro y se dejó reposar la muestra durante 3 minutos, el conteo fue realizado en microscopio compuesto con objetivo de 40X y los resultados se expresaron como eosinófilos por mm³ (Hohenhaus et al., 1998).

Conteo de las subpoblaciones celulares tisulares

Al momento del sacrificio tres muestras de tejido de 2 cm² fueron tomadas de la región fúndica y de la región pilórica abomasal (RFA y RPA respectivamente) de cada cordero. Una muestra de cada tejido fue cubierta con una mezcla de alcohol polivinil, polietilenglicol y demitel benzil amonio (OCT, Tissue-Tek®) y criopreservada a -80°C hasta su uso, otra muestra fue fijada en paraformaldehído al 4% y la muestra restante fue fijada en Carnoy.

Las muestras fijadas en paraformaldehído al 4% y en Carnoy, se deshidrataron con alcoholes de menor a mayor concentración, se pasaron a xilol y se infiltraron e incluyeron en cubos de parafina. De las muestras incluidas en parafina se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor en un micrótopo (American optical). Las secciones de las muestras fijadas en

paraformaldehído al 4% fueron teñidas con cromotropo 2R y las secciones fijadas con Carnoy fueron teñidas con azul de toluidina (Luna, 1968). A partir de las muestras criopreservadas se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor que fueron depositados en laminillas pre cubiertas con poli-L-lisina (Sigma Chemical Co.) al 0.1%. Las secciones se fijaron en acetona a 4°C durante 10 minutos se secaron al aire y se conservaron a -20°C hasta ser utilizadas. Los cortes congelados se procesaron con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina) para detectar las células productoras de las citocinas evaluadas.

Finalmente, el número de células positivas a las diferentes citocinas, eosinófilos tisulares y células cebadas de cada uno de los cortes, se contaron con un software analizador de imágenes (Image Pro Premier). En cada muestra se contó con un objetivo de 20X el número de células marcadas en 8 campos de la mucosa y en 8 campos de la submucosa que equivalen aproximadamente a $2.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

Anticuerpos

Para la realización de la tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina) se utilizó el siguiente panel de anticuerpos primarios anti-interleucinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ . La descripción de cada uno de estos anticuerpos así como la de los anticuerpos secundarios utilizados para esta técnica se incluye en cuadro 2.

Anticuerpo primario Especificidad	Clona del Anticuerpo Primario	Código del producto del Anticuerpo primario Serotec lab	Anticuerpo Secundario Biotinilado
IL-2 Ovina	IE10	MCA1826	Conejo anti-ratón IgG
IL-4 Bovina	CC303	MCA1820	Cabra anti- ratón IgG
IL-6 Ovina	Policlonal IgG	AHP424	Cabra anti- ratón IgG
IL-10 Ovina	CC318	MCA2110	Cabra anti- ratón IgG
IFN- γ Bovina	CC302	MCA1783	Cabra anti- ratón IgG

Cuadro 2. Especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios.

Tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina)

1.- Hidratación de los cortes. Los cortes congelados se colocaron durante 10 minutos en PBS para la eliminación de la solución crioprotectora y la hidratación de los mismos.

2.- Bloqueo de la peroxidasa endógena. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena los cortes de tejido fueron tratados con Peroxo-Block (00-2015, invitrogen) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar las laminillas se lavaron 3 veces por 5 minutos c/u en PBS.

3.- Bloqueo de la actividad de biotina endógena. Los cortes se cubrieron con el Avidin/Biotin Blocking Kit (00-4303, invitrogen), solución de avidina por 30 minutos y solución de biotina por 30 minutos. Al finalizar cada incubación las laminillas se lavaron 3 veces por 5 minutos c/u en PBS.

4.- Aplicación del suero de bloqueo. Los cortes para determinar las células IL-2⁺, IL-4⁺, IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ se cubrieron con suero normal de cabra y para las células IL-6⁺ se cubrieron con suero normal de conejo y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda.

5.- Aplicación del anticuerpo primario. Se decantó el suero de bloqueo normal sin lavar y se limpió perfectamente el exceso de suero de los bordes del tejido. Las preparaciones se cubrieron con el respectivo anticuerpo primario y se incubaron durante 12 horas a 4°C en cámara húmeda, al finalizar se lavaron 3 veces por 5 minutos c/u en PBS.

6.- Aplicación del anticuerpo secundario o biotinilado. Se secó completamente el PBS de los bordes del tejido y las preparaciones se cubrieron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón (50-234Z, invitrogen) para determinar las células IL-2⁺, IL-4⁺, IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ y conejo anti-ratón (50-235Z, invitrogen) para las células IL-6⁺. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al finalizar las laminillas se lavaron 3 veces por 5 minutos c/u en PBS.

7.- Aplicación del complejo estreptavidina-biotina peroxidasa. Se secó completamente el PBS de los bordes del tejido y las preparaciones se cubrieron con estreptavidina-peroxidasa del Histostain SP Kit (50-209Z, invitrogen) y se incubaron por 60 minutos en cámara húmeda. Al finalizar las laminillas se lavaron 3 veces por 5 minutos c/u en PBS.

8.- Aplicación de la diaminobencidina (DAB). Se secaron completamente los bordes del tejido del PBS de lavado y los cortes se cubrieron con DAB (00-2014, invitrogen). Se esperaron unos segundos a que se observara la reacción al microscopio óptico y se lavaron las muestras en PBS 3 veces por 5 minutos c/u.

9.- Contrateñido. El contraste al tejido se realizó con una solución de hematoxilina de Harris, durante 4 segundos. La laminilla se lavó con agua corriente, se pasó unos segundos por alcohol ácido, posteriormente 10 pases en una solución de carbonato de litio al 1% y se lavó con agua corriente. Los cortes se deshidrataron con alcoholes (70%, 90% y 100%) durante 5 minutos c/u y posteriormente se aclararon con xilol durante 5 minutos.

10.- Montaje. Las muestras fueron montadas de manera permanente, utilizando medio de montaje rápido para microscopia (Entellan® nuevo, Merck)

Análisis estadístico

El número de células positivas a interleucinas, eosinófilos, células cebadas y hgh, fue transformado por la fórmula $[\log_{10} (X+1)]$ para estabilizar las varianzas previo al análisis. Los datos fueron analizados por ANOVA factorial, utilizando el software Statistica for Windows. Se utilizó una correlación de Pearson para todas las variables utilizadas.

RESULTADOS

El promedio de la eliminación de hgh de los corderos se presenta en el cuadro tres y la figura seis. Solo los corderos de los grupos cinco y seis eliminaron huevos en la materia fecal. Los corderos del grupo 6 tuvieron promedio de eliminación de hgh (5077 ± 3397) mayor ($p < 0.05$) que los corderos del grupo cinco (2267 ± 1596). Los corderos de ambos grupos empezaron a eliminar huevos a partir del día 21 PI. Los corderos del grupo seis eliminaron una mayor cantidad ($p < 0.05$) de hgh desde el día 21 PI hasta el final del experimento (día 49 PI). Los corderos de los grupos 1, 2, 3 y 4 como era de esperar considerando su tratamiento no eliminaron huevos durante todo el desarrollo del experimento.

El promedio total de fases adultas de *H. contortus* recuperadas del abomaso de los corderos al momento del sacrificio y el porcentaje de establecimiento se presentan en el cuadro cuatro. En los corderos de grupo seis el promedio de fases adultas recuperadas fue mayor ($p < 0.05$) que en los corderos del grupo cinco, 1885 ± 253 y 700 ± 360 respectivamente. Así mismo, el porcentaje de establecimiento de las fases adultas de *H. contortus* fue mayor en los corderos del grupo seis (37.6%) que en los corderos del grupo cinco (14.0%). No se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el tamaño de las fases adultas recuperadas de los grupos cinco, hembras 2.1 ± 0.32 cm y machos 1.5 ± 0.17 cm y seis, hembras 2.3 ± 0.19 cm y machos 1.5 ± 0.1 cm.

El promedio del hematocrito de los corderos de los diferentes grupos se presenta en la figura siete. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el porcentaje del hematocrito entre los corderos de los diferentes grupos.

Se estandarizaron las tinciones especiales para eosinófilos (cromotrope 2R) y células cebadas (azul de toluidina), así como las tinciones inmunohistoquímicas para la detección de células $IL-2^+$, $IL-4^+$, $IL-6^+$, $IL-10^+$ e $INF\gamma^+$ en las diferentes regiones del abomaso. En las figuras 8, 9, 10 y 11, se presentan cortes histológicos representativos del experimento con células positivas a las interleucinas evaluadas en el estudio.

El promedio de ES de los corderos de los diferentes grupos se presentan en el cuadro cinco. Los corderos de los grupos 4 y 5 presentaron mayores ($p < 0.001$) promedios

totales de ES por mm³, 400.5±30.7 y 399±29.3 respectivamente, que los corderos de los grupos 1 y 6, 158.5±15.8 y 244±27.1 respectivamente. Los corderos del grupo 6 presentaron un mayor ($p<0.001$) promedio total de ES por mm³ que los corderos del grupo 1. Los corderos de los grupos 2 y 3 presentaron hasta su día de sacrificio mayores ($p<0.05$) promedios totales de ES por mm³, 318.7±28.2 y 490±71.1 respectivamente que los corderos de los grupos 1 y 6 en el mismo periodo, 181.2±16.3 y 195.0±23.6 respectivamente.

La cinética de ES se muestra en la figura 12. Los corderos de los grupos 4 y 5 presentaron una mayor ($p<0.01$) cantidad de ES por mm³ que los corderos del grupo 1 entre los días -4 al 14 PI y los corderos del grupo 6 entre los días 8 al 14 PI. Los corderos de los grupos 2 y 3 presentaron mayor ($p<0.01$) cantidad de ES mm³ que los corderos de los grupos 1 y 6 desde el día -4 hasta el día de su sacrificio, día 0 y 3 PI respectivamente.

En el cuadro 6 y la figura 13 se muestra el número de eosinófilos por cm² en las diferentes regiones de la pared abomasal. Los corderos del grupo 5 presentaron mayor cantidad ($p<0.001$) de eosinófilos y células cebadas en la pared abomasal que el resto de los grupos. La submucosa fúndica del grupo 5 presentó mayor ($p<0.001$) cantidad de eosinófilos que el resto de las regiones estudiadas. Las mucosas pilóricas de los grupos 4, 5 y 6 presentaron mayor cantidad ($p<0.05$) de eosinófilos por cm², 8782±2097, 9079±2002 y 7875±1859 respectivamente, que sus homologas de los grupos 1, 2 y 3, 2162±515, 3283±1094 y 3368±1901 respectivamente.

En el cuadro 7 y la figura 14 se muestra el número de células cebadas por cm² en las diferentes regiones de la pared abomasal. La mucosa fúndica y la submucosa pilórica del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.01$) cantidad de células cebadas por cm², 21226±8159 y 18677±3065 respectivamente, que sus homólogas de los grupos 1, 1490±464 y 3948±1063, 2 4825±2495 y 5623±2222, 3 4020±742 y 4102±941 y 6 10069±3006 y 11176±3205.

En las figuras 15 y 16 y el cuadro 8, se muestra el número de células IFN- γ^+ e IL-2⁺ por cm² en las diferentes regiones de la pared abomasal. En general, los corderos del grupo 5 presentaron mayor cantidad ($p<0.05$) de células IFN- γ^+ e IL-2⁺ en la pared abomasal que el resto de los grupos. En todos los grupos estudiados, la submucosa fúndica presentó mayor ($p<0.05$) cantidad de células IFN- γ^+ que las otras regiones. La mucosa y submucosa fúndica y la mucosa pilórica del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.01$) cantidad de células IFN- γ^+ que

sus regiones homólogas en el resto de los grupos. En todos los grupos, la submucosa fúndica presentó mayor ($p<0.05$) cantidad de células IL-2⁺ que la mucosa fúndica. La submucosa fúndica de los corderos del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.05$) cantidad de células IL-2⁺ que sus homólogas de los grupos 1, 2, 3 y 4.

En la figuras 17, 18 y 19 y el cuadro 9, se muestra el número de células IL-4⁺, IL-6⁺ e IL-10⁺ por cm² en las diferentes regiones de la pared abomasal. Los corderos del grupo 5 presentaron mayor cantidad ($p<0.05$) de células IL-4, IL-6 e IL-10 positivas por cm² en la pared abomasal que el resto de los grupos. En general en los grupos estudiados, las mucosas pilórica y fúndica presentaron mayor ($p<0.05$) cantidad de células IL-4⁺ que las submucosas de sus respectivos grupos. La mucosa fúndica y la mucosa pilórica del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.01$) cantidad de células IL-4⁺ que sus regiones homólogas en el resto de los grupos estudiados (figura 13). La mucosa pilórica, submucosa pilórica y mucosa fúndica del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.05$) cantidad de células IL-6⁺ que todas las regiones de los grupos 1, 2 y 3 (figura 15). La submucosa pilórica y mucosa fúndica del grupo 5 presentaron mayor ($p<0.05$) cantidad de células IL-10⁺ que sus homólogas de los grupos 1, 2, 3 y 4 (figura 15).

Se observaron correlaciones negativas ($p<0.05$) entre la carga parasitaria y células de la mucosa pilórica: células cebadas -0.60 e IFN- γ ⁺ -0.75, mucosa fúndica: células cebadas -0.62, eosinófilos -0.55, células IL-6⁺ -0.68 y células IFN- γ ⁺ -0.62, submucosa pilórica: células IL-2⁺ -0.57 y células IL-4⁺ -0.70 y submucosa fúndica: eosinófilos -0.75. Además, se observó una correlación negativa ($p<0.02$) entre carga parasitaria y ES (-0.71) y una correlación positiva ($p<0.03$) entre ES y eosinófilos en la submucosa fúndica (-0.61).

	Día del experimento					Promedio
	21	28	35	42	49	
Grupo 5	980 ±	7730 ±	7540 ±	7940 ±	7550 ±	2267.1 ±
	582.4 ^a	1907.0 ^a	1583.2 ^a	1659.2 ^a	1495.1 ^a	1596.4 ^a
Grupo 6	5750 ±	14220 ±	14060 ±	19040 ±	17770 ±	5077.9 ±
	1534.4 ^b	1951.5 ^b	2612.6 ^b	4344.6 ^b	3979.8 ^b	3397.6 ^b

Cuadro 3. Promedio ± EE de los conteos de huevos eliminados por gramo de heces en corderos Columbia inoculados con 5000 L₃ de *H. contortus* y que recibieron ExmTh, y de corderos únicamente infectados con *H. contortus*.

