

Tesis Doctoral

INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR ENTRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y RAZAS OVINAS CANARIAS. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ Y LOS EOSINÓFILOS

Julia Natividad Hernández Vega



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria

Aucas, Diciembre 2015

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: **Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria.**

Programa de Doctorado: **“SANIDAD ANIMAL”**.

Título de la Tesis

“INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR ENTRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y RAZAS OVINAS CANARIAS. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ Y LOS EOSINÓFILOS”.

Tesis Doctoral presentada por **Doña Julia Natividad Hernández Vega.**

Dirigida por el **Dr. D. Jorge Francisco González Pérez** y codirigida por el **Dr. D. José Manuel Molina Caballero** y el **Dr. D. Francisco Rodríguez Guisado.**

El Director, El Codirector, El Codirector, El Doctorando,

Jorge F. González Pérez. José M. Molina Caballero. Francisco Rodríguez Guisado. Julia N. Hernández Vega.

Las Palmas de Gran Canaria, a 14 de octubre de 2015.

El Dr. JORGE FRANCISCO GONZÁLEZ PÉREZ, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Patología Animal, Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMA:

Que la presente tesis titulada **“INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR ENTRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y RAZAS OVINAS CANARIAS. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ Y EOSINÓFILOS”** realizada por Dña. Julia Natividad Hernández Vega, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que cumple la normativa y reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor.

Arucas, 9 de octubre de 2015.

Fdo. Jorge F. González Pérez.

El Dr. JOSÉ MANUEL MOLINA CABALLERO, Catedrático adscrito al Departamento de Patología Animal, Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMA:

Que la presente tesis titulada **“INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR ENTRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y RAZAS OVINAS CANARIAS. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ Y EOSINÓFILOS**” realizada por Dña. Julia Natividad Hernández Vega, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que cumple la normativa y reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor.

Aruca, 9 de octubre de 2015.

Fdo. José M. Molina Caballero.

El Dr. FRANCISCO RODRÍGUEZ GUISADO, Catedrático adscrito al Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMA:

Que la presente tesis titulada **“INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR ENTRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y RAZAS OVINAS CANARIAS. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ Y EOSINÓFILOS”** realizada por Dña. Julia Natividad Hernández Vega, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que cumple la normativa y reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor.

Aruca, 9 de octubre de 2015.

Fdo. Francisco Rodríguez Guisado.

1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN MUNDIAL Y NUEVOS RETOS ALIMENTARIOS. GANADERÍA SOSTENIBLE	13
3.2 IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN GANADERA	15
3.2.1 PRODUCCIÓN OVINA EN EL MUNDO	15
3.2.2 PRODUCCIÓN OVINA EN EUROPA	17
3.2.3 PRODUCCIÓN OVINA EN ESPAÑA	19
3.2.4 PRODUCCIÓN OVINA EN CANARIAS	21
3.3 INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN: IMPORTANCIA DEL CONTROL PARASITARIO	24
3.3.1 PRINCIPALES NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE LA ISLA DE GRAN CANARIA: <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> , <i>TELadorsagia circumcincta</i> Y <i>TRICHOSTRONGYLUS SPP.</i>	26
3.3.2 MÉTODOS DE CONTROL DE LOS PARÁSITOS	30
3.3.2.1 Tratamiento selectivo	32
3.3.2.2 Control no químico	36
3.3.2.2.1 Manejo de los pastos	36
3.3.2.2.2 Control biológico	37
3.3.2.2.3 Control a través de la alimentación	38
3.3.2.2.4 Vacunación	39
3.3.2.2.5 Selección genética	42
3.4 RESPUESTA INMUNE A NEMATODOS GASTROINTESTINALES: RESISTENCIA A <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	47
3.4.1. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO L3	54
3.4.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO L4	55
3.4.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO ADULTO	56
4. RESUMEN	61
5. SUMMARY	65
6. MATERIAL Y MÉTODOS	69
6.1 CEPA PARASITARIA	69
6.2 ANÁLISIS SANGUÍNEOS	69
6.3 ANÁLISIS COPROLÓGICOS	70
6.4 MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO DE LOS ANIMALES	70
6.4.1 MUESTRAS DE PARED DE ABOMASO	70
6.4.2 CONTENIDO ABOMASAL	70
6.4.3 MUCUS	70
6.4.4 MUCOSA	71
6.5 OTRAS TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS	71
6.6 ANTÍGENOS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	71
6.7 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)	72
6.8 HISTOLOGÍA	73
6.9 INMUNOHISTOQUÍMICA	74

6.10 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA - WESTERN BLOTTING	75
6.11 PROCESADO DE IMAGEN	77
6.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
7. CAPÍTULOS	
CAPÍTULO I. DIFERENCIAS EN SUSCEPTIBILIDAD EN INFECCIONES NATURALES POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS CANARIOS DE PELO Y CANARIOS	81
1. RESUMEN	81
2. INTRODUCCIÓN	82
3. MATERIAL Y MÉTODOS	84
3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO Y ANIMALES	84
3.2 DATOS CLIMATOLÓGICOS	86
3.3 PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE HECES	88
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
4. RESULTADOS	89
4.1 GRANJA 1	89
4.1.1 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas dentro de estación y de año	89
4.1.2 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas entre años y estaciones	90
4.1.3 Diferencias en los recuentos de huevos dentro de razas	90
4.1.4 Identificación Larvaria	90
4.2 GRANJA 2	91
4.2.1 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas dentro de estación	91
4.2.2 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas y estaciones	92
4.2.3 Diferencias en los recuentos de huevos dentro de razas	92
4.2.4 Identificación Larvaria	92
5. DISCUSIÓN	94
CAPÍTULO II. EL OVINO RESISTENTE CANARIO DE PELO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> CONTROLA ANTES LA CARGA PARASITARIA QUE SU LONGITUD	103
1. RESUMEN	103
2. INTRODUCCIÓN	104
3. MATERIAL Y MÉTODOS	105
3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	105
3.2 MUESTRAS SANGUÍNEAS	105
3.3 ANÁLISIS COPROLÓGICOS	105
3.4 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO	105
3.5 ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS	105
3.6 CULTIVO DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS (ASC)	106
3.7 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)	106
3.8 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA	107
3.9 PROCESADO DE IMAGEN	107
3.10 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	107
3.11 ENSAYO DE MIGRACIÓN LARVARIA (LMIA)	107
3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	108

4. RESULTADOS	110
4.1 PARASITOLOGÍA	110
4.2 HEMATOLOGÍA	110
4.3 INMUNOGLOBULINAS (IgAm e IgGm) EN MUCUS	112
4.4 SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS (ASC)	114
4.5 RESPUESTA INMUNE CELULAR	119
4.6 ENSAYO DE MIGRACIÓN LARVARIA (LMIA)	121
5. DISCUSIÓN	122

CAPÍTULO III. REDUCCIÓN *IN VIVO* DE LINFOCITOS $T\gamma\delta$ EN OVINOS DE LA RAZA RESISTENTE CANARIA DE PELO INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON *HAEMONCHUS CONTORTUS* 133

1. RESUMEN	133
2. INTRODUCCIÓN	134
3. MATERIAL Y MÉTODOS	136
3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	136
3.2 ANTICUERPO CC15 ANTI-WC1	136
3.3 MUESTRAS SANGUÍNEAS	136
3.4 ANÁLISIS COPROLÓGICOS	137
3.5 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO	137
3.6 ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS	137
3.7 CITOMETRÍA	137
3.8 PROCESADO DE LOS RESULTADOS DE LA CITOMETRÍA	138
3.9 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	140
3.10 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)	140
3.11 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA	140
3.12 PROCESADO DE IMAGEN	141
3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	141
4. RESULTADOS	142
4.1 CITOMETRÍA	142
4.2 PARASITOLOGÍA	143
4.3 HEMATOLOGÍA	146
4.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR LOCAL	148
4.5 RESPUESTA INMUNE HUMORAL	151
4.6 REGRESIÓN MÚLTIPLE DE LA VARIABLE LONGITUD EN FUNCIÓN DE LA VARIABLES EOSINÓFILOS DE ABOMASO (EOS AB.) E IgA DE MUCUS ESPECÍFICA DE ANTÍGENO SOMÁTICO ADULTO (IgAmSA)	153
5. DISCUSIÓN	154
5.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LAS POBLACIONES SISTÉMICAS Y LOCALES DE LINFOCITOS $T\gamma\delta/WC1^+$	154
5.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LOS DATOS PARASITOLÓGICOS	155
5.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LOS DATOS HEMATOLÓGICOS	156
5.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LA RESPUESTA INMUNE	157

CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA REDUCCIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA INTERLEUQUINA 5 SOBRE EL PAPEL DE LOS EOSINÓFILOS EN EL CONTROL DE LA FECUNDIDAD DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EN EL OVINO CANARIO DE PELO	163
1. RESUMEN	163
2. INTRODUCCIÓN	165
3. MATERIAL Y MÉTODOS	167
3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	167
3.2 IL-5 RECOMBINANTE OVINA	167
3.3 ENSAYOS EN ANIMALES	167
3.4 MUESTRAS SANGUÍNEAS	168
3.5 ANÁLISIS COPROLÓGICOS	168
3.6 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO	168
3.7 ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS	168
3.8 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)	168
3.9 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA	169
3.10 HISTOLOGÍA	169
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	169
4. RESULTADOS	171
4.1 INMUNOGLOBINA G ANTI-IL5rOv	171
4.2 PARASITOLOGÍA	172
4.3 HEMATOLOGÍA	173
4.4 RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE ANTÍGENOS DEL PARÁSITO	176
4.4.1 Inmunoglobulinas del mucus	176
4.4.2 Electroinmunotransferencia	177
4.5 RESPUESTA INMUNE CELULAR	178
5. DISCUSIÓN	179
5.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS	179
5.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN RELACIÓN CON LOS DATOS PARASITOLÓGICOS	179
5.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN LOS DATOS HEMATOLÓGICOS	181
5.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR	183
8. DISCUSIÓN GENERAL. MECANISMO NOVEDOSO DE RESISTENCIA FRENTE A <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	189
9. CONCLUSIONES	197
10. BIBLIOGRAFÍA	201
11. AGRADECIMIENTOS	241

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico y económico mundial supone una demanda creciente de productos de origen animal. Considerando el impacto medioambiental que produce este sector y la escasez de recursos naturales, la forma más sostenible de alcanzar estos rendimientos es incrementando la productividad por animal más que su número; para lo que es necesario intentar disminuir o evitar aquellos factores que interfieran en la producción. Los nematodos gastrointestinales en los rumiantes suponen una de las principales causas de pérdidas productivas, por lo que mejorar su estado sanitario, aplicando medidas integradas de manejo y control, es la forma más sostenible para eliminar este lastre productivo.

Las resistencias a los antihelmínticos, generadas por su uso indiscriminado, y la demanda de alimentos libres de residuos, ha orientado el control de los nematodos gastrointestinales hacia medidas que limiten su uso, mediante la aplicación de tratamientos selectivos y la cría de animales más resistentes y/o resilientes.

Las razas locales resistentes, seleccionadas naturalmente debido en parte a su capacidad para sobrevivir a estos nematodos gastrointestinales, suponen una fuente de recursos genéticos de inestimable valor y son modelos naturales para el estudio de los mecanismos inmunes protectores para combatir estos parásitos, por ejemplo para la identificación de dianas farmacológicas y de vacunas.

El ovino Canario de Pelo, raza autóctona resistente a *H. contortus* en infecciones experimentales, parece generar una respuesta dirigida al estadio adulto del parásito, en la que los linfocitos $T\gamma\delta^+$, los eosinófilos y la IgA, parecen controlar la fecundidad de los vermes.

2. OBJETIVOS

- **Primero. Comparar la raza ovina Canaria y Canaria de Pelo en infecciones naturales por nematodos gastrointestinales en dos granjas ovinas con diferente localización en la isla de Gran Canaria.**
 - **Objetivos específicos:**
 - Comparar la resistencia en infecciones naturales: Recuento de huevos en heces.
 - Identificar las especies de nematodos gastrointestinales predominantes en cada granja: Influencias estacionales, en particular la temperatura y la pluviosidad.
 - Valorar las consecuencias de estos datos epidemiológicos en los planes de tratamientos profilácticos en la isla de Gran Canaria.

- **Segundo. Comparar la evolución de la infección en las razas ovina Canaria y Canaria de Pelo, tras la inoculación experimental con 20.000 L3 de *Haemonchus contortus* y periodos de sacrificio a 0, 7 y 21 días post-inoculación (dpi).**
 - **Objetivos específicos:**
 - Comparar la resistencia en ambas razas contrastando varias variables parasitológicas: carga parasitaria, longitud y del número de huevos en útero y en heces.
 - Comparar la resiliencia en ambas razas: hematocrito y proteínas plasmáticas.
 - Comparar la respuesta inmune desarrollada en ambas razas:
 - Recuentos de diferentes poblaciones celulares en la pared del abomaso implicadas en la respuesta, tales como los eosinófilos, leucocitos globulares, linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Tγδ⁺, Tγδ/WC1⁺, CD2⁺, CD5⁺, CD45RA⁺, y células CD1⁺ y MHC-II⁺.
 - Expresión de galectinas 11 y galectina 14.
 - Inmunoglobulinas A y G del mucus y del sobrenadante de células secretoras de anticuerpos. Patrón de reconocimiento del antígeno somático adulto de *H. contortus* de la IgA producida en los nódulos linfáticos locales.
 - Cinética de eosinófilos en sangre.
 - Inhibición de la movilidad larvaria del mucus.

Objetivos

- Comparar asociaciones en ambas razas entre las distintas variables parasitológicas, hematológicas e inmunológicas.
- **Tercero. Reducir la población de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$, administrando el anticuerpo CC15 por vía intravenosa y valorar su efecto en infecciones experimentales con 10.000 L3 de *Haemonchus contortus* en ovinos Canario de Pelo. En particular si afecta la longitud y fecundidad de los parásitos.**
 - **Objetivos específicos:**
 - Reducir la población de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ una vez que se han establecido las larvas para verificar su papel en el control de la fecundidad de este parásito en etapas avanzadas de la infección.
 - Comparar el efecto de la administración del anticuerpo CC15 en la resistencia valorando las variables parasitológicas: carga parasitaria, longitud de los vermes, huevos en útero y en heces; y en la resiliencia valorando el hematocrito y las proteínas plasmáticas respecto al grupo control.
 - Comparar el efecto de la administración del anticuerpo CC15 en la respuesta inmune desarrollada a través de:
 - Recuentos de diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta, tanto en sangre periférica como en la mucosa del abomaso. En concreto se analizarán los eosinófilos, mastocitos, leucocitos globulares, $CD4^+$, $CD8^+$, $T\gamma\delta^+$, $T\gamma\delta/WC1^+$, $CD45RA^+$ y $MHC-II^+$ en la mucosa del abomaso y $CD2^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $T\gamma\delta^+$, $T\gamma\delta/WC1^+$, $CD5^+$, $CD45RA^+$ y plasmocitos IgG^+ en sangre periférica.
 - Expresión de galectinas 11 y galectina 14.
 - IgA de mucus e IgG en suero específicas de *H. contortus*, y del patrón de reconocimiento proteico del antígeno somático adulto de *H. contortus* de la IgA del mucus.
 - Comparar asociaciones entre las distintas variables parasitológicas entre sí y entre estas y las variables hematológicas e inmunológicas.
- **Cuarto. Modular el papel de los eosinófilos, a través de la reducción de los niveles de Interleuquina-5 (IL-5), tras la administración subcutánea de IL-5 recombinante ovina**

Objetivos

(rIL-5ov)/QuilA y estudiar su efecto en infecciones experimentales con 10.000 L3 de *Haemonchus contortus* en ovinos Canario de Pelo.

- Generar inmunoglobulinas específicas frente a la Interleuquina 5 tras la inmunización con rIL-5ov que bloqueen su actividad biológica.
- Comparar el efecto de la administración de la rIL-5ov subcutánea en la resistencia, valorando las variables parasitológicas: carga parasitaria, longitud de vermes, huevos en útero y heces; y de la resiliencia valorando la evolución del hematocrito y de las proteínas plasmáticas.
- Comparar el efecto de la administración de la rIL-5ov subcutánea en la respuesta inmune desarrollada a través de:
 - Evolución de los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y leucocitos en sangre periférica.
 - Recuentos de diferentes poblaciones celulares implicadas en la mucosa del abomaso en la respuesta, tales como eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares.
 - IgA del mucus específica de antígeno somático de estadio adulto y de L3 de *H. contortus*. Patrón de reconocimiento del antígeno somático adulto de la IgA del mucus.
- Comparar las asociaciones entre las distintas variables parasitológicas.