Grupo 5. Corderos Columbia infectados experimentalmente con *H. contortus* y que recibieron ExmTh.

Grupo 6. Corderos Columbia únicamente infectados experimentalmente con *H. contortus*.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

	Total de fases adultas	Machos	Hembras	Porcentaje de establecimiento
Grupo 5	700.8 ± 360.8^a	342.4 ± 171.2	358.4 ± 191.6	14.0^a
Grupo 6	1884.8 ± 253.5^b	916.8 ± 134.6	968 ± 119.2	37.7^b

Cuadro 4. Promedio ± EE del total de fases adultas recuperadas y porcentaje de establecimiento de *H. contortus*, en corderos Columbia inoculados con 5000 L₃ y que recibieron ExmTh, y de corderos únicamente infectados con *H. contortus*.

Grupo 5. Corderos Columbia infectados experimentalmente con *H. contortus* y que recibieron ExmTh.

Grupo 6. Corderos Columbia únicamente infectados experimentalmente con *H. contortus*.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

	Grupo					
	1	2	3	4	5	6
Promedio	158.5 ± 15.8^b	318.7 ± 28.2^a	490 ± 71.1^a	400.5 ± 30.7^a	399 ± 29.3^a	244 ± 27.1^c

Cuadro 5. Promedio ± EE de los eosinófilos sanguíneos de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.001$.

	Grupo					
	1 ^A	2 ^A	3 ^A	4 ^A	5 ^B	6 ^A
Mucosa fúndica	325.4 ± 70.6	885.2 ± 327.5	881.4 ± 264.7	2539.7 ± 184.1	5730.9 ± 1752.8	2706.5 ± 838.7
Submucosa fúndica	1661.7 ± 411.1	1939.1 ± 577.0	4588.1 ± 1756.4	3046.8 ± 518.7	17652.9 ± 4313.3*	4738.7 ± 1053.4
Mucosa pilórica	2162.1 ± 515.9 ^b	3283.7 ± 1094.9 ^b	3368.2 ± 1901.8 ^b	8782.9 ± 2097.7 ^a	9079.1 ± 2002.3 ^a	7875.3 ± 1859.9 ^a
Submucosa pilórica	1771.7 ± 562.9	4351.1 ± 904.9	4080.4 ± 1220.1	5112.7 ± 1220.1	7040.7 ± 1475.3	5074.7 ± 833.4

Cuadro 6. Promedio ± EE de eosinófilos por cm² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p < 0.001.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa en la misma región de diferentes grupos p < 0.05.

* Indica la región con mayor número de células p < 0.001.

	Grupo					
	1 ^A	2 ^A	3 ^A	4 ^A	5 ^B	6 ^A
Mucosa fúndica	1490.2 ± 464.8 ^b	4824.7 ± 2495.6 ^b	4020 ± 742.19 ^b	14778.9 ± 3070.5	21226.4 ± 8159.4 ^a	10069.3 ± 3006.0 ^b
Submucosa fúndica	8356.5 ± 2930.9	9016.3 ± 1964.2	10816.5 ± 803.0	8950.0 ± 1165.1	16476.0 ± 4436.8	11893.6 ± 2624.8
Mucosa pilórica	946.5 ± 383.0	2264.2 ± 921.9	2476.6 ± 658.0	5821.3 ± 861.3	8189.3 ± 1235.3	3326.7 ± 1117.4
Submucosa pilórica	3948.8 ± 1063.1 ^β	5622.8 ± 2221.6 ^β	4102 ± 940.6 ^β	15211.9 ± 3722.3 ^α	18676.8 ± 3065.0 ^α	11176.4 ± 3204.9 ^β

Cuadro 7. Promedio ± EE de células cebadas por cm² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p < 0.001.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p < 0.01.

Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p < 0.01.

		Grupo					
		1 ^A	2 ^A	3 ^A	4 ^A	5 ^B	6 ^A
Mucosa fúndica	IL-2 ^o	98.9 ± 2.0	173.5 ± 37.8	128.4 ± 22.2	261.9 ± 76.2	381.7 ± 93.9	298.7 ± 82.4
	IFN- γ	287.5 ± 56.3 ^b	235.3 ± 56.0 ^b	459.9 ± 162.5 ^b	451.55 ± 87.5 ^b	1002.8 ± 305.1 ^a	444.7 ± 95.84 ^b
Submucosa fúndica*	IL-2 ^o	410.1 ± 126.3 ^β	647.1 ± 83.1 ^β	575.4 ± 141.7 ^β	768.8 ± 111.7 ^β	1312.6 ± 264.6 ^a	1114.4 ± 538.6 ^{aβ}
	IFN- γ	609.4 ± 70.1 ^b	956.8 ± 159.5 ^b	945.1 ± 174.8 ^b	1295.8 ± 317.8 ^b	1806.6 ± 428.9 ^a	1312.6 ± 264.6 ^b
Mucosa pilórica	IL-2 ^o	213.1 ± 93.3	477.4 ± 69.7	471.38 ± 125.5	576.6 ± 66.9	721.9 ± 208.3	929.2 ± 191.4
	IFN- γ	230.1 ± 37.8 ^b	286.6 ± 45.1 ^b	296.7 ± 95.6 ^b	308.2 ± 106.6 ^b	941.4 ± 119.8 ^a	436.6 ± 66.7 ^b
Submucosa pilórica	IL-2 ^o	193.1 ± 39.4	383.4 ± 67.7	495.7 ± 67.3	506.1 ± 178.1	960.5 ± 313.7	547.7 ± 78.8
	IFN- γ	298.0 ± 70.6	288.2 ± 72.1	384.6 ± 102.5	498.9 ± 132.8	723.6 ± 95.6	616.8 ± 177.2

Cuadro 8. Promedio ± EE de células IL-2 e IFN- γ positivas por cm² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p < 0.05.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homólogas de los diferentes grupos p < 0.05.

Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homólogas de los diferentes grupos p < 0.05.

Letras griegas omega diferentes indican diferencia significativa entre subregiones de la región fúndica abomasal p < 0.05.

* Indica la región abomasal con mayor número de células p < 0.05.

		Grupo					
		1 ^A	2 ^A	3 ^A	4 ^A	5 ^B	6 ^A
Mucosa fúndica	IL-4 ^a	752.9±200.4 ^b	3194.3±489.2 ^b	3429.4±708.9 ^b	5550.8±838.6 ^b	11089.1±3201.7 ^a	5185.8±1047.3 ^b
	IL-6	120.9±23.7 ^b	234.7±39.3 ^b	285.5±99.7 ^b	437.1±112.2 ^a	639.6±179.6 ^a	437.7±111.7 ^a
	IL-10	298.4±107.5 ^b	577.6±95.1 ^b	828.2±367.8 ^b	1467.6±506.9 ^b	3736.1±844.5 ^a	2361.5±964.6 ^a
Submucosa fúndica	IL-4 ^b	779.2±297.5	1265.23±249.1	2692.7±525.7	3789.2±915.9	5338.6±692.7	6756.8±2720.9
	IL-6	196.2±11.8	224.3±37.1	312.2±89.3	441.6±100.5	434.9±99.7	367.2±81.9
	IL-10	528.1±194.0	428.9±109.9	1596.2±331.8	2330.7±552.8	2555.1±904.5	2755.9±680.9
Mucosa pilórica	IL-4 ^a	1202.4±247.5 ^b	1827.5±238.2 ^b	2881.6±303.2 ^b	4333.5±833.6 ^b	8733.3±1167.7 ^a	3646.0±817.8 ^b
	IL-6	135.3±24.1 ^b	350.7±97.0 ^b	323.3±97.3 ^b	476.6±108.0 ^a	701.9±199.5 ^a	455.7±134.3 ^a
	IL-10	677.2±100.5	888.2±188.3	1591.1±445.6	1697.1±377.1	2701.4±509.3	1940.5±562.6
Submucosa pilórica	IL-4 ^b	475. ±75.1	795.2±116.4	749.2±145.8	2555.3±735.6	3716.6±404.9	1266.6±312.8
	IL-6	208.5±41.1 ^b	229.6±64.1 ^b	315.8±89.3 ^b	420.4±80.9 ^a	659.3±171.4 ^a	540.9±100.3 ^a
	IL-10	470.6±141.4 ^b	573.7±156.2 ^b	686.3±165.3 ^b	1551.2±87.6 ^b	4052.1±1466.7 ^a	2933.2±936.5 ^a

Cuadro 9. Promedio ± EE de células IL-4, IL-6 e IL-10 positivas por cm² en diferentes regiones del abomaso de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos p<0.05.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos p<0.05.

Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones p<0.05.

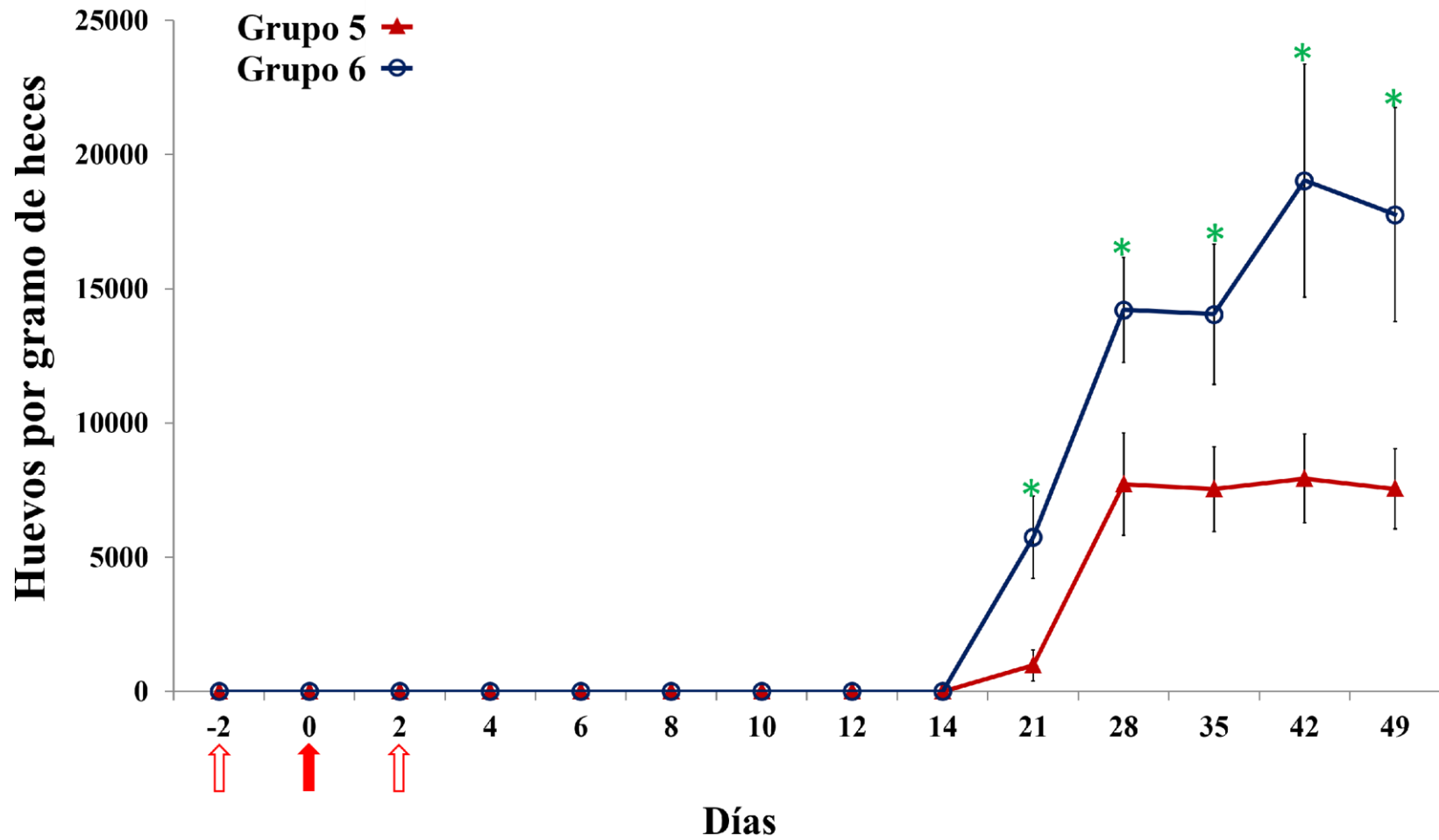


Figura 6. Promedio \pm EE del número de huevos eliminados en materia fecal de corderos de la raza Columbia infectados experimentalmente con 5000 L₃ de *Haemonchus contortus*.

Grupo 5. Corderos con administración parenteral de un extracto de metacestodo de *Taenia hydatigena* e infectados con *H. contortus* (n=5).

Grupo 6. Corderos infectados únicamente con *H. contortus* (n=5).

* Indica diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto.

La flecha sólida indica el día de inoculación con *H. contortus*.

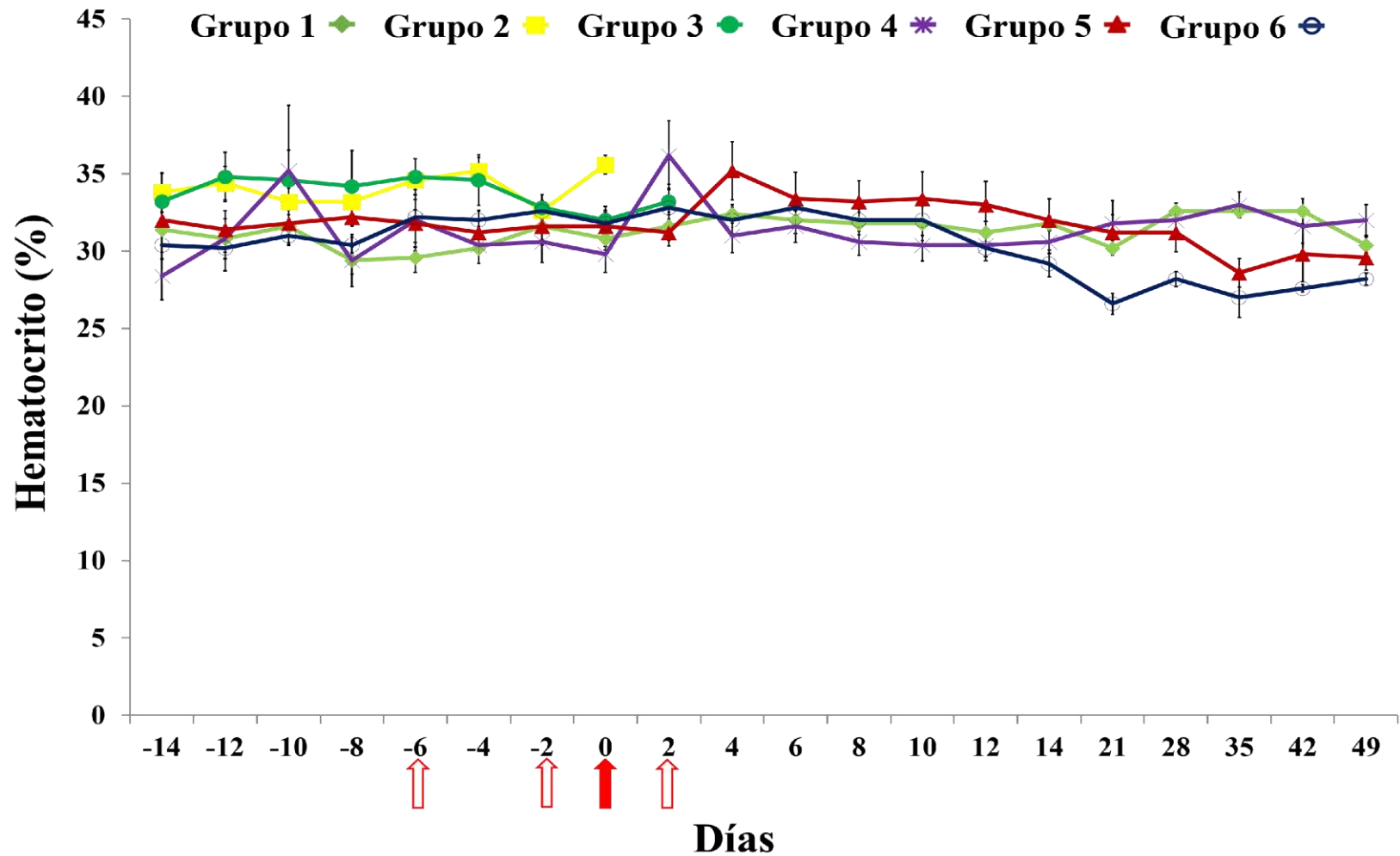


Figura 7. Promedio \pm EE del hematocrito de grupos de corderos de la raza Columbia del experimento a los cuales se les dio diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto.

La flecha sólida indica el día de inoculación con *H. contortus*.

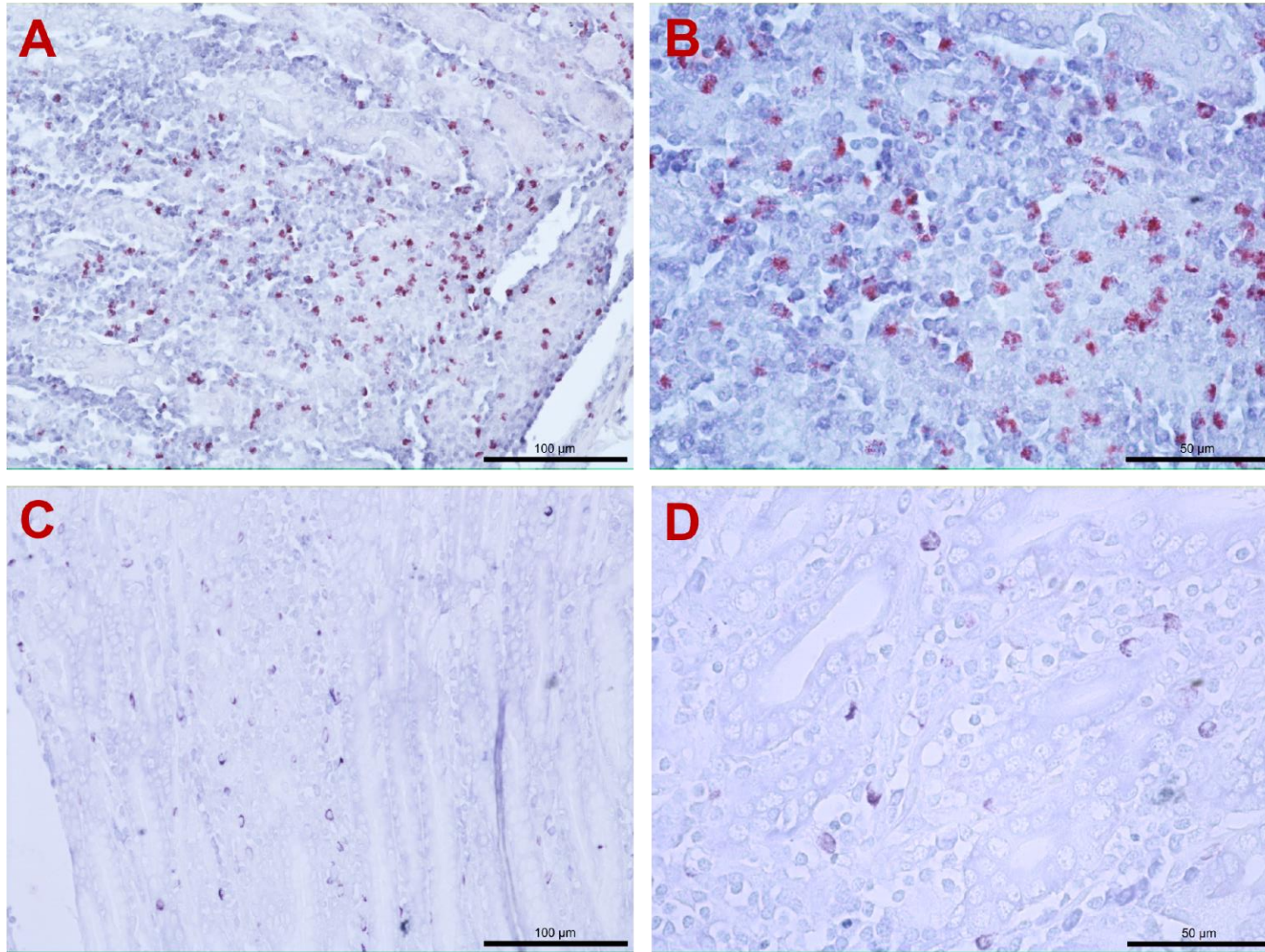


Figura 8 A) Corte histológico de mucosa pilórica abomasal teñido con cromotrope 2R, se observan numerosos eosinófilos de color rojo (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa fúndica abomasal teñido con azul de toluidina, se observan células cebadas teñidas de color morado (200X) D) Aumento de la microfotografía anterior, se observan células con gránulos de color morado (400X).

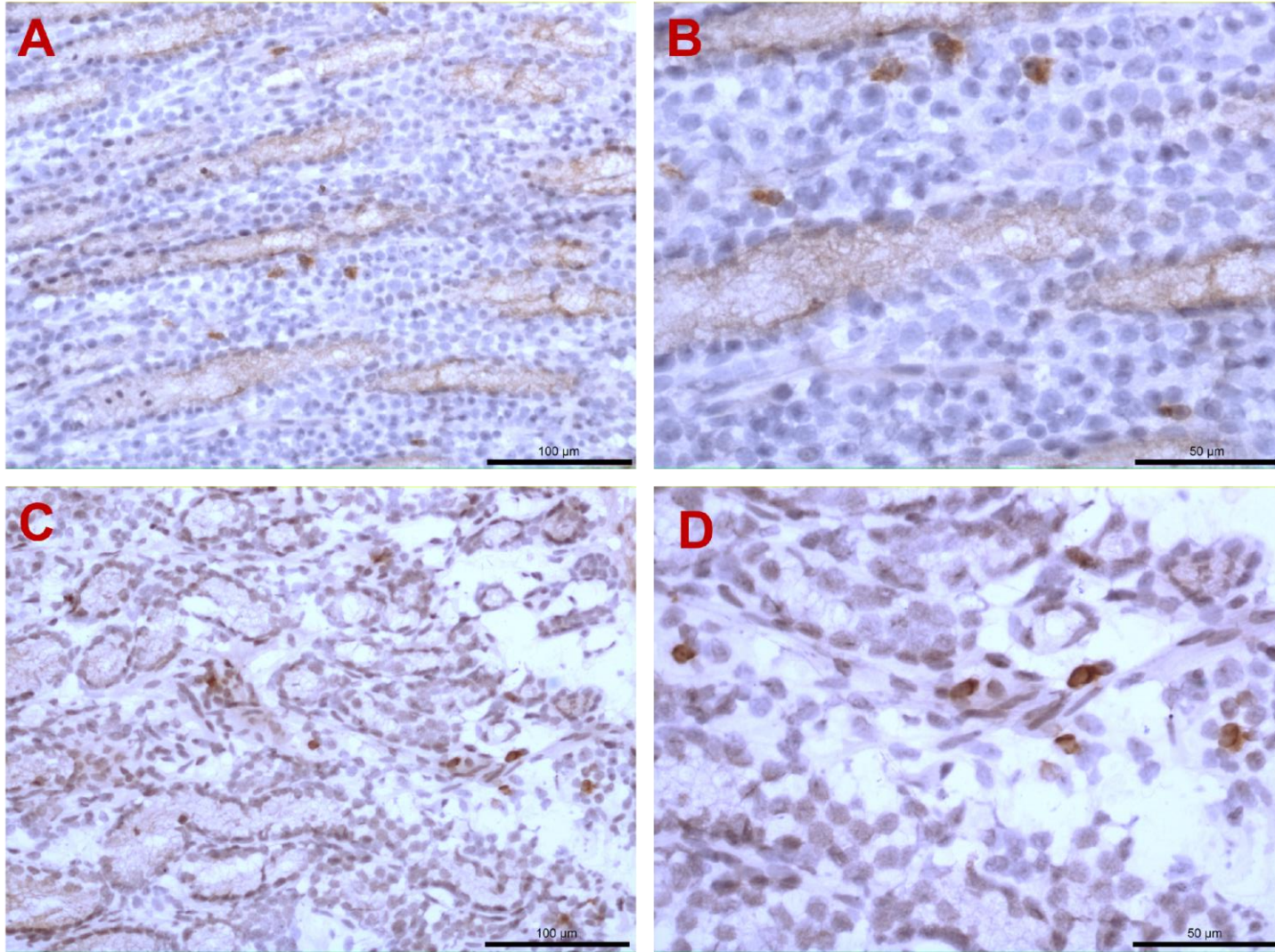


Figura 9. A) Corte histológico de mucosa fúndica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ , se observan células IFN- γ ⁺ de color café entre el tejido epitelial teñido de color azul (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2, se observan células IL-2⁺ de color café entre el tejido epitelial teñido de color azul (200X). D) Aumento de la microfotografía anterior (400X).

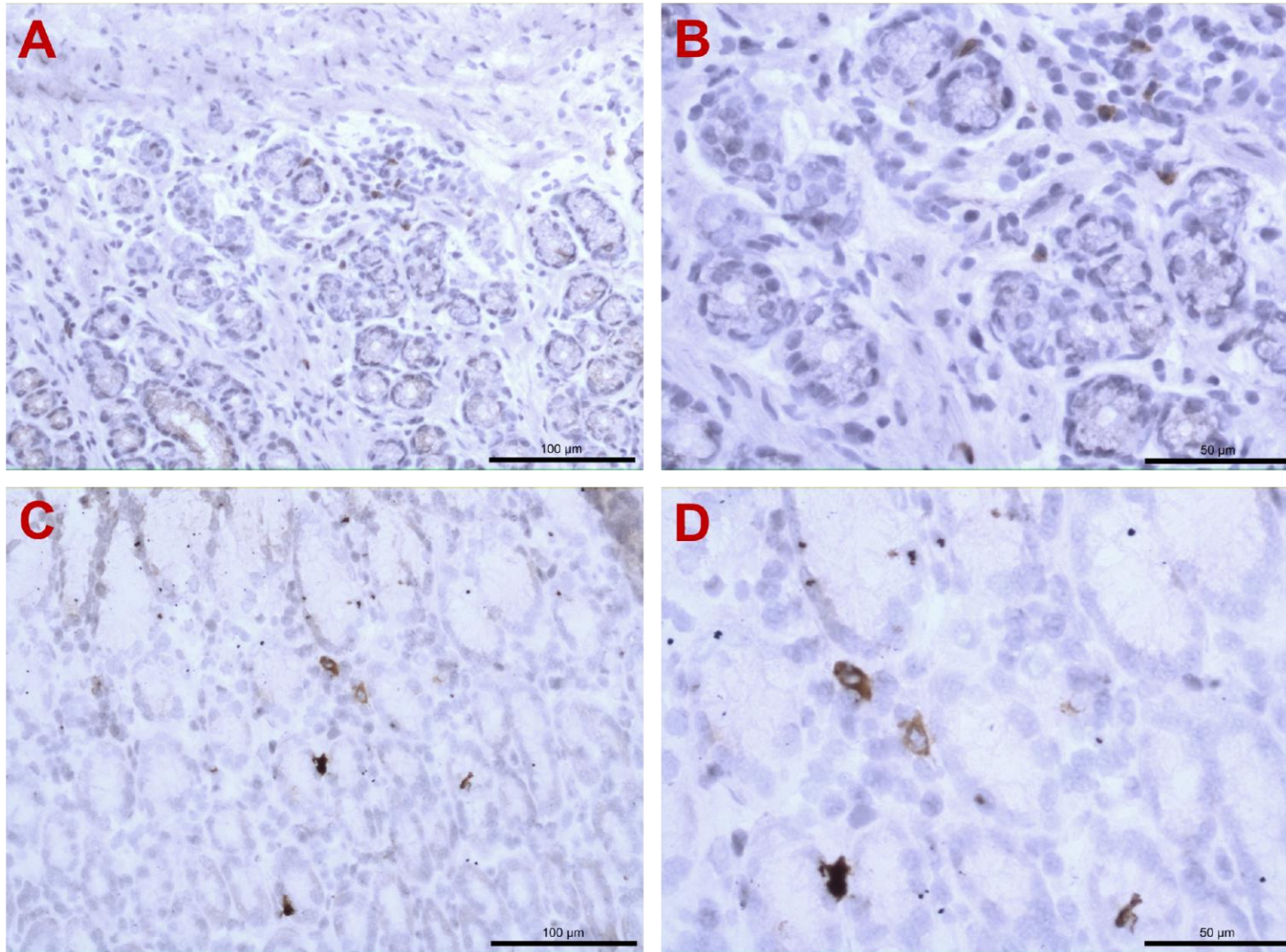


Figura 10. A) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-4, se observan células IL-4⁺ de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). B) Aumento de la microfotografía anterior (400X). C) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo policlonal anti-IL-6, se observan células IL-6⁺ de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). D) Aumento de la microfotografía anterior (400X).