Revisión
Bibliográfica

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN MUNDIAL Y NUEVOS RETOS ALIMENTARIOS. GANADERÍA SOSTENIBLE

En el primer semestre de 2015, la población mundial alcanzó los 7.349 millones de personas y se espera que alcance los 9.700 millones en 2050 (**Naciones Unidas, 2015**), lo que supone incrementar la producción de alimentos de 8.400 millones de toneladas anuales a prácticamente 13.500 millones de toneladas para el año 2050 y poder satisfacer, de este modo, las necesidades que demandará la población (**FAO, 2015**). Este crecimiento poblacional, mayoritariamente de países en desarrollo de África y Asia (**FAO 1; Naciones Unidas, 2015**), va aparejado de un crecimiento de los ingresos y cambios en los hábitos alimenticios, traducidos en una mayor demanda de carne, huevos y leche (**FAO, 2013**). Este desarrollo demográfico y económico, supone que se generen presiones por los recursos naturales existentes, agravado por la pobreza, consumos insostenibles, el cambio climático, la escasez de agua, pérdida de la biodiversidad, la deforestación o la degradación de los suelos (**FAO, 2015**). En este sentido, una cuarta parte de la superficie terrestre se utiliza para el pastoreo y un tercio de la tierra cultivable se destina a alimento para el ganado, esto supone que se destinen más recursos a la agricultura animal que a cualquier otra actividad humana (**FAO, 2013**), agravando la competitividad por los recursos (**FAO, 2015**).

Dada la escasez de tierra agrícola, y para evitar más deforestación, el 80% de las producciones que se requerirán en 2050 tendrían que proceder de las tierras destinadas a la producción actualmente (**FAO, 2015**). Con el fin de garantizar una producción intensiva sostenible que garantice ese abastecimiento de alimento partiendo de recursos naturales limitados, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O.) propone 5 principios necesarios que van encaminados a mejorar la productividad e incluso a buscar sinergias entre sectores, a través del uso eficaz de los recursos (**FAO 2**) reduciendo el impacto negativo de esta actividad para proteger, conservar y mejorar los recursos naturales (**FAO 3**), fomentar una agricultura y ganadería de subsistencia “digna” en zonas rurales mejorando la equidad, en cuanto al acceso a recursos y conocimientos, y el bienestar (**FAO 4**); así como en impulsar políticas, tecnologías y prácticas que favorezcan la estabilidad de esa producción agropecuaria ante situaciones sociales y ambientales adversas (**FAO 5**); para lo que será necesario un entorno político-institucional eficaz que favorezcan un equilibrio entre iniciativas públicas y privadas (**FAO 6**).

El sector ganadero, además de consumir recursos (agua, suelo, nutrientes), genera contaminación y gases responsables del efecto invernadero (**FAO, 2015; FAO 7**), por lo que es necesario llevar a cabo esas prácticas que permitan una producción eficaz más sostenible. En consecuencia, los principios de la F.A.O. sugieren favorecer la conservación de la biodiversidad y el establecimiento de una alimentación eficaz, equilibrada y precisa; proteger los recursos mediante la gestión de su uso y de los residuos generados, y controlar de manera integrada la salud de los animales (**FAO, 2015**). La Sanidad Animal es un pilar clave para evitar, por un lado, la propagación de enfermedades entre animales y entre estos y los hombres como consecuencia de la “masificación” (*One World, One Health*) y, por otro, para evitar mermas productivas y económicas que estas producen en el sector (**FAO, 2013**). Todo esto se traduce en incrementar la productividad de cada animal más que incrementar el número de animales.

La selección durante años de aquellos animales altamente productivos se ha hecho en detrimento de aquellas especies locales altamente adaptadas al medio, seleccionados naturalmente por su resistencia a enfermedades y parásitos (**FAO 8**). Estas razas son de gran importancia dada la situación de producción actual dónde se busca la producción sostenible y eficiente, y dónde prima la adaptación a la cambiante situación climática. Según la F.A.O., de las más de 8.200 razas notificadas por los países miembros, más de 2.500 se encuentran en peligro de extinción o ya se han extinguido (**FAO 8**) ya sea por la selección de razas más productivas, la presión demográfica y pérdida de hábitats, como por el cambio climático (**FAO 9**). Esta merma de razas supone, por un lado la pérdida de recursos económicos –subsistencia- para las poblaciones de zonas desfavorecidas y, por otro lado, la pérdida de recursos genéticos de valor incalculable (**FAO, 2010**), no solo a la hora de producir mejoras genéticas en los animales, sino también a la hora de estudiar dianas farmacológicas a enfermedades, que aportarían mejoras en sanidad animal y productividad animal (**FAO, 2010; Piedrafita et al., 2010**).

En 2013, el número de ovinos se estimaba en 1.163 millones de cabezas (**FAOSTAT**). En el año 2006 estaban descritas 1.409 razas, de las que se habían extinguido 180 y se encontraban en peligro de extinción 179 razas (**FAO, 2010**). En el año 2014 había en España 15,4 millones de ovinos (**MAGRAMA, 2014a**). Según el catálogo de razas de ganado (RD 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas y la Orden AAA/251/2012, de 9 de febrero, por el que se modifica anexo I del Real Decreto anterior), en España hay 43 razas ovinas autóctonas, de las que 33 están consideradas en peligro de extinción, por lo que dada la importancia de preservar y/o mantener la diversidad genética, existen programas de conservación -regulados por el mismo RD- de estas

razas en peligro entre las que se encuentran tanto el Ovino Canario (**MAGRAMA 1**) y el Ovino Canario de Pelo (**MAGRAMA 2**).

3.2 IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN GANADERA.

El sector ganadero representa el 40% del P.I.B. agrario y sus productos suministran un tercio de las proteínas consumidas mundialmente (**FAO, 2009**). En 2050 se calcula que será necesario producir 465 millones de toneladas de carne y 1.043 millones de toneladas de leche, lo que supone doblar las producciones de 1999 (**FAO, 2009**). Debido a la mayor demanda de productos de origen animal por este crecimiento demográfico, el sector ganadero está sufriendo un cambio no solo por la tendencia a intensificar sus sistemas de explotación y a los cambios geográficos que sufren las explotaciones a medida que se desarrolla la región, sino también por la tendencia cambiante en la producción, seleccionando razas más productivas, dónde la extensión del sector es mayor en sistemas intensivos de aves y porcinos que en rumiantes (**FAO, 2009; FAO 10**).

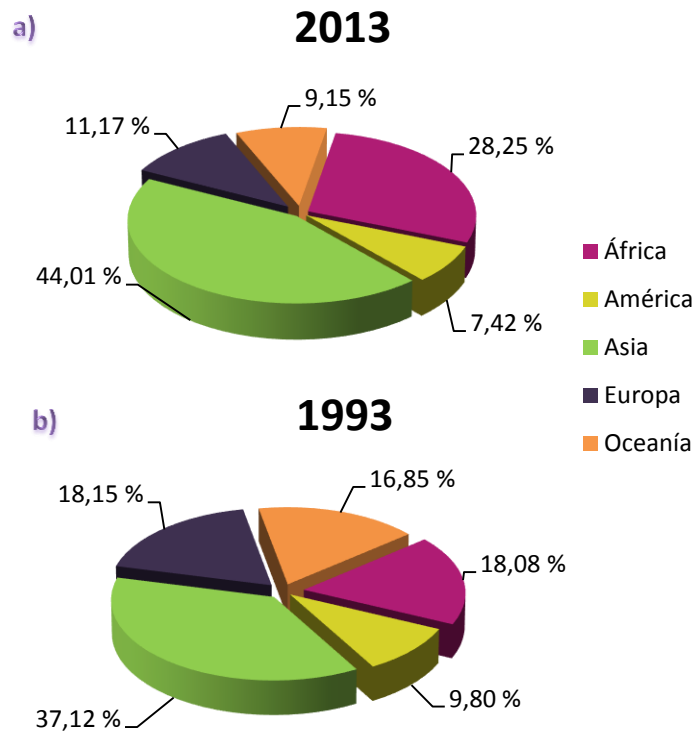
La ganadería de pequeños rumiantes, con mayor distribución en países en desarrollo (**FAO, 2009**), aporta alimento, lana y abono, suponiendo en muchas ocasiones una economía de subsistencia rural, dónde es frecuente la cría de razas locales mejor adaptadas al medio (**FAO 8**) capaces de generar beneficios con un mínimo de inversión al aprovechar gran variedad de vegetales (**FAO, 2010**). Los ovinos y caprinos se pueden criar en cualquier ambiente, sin embargo, las cabras suelen estar más presentes en zonas secas y abruptas, mientras que las ovejas en zonas de clima húmedo y templado (**FAO, 2013**).

Dada la importancia de obtener productos de origen animal para satisfacer la demanda nutritiva de la población, a continuación, se hará un resumen de las producciones ovinas de carne, leche y queso a nivel mundial, europeo y español. Cabe resaltar la importancia de esta especie, pues el consumo de su carne tiene pocas restricciones en las principales religiones del mundo comparada con otros tipos de carnes, como por ejemplo el cerdo (**Contreras, 2007**).

3.2.1 PRODUCCIÓN OVINA EN EL MUNDO

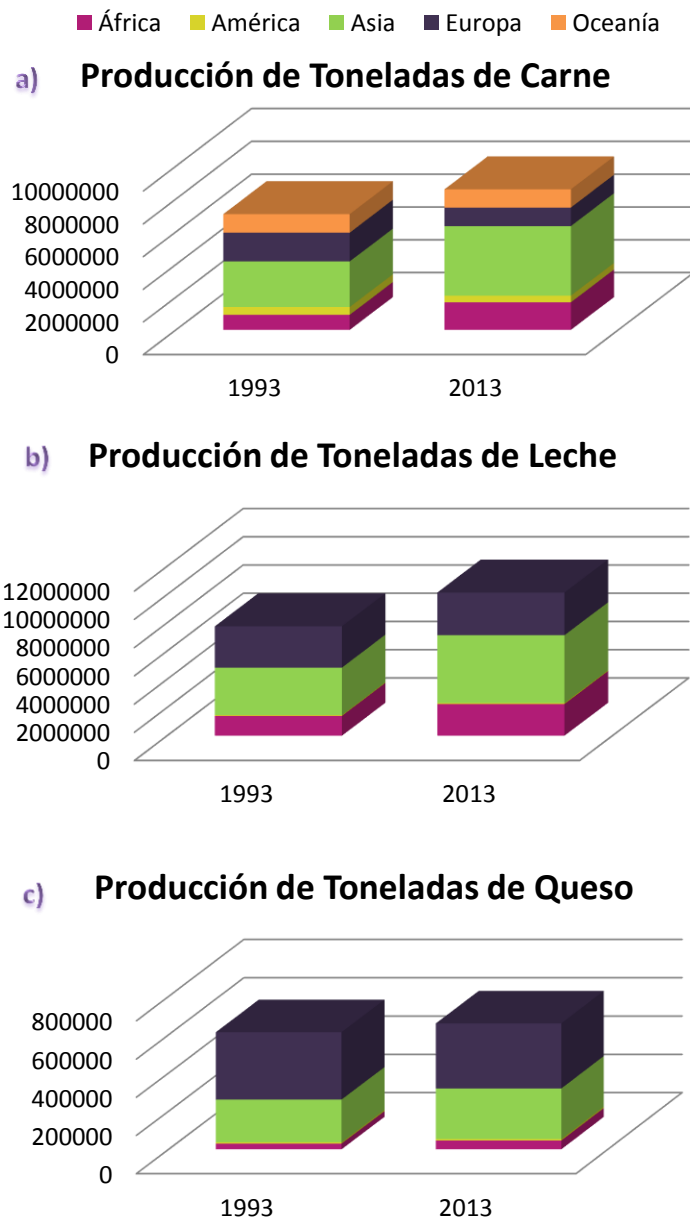
A nivel mundial, en el año 2013, el número de cabezas ovinas se sitúa alrededor de 1.163 millones (**FAOSTAT**) (Figura 3.1a), dónde África y Asia, tienen el mayor número de ovejas, siendo China, Australia e India los países con mayor censo ovino (**FAOSTAT**). En los últimos 20 años la cabaña ovina sigue una tendencia positiva a nivel mundial, observándose un incremento de más de 44 millones de animales con respecto a los 1.118 millones que había en el año 1993 (**FAOSTAT**), con un particular incremento en África y Asia (Figura 3.1a y 3.1b).

Figura 3.1 Datos porcentuales del total de ovinos a nivel mundial que representa cada continente en el año 2013(a) y 1993 (b). Cifras extraídas de FAOSTAT.



En cuanto a los productos obtenidos del ovino a nivel mundial, en 2013 se produjeron casi 8,6 millones de toneladas de carne, 10,1 millones de toneladas de leche fresca de ovino y 0,6 millones de toneladas de queso de ovino (**FAOSTAT**), experimentándose un aumento de las producciones a nivel mundial desde 1993 hasta 2013 con patrón de crecimiento similar al observado en el número de cabezas de animales, siendo el incremento de la producción en toneladas de carne (Figura 3.2a), leche entera fresca (Figura 3.2b) y queso (Figura 3.2c) mayor en África y Asia. En América y Europa el número de cabezas descendió pero se produjeron más toneladas de leche (América-Europa) y queso (América), lo que se traduce en una mejora en la producción de esos animales y una mayor tendencia a la intensificación del sistema de explotación (**FAO, 2009**).

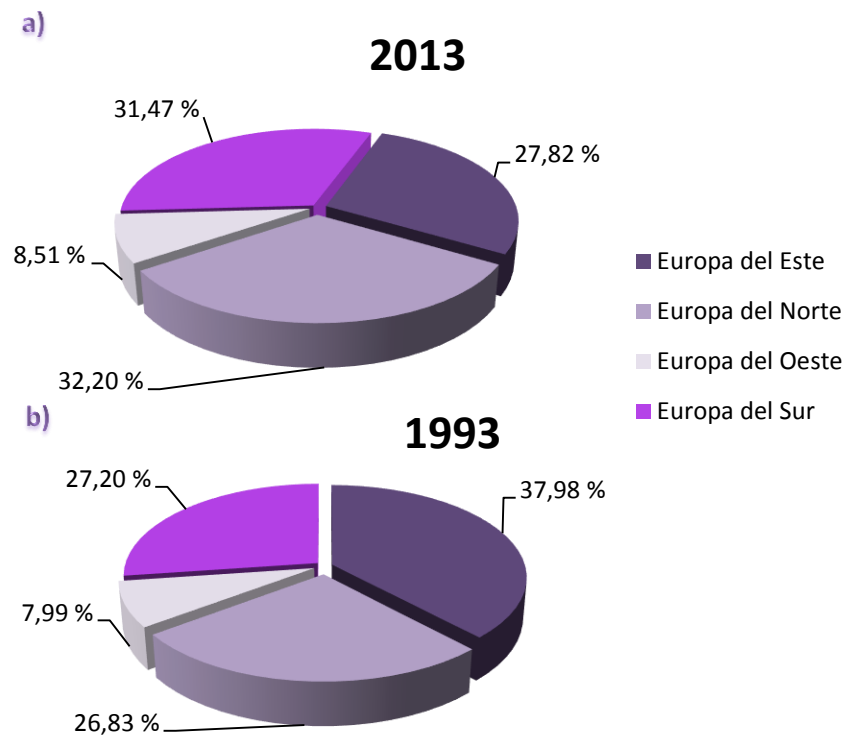
Figura 3.2 Toneladas de carne (a), leche entera fresca (b) y queso (c) ovinos a nivel mundial de cada continente en los años 1993 y 2013. Cifras extraídas de FAOSTAT.