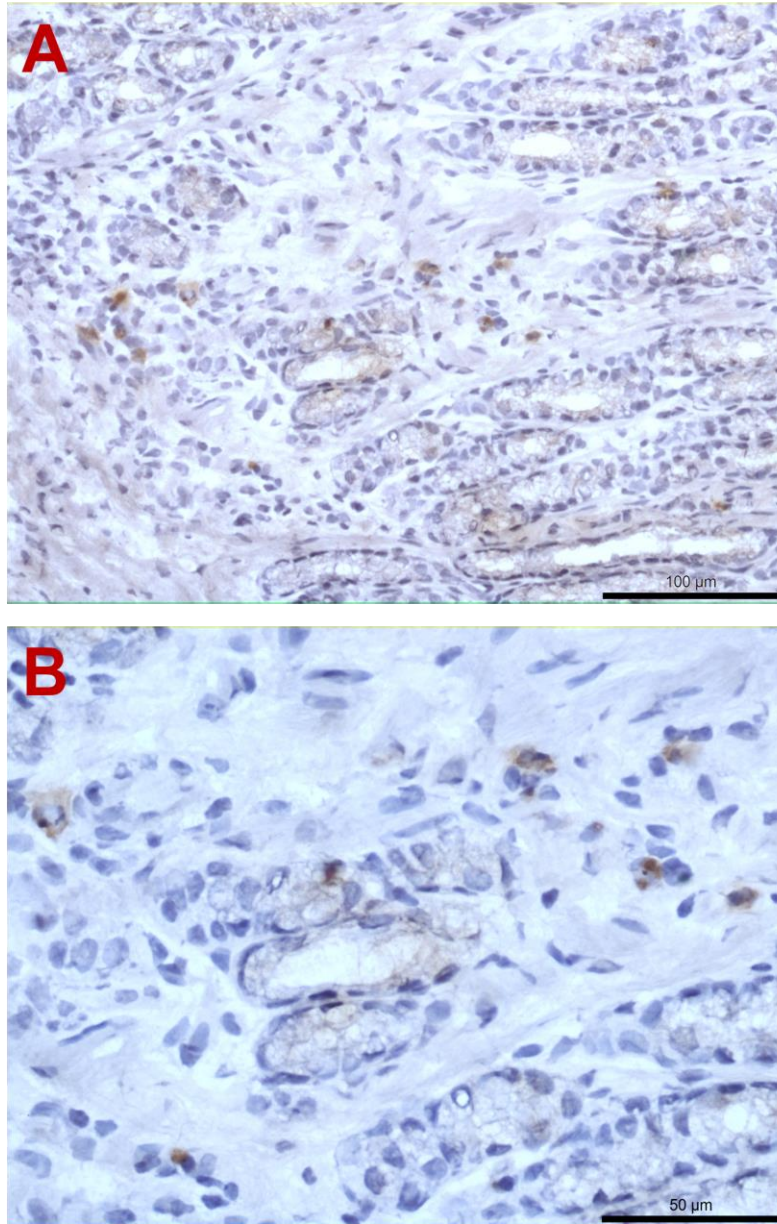


Figura 11. A) Corte histológico de mucosa pilórica, tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) con el anticuerpo monoclonal anti-IL-10, se observan células IL-10⁺ teñidas de color café entre el tejido epitelial de color azul (200X). **B)** Aumento de la microfotografía anterior (400X).

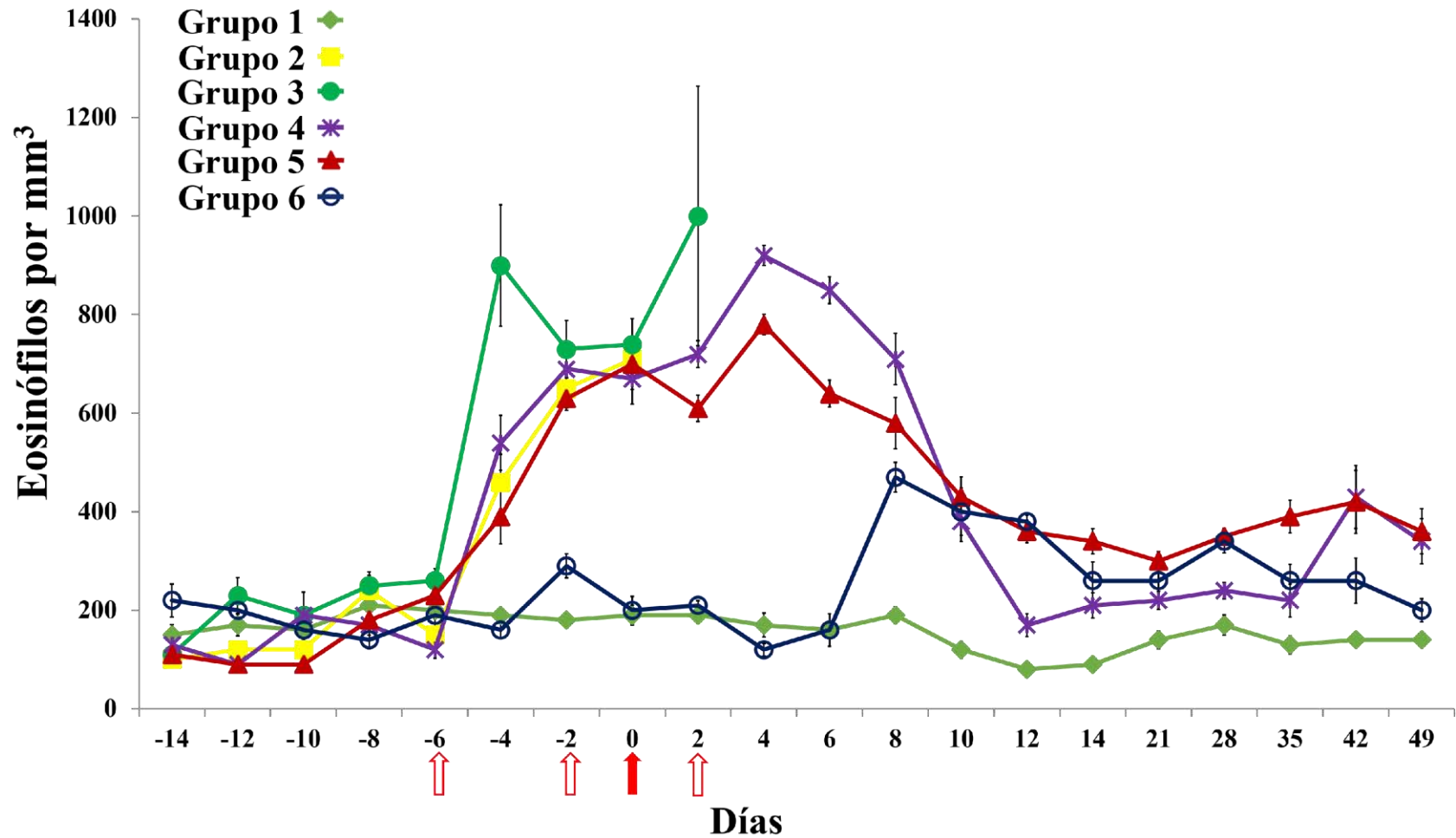


Figura 12. Cinética de los promedios \pm EE de eosinófilos sanguíneos de grupos de corderos de la raza Columbia con diferentes tratamientos.
 Grupo 1. Testigo sin tratamiento.
 Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.
 Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 3.
 Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.
 Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.
 Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.
 Las flechas con bordes indican los días en que se aplicó el extracto.
 La flecha sólida indica el día de inoculación con *H. contortus*.

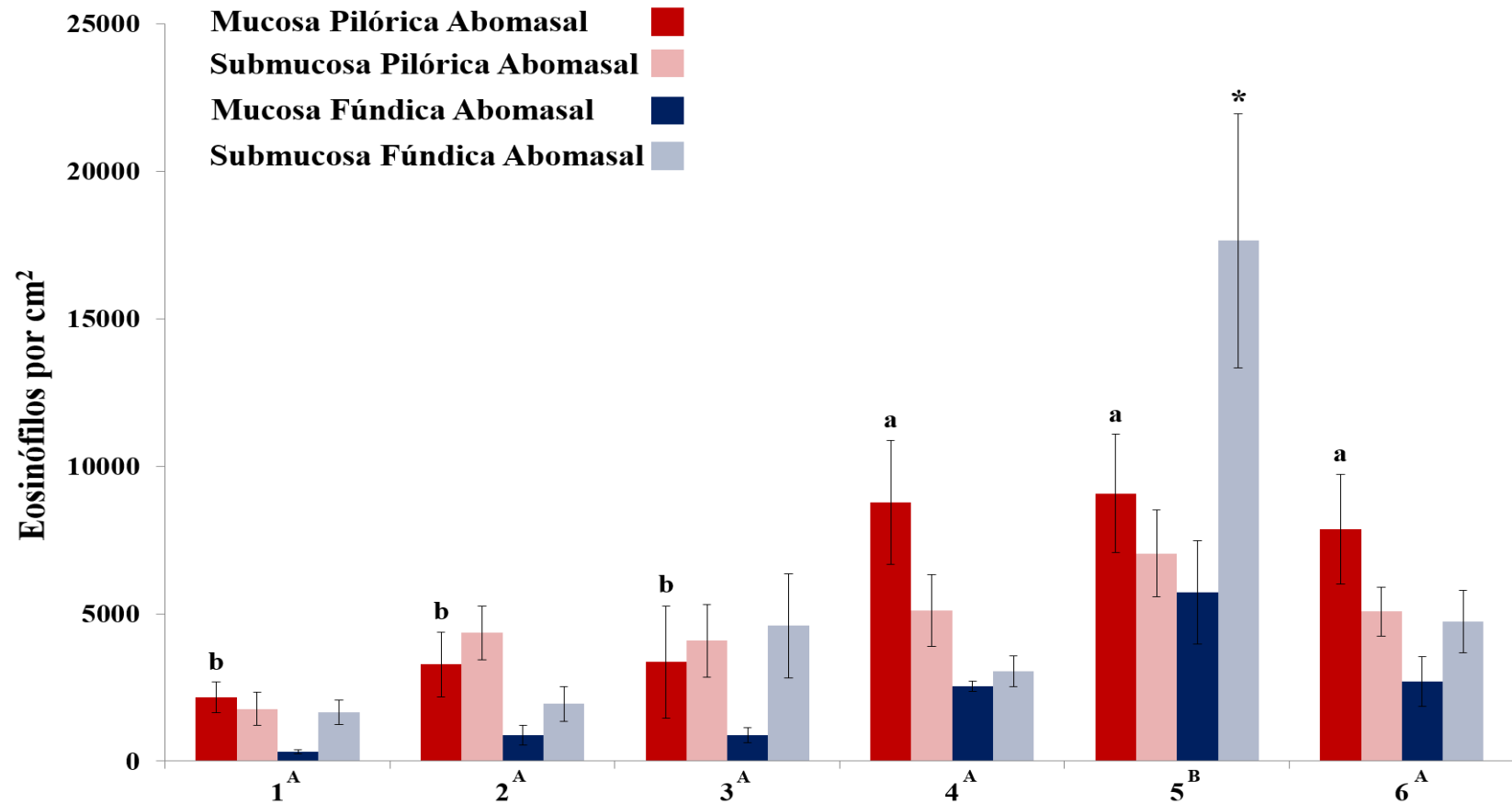


Figura 13. Promedio \pm EE de eosinófilos presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.001$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa en la misma región de diferentes grupos $p < 0.05$.

* Indica la región con mayor número de células $p < 0.001$.

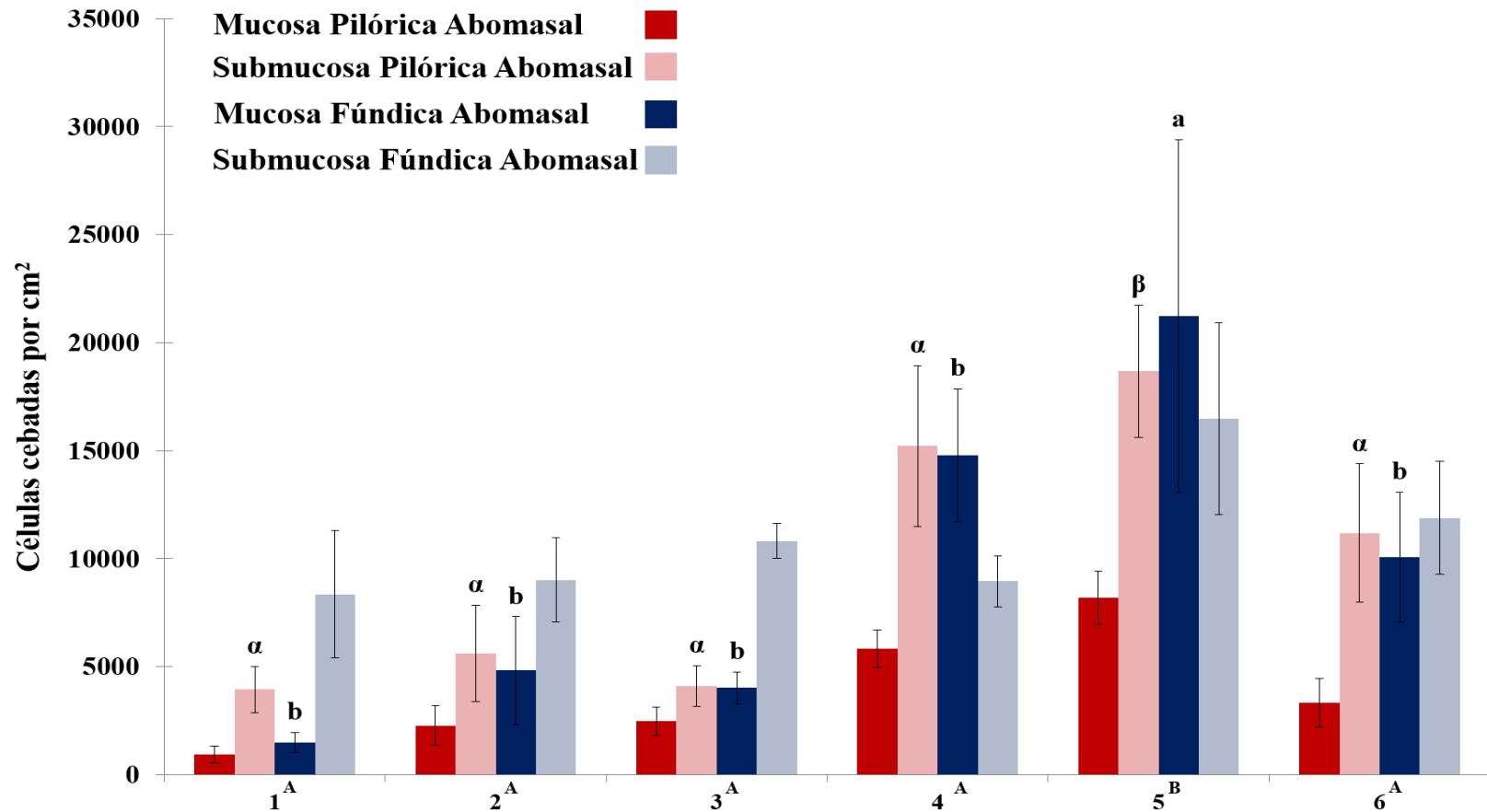


Figura 14. Promedio \pm EE de células cebadas presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.001$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.01$.

Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.01$.

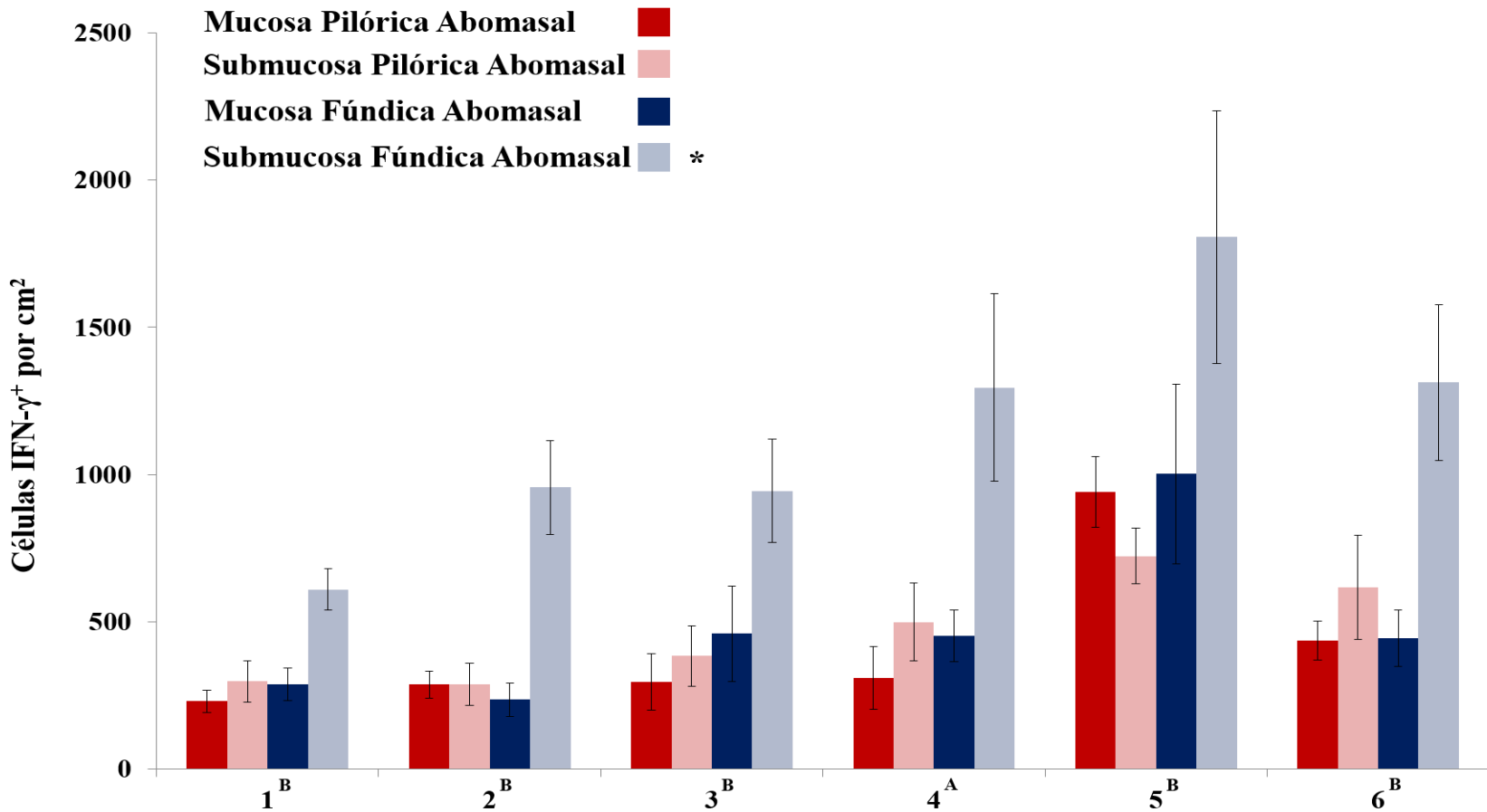


Figura 15. Promedio \pm EE de células IFN- γ^+ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

* Indica la región abomasal con mayor número de células $p < 0.05$.

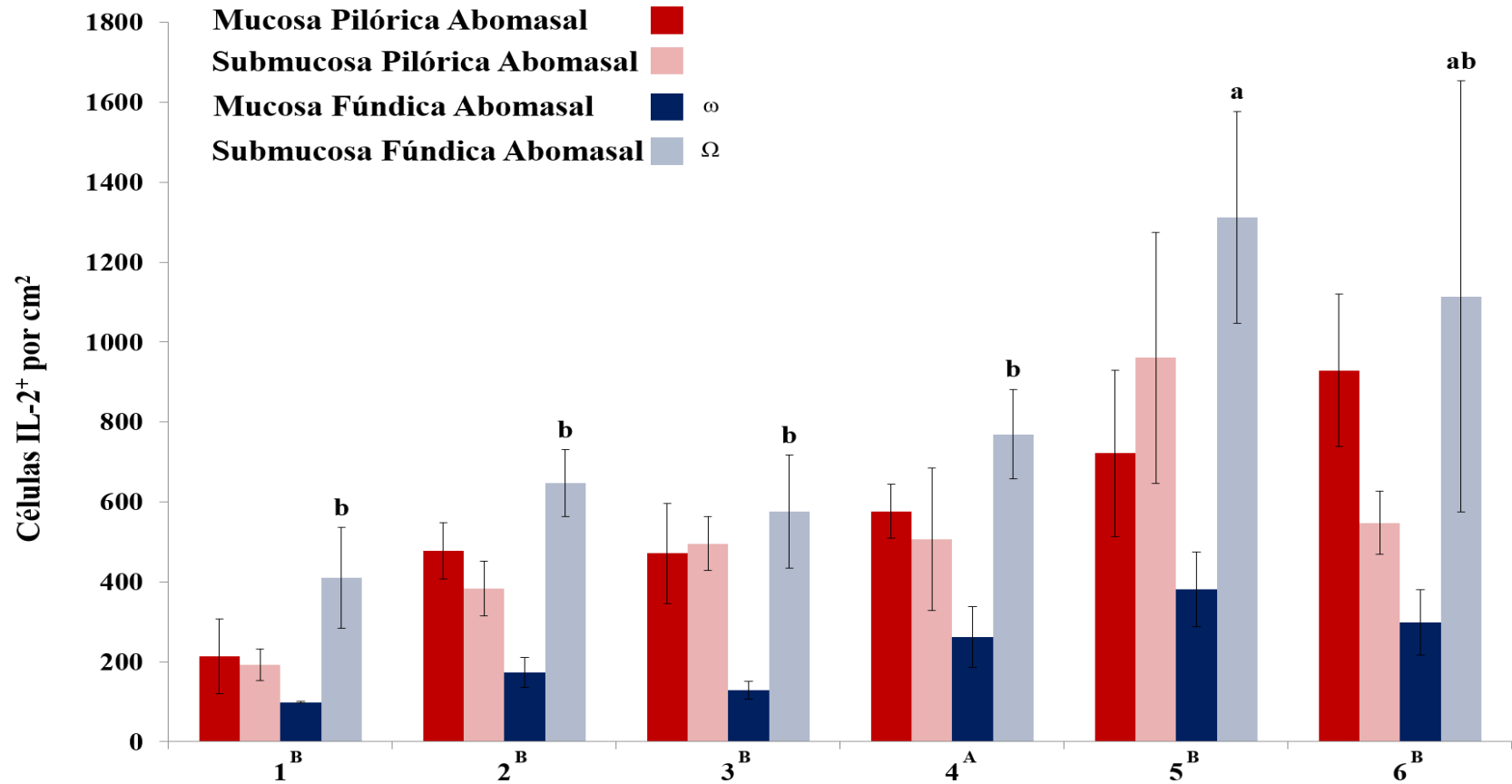


Figura 16. Promedio \pm EE de células IL-2⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$.

Letras griegas omega diferentes indican diferencia significativa entre subregiones de la región fúndica abomasal $p < 0.05$.

* Indica la región abomasal con mayor número de células $p < 0.05$.

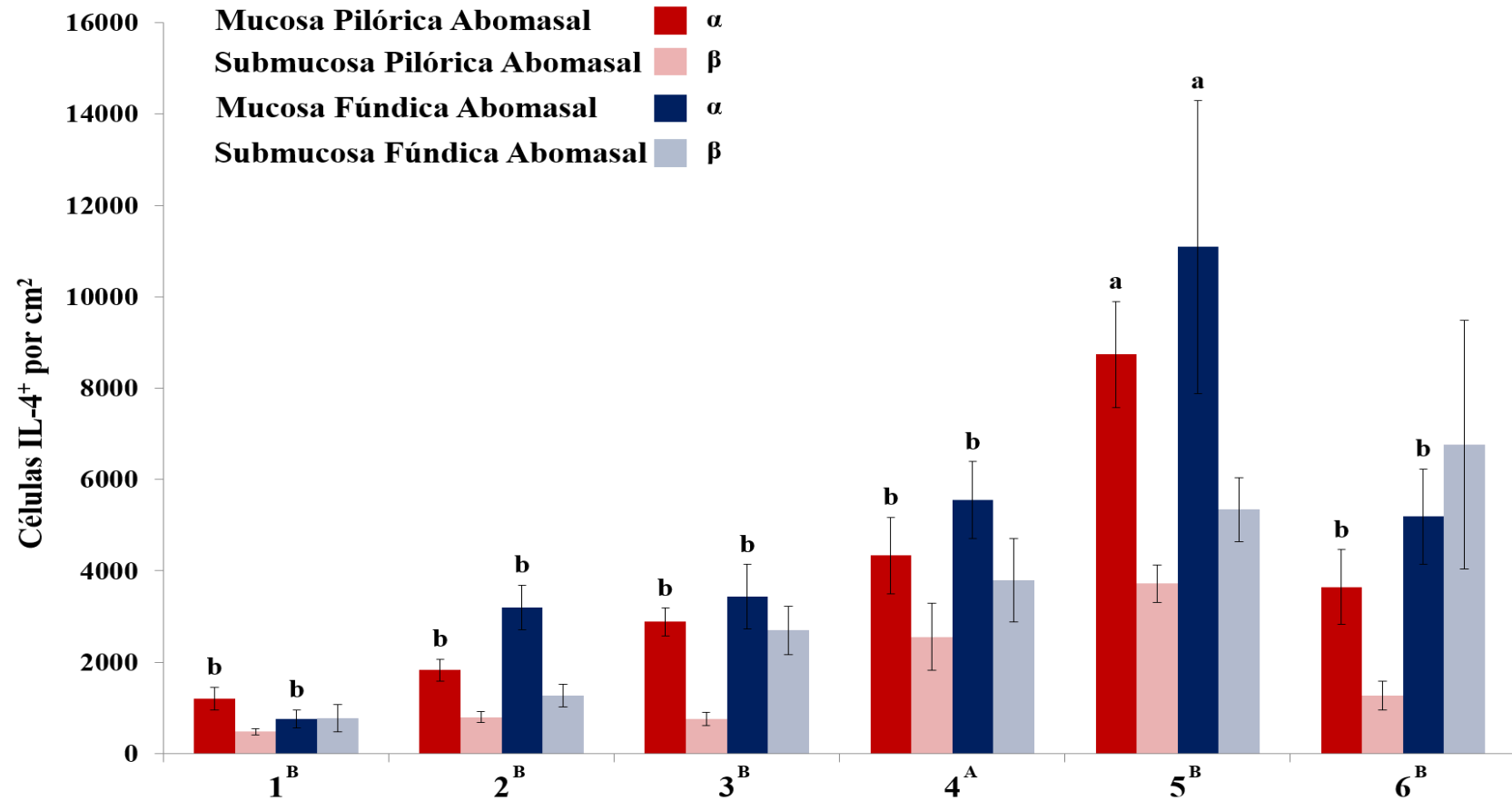


Figura 17. Promedio \pm EE de células IL-4⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$.

Letras griegas diferentes indican diferencia significativa entre regiones $p < 0.05$.