3.2.2 PRODUCCIÓN OVINA EN EUROPA

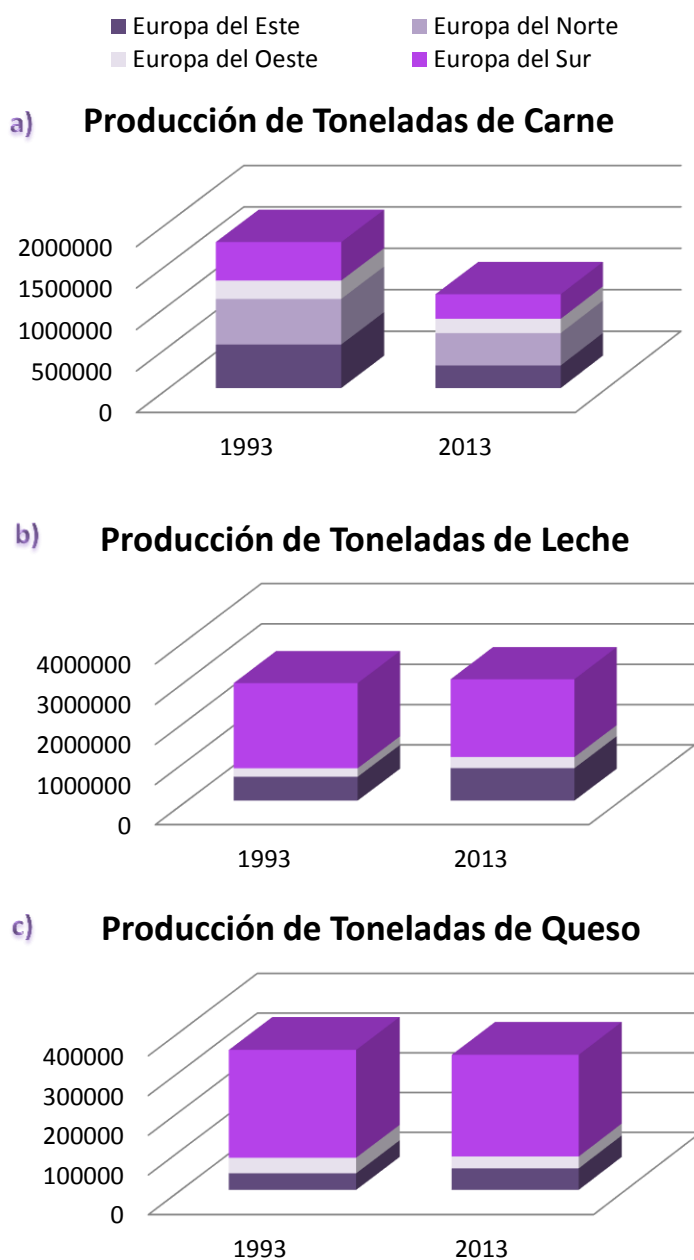
En el año 2013 habían alrededor de 130 millones de ovinos (11,2% mundial), lo que supone un descenso de 73 millones de cabezas con respecto a 1993, año en el que habían casi 203 millones (**FAOSTAT**). Europa del Este es la zona que mayor número de cabezas perdió durante esos 20 años, pasando de 77 millones en 1993 a poco más de 36 millones de cabezas en 2013 (Figura 3.3a y 3.3b) (**FAOSTAT**). Los países con mayor censo en Europa son Turquía (31,1 millones), Reino Unido (23 millones), España (15,4 millones), Rumanía (9,5 millones) y Grecia (9 millones) (**EUROSTAT**, cifras para el año 2014).

Figura 3.3 Datos porcentuales del total de ovinos a nivel europeo que representa cada región en los años 2013 (a) y 1993 (b). Cifras extraídas de FAOSTAT.



En 2013, Europa produjo 1,13 millones de toneladas de carne, poco más de 3 millones de toneladas de leche fresca de oveja y casi 0,34 millones de toneladas de queso de oveja, que representan un 13,2%, 29,8% y 51,6% de la producción mundial respectivamente (**FAOSTAT**). Cabe destacar que si bien los niveles de producción de carne en 2013, descendieron con respecto a 1993 en todas las regiones (Figura 3.4a), a consecuencia, probablemente, de la reducción de los censos; la producción de leche se incrementó un 3,2% (Figura 3.4b), como consecuencia de los incrementos productivos de Europa del Este (26,6%) y de Europa del Oeste (22,7%). Europa del Este, posiblemente a consecuencia de una mayor producción de leche, produjo un 22,9% más de toneladas de quesos, a pesar que la producción total de toneladas de quesos de Europa fue un 3,5% inferior con respecto a 1993. Europa del Norte no presenta producciones de leche fresca o queso.

Figura 3.4 Toneladas de carne (a), leche entera fresca (b) y queso (c) ovinos de cada región a nivel europeo en los años 1993 y 2013. Cifras extraídas de FAOSTAT.



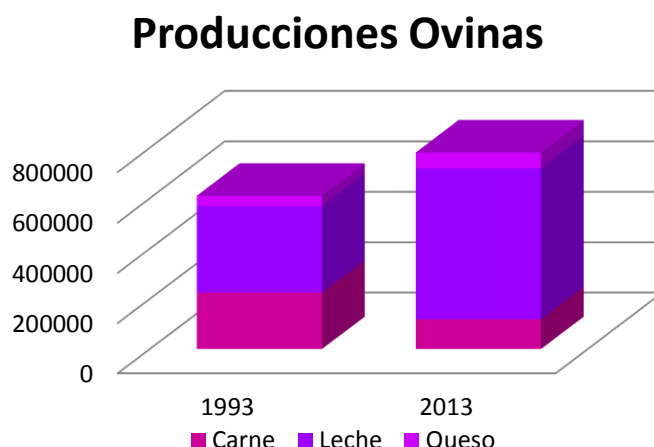
3.2.3 PRODUCCIÓN OVINA EN ESPAÑA

En España la tendencia del sector es la misma que Europa en cuanto a reducir su número de cabezas, pasando de 24,6 millones en 1993 a 16,1 millones en 2013 (**FAOSTAT**), lo que supone una reducción 34,5%. La cabaña ovina de España en 2013, representaba el 1,4% mundial, 12,4% de Europa y el 39,4% de Europa del Sur.

La producción ovina en España en 2013 (Figura 3.5) superó las 118.000 toneladas de carne ovina, 600.000 toneladas de leche fresca ovina y 62.000 toneladas de queso de leche ovina (**FAOSTAT**), lo que supuso una reducción del 47,2% de producción de carne y el incremento en

un 42,6% de leche y un 34,3% de queso con respecto a 1993. Estas cifras corresponden con el 10,5%, 40%, 1,4% de la producción de carne; 19,9%, 31%, 5,9% de producción de leche y 18,4%, 24,4% y 9,5% de producción de queso a nivel Europa, Europa del Sur y Mundial respectivamente; ocupando el segundo lugar de la Unión Europea en cuanto a producción (**MAGRAMA 3**).

Figura 3.5 Toneladas de carne, leche entera fresca y queso ovinos producidos en España en los años 1993 y 2013. Cifras extraídas de FAOSTAT.



A pesar de que el consumo per cápita de carne de ovino-caprino descendió alrededor de un 69% entre 2003 y 2013, probablemente por la situación económica actual del país y a cambios en los hábitos de consumo, la producción de carne ovina-caprina consiguió una facturación estimada de casi 790 millones de euros durante 2013 (aunque 93 millones de euros menos con respecto a 2012), representando el 1,7% de la producción final agraria y un 4,9% la producción final ganadera (que en 2012 representaron el 1,9% y 5,5% respectivamente), observándose además un balance positivo de exportaciones/importaciones de carne de ovino de 106,2 millones de euros ese mismo año (**MAGRAMA, 2013**). En 2014, la producción de este tipo de carne (ovino-caprino) representó una cuota del 4,7% del volumen total de carne fresca consumida producida en el país (**MAGRAMA, 2014b**). El consumo de carne ovina-caprina en 2014, siguió la tendencia de años anteriores, descendiendo a 1,78kg/per cápita (**MAGRAMA, 2014b**), frente a 1,82 kg/per cápita en 2013 (**MAGRAMA, 2013**).

Por otro lado, el sector lechero ovino-caprino en 2012, representó el 13% de la producción el sector lechero de España, facturando 715 millones de euros (71 millones de euros más con respecto a 2011) que representa el 25,5% del valor económico de la producción final lechera del país y que suponen un 1,6% del producto final agrario y 4,8% del producto final ganadero (en 2011 representaron el 1,5 y 4,4% respectivamente) (**MAGRAMA, 2013**). La mayor producción lechera a pesar de la reducción del censo, fue debido a la introducción de razas foráneas mejoradas y a la intensificación del sector con estabulación permanente (**MAGRAMA, 2013**),

siendo el principal destino de esta producción la elaboración de queso (**MAGRAMA 3**). El consumo de queso también sufre una tendencia negativa, reduciéndose su consumo de 0,41 kg/per cápita en 2013 a 0,39kg/per cápita en 2014 (**MAGRAMA, 2014b**).

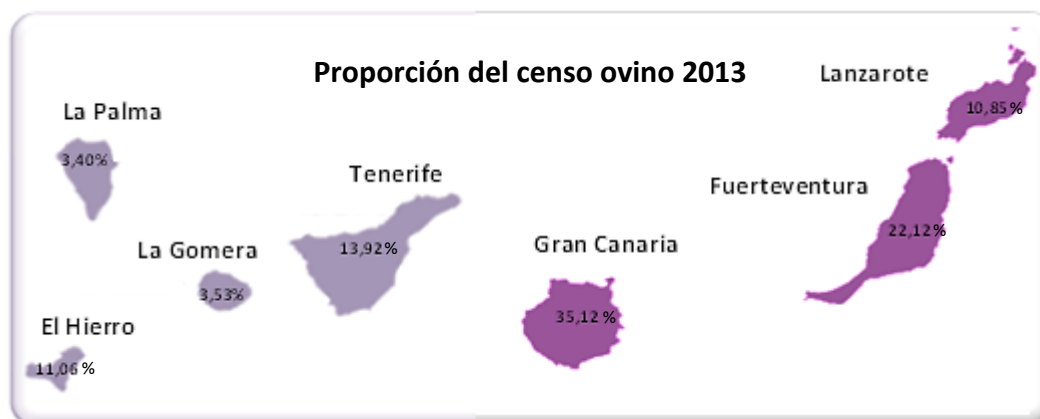
La cabaña ovina española, con unos 15,4 millones de cabezas en 2014, se sitúa en tercer lugar por detrás de Turquía y Reino Unido en Europa en cuanto a número de cabezas (**EUROSTAT**); siendo Castilla y León (~3,07 millones), Extremadura (~3,04 millones), Castilla La Mancha (~2,30 millones), Andalucía (~2,16 millones) y Aragón (~1,81 millones) las principales provincias que mantienen el censo ovino (**MAGRAMA, 2014a**). De las ovejas que integran ese censo, aproximadamente 2,46 millones se cubrieron para la producción de leche y 8,82 millones para la producción de carne (**MAGRAMA, 2014a**), existiendo registradas en enero del 2015, 91.091 explotaciones para la producción de carne frente a 7.901 para la producción de leche y 10.528 para la producción mixta (**MAGRAMA, 2014c**). Este sector se encuentra en zonas desfavorecidas, áridas y secas, explotado razas autóctonas bajo un sistema tradicional en régimen extensivo o semi-extensivo con aporte de alimento en periodos críticos (**MAGRAMA 3**) caracterizado por un alto apoyo económico a través de primas y ayudas, lo cual supuso en el año 2011 más del 64% del volumen facturado (**MAGRAMA 4**).

Aun recibiendo una alta proporción de ayudas, el sector suponen un atractivo para la sociedad, prueba de ello es que si bien el número de cabezas está disminuyendo, el número de explotaciones se está incrementando, existiendo 116.319 explotaciones en 2015, lo que supone un 1,21% más con respecto a 2014 (**MAGRAMA, 2014c**), teniendo el mayor número de explotaciones Galicia (23.441 explotaciones), Andalucía (19.598 explotaciones), Extremadura (15.108) y Castilla y León (11.090) (**MAGRAMA, 2014c**).

3.2.4 PRODUCCIÓN OVINA EN CANARIAS

En 2014, en Canarias había un censo de 82.746 ovinos, que corresponden con el 0,54% del total del país para ese mismo año (**MAGRAMA, 2014a**). El censo ovino en canarias se ha reducido un 33,75% con respecto a 2007, año en el que había 124.907 ovinos registrados (**GobCan 1**), sin embargo, se ha incrementado un 29,28% con respecto a 2013, año en el que había 58.514 ovinos (**GobCan 1**). El censo ovino a fecha de enero de 2015 se encontraba repartido en 1.666 explotaciones ovinas, de las cuales 177 se dedican a producir leche, 542 a producir carne, 900 son de producción mixta y 47 con otras clasificaciones (**MAGRAMA, 2014c**), cubriéndose 30.309 hembras para ordeñar y 36.814 para la producción de carne (**Figura 3.6**) (**MAGRAMA, 2014a**).

Figura 3.6 Representación del total de ovinos de la Comunidad Autónoma Canarias en el año 2013. Cifras extraídas de GobCan 1.



La cabaña ovina en canarias está integrada por las tres razas autóctonas: el ovino Canario, el ovino Canario de Pelo y el ovino Palmero (**GobCan 2**), consideradas de protección especial, pues se encuentran en peligro de extinción (Real Decreto 2129/2008), contando con programas de conservación (**MAGRAMA 1; 2; 5**). De las tres razas, el ovino Palmero es el que tiene mayor riesgo de extinción, ya que se encuentra solamente en la isla de La Palma y su población no sobrepasa los 100 animales, pues se destinaba a la producción de lana y ha sido desplazada por la fibras sintéticas y ovinos lecheros más productivos (**GobCan 2**).

De modo que, debido a las restricciones de movimiento de animales por el estatus sanitario libre de Brucelosis caprina y ovina, las condiciones ambientales/climáticas de las islas y socioeconómicas del sector, por su adaptabilidad y capacidad productiva, la principal raza ovina en las islas - en términos cuantitativos- es la Canaria –aunque el censo ovino Canario de Pelo se está incrementando-; pues la producción principal del sector ovino es la leche para la elaboración del queso, principalmente artesanal (**CabGC**), siendo esta Comunidad Autónoma tradicionalmente una de las que mayor consumo de queso de España, por el contrario, es una de las regiones españolas en las que menos carne de ovino-caprino se consume (**MAGRAMA, 2014b**). Cabe destacar que en la isla de Gran Canaria existe la Denominación de Origen Queso de Flor de Guía y Queso de Guía (Resolución de 15 de abril de 2008, BOE núm. 137, viernes 6 de junio de 2008), lo que le confiere el reconocimiento de distinción y calidad a esos productos locales. Además, de la explotación de ovinos de raza Canaria, también se obtienen beneficios secundarios de la venta de la carne de los corderos y ovejas al final de su vida productiva, y de la lana (**CabGC; MAGRAMA 6**). El sector ovino lechero produjo en el año 2012 en Canarias aproximadamente 3,33 millones de litros de leche, lo que supuso el 0,6% de la producción de leche ovina de España para ese año (**MAGRAMA, 2013**).

El ovino Canario (Orden de 12 de junio de 2006, BOC núm. 119, 21 de junio de 2006) es un ovino de lana que surge del cruce de las ovejas importadas por los colonos y la oveja criada por los aborígenes, que presenta un perfil rectilíneo o sub-convexo y capas de color blanco generalmente, admitiéndose el negro, marrón y sus combinaciones; los machos tienen un peso de unos 60kg y las hembras de 50kg (**GobCan 2; MAGRAMA 6**). Esta raza, explotada en todas las islas en sistemas semi-intensivos y extensivos dónde es frecuente la trashumancia, tiene mayor presencia en la isla de Gran Canaria (**MAGRAMA 6**).