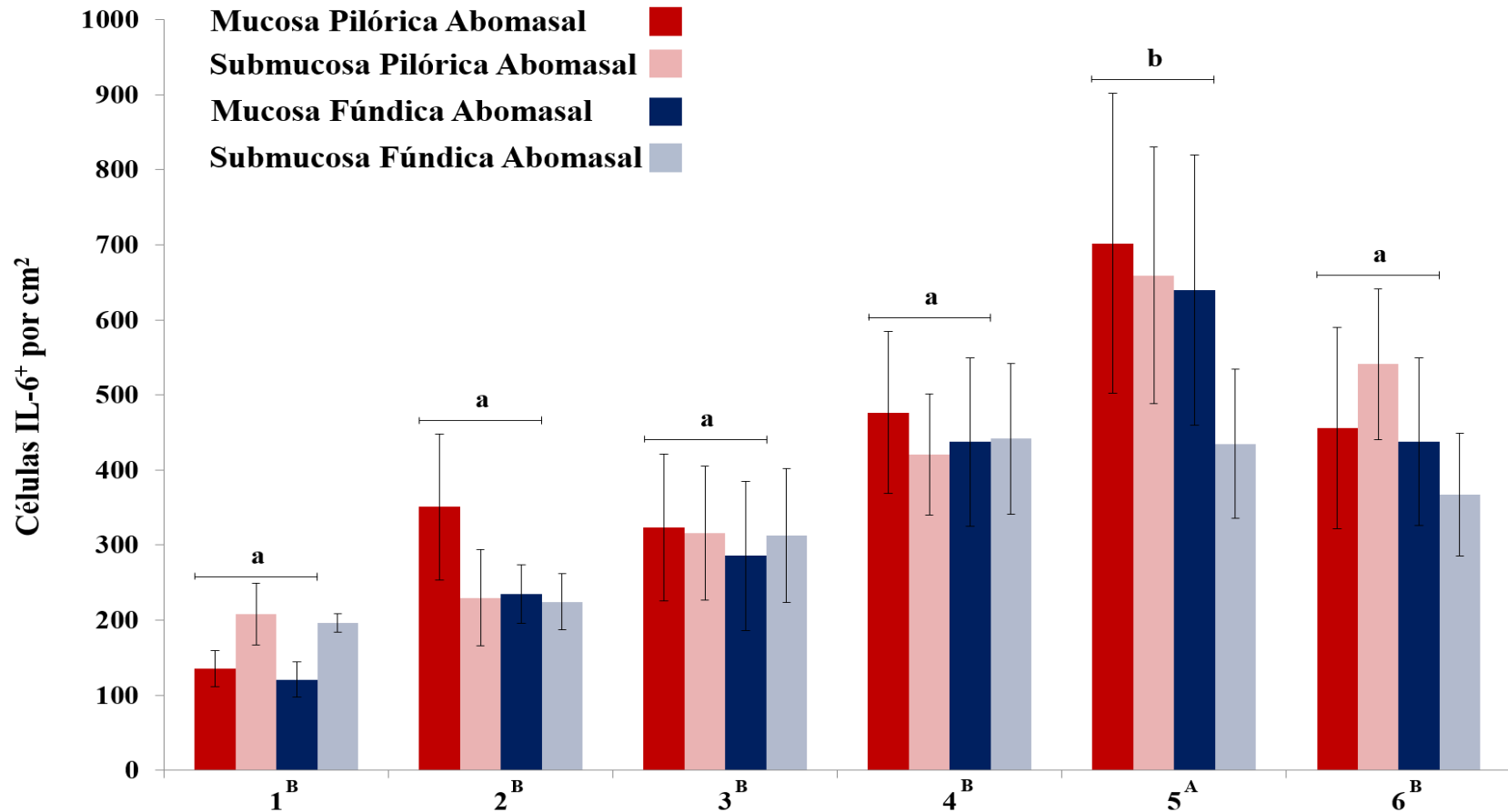


Figura 18. Promedio \pm EE de células IL-6⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$.

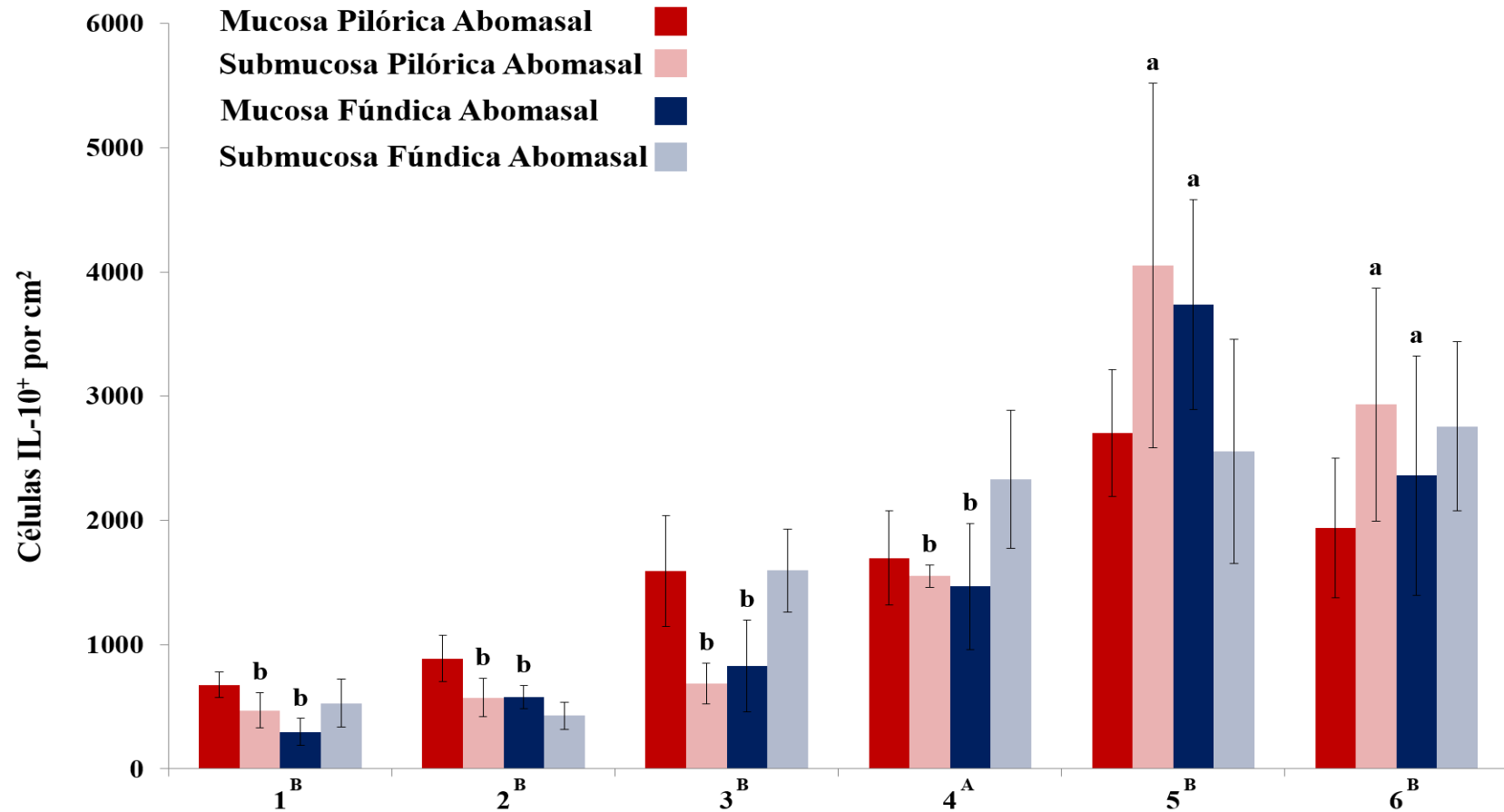


Figura 19. Promedio \pm EE de células IL-10⁺ presentes en diferentes regiones de pared abomasal de grupos de corderos de la raza Columbia con diferente tratamiento:

Grupo 1. Testigo sin tratamiento.

Grupo 2. Administrado con extracto de metacestodo de *T. hydatigena* (ExmTh), sacrificado día 0.

Grupo 3. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* sacrificado día 3.

Grupo 4. Administrado con ExmTh, sacrificado día 49.

Grupo 5. Administrado con ExmTh e infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Grupo 6. Infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus*, sacrificado día 49.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre grupos $p < 0.05$.

Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre regiones homologas de los diferentes grupos $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Muchos de los estudios para evaluar la respuesta inmune y la protección inducida a la hemoncosis ovina, se han realizado en ovinos con infecciones naturales adquiridas en los potreros, en las cuales no se tiene un control sobre el número de larvas ingeridas o las especies de estas, pues en forma natural son comunes las infecciones mixtas y aunque *H. contortus* es de los NGE más comunes, pueden estar presentes otros géneros (Torres-Acosta et al., 2000; Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2004; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). En este tipo de modelo tampoco se conoce el momento de la infección, porque es el resultado de la ingestión continua de larvas presentes en los pastos, por lo que los resultados observados pueden ser afectados por la respuesta inmunológica generada por estas continuas infecciones, lo anterior no permite realizar un análisis preciso y dificulta la interpretación de los resultados. Así mismo, en infecciones experimentales diferidas, como en el trabajo realizado por Muñoz-Guzmán et al. 2006, en el que se lleva a cabo un contacto repetido del hospedador con el parásito, en forma similar a una inmunización, se provoca una inducción de la respuesta inmune de tipo celular o humoral. En este trabajo se utilizaron corderos nacidos en corrales, que nunca pastaron en praderas y se mantuvieron en corrales libres de NGE, por lo que no habían tenido contacto con ninguno de estos parásitos. Por lo anterior, concluimos que la respuesta inmunológica observada y la protección inducida, son el resultado de la administración del ExmTh y/o una infección única con larvas de *H. contortus* y no al efecto de infecciones o inmunizaciones previas.

El sistema inmunológico puede ser estimulado de forma inespecífica por sustancias como glicanos, muramildipeptidos y otros, lo que puede mejorar la respuesta inmune contra algunos patógenos (Dissanayake *et al.*, 2002; Dissanayake and Shahin, 2007). En el presente estudio la aplicación intraperitoneal del extracto produjo en los corderos eosinofilia y aumento de eosinófilos tisulares, células cebadas y células que expresan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF γ ⁺ en la pared abomasal. Lo anterior sugiere que dicho extracto actúa como un inmunoestimulador inespecífico de la respuesta inmune abomasal y probablemente de todo el tracto digestivo.

Se ha demostrado que la infección con algunos parásitos como *Oestrus ovis* induce una respuesta del hospedador que disminuye la implantación de *H. contortus* en el abomaso (Terefe *et al.*, 2005). Aunado a esto, se sabe que es posible inducir eosinofilia en roedores tras la administración por vía aérea o intraperitoneal de ovoalbúmina (Tomaki *et al.*, 2000), la inoculación de diferentes fracciones de la pared de *Histoplasma capsulatum* (Sá-Nunes *et al.*, 2004) o de huevos larvados de *Toxocara canis* (Faccioli *et al.*, 1996). En experimentos previos se indujo eosinofilia en corderos con una combinación de la administración intraperitoneal e intramuscular de un ExmTh y se asoció la presencia de la eosinofilia con resistencia a la infección experimental con *H. contortus*. La administración de este extracto indujo al mismo tiempo un aumento de linfocitos CD4⁺ y $\gamma\delta^+$ en la pared abomasal (Cuenca-Verde *et al.*, 2011). En el presente estudio se confirmó la protección inducida por la administración del ExmTh y se asoció esta protección a la expresión de algunos tipos de citocinas. Lo anterior, parece confirmar que la protección inducida por el extracto tiene una base inmunológica.

Las fases adultas de *H. contortus* se encuentran en la luz del abomaso, por lo que probablemente los eventos inmunológicos que ocurran en la mucosa abomasal son más importantes que los sistémicos, sin embargo, ambos pueden ocurrir simultáneamente y estar relacionados. La eosinofilia ha sido frecuentemente asociada a la protección contra *H. contortus* (Bricarello *et al.*, 2004; Terefe *et al.*, 2007; Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). En el presente estudio se observó que los corderos que recibieron el ExmTh incrementaron sus niveles de ES y estos correlacionaron negativamente con la carga parasitaria. La cantidad de ES correlacionó positivamente con la cantidad de eosinófilos tisulares en la región fúndica abomasal, su presencia en sangre resultó un reflejo de lo que ocurre en la mucosa. En este trabajo, se contó el número de fases adultas totales, pero no se contó el de fases adultas en cada una de las regiones abomasales, sin embargo, en observaciones previas, la región fúndica abomasal fue donde se encontró la mayor cantidad de fases adultas (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que los ES migran continuamente al sitio donde se encuentra la mayor carga parasitaria, aumentando la cantidad de eosinófilos presentes en la mucosa abomasal que tiene contacto directo con las fases adultas y disminuye su cantidad.

Por otro lado, se ha demostrado que la infección con larvas de *H. contortus* induce el aumento de células CD4⁺ en la pared abomasal de corderos y la expresión de RNAm codificador de algunas citocinas (Meeusen et al., 2005; Robinson et al., 2010; Muñoz-Guzman et al., 2012). Los resultados muestran que la infección con *H. contortus* indujo aumento de eosinófilos, células cebadas y de la expresión *in situ* de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , de manera similar a la estimulación que produjo el ExmTh, los corderos que recibieron el ExmTh previo a la infección tuvieron menores cargas parasitarias y la expresión de estas citocinas fue significativamente mayor que en los corderos que solo recibieron el ExmTh o que solo fueron infectados. Además, la cantidad de eosinófilos, células cebadas y la expresión *in situ* de, IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ en la pared abomasal, estuvo correlacionada negativamente con la carga parasitaria. Lo anterior sugiere que la disminución de la carga parasitaria en los corderos que recibieron el extracto y la infección con larvas de *H. contortus*, es el resultado de la suma de ambos estímulos.