El ovino canario de Pelo (Orden de 13 de agosto de 2001, BOC núm. 117 de 5 de septiembre de 2001) fue criado por los aborígenes y se ha recuperado gracias a la reintroducción en las islas de ovinos de raza Pelibuey a principios de la década de los 80. Este ovino de perfil convexo o sub-convexo se caracteriza por no tener lana, aunque se acepta la lana vestigial del dorso, y porque se destina a la producción de carne, apreciada por su calidad organoléptica y gastronómica diferenciada, y estiércol (**GobCan 2; 3**). El color de su capa va de rojiza clara a oscura, dónde los negros, blancos y pintos son menos frecuentes (**GobCan 2**) y su peso ronda los 70kg en los machos y los 50kg en las hembras (**MAGRAMA 7**). Su producción está vinculada a sistemas producción intensiva de plátanos y tomates, alimentándose de sus subproductos y fertilizando los campos (**MAGRAMA 7**). Esta raza se encuentra distribuida en todas las islas pero especialmente en Tenerife (**MAGRAMA 7**). Ambas razas, dada su rusticidad, capacidad productiva y adaptación a los microclimas de las islas (**GobCan 2; MAGRAMA 6; 7**) suponen un recurso productivo para el sector local.

A pesar de que la aportación del sector agrario a la economía canaria es baja, este sector tiene un papel importante en la conservación del medio ambiente y social canario; y aunque se enfrenta a restricciones de suelo, agua y forrajes, y requiere de gran dedicación y trabajo, su actividad se está incrementando tal y como muestra el censo (**GobCan 3**). Esta ganadería tradicional de tipo familiar dónde permanecen las costumbres y tradiciones en cuanto a manejo y alimentación, se caracteriza por ser explotaciones precarias situadas en pequeños establos e incluso en cuevas de difícil acceso, con un número limitado de animales (menos de 200) -siendo frecuente la explotación con caprino o bovino, ya que la mayoría de los quesos se hacen con mezclas de leches- y dónde el nivel de tecnificación es bajo tanto en el ordeño, como en la elaboración de queso, por lo que se destina mucha mano de obra a pesar del bajo número de animales (**CabGC; GobCan 4**). La alimentación está vinculada a actividades agrícolas y forrajes locales con limitada suplementación a base de concentrados; esta limitación en la alimentación generalmente por su elevado coste, se traduce en niveles productivos bajos (**CabGC; GobCan 4**). Como es tendencia en la España peninsular, el sector recibe subvenciones económicas que

permiten obtener beneficios, sin embargo, para hacer este sector más productivo sería necesario mayor formación del productor en cuanto a manejo y técnicas productiva, así como una mayor inversión en las explotaciones (**GobCan 4**).

Por todo lo dicho anteriormente, es importante preservar estas razas de gran valor genético, capaces de producir en condiciones precarias, y de aportar un sustento económico y un producto diferenciado y de calidad.

3.3 INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN: IMPORTANCIA DEL CONTROL PARASITARIO

El incremento de las producciones de los animales no se conseguirá solo suministrando una alimentación adecuada, invirtiendo en las instalaciones o criando especies altamente productivas, pues esa inversión no se verá reflejado en las producciones si los animales no gozan de un buen estado de salud, ya que las enfermedades suponen mermas productivas (**FAO, 2013**), causando aproximadamente el 20% de pérdidas (**OIE**), y pueden suponer un cierre del comercio exterior.

Los parásitos gastrointestinales ocasionan pérdidas económicas y productivas, pues se caracterizan por producir enfermedades acompañadas de pérdida de peso, alteración de la aptitud reproductiva y el rendimiento de lactancia, retraso en el crecimiento, anemia e incluso muerte (**Piedrafita et al., 2010**) predisponiendo al desarrollo de enfermedades secundarias. Estas pérdidas productivas, principalmente por daños tisulares y pérdidas de proteínas (**Fitzpatrick, 2013**), son difíciles de cuantificar por el curso crónico o subclínico que frecuentemente presentan, suponiendo pérdidas estimadas de 369 millones de dólares australianos en Australia (**Sackett et al., 2006**), 81,8 millones de dólares americanos anuales en Etiopia (**Biffa et al., 2007**), 84 millones de libras anuales en Gran Bretaña (**Nieuwhof y Bishop, 2005**), 103 millones, 26 millones y 46 millones de dólares anuales en India, Kenia y Sudáfrica respectivamente (**Waller y Chandrawathani, 2005**).

El control de los nematodos gastrointestinales se ha realizado tradicionalmente mediante tratamientos antihelmínticos de amplio espectro, cuyo uso indiscriminado y/o erróneo ha generado resistencias a casi todos los fármacos comerciales en todos los continentes (**Van Wyk et al., 1999; Bartley et al., 2003; Černánská et al., 2006; Coles et al., 2006; Álvarez-Sánchez et al., 2006; Cezar et al., 2010; Saeed et al., 2010; Martínez-Valladares et al., 2013a; Lyndal-Murphy et al., 2014; Liébano-Hernández et al., 2015; Van den Brom et al., 2015**). Esta pérdida de la principal defensa contra los parásitos, implica tener que descubrir y/o establecer nuevas medidas de control, como por ejemplo la selección de animales resistentes genéticamente o

vacunas, pues producir nuevos fármacos es extremadamente costoso y poco rentable para las farmacéuticas (**Waller, 1997a**). El cambio climático, los cambios en sistemas de producción, entre otras cosas, provocan movimientos de animales, cambios de usos del suelo, etc. que afecta la dinámica de infección (**Fitzpatrick, 2013**), agravando aún más esta situación.

La selección ovina en países desarrollados se ha hecho en favor de caracteres productivos, que unido al alto uso de antiparasitarios, ha ido en detrimento de la resistencia de los ovinos a parásitos; no obstante en los países en desarrollo, debido principalmente a las limitaciones de recursos, se mantienen razas locales menos productivas pero de alta rusticidad y adaptación al medio, sometidas a la selección natural lo que les ha conferido resistencia a especies parásitas (**Piedrafita et al., 2010**). Algunos ejemplos de estas razas resistentes son la Canaria de Pelo (**González et al., 2008**), Barbados Black Belly (**Aumont et al., 2003; Gruner et al., 2003; Terefe et al., 2007a**), Florida Native (**Radhakrishnan et al., 1972; Amarante et al., 1999**), Gulf Coast Native (**Miller et al., 1998**), Santa Inés (**Amarante et al., 2004**), St-Croix (**Gamble y Zajac, 1992; Burke y Miller, 2004**) o Red Massai (**Mugambi et al., 1996; 1997**). Estas razas son importantes - prueba de ello es el intento de conservarlas y preservar su variabilidad genética por parte de instituciones locales, nacionales e internacionales- pues la identificación y entendimiento del papel de esos genes ligados a la resistencia, así como el estudio del propio mecanismo en sí, podría permitir introducir mejoras genéticas en razas más susceptibles y aportar información sobre nuevas dianas para fármacos y vacunas (**Piedrafita et al., 2010**).

El ovino Canario de Pelo presenta un peculiar mecanismo de control de la fecundidad de *Haemonchus contortus*, en el que parece que la diana es el estadio adulto (**González et al., 2008**) y que están implicados los eosinófilos y los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ (**González et al., 2011a**). El estudio en profundidad de este mecanismo de resistencia, nos aportaría más información y nos abriría puertas para entender la compleja respuesta del sistema inmune a los parásitos gastrointestinales.

De cara a entender los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, a continuación, se hará una revisión que recoge un breve resumen sobre nematodos gastrointestinales ovinos -más frecuentes en la isla de Gran Canaria y con especial énfasis en *Haemonchus contortus*- sus signos clínicos, métodos de control y respuesta inmune.

3.3.1 PRINCIPALES NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE LA ISLA DE GRAN CANARIA: *HAEMONCHUS CONTORTUS*, *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA* Y *TRICHOSTRONGYLUS SPP.*

Los principales nematodos abomasales encontrados en infecciones mixtas naturales en explotaciones caprinas de la isla de Gran Canaria fueron *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* y *Haemonchus contortus* (Molina *et al.*, 1997). Estas son precisamente las especies/género (*Trichostrongylus spp.*) más frecuentes y las principales responsables de pérdidas económicas en el sector ovino en el mundo (O'Connor *et al.*, 2006), teniendo una prevalencia del 100% los animales en pastoreo en algunas regiones de España (Meana y Rojo, 1999). De estos tres géneros pertenecientes a la familia Trichostongylidae, el que mayor importancia tiene por su patogenicidad y distribución es *Haemonchus contortus* (Levine, 1978). Las características de algunos ejemplos de estas especies/género en cuanto a localización en el hospedador, morfología y distribución vienen recogidas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características morfológicas, localización y distribución *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. H: hembras, M: machos.

Genero /Especie	Localización	Longitud adultos (mm)		Características de la "cabeza"		Características del órgano reproductor		Medidas huevos (µm)	Medidas Larva 3 (µm)	Medidas vaina de la cola (µm)	Distribución
		H	M			H	M				
<i>H. contortus</i>	Abomaso	18-30	10-20	*Cabeza de menor de 50 µm de diámetro. *Cavidad bucal con lanceta. *Tres labios poco marcados. *Papilas cervicales espiniformes y prominentes.		*Solapa vulvar. *Ovarios blancos enrollados alrededor de intestino rojo.	*Espículas de 440 µm. *Gubernáculo de 200 µm. *Asimetría lobulo dorsal de la bolsa copuladora.	62-90 x 39-50	650-751	65-82	Áreas tropicales, a latitud 23.82N y 23.89S, que abarca grandes áreas de Asia sudoriental, sur de la India, África central, y norte de América del Sur; y Subtropicales latitudes siguientes a las anteriores y abarcando este de Australia, África del sur, sur de América del Norte, América del Sur y sureste de China. <u>Regiones con lluvias dominantes en verano.</u>
<i>T. circumcincta</i>		10-12	7-9	*Cabeza y cavidad bucal pequeñas. *Papilas cervicales		*Solapa vulvar.	*Espículas 280-330 µm. *Gubernáculo 90 µm. *Bolsa copuladora.	85-103 x 44-58	797-866	30-44	Predominantes en invierno y áreas de lluvias uniformes, con especial predominancia en latitudes superiores a 40º como es Norte Europa, Escandinavia, Norte de Asia, Norte de Norteamérica, Nueva Zelanda.
<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>T. vitrinus</i>	5-8	4-7	*Cabeza pequeña.		—	*Espículas de 149-176 µm *Gubernáculo de 74-96 µm *Bolsa copuladora.	93-118 x 41-52	622-796	18-32	Sudeste de Australia en invierno y primavera.
	<i>T. colubriformis</i>	5-9	4-8				*Espícula derecha 123-154 µm *Espícula izquierda 136-171 µm *Gubernáculo 66-88 µm *Bolsa copuladora.	79-101 x 66-92	674-749		

Fuentes Levine, 1978; Medidas vaina de la cola Van Wyk y Mayhew, 2013; Distribución de O'Connor et al. 2006.

Todos estos nematodos se caracterizan por tener un ciclo biológico directo (Figura 3.7) en el que los huevos, incoloros y con cascara fina, salen con las heces sin embrionar (Meana y Rojo, 1999). El número de huevos dependerá del estado inmune del hospedador y/o su edad, así como de la prolificidad de la especie y la carga parasitaria, produciendo diariamente las hembras de *H. contortus* 5.000-10.000 huevos y *Trichostrongylus spp* o *T. circumcincta* 100-200 huevos (Meana y Rojo, 1999). El estadio larvario 1 (L1) eclosionará del huevo y sufrirá dos mudas hasta L3, siendo este último estadio el infectante y se caracteriza por estar cubierta por una vaina que no es más que la cutícula de la L2 (Levine, 1978). Esta vaina, que le impide alimentarse -la L1 y L2 se alimentan en el medio (Veglia, 1915) – obligándole a subsistir con sus reservas en las células intestinales (Levine, 1978), le confiere protección frente a la desecación (O'Connor et al., 2006). La duración de esta etapa de vida libre es de 5 a 14 días (Meana y Rojo, 1999), dependiendo de la temperatura y la humedad (Tabla 3.2), de modo que a temperaturas óptimas, generalmente más cálidas, se acorta el ciclo y las bajas lo detienen (O'Connor et al., 2006), adaptándose a las condiciones locales dominantes (Stear et al., 2007a). Cuando las condiciones de luz, temperatura y humedad son adecuadas, las L3 migran hasta la hierba desde dónde serán ingeridas, (Veglia, 1915; Soulsby, 1987).

Tabla 3.2 Características de viabilidad a las condiciones climáticas de los estadios de vida libre de *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus colubriformis*.

	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	<i>Trichostrongylus spp.</i> <i>T. colubriformis</i>
Huevo	*No viable por debajo de 10°C., susceptible al frío y desecación.	*Viabilidad entre 0-10 °C. Susceptibilidad baja al frío y desecación.	* No viable por debajo de 5°C. Susceptibilidad intermedia al frío y desecación.
L1 –L2	*Susceptibilidad elevada al frío y desecación.	*Susceptible a la desecación y media al frío.	*Susceptible a la desecación y al frío. Elevada mortalidad por debajo de 5°C.
L3	*Elevada supervivencia en climas cálidos y húmedos. *Baja supervivencia bajo 0°C, en climas fríos o cálidos y secos.	*Elevada supervivencia en climas fríos, húmedos y bajo 0°C. *Baja supervivencia en climas cálidos y secos.	* Elevada supervivencia en climas fríos o cálidos con humedad. * Baja supervivencia bajo 0°C.

Tabla adaptada de la elaborada por O'Connor et al., 2006 denominada "Key differentiating features of environmental influences on the free-living stages of the major trichostrongylid nematode parasites of sheep".

Una vez ingeridas, estas L3 se desenvainan en el rumen (*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. axei*) o abomaso (*Trichostrongylus spp.* intestinales), proceso favorecido por los compuestos no ionizados del tampón bicarbonato-CO₂, CO₂ no dissociado y gaseoso del aparato digestivo del hospedador que estimulan la secreción del "fluido de muda" de la larva (Soulsby, 1987; Lee, 2002). Una vez desenvainadas, estas larvas migran al abomaso en el caso de *H. contortus* y *T. circumcincta* y al intestino delgado en el caso de *T. colubriformis*. Las L3 de *H. contortus* penetran entre las glándulas epiteliales de la zona fúndica del abomaso, *T. circumcincta* penetra en la base

de las glándulas gástricas de la zona antro pilórica y las especies intestinales de *Trichostrongylus spp.* se sitúan entre el epitelio y la membrana basal del primer tercio del intestino delgado dónde mudaran al estadio L4 (Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999).

Durante este periodo puede tener lugar el fenómeno conocido como hipobiosis en el que las larvas quedan latentes deteniendo el desarrollo del ciclo durante varios meses, asociado a factores ambientales (condiciones adversas para los estadios de vida libre), al hospedador (resistencia) o como un mecanismo del parásito para regular su población (Soulsby, 1987). De no ocurrir esto, las L4 emergen a la luz a los 4-5 días en *H. contortus* (Veglia, 1915) y a los 6- 10 días en *T. circumcincta* (Martínez-Valladares, 2006), o quedan embebidos en la mucosa desde los 7 días en *Trichostrongylus spp.* (Soulsby, 1987). Esta L4 mudará al estadio L5 (preadulto), presente en el lumen del órgano y que al madurar sexualmente se convierte en estadio adulto (Veglia, 1915) que cerrará el ciclo al eliminar huevos al exterior con las heces. El periodo pre-patente es de 15-20 días para *H. contortus* y de 17-21 días para *T. circumcincta* y *Trichostrongylus spp.* (Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999).

Figura 3.7 Representación del ciclo biológico directo para *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus spp.* en el ovino.



*Referencia foto gota-larvas: http://www.nature.com/nature/journal/v452/n7184/fig_tab/452157a_F1.html

La acción patógena va a depender de la edad de los animales y de la intensidad de la infección (Meana y Rojo, 1999). *Haemonchus contortus* es considerado el parásito más importante de la oveja, es hematófago desde el estadio L4, produciendo anemia, pérdida de peso, debilidad y edemas frecuentemente visible en la región submandibular como consecuencia de la

hipoproteinemias, produciéndose la muerte en infecciones graves (Levine, 1978). Si bien *T. circumcincta* es histotrofa, también ingiere sangre, pero las cantidades no son tan elevadas (Levine, 1978), y se caracteriza por el daño glandular que produce en el abomaso, causando cambios del pH que ocasionan pérdida de apetito, peso y diarrea; signos similares a los observados en *Trichostrongylus spp.* por los daños que producen los diferentes estadios (Soulsby, 1987).

3.3.2 MÉTODOS DE CONTROL DE LOS PARÁSITOS

Tradicionalmente el tratamiento y control de los nematodos gastrointestinales se ha realizado con fármacos describiéndose resistencia a los principales antiparasitarios de amplio espectro del mercado en ovejas de todo el mundo (Coles *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2009), definiéndose resistencia como la habilidad del parásito a tolerar la dosis terapéutica, favorecida por heterocigosis, velocidad de mutación de los alelos resistentes y la capacidad reproductiva de los parásitos (FAO, 2003). En este sentido, mantener animales dentro del rebaño que no reciban tratamiento, dónde los parásitos sin tratar, conocidos como refugio, permitirán diluir esos genes resistentes en el medio (van Wyk, 2001).

En la década de los 50 se introdujeron en los mercados nuevas clases de antihelmínticos altamente eficaces y seguros (van Wyk *et al.*, 2006) que permitieron el control de los parásitos de una forma fácil por parte del ganadero que desplazó el diagnóstico y el asesoramiento profesional (FAO, 2003). En 1957, se comunicó la primera resistencia de *H. contortus* a la fenotiazina y en 1964, se describió su resistencia al tiabendazol, observándose en años posteriores resistencias cruzadas entre principios activos de un mismo grupo (Soulsby, 1987) reduciéndose rápidamente la efectividad de los fármacos.

A día de hoy, en el mercado hay varios fármacos clasificados principalmente en los siguientes grupos: benzimidazol, imidazotiazoles, tetrahidropirimidinas, lactonas macrocíclicas, derivados amino-acetonitrilo, espiroindoles, salicilanilidas, isoquinolonas u organofosforados (<http://www.wormboss.com.au/tests-tools/management-tools/drench-groups-and-actives.php>). Hay descritas resistencias en numerosas partes del mundo (Waller, 1997a) a muchos de los principios activos que integran estos grupos de productos utilizados en el tratamiento de nematodos gastrointestinales, como por ejemplo al albendazol (Gill, 1996), fenbendazol (Barton *et al.*, 1985), oxfendazol (Borgsteede *et al.*, 1997), levamisol (Barton *et al.*, 1985; Gill, 1996), morantel (Yadav *et al.*, 1993), ivermectina (Vieira *et al.*, 1992), moxidectina (Scheuerle *et al.*, 2009), abamectina (Kaminsky *et al.*, 2011), monepantel (Scott *et al.*, 2013), closantel (Love *et al.*, 1992), rafoxanida (Boersema y Pandey, 1997) y organofosforados (Green

et al., 1981). En España hay descritas resistencias a benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Díez-Baños *et al.*, 2008; Martínez-Valladares *et al.*, 2013a), lo que permite hacerse una idea de la complicada situación que se está generando.

Este contexto se ha agravado con la incapacidad de la industria farmacéutica de producir fármacos en un corto periodo de tiempo, a los que los parásitos no se adapten -resistencia- rápidamente (FAO, 2003). Esta inversión, además resulta poco rentable para las farmacéuticas que prefieren invertir en otras especies domésticas (y en la especie humana) al considerarlos mercados más lucrativos para ellas (Waller, 1997a). Prueba de todo ello es que en 2009 salió al mercado como solución a estas multiresistencias el Monepantel (única molécula del grupo de los amino-acetonitrilo) y pocos años después se publicó el primer caso de resistencias en Nueva Zelanda (Scott *et al.*, 2013), identificándose también recientemente en Europa, concretamente en Países Bajos (Van de Brom *et al.*, 2015). Otro fármaco, lanzado al mercado un año posterior (2010) también en Nueva Zelanda, está formado por la combinación de Derquantel, perteneciente al grupo denominado espiroindoles, y Abamectina, una lactona macrocíclica, las cuales están consideradas el grupo de antihelmínticos con más registros de resistencias, se ha visto que tiene una eficacia dudosa frente a algunos parásitos resistentes, debiéndose de tener en consideración el espectro a la hora de aplicarlo (Kaminsky *et al.*, 2011; George *et al.*, 2012).

Dado el impacto económico que tienen los nematodos gastrointestinales y su tratamiento en el sector ovino y la velocidad con la que los parásitos desarrollan estas resistencias, garantizar y alargar la actividad de los fármacos es absolutamente necesario. El diagnóstico a través de recuentos fecales de huevos mediante McMaster o test de reducción de recuentos fecales de huevos (siglas en inglés *FECRT*) en el campo o, a través de técnicas de laboratorio como el test de eclosión de huevos (siglas en inglés *EHT*), desarrollo (siglas en inglés *LDT*) y/o movilidad larvario (siglas en inglés *LMT*) (Kassai, 1999) permite detectar resistencias dentro de las granjas y no hacer cambios de tratamientos indiscriminadamente (FAO, 2003).

Una buena estrategia, para aumentar la viabilidad de los fármacos, sería implantar un programa de manejo integrado (Walker *et al.*, 1988) a través de la combinación de estrategias de control, tanto químicas como no químicas (Waller, 1997a, 1997b; FAO, 2003; Paul *et al.*, 2010; Kahn y Woodgate, 2012), garantizando una producción más sostenible que reduzca los costes y la presencia de residuos en los productos (FAO, 2003). Para ello es indispensable tanto la implicación de los ganaderos (Kassai, 1999) así como de tecnologías que simplifiquen la recogida y análisis de datos y que aporten información sobre manejo de parásitos (Van Wyk *et al.*, 2006).

Estas medidas químicas estarían enfocadas en el tratamiento selectivo de animales a través del diagnóstico de los más susceptibles y entre las medidas no químicas se incluyen aquellas encaminadas a mejorar la respuesta del hospedador, ya sea mediante la alimentación, selección según resistencia o a través de vacunas, así como medidas de manejo del pasto y control biológico (Waller, 1999).

3.3.2.1 Tratamiento selectivo

Las cargas parasitarias no se encuentran uniformemente distribuidas en la población, siendo una minoría de animales la que presentan las mayores cargas debido a que hay animales más susceptibles y otros más resistentes, resilientes o tolerantes a la infección (Van Wyk *et al.*, 2006; FAO, 2003). En este sentido, el tratamiento selectivo consiste en aplicar tratamiento a aquellos animales en los que la presencia de parásitos produce enfermedad y/o pérdidas productivas considerables en vez de tratar todo el rebaño (Van Wyk *et al.*, 2006), permitiendo que se mantengan poblaciones de parásitos en refugio en el rebaño que disminuyan los niveles de resistencia antihelmíntica que se pudieran generar (Van Wyk, 2001). Para poder realizar este tratamiento selectivo con éxito, es necesario disponer de métodos que permitan identificar adecuadamente a esos animales susceptibles para poder administrar el mejor tratamiento en cada momento, lo que por otro lado también permitirá identificar y seleccionar para la cría a aquellos animales más resistentes (van Wyk *et al.*, 2006; Preston *et al.*, 2014).

Existen varios marcadores asociados con la infección por nematodos gastrointestinales (Tabla 3.3) (Preston *et al.*, 2014), como por ejemplo la presencia de huevos en heces, la anemia que se puede determinar/estimar por el hematocrito (Gray *et al.*, 1987) o por el FAMACHA® (Bath *et al.*, 1996; Van Wyk y Bath, 2002), cambios en el comportamiento animal (Falzon *et al.*, 2013) o la pérdida de peso, estimado mediante el *Happy Factor* (Greer *et al.*, 2009; 2010) o de la condición corporal (van Wyk *et al.*, 2006; Bath y van Wyk, 2009).

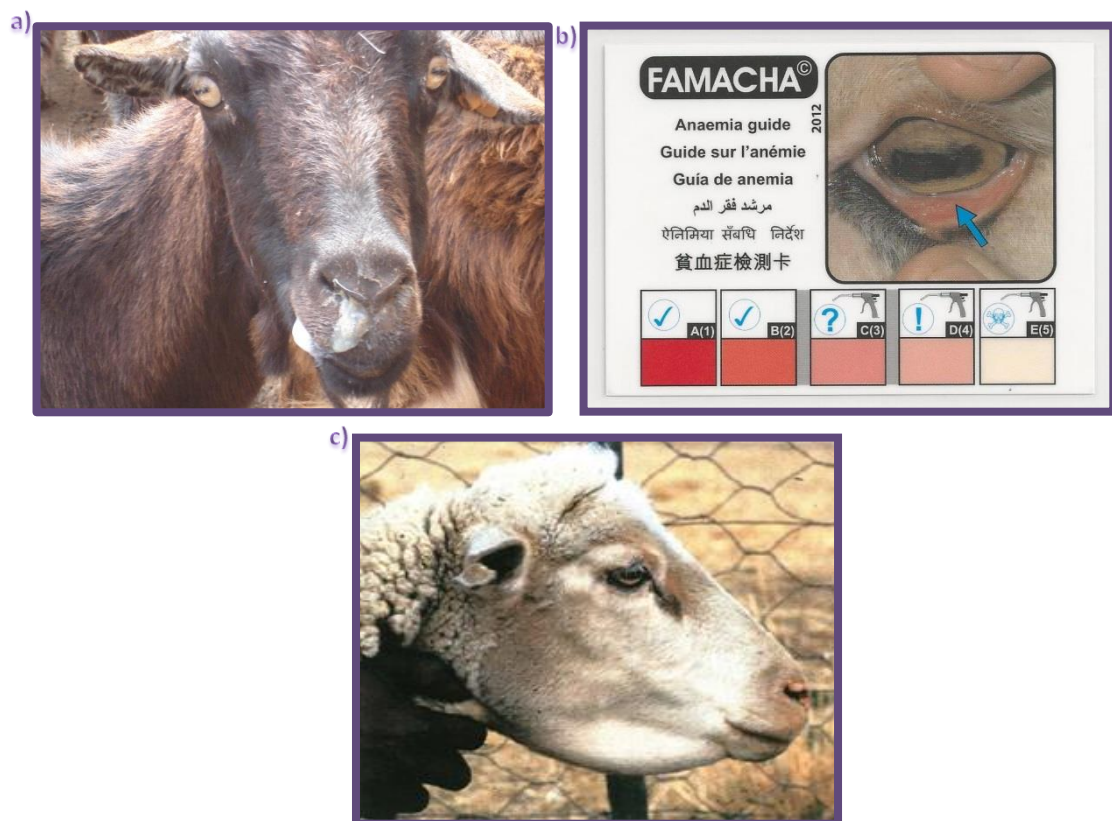
Tabla 3.3 Descripción de algunos marcadores asociados con la infección para el diagnóstico de nematodos gastrointestinales (adaptada de Preston *et al.*, 2014).

	Descripción	Inconvenientes
Recuento de huevos en heces	Permite contabilizar los huevos en heces frescas como indicador de infección de adultos. Medida directa de la infección.	Laborioso en la toma de muestras, costoso y tiene alta variabilidad en los recuentos. No permite identificar la mayoría de las especies de nematodos gastrointestinales, existiendo para ello técnicas rápidas como PCR o uso de lectinas marcadas con fluorescencia.
Hematocrito	Permite valorar la anemia midiendo el porcentaje de células rojas en sangre. Medida directa de la infección.	Invasivo. No es específico ya que otras enfermedades también producen pérdidas de sangre.
FAMACHA®	Permite valorar la anemia a través de comparar el color de la conjuntiva con una escala del 1 (no tratamiento) al 5 (riesgo de muerte). Rápido y no es invasivo.	Subjetivo. No es específico ya que otras enfermedades también producen pérdidas de sangre.
Comportamiento animal	Permite, a través de GPS, identificar indirectamente animales susceptibles, basándose en que estos se movilizan más durante el pastoreo, pues necesitan consumir más, para recuperar la pérdida de proteínas y beber agua.	Requiere de una alta inversión económica en dispositivos GPS.
Happy Factor	Permite calcular la ganancia de peso basado en la tasa de eficiencia de los alimentos. Requiriendo tratamiento aquellos que no alcancen el valor previamente estimado. Medida indirecta.	Requiere de inversión económica en tecnología y pesaje de los animales cada 15 días.
Puntuación de la condición corporal	Permite determinar la pérdida de condición corporal mediante la palpación de diferentes estructuras del dorso del animal. Está basada en una escala del 1 (muy flaca) al 5 (muy gruesa). Medida indirecta.	Subjetivo. No es específico ya que otras enfermedades también producen pérdidas de condición corporal.

Algunos de los marcadores descritos anteriormente son poco prácticos en las granjas, requiriendo del envío de muestras a laboratorios o incluso de inversión económica en tecnología, quedando su aplicación limitada a la investigación (Preston *et al.*, 2014). No obstante, existe un sistema relativamente sencillo que integra varios puntos a chequear en el animal y que puede ser útil para realizar un tratamiento, el *Five Point Check*® (Bath y van Wyk,

2009). Este sistema descrito por **Bath y van Wyk, 2009**, consiste en valorar, siguiendo unas escalas, 5 puntos en el animal como son la nariz (si hay o no secreciones -como indicativo de oestrosis, aunque no es específico) (Figura 3.8a), el color de la conjuntiva del ojo (FAMACHA®- indicativo de parásitos hematófagos como *Haemonchus contortus*) (Figura 3.8b), la mandíbula (si hay o no edema submandibular – que indicaría hipoproteinemia producida por parásitos) (Figura 3.8c), el dorso (estimación de la condición corporal que se afectaría principalmente por *Teladorsagia spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus spp.* y *Oesophagostomum columbianum*) (Tabla 3.4a) y la cola o zona perineal (*dag scores* - puntuar del 0 al 5 en función de la suciedad del perineo y región caudal provocada por diarrea ocasionada por los mismos parásitos que en el punto anterior) (Tabla 3.4b). Sin embargo, dado que ninguno de estos puntos supone un diagnóstico absoluto, pues son signos clínicos observados en varias enfermedades, se debe de tener en consideración también los factores ambientales y epidemiológicos de la granja (**Bath y van Wyk, 2009**).

Figura 3.8 Imagen de caprino con secreción nasal (a), guía de anemia del FAMACHA® (b) e imagen del edema submandibular (c) (Imagen “c” extraída de Bath y van Wyk, 2009).



Revisión Bibliográfica

Tabla 3.4 Puntuación de la condición corporal de la oveja (a) y puntuación del periné (b) (adaptadas de Bath y van Wyk, 2009).

a) PUNTUACIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL DE LA OVEJA					
Apófisis espinosa	Individualmente sentida, aguda, obvia	Forma o líneas suave con ondulaciones profundas	Solo ondulaciones detectables	Solo es detectable con presión firme	No detectable
Apófisis transversa	Los dedos pasan fácilmente por debajo	Bordes redondos y lisos	Bien cubierto, hay que empujar para poder pasar los dedos por debajo	No se siente en absoluto	
Músculo	Muy poco, cóncavo	Cóncavo	No cóncavo, no convexo	Máximamente desarrollado, convexo	
Capa de grasa	No	Muy delgada	Moderada	Gruesa	Muy gruesa, forma hendidura en la zona media








Puntuación	1	2	3	4	5
-------------------	---	---	---	---	---

• En caso de no poder puntuar con esta clasificación, se pueden añadir puntos intermedios, por ejemplo 1.5, 2.5, etc.

b) PUNTUACIÓN COLA/PERINÉ – MANCHA DIARREA		
0	No hay suciedad. No se recomienda tratamiento.	
1	Muy poca suciedad en la cola o en ambos lados. No necesita tratamiento.	
2	Ligera suciedad en el borde de la cola y en cada lado. Por lo general no necesita tratamiento.	
3	Moderada suciedad de la cola y la lana. Formación de costras de heces en la lana. Considerar tratamiento.	
4	Suciedad que se extiende más a los lados en la lana. Formación severa de costras de heces en la lana. Tratamiento recomendado.	
5	Muy severa. Diarrea acuosa extendida por los corvejones. Tratamiento.	

3.3.2.2 Control no químico

El control integrado de parásitos incluye medidas de manejo de pastos y control biológico como medidas de control de los estadios preparásitos; y suplementación nutricional, vacunación y mejora genética como estrategias de control de los estadios parásitos, no siendo estas estrategias excluyentes unas de las otras, es decir, estos métodos se deben de combinar dentro de las posibilidades de cada explotación, adaptándose a las circunstancias locales (**Stear *et al.*, 2007a**).