En varias especies animales se considera que el número y tipo de linfocitos presentan una distribución característica en las regiones histológicas del intestino delgado. En la mucosa intestinal se observan principalmente linfocitos CD8⁺ activados y en la submucosa intestinal mayor número de linfocitos CD4⁺ (Murphy, 2012; Williams, 2012). Algunos estudios han mostrado que corderos infectados con *H. contortus* presentan un mayor número de eosinófilos en la submucosa que en la mucosa de la pared abomasal, lo que sugiere la existencia de una respuesta diferenciada entre ambas regiones histológicas del abomaso (Amarante et al., 2005 y Terefe et al., 2009). En general se demostró una mayor expresión de IL-2 e IFN- γ en la submucosa que en la mucosa abomasal y, por el contrario, una mayor expresión de IL-4 en la mucosa que en la submucosa abomasal. Lo anterior sugiere una respuesta inmune compartimentalizada, en la cual la submucosa abomasal presentó una respuesta tipo Th1 y la mucosa abomasal una tipo Th2.

La mayoría de los estudios para evaluar la expresión de las citocinas en infecciones experimentales por nematodos gastroentéricos están basados en la cuantificación por PCR en tiempo real del ARNm que las codifica (Lacroux et al., 2006; Ibelli et al., 2011; Zaros et al., 2014). Sin embargo, la cantidad de ARNm presente en el tejido, no necesariamente indica que estas citocinas se produzcan, puesto que existen mecanismos de regulación postranscripcionales que podrían modificar la producción real de las citocinas en las células

(Alberts et al., 2008). Además, esta técnica no permite determinar la localización histológica de las células positivas o definir su morfología. En este trabajo se detectaron y cuantificaron las células por mm² que expresan las diferentes citocinas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales o policlonales altamente específicos contra IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , esto permitió medir la densidad de células en el tejido, determinar su localización *in situ* y asociar esa expresión a las diferentes regiones histológicas del abomaso. Esta es una de las técnicas más aceptadas actualmente en estudios patológicos e inmunológicos (Zheng et al., 2007; Lacroux et al., 2006; Appel et al., 2013; Chen et al., 2013; Lan et al., 2013). Lo anterior aporta nueva información sobre la respuesta inmune local y posiblemente disminuye errores en la evaluación de la expresión de las citocinas involucradas en la respuesta inmune.

Muchos investigadores han asociado la protección a la hemoncosis con una respuesta inmunológica tipo Th2 (Meeusen et al., 2005; Muñoz-Guzman et al. 2006; Lacroux et al., 2006; Shakya et al. 2009; Zaros et al., 2014), sin embargo, algunas investigaciones recientes sugieren que la dicotomía entre las respuestas tipo Th1 y Th2 en el tracto digestivo de ovinos no es igual a la respuesta inmune sistémica observada en modelos murinos (Robinson et al., 2011, Zaros et al. 2010). Se demostró que en el abomaso se pueden presentar simultáneamente ambos tipos de respuesta inmune, en regiones histológicas diferentes, las implicaciones fisiológicas o posibles actividades sinérgicas de estas respuestas son desconocidas.

CONCLUSIONES

- La administración de un ExmTh previa a la inoculación con larvas de *H. contortus* disminuyó la eliminación de hgh y el número de fases adultas del parásito.
- Los corderos que recibieron el ExmTh presentaron mayor cantidad ($p<0.05$) de ES que aquellos que no lo recibieron.
- Los corderos que recibieron el ExmTh y fueron infectados con larvas de *H. contortus* (sacrificados el día 49 PI) presentaron mayor cantidad ($p<0.001$) de eosinófilos y células cebadas en la pared abomasal que el resto de los grupos. La submucosa fúndica de este grupo presentó mayor cantidad de eosinófilos que el resto de las regiones estudiadas ($p<0.001$).
- Los corderos que recibieron el ExmTh y fueron infectados con larvas de *H. contortus* (sacrificados el día 49 PI) presentaron mayor cantidad de células productoras de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ en la pared abomasal que el resto de los grupos ($p<0.05$).
- La submucosa fúndica de los corderos de todos los grupos presentó mayor cantidad de células productoras de IFN- γ que las otras regiones estudiadas ($p<0.05$).
- La submucosa fúndica de los corderos de todos los grupos presentó mayor cantidad de células productoras de IL-2⁺ que sus respectivas submucosas pilóricas ($p<0.05$).
- En general las mucosas pilórica y fúndica de los corderos de todos los grupos presentaron mayor cantidad de células productoras de IL-4 que las submucosas de sus respectivos grupos ($p<0.05$).
- Los corderos que recibieron el ExmTh y fueron infectados con larvas de *H. contortus* (sacrificados el día 49 PI) presentaron mayor cantidad de células productoras de IL-4 en la mucosa fúndica y la mucosa pilórica que las regiones homólogas del resto de los grupos estudiados ($p<0.01$).

- Los resultados sugieren una respuesta inmune compartimentalizada, en la cual, la submucosa abomasal presenta una respuesta tipo Th1 y la mucosa abomasal una tipo Th2.
- Se observaron correlaciones negativas ($p < 0.05$) entre la carga parasitaria y células de la mucosa pilórica (células cebadas -0.60 e $\text{IFN-}\gamma^+$ -0.75), mucosa fúndica (células cebadas -0.62 , eosinófilos -0.55 , células IL-6^+ -0.68 y células $\text{IFN-}\gamma^+$ -0.62), submucosa pilórica (células IL-2^+ -0.57 y células IL-4^+ -0.70) y submucosa fúndica (eosinófilos -0.75).
- Se observaron correlaciones negativas ($p < 0.02$) entre carga parasitaria y ES (-0.71) y una correlación positiva ($p < 0.03$) entre ES y eosinófilos en la submucosa fúndica (-0.61).

REFERENCIAS

Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F., Hoste, H., Sandoval-Castro, C., López-Flores, M. 2005. Effect of supplementary feeding with energy and/or protein on the resilience and resistance of criollo kids against *Haemonchus contortus*. Congress of Novel Approaches to the control of helminth parasites of livestock. Worm control or worm management: new paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México. p. 29.

Alba-Hurtado, F. (Eds.), 2007. Parasitología Veterinaria. Manual de laboratorio, 128 pp.

Alba-Hurtado F., Romero-Escobedo E., Muñoz-Guzmán M.A., Torres-Hernández G., Becerril-Pérez C.M. 2010. Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 172, 277-282.

Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A. 2014. Avances recientes en el estudio de helmintos parásitos. Respuesta inmune asociada a la resistencia en la hemoncosis ovina. Ma. Guadalupe Ortega-Pierres y Jorge Morales-Montor editores. México: UNAM. pp. 181-204.

Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A. 2013. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. Biomed Res. Int. 2013:162158.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (Eds.), 2008. Molecular Biology of the cell, (5th ed.). Garland Science, U.S.A. New York, 1729 pp.

Almería, S., Canals, A., Zarlenga, D.S., Gasbarre, L.C. 1997. Quantification of cytokine gene expression in lamina propria lymphocytes of cattle following infection with *Ostertagia ostertagi*. J. Parasitol. 83, 1051-1055.

Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H. 2008. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. Vet. Parasitol. 153:187-92.

Appel, H., Maier, R., Bleil, J., Hempfing, A., Loddenkemper, C., Schlichting, U., Syrbe, U., Sieper, J. 2013. In situ analysis of interleukin-23 and interleukin-12 positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 65(6), 1522-9.

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

Amarante, A.F., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M. 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. Vet. Parasitol. 26, 91-106.

-
- Amarante, A.F., Craig, T.M., Ramsey, W.S., Davis, S.K., Bazerc, F.W. 1999. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbreed lambs. *Vet. Parasitol.* 80, 311-324.
- Baker, R.L., Gray, G.D. 2004. Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics. En: Sani R.A., Gray G.D., Baker R.L. (Eds.), *Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia*. Canberra, Australia. ACIAR Monograph.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N. 2000. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75, 109-20.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N. 2000b. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in sheep. *Adv. Parasitol.* 45, 182-241.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39-46.
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N. 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-15.
- Behm, C.A., Ovington, K.S. 2000. The role of eosinophils in parasitic helminthes infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today.* 16:202-209.
- Biffa, D., Jobre, Y., Chakka, H. 2007. Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Anim. Health Res. Rev.* 7, 107-118.
- Bilgrami, A., Brey, C. 2008. Potential of predatory nematodes to control plant parasitic nematodes. In: *Nematodes as biocontrol agents*. Grewal, P. S., Ehlers, R. U. Shapiro-Ilan, D. I., Eds, Cab Publishing, Cambridge Edit., UK. 590p.
- Bowles, V.M., Brandon, M.R., Meeusen, E. 1995. Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunol.* 84:669-674.
- Bouix, J., Krupinski, J., Rzepecki, R., Nowosad, B. 1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *Int. J. Parasitol.* 28 (11): 1797-1804.
- Bowman, D.D. 2014. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 10th ed. Elsevier Saunders. China. pp. 159-165.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
-

-
- Bricarello, P., Gennari, T., Olivera-Sequeira, T., Vaz, C., Goncalves, I., Echeverria, F., 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small. Rum. Res.* 51,75-83.
- Brunet, S., Martínez-Ortíz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H. 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157:81-88.
- Buddle, B.M., Jowett, G., Green, R.S., Douch, P.G., Risdon, P.L. 1992. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22, 955-960.
- Canals, A., Zarlenga, D.S., Almeria, S., Gasbarre, L.C. 1997. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 58, 63-75.
- Chen, W.C., Lai, Y.H., Chen, H.Y., Guo, H.R., Su, I.J., Chen, H.H. 2013. Interleukin-17 producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathol.* 63(2):225-33.
- Coadwell, W.J., Ward, P.F. 1981. The development, composition and maintenance of experimental populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitol.* 82:257-61.
- Cox, F.E., Liew, E.Y. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitol. Today.* 8(11):371-4.
- Crowe, S.E., Perdue, M.H. 1992. Gastrointestinal tract hypersensitivity: Basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterol.* 1113, 1075-1095.
- Cuéllar, O.J.A. 2014. Estrategias actuales para contrarrestar la presencia de nematodos gastroentéricos resistentes a antihelmínticos. Ganzábal, A. (Ed.). CYTED, Madrid, España. pp. 66-76.
- Cuenca-Verde, C., Cuenca-Verde, N.M. 2005. Comparación, tamaño y prolificidad de fases adultas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Blackbelly. Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- Cuenca-Verde, C., Buendía-Jiménez, J.A., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Muñoz-Guzmán, M.A., Alba-Hurtado, F. 2011. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. *Vet. Parasitol.* 177:332-338.
- Deplancke, B., Gaskins, H.R. 2001. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1131S-1141S.
-

-
- Dissanayake, S., Khan, N., Shahin, A., Wijesinghe, S., Lukic, M. 2002. Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates. *Immunology*. 107, 411-9.
- Dissanayake, S., Shahin, A., 2007. Induction of interferon-gamma by *Taenia crassiceps* glycans and Lewis sugars in naive BALB/c spleen and peritoneal exudate cells. *Mol. Immunol.* 44, 1623-1630.
- Douch, P.G., Harrison, G.B., Buchanan, L.L., Brunson, R.V. 1984. Relationship of histamine in tissues and antiparasitic substances in gastrointestinal mucus to the development of resistance to trichostrongyle infections in young sheep. *Vet. Parasitol.* 16, 273-288.
- Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Van Khanh, N., Morand, S. 1997. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils?. *Parasitol. Res.* 83(7):727-30.
- Eady, S.J., Woolaston, R.R., Mortimer, S.I., Lewer, R.P., Raadsma, H.W., Swan, A.A., Ponzoni, R.W. 1996. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: sources of genetic variation. *Aust. J. Agr. Res.* 47:895-915.
- Faccioli, L.H., Mokwa, V.F., Silva, C.L., Rocha, G.M., Araujo, J.I., Nahori, M.A., Vargaftig, B.B. 1996. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. *Mediators Inflamm.* 5:24-31.
- Figuroa, J.A., Méndez, R.D., Berruecos, J.M., Gayosso-Vázquez, A., Ulloa-Arvízu, R., Acosta, R., Pérez, H., Alonso, R.A. 2010. Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 177:339-344.
- Fox, M.T., Gerrelli, D., Shivalkar, P., Jacobs, D.E. 1989. Effect of omeprazole treatment on feed intake and blood gastrin and pepsinogen levels in the calf. *Res. Vet. Sci.* 46, 280-2.
- Frankena, K. 1987. The interaction between *Cooperia* spp. and *Ostertagia* spp. (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle. PhD Thesis. Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Fujita, H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. 2013. *J. Dermatol. Sci.* 72(1):3-8.
- Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J. 2000. Induction of Th1 and Th2 type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunol.* 99, 458-63.
- Gill, H.S., Watson, D.L., Brandon, M.R. 1993. Monoclonal antibody to CD4 T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunol.* 78, 43-49.
- Gill, H.S. 1994. Cell-mediated immunity in Merino lambs with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 24, 749-756.
-

-
- Gómez-Muñoz, M.T., Cuquerella, M., Gómez-Iglesias, L.A., Méndez, S., Fernández-Pérez, F.J., de la Fuente, C., Alunda, J.M. 1999. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81, 281-93.
- Haag, E. 1995. The effect of *Haemonchus contortus* excretory/secretory products on abomasal secretion. PhD Thesis. Hannover University.
- Harrison, G.B.L, Heath, D.D., Dempster, R.P. 1996. Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *Int. J. for Parasitol.* 26, 195-204.
- Henderson, N.G., Stear, M.J. 2006. Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 62-66.
- Mackay, C.R. and Hein, W.R. 1991. Marked variations in gamma delta T cell numbers and distribution throughout the life of sheep. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 173:107-11.
- Hein, W.R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., Meeusen, E.N. 2010. Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* 32, 541-548.
- Hooda, V., Yadav, C.L., Chaudhri, S.S., Rajpurohit, B.S. 1999. Variation in resistance to Haemonchosis: Selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J. Helminthol.* 72, 137-142.
- Hohenhaus, M.A., Josey, M.J., Dobson, C., Outteridge, P.M. 1998. The eosinophil leucocyte, a phenotypic marker of resistance to nematode parasites, is associated with calm behaviour in sheep. *Immunol. Cell Biol.* 76(2):153-8.
- Hohenhaus, M.A., Outteridge, P.M. 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br. Vet. J.* 151, 119-140.
- Honde, C., Bueno, L. 1982. *Haemonchus contortus*: egg laying influenced by abomasal pH in lambs. *Exp. Parasitol.* 54, 371-8.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C. 2005. Interaction between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Rum. Research.* 60, 141-151.
- Ibelli, A.M., Nakata, L.C., Andréo, R., Coutinho, L.L., Oliveira, M.C., Amarante, A.F., Furlong, J., Zarus, L.G., Regitano, L.C., 2011. mRNA profile of Nellore calves after primary infection with *Haemonchus placei*. *Vet. Parasitol.* 176, 195-200.
- Jacobs, H.J., Ashman, K., Meeusen, E. 1995. Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 323-332.
-