3.3.2.2.1 Manejo de los pastos

El manejo de pastos es una medida encaminada a reducir el número de larvas infectivas (reduciendo la deposición de huevos, su desarrollo y/o supervivencia larvaria) disminuyendo la exposición del ganado para lo que es un requisito indispensable conocer la epidemiología y ecología de los parásitos en cada zona (**Soulsby, 1987; Stear *et al.*, 2007a**).

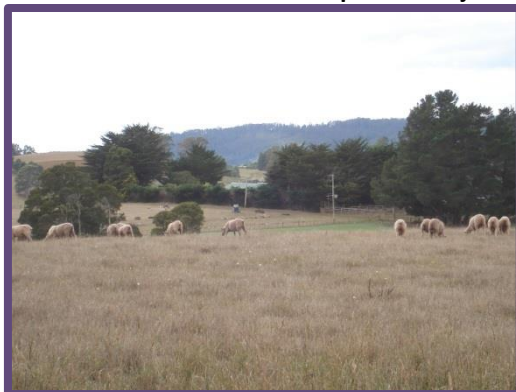
El movimiento de animales más susceptibles a pastos limpios o trasladarlos tras aplicarles un tratamiento antiparasitario, son formas de reducir la exposición y las cargas contaminantes al retirar animales susceptibles en el primer caso y de evitarla en el segundo; aunque en este último caso se estaría fomentando la resistencia antihelmíntica si algún parásito escapa del tratamiento (**Stear *et al.*, 2007a**) al no promoverse el fenómeno de refugio (**van Wyk, 2001**). Otra forma de disminuir la contaminación de los pastos es estabulando a los animales cuando son más susceptibles, es decir hembras en periparto y corderos, alimentándolos con concentrado durante ese periodo, que si bien se incrementa la producción, se encarece mucho el proceso (**FAO, 2003**).

Otra opción es la reducción de las densidades de animales en el pasto, lo que se traduce en menos contaminación de heces y por tanto menos riesgo de infectarse; alternando el uso del pasto con cultivos que favorecerían la muerte de las larvas al no existir contacto con el hospedador; o pastoreando diferentes especies de animales (que no sean cabra-oveja) aprovechando la especificidad de los parásitos, aunque se debe tener en cuenta la capacidad de infectar a varias especies de *T. axei*, *H. contortus* y *H. placei* (**Barger, 1999; Kassai, 1999; Stear *et al.*, 2007a**). Esta última medida, alternando pastoreo de ovejas y bovinos, y en ocasiones tratamientos, ha aportado beneficios en el control de parásitos en regiones de clima templado (**Waller, 1999**).

En la rotación de pastos en sistemas de explotación extensivos, en la que los pastos se dividen en secciones de pastoreo (Figura 3.9), los animales van rotando con el fin de que las larvas acaben muriendo al enfrentarse a las condiciones medioambientales; de modo que esta

estrategia es más viable en climas tropicales y húmedos dónde las larvas son más activas y agotan rápidamente sus reservas energéticas, lo que permite seguir ciclos de rotación más cortos (**Barger, 1999; Kassai, 1999; Waller, 1999; Stear et al., 2007a**). Para garantizar la eficacia de la estrategia, es necesario establecer un tiempo de rotación adecuado que optimice el control parasitario con la productividad del pasto en cada región (**Barger, 1999; FAO, 2003**).

Figura 3.9 Imagen de pastos divididos en secciones dónde pastan ovejas. Tasmania, Australia.



3.3.2.2.2 Control biológico

El control biológico tiene como diana los estadios de vida libre del parásito, sensibles a factores abióticos (temperatura y comida) y bióticos (escarabajos y microartrópodos, lombrices, nematodos predadores, virus, bacterias y hongos) (**Waller, 1997b; Kassai, 1999; Stear et al., 2007a**).

El uso de hongos nematófagos, especialmente los predadores con habilidad para atrapar las larvas en movimiento (**FAO, 2003**), es una opción prometedora, siendo necesario que las esporas de este hongo sobrevivan al tracto gastrointestinal sin ser destruidas y que colonicen las heces (**Larsen et al., 1992; Kassai, 1999**). *Duddingtonia flagrans* es un hongo de distribución mundial ampliamente investigado que cumple esos requisitos y reduce el número de larvas en el pasto al inmovilizarlas con los micelios, disminuyendo por tanto, la intensidad y severidad de la infección (**Kassai, 1999; Waller et al., 2004; Stear et al., 2007a; Torres-Acosta et al., 2012**) y cuyo uso se basa en administrar clamidosporas en la dieta (**Torres-Acosta et al., 2012**). Este hongo ha sido registrado recientemente como BioWorma® (**Knox et al., 2013**).

Otra forma de poner en práctica el control biológico es tan sencilla como retirar las heces del medio para evitar el contacto de las formas infectivas con los hospedadores, o la degradación de las heces para que los estadios libres se expongan a las condiciones medio ambientales y se destruyan las larvas; en este último caso participan activamente los escarabajos, lombrices y las aves que se alimentan de esos invertebrados, siempre que se den las condiciones ambientales

favorables para ellos (**Waller, 1997b**). La degradación de las heces depende de su densidad y distribución en el terreno, de la presencia de animales pastando e incluso del tipo de pasto (**Williams y Warren, 2004; Stear et al., 2007a**). No obstante, las larvas también podrían verse favorecidas al facilitar su salida hacia la hierba (**Vlassoff et al., 2001**) o incluso su enterramiento por parte de los escarabajos, podrían conferirles protección (**Waghorn et al., 2002; Stear et al., 2007a**).

3.3.2.2.3 Control a través de la alimentación

La nutrición es el principal limitante productivo en muchos países en desarrollo, donde el aporte de dieta fibrosa de baja calidad y carente de componentes que promuevan la eficiente actividad de rumen (**Waller, 1997b**), suele asociarse a enfermedades parasitarias que reducen la ingesta y la asimilación del alimento, empeorando la situación. El aporte proteico (**Donaldson, 1997; Waller, 1999**) y de macrominerales como el fósforo (**Paul et al., 2010**) u oligoelementos como el cobre, molibdeno, hierro o zinc (**Koski y Scott, 2003**) producen un efecto beneficioso en la resistencia o resiliencia de los animales, contrarrestando el efecto patógeno de los parásitos (**Knox, 1996; Waller., 1997b**).

El aporte proteico en ovejas preñadas o lactantes, momento en el que su sistema inmune se debilita siendo las hembras más susceptibles, puede ser beneficioso al reducir la excreción de huevos y el establecimiento larvario (**Barger, 1999**). Suplementar con proteínas las dietas basadas en pastos de baja calidad, suponen un incremento de los costes que en los países en vías de desarrollo no pueden asumir (**Waller, 1997b**), sin embargo una fuente de nitrógeno no proteico como la urea, es una forma muy económica de mejorar la funcionalidad del rumen, incrementando la producción de proteína microbiana y favoreciendo la respuesta inmune y productividad del animal (**Waller, 1997b; Kassai, 1999**). La mejora de la respuesta inmune del animal tras suministrar proteínas está descrita en infecciones con *T. colubriformis* (**Kambara et al., 1993**), *H. contortus* y *T. circumcincta* (**Strain y Stear, 2001**).

Otra alternativa que se puede introducir en esta sección es el uso de extractos vegetales con actividad antihelmíntica, muchos de ellos conocidos a partir del acervo popular, como es el caso de *Bromelia pinguin* una planta que posee cierta actividad contra *H. contortus* (**FAO, 2003**). En este sentido ha surgido un nuevo término, plantas nutraceuticas, que **Andlauer y Fürst, 2002** definen como “cualquier sustancia que puede ser considerada comida o parte de comida capaz de proveer beneficios en la salud, incluyendo prevención y tratamiento” (**Hosté et al., 2015**). Esto podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios en las plantas o compuestos bioactivos, siendo el modelo más estudiado, los taninos de las legumbres, que poseen actividad

antihelmíntica, reduciendo el establecimiento y desarrollo de los vermes y de la excreción de huevos (**Hosté et al., 2015**), habiéndose observado un efecto similar con las saponinas y lectinas (**Torres-Acosta et al., 2012**).

3.3.2.2.4 Vacunación

Desde su entrada al tracto gastrointestinal, se establecen relaciones entre los antígenos del parásito, como por ejemplo sustancias de excreción-secreción y antígenos de superficie, etc. con el sistema inmune del animal (**Bautista, 2010**). Con el uso de las vacunas producidas con dichos antígenos, se pretende estimular el sistema inmune del animal para que se genere una respuesta eficaz que evite o disminuya el desarrollo de la enfermedad, reduzca las pérdidas productivas y disminuya la contaminación del campo, aparte de que no deja residuos en los productos animales ni en el medio ambiente.

Estas vacunas, según algunos modelos matemáticos, no tendrían que alcanzar un 100% de eficacia, pues se estima que con eficacias comprendidas entre un 60- 80% ya aportarían beneficios económicos (**Barnes et al., 1995**). Existen tres tipos de vacunas: basadas en vacunas irradiadas (**Bain, 1999**), en inmunidad natural (**Meeusen y Piedrafita, 2003**) y en antígenos ocultos (**Knox et al., 2003; Stear et al., 2007a**).

La primera vacuna frente a enfermedades parasitarias comercializada frente a parásitos se produjo al final de la década de los 50, cuando **Jarrett et al., 1960** observaron que la infección con larvas atenuadas por irradiación de *Dictyocaulus viviparus* confería protección en ganado vacuno, comercializándose desde la década de los 60 bajo el nombre de “Dictol” hasta la actualidad (www.worldchanging.gla.ac.uk/article/?id=12), aunque hoy en día se comercializa con otro nombre, “Bovilis Huskvac™” (http://www.msd-animal-health.ie/Binaries/Huskvac_Tech_Bulletin_tcm102-94084.pdf). Otra vacuna similar también comercializada, es la vacuna de larvas irradiada de *D. filaria* en ovino (**Jovanovic et al., 1965; Waller, 1997b**). A pesar del éxito de estas vacunas frente a vermes broncopulmonares, los intentos de conseguir protecciones similares con larvas irradiadas frente a parásitos gastrointestinales se considera fallido (**Klei, 1997**) puesto que, a pesar de que indujo respuesta en individuos adultos, no produjeron respuesta en los corderos (**Newton y Meeusen, 2003; Smith y Zarlenga, 2006**), posiblemente porque el mecanismo de inmunidad en el sistema gastrointestinal es diferente al del pulmón (**Stear et al., 2007a**). Además, al tener que producir larvas para conseguir la dosis adecuada, hace que la comercialización sea poco factible, siendo aún más difícil con las especies parásitas poco prolíficas (**Newton y Meeusen, 2003**).

Las vacunas de antígenos naturales se basan en el uso de antígenos de superficie o de excreción/secreción que generalmente reconoce el hospedador durante su respuesta inmune, y las vacunas de antígenos ocultos, emplean antígenos que no están en contacto con el hospedador de forma natural y que generalmente proceden del intestino del parásito, siendo generalmente eficaces cuando se trata de parásitos hematófagos como *H. contortus* (**Newton y Meeusen, 2003**). No obstante, los antígenos ocultos requieren de revacunaciones frecuentes para mantener la protección a diferencia de los antígenos naturales, que se benefician de las reinfecciones en el campo (**Knox, 2000**). Si bien, lo ideal de una vacuna es que sea efectiva frente a varios géneros de nematodos gastrointestinales (**Klei, 1997**), a día de hoy solo existen vacunas o prototipos monovalentes (**Smith y Zarlenga, 2006**).

En las últimas décadas, se han identificado numerosos antígenos naturales que podrían ser utilizados para elaborar vacunas (**Smith y Zarlenga, 2006**) especialmente frente *H. contortus*, siendo mucho más limitada la identificación de antígenos que produzcan protección frente a otros nematodos gastrointestinales menos prolíficos (**Newton y Meeusen, 2003**). Sin embargo, el problema surge a la hora de la comercialización, pues estas moléculas tienen que ser seguras y eficaces tanto en animales adultos como en corderos (pues son los más susceptibles), además de fáciles y baratas de producir (**Schallig, 2000**). Los principales obstáculos en la producción surgen a la hora de conseguir la versión recombinante del antígeno con la configuración terciaria adecuada que induzca y mantenga en el tiempo la respuesta inmune, y a la hora de elegir el adyuvante adecuado que incremente la respuesta (**Smith y Zarlenga, 2006**). Un mayor entendimiento de los mecanismos de inmunidad permitiría desarrollar mejores diseños de inmunización (**Newton y Meeusen, 2003**). En 2014 se autorizó la venta en el mercado australiano de la primera vacuna con antígenos nativos frente a *H. contortus* llamada Barbervax® (Tabla 3.5), la cual está indicada, de momento, para conferir protección (75-95%) frente *H. contortus* en los corderos, siendo necesario aplicar 5 inyecciones subcutáneas con intervalos de 3 a 6 semanas (<http://barbervax.com.au/> ; <http://www.wormboss.com.au/news/articles/nonchemical-management/barbervaxa-new-approach-to-barbers-pole-worm-control.php>; **Smith et al., 2015**).

Revisión Bibliográfica

Tabla 3.5 Ejemplos de antígenos estudiados como vacunas frente a nematodos gastrointestinales.

Tipo de antígeno	Especie parásita	Estadio parasitario del que procede	Origen del antígeno	Nombre	Peso Molecular	Recombinante eficaz, (diferencias entre grupos)	Efectividad		Reducción antígeno nativo		Comercializada	Bibliografía
							Adultos	Corderos	HGH	Carga parasitaria		
Natural	<i>H. contortus</i>	Adulto	E/S	ES15 y ES24	15kDa y 24kDa	Si, sin repetibilidad	Si	Si (>6 meses)	32-77%	64-85%	No	Schallig et al. 1994; 1997. Schallig y van Leeuwen, 1997. Vervelde et al. 2001; 2002. Newton y Meeusen, 2003
				DTT eluted fraction	Complejo de proteínas: 32 a 200 kDa	-	-	Si (9 meses)	52%	50%	No	Bakker et al. 2004
				AC-5 cathepsin B-like protease	43kDa	-	-	Si (6 meses)	32%	36%	No	De Vries et al. 2009
		Larvario	Somático	Hc23	23 kDa	Si	-	Si (4-5 meses)	>70%	>67%	No	Fawzi et al. 2014; 2015.
			Superficie	Hc-sL3	70-83kDa	No	-	Si (3 meses/8 meses)	64-69%	45-55%	No	Raleigh y Meeusen, 1996. Jacobs et al. 1999. Newton y Meeusen, 2003. Piedraflita et al. 2012, 2013. Nisbet et al. 2015.
	<i>T. circumcincta</i>	Larvario (L3)	Lisis larva	Antígeno purificado etapa específico de 31kDa	Complejo de proteínas de 31kDa	-	-	Si No	-	-	No	McGillivray et al. 1992. Morton et al. 1995
			Superficie	Antígeno de superficie	-	-	-	Si (5 meses)	-	72%	No	Wedrychowicz et al. 1992
	<i>T. colubriformis</i>	Adulto	E/S	Globin like antigen	17kDa	Si	-	Si (neonatos)	>50% con su forma recombinante		No	Frenkel et al. 1992. Emery et al. 1999. Smith y Zarlanga, 2006.
Oculto	<i>H. contortus</i>	Adulto	Intestino	H11 Integral membrane glycoprotein complex – family of microsomal aminopeptidases	110kDa	Si, para isoforma H11-1.	Si	Si	>90%	>75%	Si, Barbervax®, combinación de estos dos antígenos nativos. http://www.vetvacnet.co.uk/publications/barbervax-first-commercially-available-sub-unit-vaccine-nematode-parasite	Smith et al. 1993; Newton y Munn, 1999; Newton y Meeusen, 2003. Nisbet et al. 2015
				H-gal-GP galactose-containing glycoprotein complex	Complejo de proteínas: cuatro mayores complejos aproximadamente 35, 45, 170 y 230kDa.	No	-	Si (2 a 10 meses)	>80%	>60%		Smith y Smith, 1996. Newton y Munn, 1999. Knox y Smith, 2001. Smith et al. 1994; 1999; 2003. Newton y Meeusen, 2003. Nisbet et al. 2015.
				Cysteine Proteinases-TSBP – thiol-sepharose binding protein component	Complejo de proteínas: banda prominente de 60kDa (no confiere protección ella sola) y por encima de 205kDa. Bandas más débiles entre 35 y 45kDa y 97 y 120kDa.	No	-	Si	77%	47%	No	Knox et al. 1999. Knox y Smith, 2001. Newton y Meeusen, 2003. Nisbet et al. 2015
				p46 y p52	46kDa y 52kDa	No	-	Si	78%	33%	No	Jasmer et al. 1996. Knox y Smith, 2001. Smith et al. 2000. Nisbet et al. 2015.
	<i>T. circumcincta</i>	Adulto	Intestino	Concavalina A binding fraction – Homólogos de H11 y H-gal-GP de <i>H. contortus</i> ; Oc12 y Oc-gal-GP respectivamente	Oc12= ~124kDa Oc-gal-GP = complejo de proteínas de 95 y 120kDa.	-	No	-	No diferencias entre grupos inmunizados y control.		No	Knox y Smith, 2001. Smith et al. 2001.
				Homólogo de TSBP de <i>H. contortus</i>	-	-	-	Si	71%	65%	No	Knox y Smith, 2001.
		Larvario (L4)		Concavalina A binding fraction	Amplio rango: bandas más definidas a 40, 60 y 200kDa.	-	No	No	No hay diferencias entre grupos, no obstante se observó un 29% reducción HGH acumulado en uno de los grupos con respecto al control.		No	Halliday y Smith, 2011.