-
- Kanobana, K., Ploeger, H.W., Vervelde, L. 2002. Immune expulsion of the Trichostrongylid *Cooperia oncophorais* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. *Int. J. Parasitol.*, 32, 1389-398.
- Karanu, F.N., McGuire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E, Jasmer, D.P. 1997. CD4⁺ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19, 435-445.
- Kemp, J.M., Robinson, N.A., Meeusen, E.N., Piedrafita, D.M. 2009. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *Int. J. Parasitol.* 39, 1589-94.
- Ketzis, J.K., Vercruyse, J., Stromberg, B.E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J.G. 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet. Parasitol.* 139: 321-335.
- Knox, M.R. 2002. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust. Vet. J.* Apr, 80 4:224-7.
- Lacroux, C., Nguyen, T.H., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquet, P. 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-22.
- Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q., Lu, J., Liu, J. 2013. High density of IL-17 producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res.* 352(2):351-9.
- Le Jambre, L.F. 1995. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *Int. J. Parasitol.* 25(3):269-73.
- Liébano, H., E. 2011. Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos.* Quiroz-Romero, H., Figueroa-Castillo, J. A., Ibarra-Velarde, F. y López-Arellano, M.E. Ed. Editado por AMPAVE. pp. 254-272.
- López-Arellano, M.E., Bravo-de-la-Parra, A., Mendoza-de-Gives, P., Hernández-Linares, I., Yáñez-Pérez, N. G., Vázquez-Pineda, A. y Lara-García, E. 2014. Avances recientes en el estudio de helmintos parásitos. Valoración del uso de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* como agente terapéutico contra la hemoncosis ovina y triquinosis en ratones. Ma. Guadalupe Ortega-Pierres y Jorge Morales-Montor editores. México:UNAM. pp. 243-268.
- Luna, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. Ed. McGraw-Hill, Inc. USA.
- McKay, D.M., Bienenstock, J. 1994. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. Today.* 15, 533-8.
-

-
- Mackay, C.R., Hein, W.R. 1991. Marked variations in gamma delta T cell numbers and distribution throughout the life of sheep. *Curr. Top Microbiol Immunol.* 173:107-111.
- Martínez-Valladares, M., Vara-del-Río, M.P., Cruz Rojo, M.A., Rojo Vázquez, F.J. 2005. Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*. IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunol.* 27, 213-18.
- McLeod, R.S. 2004. Economic impact of worm infections in small ruminants in South East Asia, India and Australia. En: Sani R.A., Gray G.D., Baker R.L. (Eds.). *Worm Control of Small Ruminants in Tropical Asia*. ACIAR Monograph
- McKay, D.M., Bienenstock, J. 1994. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. today.* 15, 533-8.
- Meana, A., Rojo, F.A. 1999. Parasitosis de los rumiantes. Tricostrogilidosis y otras nematodosis. En: Cordero del Campillo M. et al. (Eds.). *Parasitología Veterinaria*. Madrid. Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Meeusen, E.N., Balic A. 2000. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites?. *Parasitol Today.* 16, 95-101.
- Meeusen, E.N., Balic, A., Bowles, V. 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 121-5.
- Mendoza de Gives, P. 1999. "Interaction between nematodes and bio-control agents with potential for use in bio-management systems." PhD Thesis. Faculty of Life Sciences. University of Nottingham, Nottingham, UK.
- Mendoza de Gives, P., Valero Coss, R.O. 2009. Uso de hongos nematófagos: una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. INIFAP. Morelos México. Folleto Técnico No. 7.
- Miller, H.R. 1996. Mucosal mast cells and allergic response against nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 331-6.
- Miller, J.E., Bahirathan, M., Lemarie, S.L., Hembry F.G., Kearney M.T., Barra, S.R. 1998, Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 55-74.
- Miller, J.E., Horohov, D.W. 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84. 124-32.
- Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Owango, M.O., Duncan, J.L., Stear, M.J. 1996. Response of Dorper and red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Res. Vet. Sci.* 61, 218-21.
-

Muñoz-Guzmán, M.A, Cuéllar-Ordaz, J. A., Valdivia-Anda, A.G., Buendía-Jiménez J.A., Alba-Hurtado, F. 2006. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. *Can. J. Anim Sci.* 86, 363-71.

Muñoz-Guzmán, M.A. 2007. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Haemonchus contortus* en razas de alta y baja susceptibilidad. Tesis doctoral, UNAM, México.

Muñoz-Guzmán, M.A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F. 2012. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 185, 175-180.

Murphy, K. (Ed.), 2012. Janeway's immunobiology (8th ed). Garland Science, New York, USA, 892 pp.

Newton, S.E., Meeusen E.N. 2003. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites in sheep. *Parasite Immunol.* 25, 283-96.

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

Peacock, R., Poynter, D. 1980. Field experience with a bovine lungworm vaccine. *Vaccines against Parasites.* 18, 141-148.

Parker, C.F., McClure, K.E., Herd, R.P. 1993. Hair sheep potential for specific environmental conditions and productions system in North America. Mem. Sexto Congreso Nacional de Producción ovina. Cd. Valles, San Luis Potosi.

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

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Bisset, S.A., Jonas, W.E., Cabaj, W., Pulford, H.D. 1995. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. *Int. J. Parasitol.* 25, 523-529.

Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Green, R., Shaw, R, Hein WR. 2006. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 135-148.

Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Hein, W.R. 2005. Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect. Immun.* 73, 2175-2183.

-
- Pfeffer A., Douch P.G., Shaw R.J., Gatehouse T.K., Rabel B., Green R.S., Shirer C.L., Jonas W.E., Bisset S. 1996. Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. *Int. J. Parasitol.* 26,765-773.
- Quiroz, R.H. 1986. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. LIMUSA. México.
- Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2002. 26.- Enfermedades causadas por parásitos helmintos, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Rainbird, M.A., Macmillan, D., Meeusen, E.N. 1998. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* 20, 93-103.
- Redmond, D.L., Knox, D.P. 2004. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252-61.
- Robinson, N., Piedrafita, D., Snibson, K., Harrison, P., Meeusen, E.N.T., 2010. Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunization and challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* 41, 37.
- Robinson, N., Pleasance, J., Piedrafita, D., Meeusen, E.N. 2011: The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 41, 487-493.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry.* 69:299-322.
- Sá-Nunes, A., Medeiros, A.I., Faccioli, L.H. 2004. Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. *Braz J Med Biol Res.* 37:343-6.
- Sackett, D., Holmes, P., Abbott, K., Jephcott, S., M. Barber M. 2006. Assessing the economic cost of endemic disease on profitability of Australian beef cattle and sheep producers (final report). Sydney. Meat and Livestock Australia
- Saddiqi, H.A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., Shahzad, A. 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res.* 109(6):1483-500.
- Schallig, H.D., van Leeuwen, M.A., Hendriks, W.M.L. 1995. Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol.* 56 149-162.
- Schallig, H.D., van Leeuwen, M.A., Cornelissen, A. W. 1997. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol.* 19 447-53.
-

-
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57-66.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D. 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Vet. Parasitol.* 181, 239-247.
- Schmidt, A., Oberle, N. and Krammer, P.H. 2012. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 2; 3:51.
- Serrano Hernández, A. 2009. Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reumatol. Clin.* 5 (S1):1-5.
- Sher, A., Coffman, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 10:385-409.
- Singh, S., Yadav, C.L., Banerjee, D.P. 1997. Comparison of the post-parturient rise in faecal egg counts of indigenous and cross-bred ewes. *J. Helminthol.* 71 (3): 249-252.
- Simpson, H.V., Lawton, D.E., Simcock, D.C., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E. 1997. Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *Int. J. Parasitol.* 27, 825-31.
- Soulsby, E.J.L. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* México D.F. McGraw Hill. Interamericana.
- Stankiewicz, M., Jonas, W.E., Douch, P.G., Rabel, B., Bisset, S., Cabaj, W. 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J. Parasitol.* 79, 940-945.
- Stear, M.J., Bishop, S.C., Mallard, B.A., Raadsma, H. 2001. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res. Vet. Sci.* 71, 1-7
- Stear, M.J., Doligalska, M., Donskow-Schmelter, K. 2007. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitol.* 134, 139-151.
- Stear, M.J., Murray, M., 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 54, 61-176.
- Strain, S.A.J., Stear, M.J. 2001. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 23, 527-31.
- Sutherland, I.A., Brown, A.E., Green, R.S., Miller, C.M., Leathwick, D.M. 1999. The immune response of sheep to larval challenge with *Ostertagia circumcincta* and *O. ostertagi*. *Veterinary Parasitol.* 80, 261-271.
-

Sutherland, I., Scott, I. 2010. *Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control*. Ed. Wiley-Blackwell, United Kingdom.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. 2007. *Veterinary parasitology*. Ed. Blackwell, 3th edition. United Kingdom.

Tembely, S., Lahlou-kassi A., Rege J.E., Sovani, S., Diedhiou, M.L., Baker, R.L. 1997. The epidemiology of nematode infections in sheep in a cool tropical environment. *Vet. Parasitol.* 70(1-3):129-41.

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

Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Bouix, J., Borchies, P., Jacquiet, P., 2007. Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol.* 29, 415-424

Terefe, G., Lacroux, C., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Dorchies, P., Foucras, G., Jacquiet, P. 2009. Eosinophils in *Haemonchus contortus* infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and *in vitro* functional state. *Vet. Parasitol.* 165, 1-4.

Tizard, I.R. 2009. *Introducción a la inmunología Veterinaria*, 8th edición. Elsevier, Barcelona, España.

Tjabringa, G.S., Vos, J.B., Olthuis, D., Ninaber, D.K., Rabe, K.F., Schalkwijk, J., Hiemstra, P.S., Zeeuwen, P.L. 2005. Host defense effector molecules in mucosal secretions. *Immunol. Med. Microbiol.* 1; 45 (2), 151-8.

Tomaki, M., Zhao, L.L., Lundahl, J., Sjöstrand, M., Jordana, M., Lindén, A., O'Byrne, P., Lötvall, J. 2000. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J. Immunol.* 165:4040-50.

Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J. 2000. Nematodos gastrointestinales de caprinos y ovinos en el trópico: Control integral. Mem. Curso de medicina y enfermedades infecciosas de pequeños rumiantes en el trópico. Yucatán, México. 114-117.

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

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

-
- Urban, J.F. Jr., Madden, K.B., Svetic, A., Cheever, A., Trotta, P.P., Gause, W.C., Katona, I.M., Finkelman, F.D. 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127, 205-220.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 2001. *Parasitología veterinaria*. Acriba, Zaragoza, España.
- Valderrábano, J., Gómez-Rincon, C., Uriarte, J. 2006. Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 141, 122-31.
- Valdez-Ramírez, L., 2004. Aislamiento de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino. Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- Van Die, I., Gomord, V., Kooyman, F.N.J., Van Den Berg, TK, Cummings, RD, Vervelde, L. 1999. Core α 1-3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminthes and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep. *FEBS Lett*, 463:189-193.
- Van Wyk, J.A. 2001. Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *J. Vet. Res.* 68, 55-67.
- Van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R.M., Besier R.B. 2006. Targeted selective treatment for worm management. How do we sell rational programs to farmers?. *Vet. Parasitol.* 139, 336-46.
- Vervelde, L., Bakker, N., Kooyman, F.N., Cornelissen, A.W., Bank, C.M., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Van Die, I. 2003. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. *Glycobiol.* 13, 795-804.
- Vignau, M.L., Venturini, L.M., Romero, J., R., Eiras, D.F. y Basso, W.U. 2005. *Parasitología Práctica y Modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 1ª ed. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. Buenos aires, Argentina.
- Waller, P.J. 1997. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71, 195-207.
- Waller, P.J., Chandrawathani, P. 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed.* 22, 131-137.
- Watson, D.L., Colditz, I.G., Andrew, M., Gill, H.S., Altmann, K.G. 1994. Age-dependent immune response in Merino sheep. *Res. Vet. Sci.* 57, 152-158.
- Williams, A.E., 2012. *Immunology: Mucosal and Body Surface Defenses*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 400 pp.
-

-
- Winter M.D., Wright, C., Lee, D.L. 1997. The mast cell and eosinophil response to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitol.* 114, 189-93.
- Wood, P.R., Seow, H.F. 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 54, 33-44.
- Yatsuda A.P., Krijgsveld J., Cornelissen A.W.C.A., Heck A.J.R., de Vries E. 2003. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J. Biol. Chem.* 278, 16941-16951.
- Yacob, H.T., Basazine, B.K., Basu, A.K., 2008. Experimental concurrent infection of Afar breed goats with *Oestrus ovis* (L1) and *Haemonchus contortus* (L3): interaction between parasite populations, changes in parasitological and basic haematological parameters. *Exp. Parasitol.* 120, 180-184.
- Yong, W.K., Saunders, M.J., Morton, R.E., Hermon, M., McGillivray, D.J., Hooper, I.J., Morgan, P., Riffkin, G.G., Cummins, L.J., Thompson, R.M. 1991. Immunology of *Ostertagia* resistance. En: Gray, G. D., Woolaston, R. R. (Eds.). *Breeding for Disease Resistance*. Melbourne. Australian Wool Corporation.
- Zaros, L.G., Bricarello, P.A., Amarante, A.F., Rocha, R.A., Kooyman, F.N., De Vries, E., Coutinho, L.L., 2010. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Vet. Parasitol.* 171, 68-73.
- Zaros, L. G., Neves, M. R. M., Benvenuti, C. L., Navarro, A. M. C, Sider, L. H., Coutinho, L. L., Vieira, L. S., 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Research*, 113, 1155-1161
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., Ouyang, W. 2007. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23 induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 445(8), 648-51.