Dado lo complicado de obtener resultados prometedores con antígenos recombinantes, cabe destacar la vacuna desarrollada por **Nisbet et al., 2013**, que tras tres inmunizaciones en corderos (172-206 días de edad) con un pool de 8 proteínas recombinantes de *T. circumcincta* (*cathepsin F-1* (Tci-CF-1), *astacin-like metalloproteinase-1* (Tci-MEP-1), proteínas con función desconocida de 20kDa (Tci-ES20) y *activation-associated secretory protein-1* (Tci-ASP-1), inmunogeno homólogo al antígeno de *Ancylostoma caninum* de *T. circumcincta* (Tci-SAA-1), *macrophage migration inhibitory factor-1* (Tci-MIF-1), *calcium-dependent apyrase-1* (Tci-APY-1) y un homólogo de TGFβ (Tci-TGH-2)), más el adyuvante Quil A y posterior inoculación múltiple con L3 de *T. circumcincta*, observaron en dos ensayos diferentes, una reducción del 70% y del 58% en la media de producción de huevos acumulada y una reducción del 75% y del 56% de la carga parasitaria con respecto a los grupos control para cada ensayo, sin embargo no se observó diferencias en los grupos de animales más jóvenes. Actualmente, con el fin de optimizar este prometedor prototipo vacunal, se dispone de financiación europea dentro del programa H2020 (*Societal Challenge 2-Food security, sustainable agriculture and forestry, marine and maritime and inland water research and bioeconomy, Call H2020-SFS-2014-2*), denominado **PARAGONE: vaccines for animal parasites (635408)**, con objetivos, entre otros, de identificar las causas de las variaciones en las respuestas entre individuos, las causas de la falta de protección en corderos y optimizar su administración.

Otra vacuna con resultados muy interesantes -en este caso frente a *H. contortus*- es la desarrollada por **Fawzi et al., 2014**, a partir de antígeno denominado Hc23, que es una proteína somática del estadio adulto de dicho parásito. Tras la inmunización de corderos con el antígeno nativo con el adyuvante, hidróxido de aluminio o una preparación inmune moduladora bacteriana, y posterior desafío con 15.000 L3, observaron reducciones superiores al 70% en el recuento de huevos y del 67% de la carga parasitaria, resultados muy esperanzadores. El ensayo de la versión recombinante de dicho antígeno (rHc23) con hidróxido de aluminio y posterior desafío en corderos (**Fawzi et al., 2015**), produjo reducciones superiores al 80% de los recuentos de huevos en heces y de la carga parasitaria.

3.3.2.2.5 Selección genética

Seleccionar animales resistentes supone una alternativa interesante para el control de los nematodos gastrointestinales que aporta una solución sostenible a largo plazo al tratarse de un rasgo heredable (**Bishop y Stear, 2003; Sayers y Sweeney, 2005; Piedrafita et al., 2010 Bishop, 2012**) y al que los parásitos tardarían en adaptarse debido al alto número de genes, y por tanto “dianas”, que participan en la resistencia (**Bishop, 2012**). El recuento de huevos en heces,

habitualmente empleado como indicador de resistencia (**Bishop, 2012**), tiene una heredabilidad entre 0,2 y 0,4 en ovejas, valores similares a los de producción lechera o ratio de crecimiento en bovino (**Kassai, 1999; FAO, 2003; Stear et al., 2007a**). Este valor de heredabilidad está influenciado por la edad y exposición de los animales estudiados, precisión del recuento, el número de muestras (**Stear y Wakelin, 1998**), especie de parásito y raza ovina (**McManus et al., 2014**). Para poder mejorar esta cualidad (resistencia) es necesario que exista variabilidad genética, la cual está descrita entre y dentro de raza (**Vanimisetti et al., 2004a; 2004b; Stear et al., 2007a; Piedrafita et al., 2010, Bishop, 2012**). No obstante, seleccionar esta característica tiene una opinión controvertida sobre su efecto en productividad, pues algunos autores han observado efecto negativo en las producciones y otros en cambio no han observado ese efecto (**Piedrafita et al., 2010**). En este sentido, existe otro rasgo a la hora de seleccionar a los animales, conocido como resiliencia, que viene definido como la capacidad de mantener la salud y las producciones durante la infección (**Bisset y Morris, 1996**). Pese a que se puede estimar a través del ratio de crecimiento, anemia, *dag score* y frecuencia de tratamiento, este rasgo presenta una baja heredabilidad y no reduce la contaminación del campo (**Bisset y Morris, 1996**). A pesar de que se ha conseguido reducir exitosamente los tratamientos e incrementar el ratio de crecimiento seleccionando animales resilientes, resulta complejo ponerlo en práctica y no mejora la resistencia (**Bishop, 2012**), por lo que no se reduce la transmisión de la infección a otros animales. De todos modos, disociar entre resistencia y resiliencia como criterio de selección es, cuanto menos, controvertido puesto que, generalmente, son parámetros que se vinculan entre sí (**Stear, comunicación personal**).

La selección mediante el recuento de huevos está ampliamente extendida y se ha conseguido establecer resistencia genética en los rebaños (**Sayers y Sweeney, 2005; Piedrafita et al., 2010**) al incluir este rasgo en los programas de cría (**Stear y Wakelin, 1998**). Una manera sencilla de mejorar la resistencia del rebaño sería eliminar como reproductores a los animales con mayores recuentos o más susceptibles (**Kassai, 1999**) o haciendo cruces con razas resistentes.

Tal y como se describió al inicio de esta revisión bibliográfica, la FAO fomenta la conservación de las razas locales, principalmente de zonas tropicales y subtropicales, que por su adaptación a las condiciones medioambientales, han sido seleccionadas de forma natural por su resistencia a los nematodos gastrointestinales, suponiendo una fuente de recursos genéticos. Estas razas se suelen “despreciar” por asociarse a baja productividad debido, probablemente, a las pobres condiciones en las que se crían, con escasos aportes nutricionales y/o médicos, pues al compararlas dentro de su entorno con razas más productivas, las razas locales consiguen mayores producciones (**Piedrafita et al., 2010**). El cruce de estas razas resistentes con razas más

productivas podría aportar mejoras en sus descendencias, sin embargo, esta teoría junto con la explotación de estas razas en ambientes diferentes esta poco estudiada, requiriéndose una mayor investigación (**Piedrafita et al., 2010**).

El grado de resistencia conseguido tras el cruce de razas susceptibles y resistentes depende de la raza, edad y de si la infección es natural o artificial (**McManus et al., 2014**) y su utilidad con fines productivos puede ser controvertida. Ejemplos de cruces entre razas, es el cruce de ovinos de la raza Suffolk (susceptible) con Gulf Coast Native (resistente) del que se obtuvo corderos con mejoría en resistencia a *H. contortus* pero con mermas en los rendimientos productivos (**Li et al., 2001**). No obstante, en áreas donde la alta prevalencia parasitaria causa importantes pérdidas, este cruce podría suponer una alternativa (**Li et al., 2001**). Tras el cruce de machos de la raza Rhön (susceptible) con hembras de Merinoland (resistente) los corderos presentan una mejoría en resistencia a *H. contortus* sin efecto negativo en la productividad (**Hielscher et al., 2006**). La descendencia del cruce Suffolk, Ile de France, Texel y Dorper con Santa Inés (resistente) tuvo una resistencia similar a Santa Inés, manteniendo también las producciones (**Amarante et al., 2009**).

Por otro lado, para poder seleccionar a los individuos más resistentes es necesario, obviamente, identificarlos, mediante marcadores relacionados con la infección (citados anteriormente en el apartado 3.3.2.1) o inmunológicos (**Preston et al., 2014**) como por ejemplo: la eosinofilia en sangre periférica (altos recuentos de eosinófilos asociados a resistencia), inmunoglobulinas (IgG₁ e IgA) específica en suero, heces y en saliva (niveles altos asociado a resistencia- ejemplo comercial: el test para detectar IgA en saliva específica del carbohidrato larvario de 35kDa CarLA (**Harrison et al 2003; 2008; <http://www.carlasalivatest.com/>**) o los niveles de la hormona *Ghrelin* (hormona reguladora de la saciedad) (**Preston et al., 2014**). Sin embargo, estos marcadores implican permitir el desarrollo de la infección en los animales con su correspondiente impacto en el rendimiento de la explotación (**Kassai, 1999**). Poder identificar a través de marcadores innatos o genéticos, como los genes asociados a caracteres cuantitativos (*Quantitative trait loci* – QTL) o al polimorfismo de un único nucleótido de secuencias de ADN entre cromosomas homólogos (*Single nucleotide polymorphism* SNP) (**McManus et al., 2014**), que permitan identificar a los animales resistentes independientemente del desarrollo de la infección es lo ideal, pues estos marcadores genéticos pueden predecir el estatus de resistencia del animal (**Sayers y Sweeney, 2005**).

Se han propuesto varios marcadores de resistencia con este propósito, tales como el tipo de sangre (hemoglobina), genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y genes del

interferón gamma (IFN- γ) (Preston *et al.*, 2014). En relación al tipo de hemoglobina, algunos autores sugieren que animales que tienen hemoglobina (Hb) con alelos AA son más resistentes en infecciones con *H. contortus* y *T. circumcincta* que los que presentan HbAB y HbBB (Altaif y Dargie, 1978; Tizard, 2009), sin embargo, otros no apoyan esta asociación (Kassai *et al.*, 1990; Gray, 1997).

El complejo mayor de histocompatibilidad se corresponde con receptores presentadores de antígenos, MHC clase I (MHC-I) presente en casi todas las células nucleadas y MHC clase II (MHC-II) que se localizan en las células presentadoras de antígenos (Tizard, 2009). El MHC-II es el que más se ha asociado a resistencia a nematodos (Lee *et al.*, 2011), encontrándose alelos específicos asociados a esta resistencia (Stear *et al.*, 2007b). La variación dentro de este complejo, localizado en el cromosoma 20, determina resistencia o susceptibilidad (Lee *et al.*, 2011). El MHC-II está codificado por dos genes, sin embargo se ha prestado mayor atención al HLA-DR que es más polimórfico y representativo que HLA-DQ, por su elevada expresión en las células presentadoras de antígeno (Preston *et al.*, 2014). En este sentido se han realizado numerosos estudios que relacionan el alelo DRB1 del MHC-II con resistencia en diferentes razas de ovejas (Lee *et al.*, 2011; Hayward, 2013), como por ejemplo frente a *T. circumcincta* en ovinos Scottish Blackface (Schwaiger *et al.*, 1995). Otros estudios han encontrado esta asociación con la región Ovar-DYA del MHC clase IIb para *H. contortus* y *T. circumcincta* (Lee *et al.*, 2011). Con el uso de chip de ADN (*DNA microarray*) o PCR se ha observado en numerosos estudios esta asociación con la expresión varios genes, por ejemplo el DQB1, DRA y DQA1 del MHC-II, en los animales resistentes a nematodos gastrointestinales (Lee *et al.*, 2011).

Otro de estos marcadores genéticos es el IFN- γ , pues se ha descrito que el polimorfismo en un alelo en un locus microsatélite situado en el primer intrón del gen de IFN- γ (localizado en el cromosoma 3) ha sido asociado con resistencia a la infección de *T. circumcincta* en ovejas Soay al reducir su expresión o afinidad del receptor de IFN- γ , pues su expresión, ligada a una respuesta inmune tipo Th1, resulta beneficiosa para el nematodo gastrointestinal (Coltman *et al.*, 2001; Hayward, 2013). También se ha observado esta asociación en ovinos Texel, Romney y Merino (Sayers y Sweeney, 2005).

Sin embargo, la resistencia a parásitos es un rasgo poligenético producido por muchos genes que tienen un efecto pequeño (Crawford *et al.*, 2006), por lo que resulta difícil seleccionar resistencia identificando un único gen. Los estudios QTL podrían estar limitados por su sesgo en la varianza genética y se limitan a relativamente pocos locus y son difíciles de replicar (Hayward, 2013). La combinación de mapeo de genes y genes candidatos junto con los avances en

genómica comparativa ayudarán a detectar mejor los cambios genéticos relacionados con la resistencia (**Dominik, 2005**)

Los avances tecnológicos, han permitido desarrollar otros marcadores que abarcan más ampliamente el genoma (del inglés *Genome-wide association studies GWAS*) (**Hayward, 2013**). SNPs, cuyo uso está ampliamente extendido, aportan información de regiones que codifican o no proteínas (inclusive regiones reguladoras), tienen un bajo coste y se dispone actualmente de catálogos de variación dentro de especies, existiendo para caracteres productivos en ovinos los chips OvineSNP50 o OvineSNP700 *genotyping BeadChip* (Illumina®) que permiten caracterizar simultáneamente más de 50.000 SNPs (**McManus et al., 2014; Preston et al. 2014**). **Kemper et al., 2011** estudiaron la posibilidad de usar el chip OvineSNP50 *genotyping BeadChip* (Illumina®) como marcador genético del recuento de huevos en ovinos infectados con *T. colubriformis* y *H. contortus*, obteniendo un promedio de 0.40% y 0.08% de la varianza fenotípica de los recuentos respectivamente, considerándolo un resultado consistente. **McRae et al., 2014**, estudiaron a través del mismo chip la asociación de los SNP con resistencia o susceptibilidad en ovinos de raza Romney y Perendale infectados naturalmente (con predominio de las especies *T. colubriformis* y *T. circumcincta*), en los que identificaron 14 nuevas regiones asociadas con resistencia y susceptibilidad.

Otro marcador innato propuesto por **Preston et al., 2014** es la reacción cutánea de hipersensibilidad. **Preston, 2013**, basándose en que la medida de la reacción de hipersensibilidad cutánea se usa como diagnóstico de algunas enfermedades y de que esta característica ha mostrado ser heredable, estudió la reacción de hipersensibilidad cutánea tras la inoculación cutánea de L3 desenvainadas de *H. contortus*, con el fin de encontrar asociación entre la medida de esta reacción y resistencia al parásito en ovinos con valor de cría para recuento de huevos en heces conocido, pues en una experiencia anterior observó asociaciones entre esta reacción de hipersensibilidad cutánea y parámetros parasitológicos, prediciendo la protección inducida por la vacunación con antígeno HcsL3. Sin embargo, no observaron asociaciones entre las reacciones de hipersensibilidad y la resistencia a nematodos gastrointestinales, quizás por la diversidad de mecanismos de inmunidad que la oveja podría desarrollar. Se precisan más estudios para validar este método, que aportaría información, relativamente fácil de recabar y monitorizar, sobre la respuesta inmune (**Preston et al., 2014**).

3.4 RESPUESTA INMUNE A NEMATODOS GASTROINTESTINALES: RESISTENCIA A *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Conocer en detalle la compleja respuesta inmune frente a los nematodos gastrointestinales, sería una información muy útil para poder desarrollar nuevos fármacos o vacunas (FAO, 2003; Piedrafita *et al.*, 2010). Esta respuesta comprende la interacción de componentes específicos e inespecíficos del sistema inmune (Miller, 1984; Bautista, 2010), teniendo importancia tanto la respuesta inmune innata como la adquirida (Bautista, 2010). A la inmunidad innata se le reconoce un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida, regido por la activación inicial de este sistema (de Veer *et al.*, 2007).

Los nematodos gastrointestinales se han adaptado al hospedador y son capaces de evitar su respuesta inmune sobreviviendo y desarrollándose, estableciendo un equilibrio al producir generalmente enfermedades subclínicas y crónicas, causando enfermedad grave cuando la carga parasitaria/dosis infectiva es muy elevada o la interacción parásito-hospedador está descompensada, dependiendo esto último de factores ambientales, del hospedador (Tabla 3.6) y del parásito (Salinas, 2007; Tizard, 2009; Bautista, 2010).

Tabla 3.6 Factores dependientes del hospedador.

Factor	Descripción	Referencias
Genético	Esta descrita la variación en resistencia entre razas y dentro de razas.	Saddiqi <i>et al.</i> , 2011. Vanimisetti <i>et al.</i> , 2004a, 2004b. Stear <i>et al.</i> , 2007a. Piedrafita <i>et al.</i> , 2010. Bishop, 2012.
Edad	Individuos jóvenes son más susceptibles. Asociado a factores hormonales y deficiencia de la respuesta inmune celular.	Kassai, 1999. Salinas, 2007. Tizard, 2009. Bautista, 2010. Saddiqi <i>et al.</i> , 2011.
Sexo – Estado reproductivo	Machos más susceptibles que las hembras. Causa aún en estudio, se ha asociado a interacciones inmuno-endocrinas y altos niveles de testosterona que producen inmunosupresión o que alteran el comportamiento y los genes influenciando en la susceptibilidad y resistencia. Las hembras en peripartos son más susceptibles. Se desconoce el motivo aunque se asocia a hormonas como la prolactina.	Soulsby, 1987. Fleming, 1993. Klein, 2004. Saddiqi <i>et al.</i> , 2011. Hayward, 2013.
Nutricional	Las dietas deficientes producen una respuesta inmune deficiente, agravando la situación los efectos patógenos de los parásitos. Se ha observado que la suplementación nutricional incrementa la resistencia/resiliencia de los animales.	Knox, 1996. Waller, 1997b. Kassai, 1999. Strain y Stear, 2001. Saddiqi <i>et al.</i> , 2011.

Cuando un parásito penetra en el organismo, se produce una respuesta inmune innata o inespecífica, constituida por células y moléculas (Tabla 3.7) de activación rápida presentes previamente en el organismo y que no generan memoria inmunológica, cuyo objetivo es eliminar rápidamente al patógeno y reparar los tejidos (Cutuli, 2007). La respuesta inmune adaptativa se hace efectiva tras varios días, pues se requiere del reconocimiento antigénico y la diferenciación y activación de los linfocitos T y B (González, 2007).

En la respuesta inmune también participan proteínas (citoquinas) liberadas por las células que les permite comunicarse y coordinarse durante la respuesta, las cuales actúan a dosis bajas tras unirse a receptores específicos en las células diana, y entre ellas encontramos las interleuquinas que regulan las relaciones entre los leucocitos; las quimioquinas que actúan sobre la circulación y migración de los leucocitos participando en la inflamación; los interferones, los factores de necrosis tumoral y los factores de crecimiento (García, 2007).

Tabla 3.7 Principales componentes de la respuesta inmune innata (Cutuli, 2007).

	Tipo	Integrantes	Mecanismo
Externos	Barreras físicas	Piel y superficies mucosas.	Impiden la entrada a través de la integridad de estas estructuras, tos, estornudo, el peristaltismo intestinal y el mucus.
	Barreras químicas	Ph, mucus, sustancias antimicrobianas, enzimas.	Actúan inhibiendo el desarrollo o alterando las estructuras del parásito.
	Barreras biológicas	Microbiota autóctona.	Establece competencia con los agentes patógenos.
Internos	Factores solubles	Sistema del complemento, mediadores de la inflamación y citoquinas.	Favorecen inflamación y atracción y/o activación celular.
	Células	Macrófagos, Neutrófilos, <i>Natural killer</i> .	Fagocitosis. Presentación de antígenos, acción efectora sobre patógenos. Liberación de citoquinas.

Una vez el parásito alcanza el abomaso se enfrentan al bajo pH, el cual tolera por su cutícula, y al mucus, al que se liberan sustancias mediadoras de la respuesta o con actividad antimicrobiana que facilitan la respuesta inflamatoria (de Veer *et al.*, 2007). Al mucus del tracto gastrointestinal se liberan lectinas, como la galectina-11 producida por las células epiteliales y

presente en el mucus 3 días después de la infección (**Dunphy et al., 2000**) o la galectina-14 producida y liberada por los eosinófilos durante su activación (**Young et al., 2009**). Estas galectinas se unen a determinados carbohidratos presentes en los parásitos y cambian las propiedades del mucus haciéndolo más viscoso, dificultando la movilidad (**Miller, 1987; Dunphy et al., 2000; de Veer et al., 2007; Young et al., 2009**) y/o alimentación de los vermes. **Preston, 2013**, observó que la galectina-11 se unía a la superficie de la L4 de *H. contortus*, pero no al estadio L3, inhibiendo su crecimiento y desarrollo *in vitro*, observándose unión de esta galectina en la región faríngea interfiriendo en la alimentación (**Preston et al., 2015**).

Una vez superen estas barreras, entran en juego mecanismos innatos internos que tratan de evitar el establecimiento y acción patógena del parásito, comenzando con la activación y fijación del complemento, concretamente la vía alternativa, que conduce a la respuesta inflamatoria, activación de la fagocitosis por neutrófilos/macrófagos y la activación de los linfocitos B para el inicio de la respuesta humoral, en este último caso a través del reconocimiento del producto C3d por parte de receptores como por ejemplo el CD21, CD35 y CD81, aunque también son capaces de reconocer antígenos a través de su receptor de células B (BCR) (**Arjona, 2007; Cutuli, 2007; Gibello, 2007**). Estos componentes de la vía alternativa del complemento se unen a la superficie de los patógenos o moléculas secretadas por los parásitos, favoreciendo la atracción de células fagocitarias como neutrófilos y macrófagos o células efectoras como los eosinófilos y mastocitos (**de Veer et al., 2007; Cutuli, 2007; Salinas, 2007**).

Los linfocitos B que han reconocido un antígeno, pueden actuar como células presentadoras de antígenos, presentándoselo a través de moléculas MHC-II a los linfocitos T para activarlos y activarse a ella misma por coestimulación de su receptor CD40 (se une al CD154) y CD86 (se une al CD28), lo que le permitirá la expresión de moléculas de superficie y receptores que cooperaran en su activación y transformación en célula plasmática productora de inmunoglobulinas (**Arjona, 2007**).

Los macrófagos y neutrófilos vierten mediadores que potencian la inflamación y la reparación tisular (**Cutuli, 2007**). La respuesta desencadenada por los macrófagos va encaminada al tipo Th1 o intracelular que no resulta generalmente efectiva contra los nematodos gastrointestinales, al igual que tampoco están asociados los neutrófilos en la actividad efectora frente a los vermes (**de Veer et al., 2007**).

Cabe resaltar el papel de los linfocitos $\gamma\delta^+$ que son células T con un receptor TCR formado por cadenas γ y δ unido a un grupo de glicoproteínas denominado CD3 necesario para la transducción de señales (**Arjona, 2007**), además en rumiantes se presenta la molécula de

superficie WC1 que podría actuar como receptor durante reconocimiento antigénico (Tizard, 2009). Los linfocitos $T\gamma\delta^+$ principalmente presentes en la piel y mucosas son capaces de reconocer antígenos directamente, regular la respuesta de IgA o bloquear la producción de inmunoglobulinas de los linfocitos B, reconociéndoles función citotóxica y la producción de citoquinas como IFN- γ (Rodríguez, 2007; Tizard, 2009). Por lo que pueden funcionar tanto en respuesta innata como promoviendo la respuesta inmune adaptativa al secretar citoquinas (Cutuli, 2007). Esta población celular se ha visto elevada en diferentes infecciones por nematodos gastrointestinales vinculándose a resistencia (McClure *et al.*, 1992; Balic *et al.*, 2000a; de Marez *et al.*, 2000) aunque su papel es un poco controvertido, pues la reducción de dicha población celular se ha visto que favorece al hospedador al disminuir las cargas parasitarias (McClure *et al.*, 1995). No obstante, González *et al.*, 2011a observaron asociación negativa de esta población celular con la fecundidad de *H. contortus*.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos, 100 veces más potentes que macrófagos y linfocitos B, capaces de activar a los linfocitos T, para ello tiene que atrapar, procesar y presentar el antígeno peptídico a través de moléculas MHC-II y producir citoquinas, estando consideradas nexo de unión entre inmunidad innata y adquirida (Arjona, 2007; Tizard, 2009). Estas células están distribuidas por los tejidos linfoides, conectivos y epitelios, una vez reconocen el antígeno, viajan al nódulo linfático dónde presentarán el antígeno a los linfocitos T (Arjona, 2007). Hay varios receptores que podrían emplear estas células para el reconocimiento en infecciones por nematodos, como los receptores tipo toll (del inglés *toll-like receptor* TLR) -que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos-, receptores de manosa -que reconocen la manosa presente en glucoproteínas y glucolípidos- o receptores de lectinas tipo C -que reconocen carbohidratos- (de Veer *et al.*, 2007).

Los mastocitos se localizan en el tejido conectivo y las mucosas, diferenciándose dos poblaciones con el mismo nombre que su localización, y que difieren en su tamaño, composición de sus gránulos y vida media (Serrano y Úceda, 2007). Los mastocitos de mucosa pueden encontrarse en la lámina propia o en el epitelio; estos últimos reciben el nombre de leucocitos globulares y presentan gránulos más grandes, y se considera como el estadio final efector de esta célula (Balic *et al.*, 2000b). Los gránulos de los mastocitos contienen heparina, histamina, serotonina y proteasas y tras su apropiada estimulación pueden producir citoquinas (como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF y TNF- α) (Tabla 3.8), quimioquinas (como MIP-1 α , RANTES, MCP-1) leucotrienos, factor de activación plaquetario y prostaglandinas, todos ellos producen efectos encaminados a eliminar el parásito, ya sea con la llamada de otras poblaciones celulares como eosinófilos, como por el aumento de las contracciones del músculo liso,

secreción del mucus y de la permeabilidad vascular (**Balic *et al.*, 2000b; Serrano y Úceda, 2007; Tizard, 2009**). Estos mastocitos, a pesar de que la principal vía de activación sea a través de la unión de la IgE a su receptor FcεRI de alta afinidad para dicha inmunoglobulina tras el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (**Balic *et al.*, 2000b**), también se pueden activar por productos de la vía alternativa del complemento o a través del reconocimiento antigénico por TLR (**de Veer *et al.*, 2007; Serrano y Úceda, 2007; Tizard, 2009**). La IL-3 producida por los linfocitos T activados es la responsable de la expansión, generación y supervivencia de los mastocitos (**Macaldowie *et al.*, 1997; Lantz *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2000b**), aunque también es importante la IL-4 que induce la producción de inmunoglobulina E y la IL-10 que favorece su proliferación (**Serrano y Úceda, 2007**).

Revisión Bibliográfica

Tabla 3.8 Características de algunas citoquinas (García, 2007; Tizard, 2009).

Nombre	Siglas	Peso molecular	Producida	Descripción
Interleuquina 1	IL-1	Inicialmente 31kDa pero se fragmenta a 17kDa (péptido activo).	Macrófagos activados, Neutrófilos, células dendríticas, endoteliales, musculares lisas y NK, linfocitos T y B, queratinocitos, astrocitos y fibroblastos.	Mediador pro-inflamatorio. Activación de linfocitos T favoreciendo producción de IL-2 y sus receptores. Estimula los linfocitos Th2.
Interleuquina 2	IL-2	Glucoproteína de 15,4kDa.	Producida por linfocitos T CD4 Th1 y células NK.	Estimula la proliferación clonal y activación de los linfocitos T colaboradores y citotóxicos y células NK.
Interleuquina 3	IL-3	Proteína de 15kDa.	Linfocitos T activados, células NK, eosinófilos y mastocitos.	Estimula crecimiento y maduración de precursores de eosinófilos, neutrófilos y monocitos.
Interleuquina 4	IL-4	Proteína de 15kDa.	Producida por linfocitos T CD4 Th2, mastocitos y basófilos activados.	Estimula crecimiento y diferenciación de células B (induce producción IgE), proliferación de mastocitos y diferenciación de células Th2. Inhibe en macrófagos secreción de IL-1, IL-6 y TNF- α y aumenta expresión MHC-II.
Interleuquina 5	IL-5	Glucoproteínas de 26kDa.	Linfocitos T CD4 Th2 activados, mastocitos y eosinófilos.	Activación y proliferación de eosinófilos. En ratones, se ha asociado a un aumento de proliferación de linfocitos B, síntesis de IgA y producción de IgE mediada por IL-4.
Interleuquina 6	IL-6	Glucoproteínas de 20 a 30kDa.	Macrófagos activados, fibroblastos, células endoteliales, linfocito T y B, mastocitos, queratinocitos, células mesangiales.	Aumenta respuesta a otras citoquinas. Estimula la producción de IL-2 y sus receptores, diferenciación de linfocito T y de linfocito B en célula plasmática. Actúa como cofactor de IL-1 para producir IgM, de IL-5 para IgA y actúa de forma sinérgica con IL-4 para diferenciación Th2.
Interleuquina 9	IL-9	14 kDa.	Linfocitos CD4 Th2	Favorece el crecimiento de linfocitos T colaboradores y mastocitos. Potencia los efectos de la IL-4 en la producción de IgE.
Interleuquina 10	IL-10	Proteína de 18,6kDa.	Principalmente por linfocitos T CD4 Th2. También por los linfocitos T y B, monocitos y mastocitos, células NK, algunas células dendríticas.	Inhiben síntesis por parte de macrófagos y linfocitos Th2 de citoquinas que participan en la inflamación como IL-2, IL-3, TNF- α , IFN- γ o GM-CSF. También estimula a los linfocitos T y B y mastocitos.
Interleuquina 13	IL-13	Glucoproteína de 12,5kDa.	Linfocitos T CD4 Th2, linfocitos citotóxicos, mastocitos y células dendríticas.	Actividad similar a la IL-4.
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF- α	Proteínas de 17kDa.	Macrófagos, mastocitos, linfocitos T y B, células endoteliales, adipocitos y fibroblastos.	Inductor de la inflamación. Activa a los macrófagos para la producción de citoquinas. Desencadena los mecanismos que inducen muerte celular de células tumorales o infectadas por virus.
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	GM-CSF	Proteínas de 14kDa.	Linfocitos T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales.	Regulador de los precursores de los granulocitos y macrófagos. Induce fagocitosis, superóxido y ADCC por los neutrófilos.
Interferón gamma	IFN- γ	Glucoproteína de 17kDa.	Linfocitos Th1 CD4 ⁺ , algunos CD8 ⁺ y por NK.	Mediador de las respuestas inmune mediada por las células. Aumenta producción de IgG _{2a} e inhibe producción IL-4. Estimula producción de IL-2 y sus receptor. Incrementa expresión MHC-I en linfocitos T y MHC-II en células endoteliales, mieloides, dendríticas...

Los eosinófilos son células polimorfonucleares con gránulos que se tiñen con la eosina (incluyen proteínas catiónicas e hidrolasas y al activarse producen gran variedad de quimioquinas, citoquinas y mediadores lipídicos), es una población celular presentes en un alto número en el tracto gastrointestinal, incrementándose su número y focalizándose sobre el parásito tras la infección (**Balic *et al.*, 2000b**). La activación de los eosinófilos se produce a través de la unión a sus receptores de componentes del complemento, de IgG e IgA y receptores de baja afinidad de IgE, aunque la IL-3, IL-5 y GM-CSF (Tabla 3.8), producidas por los mastocitos y linfocitos T promueven su degranulación, multiplicación y supervivencia (**Balic *et al.*, 2000b; Tizard, 2009**). Estas células ocasionan daño a las larvas de los parásitos al degranular su

contenido en la superficie de las mismas, habiéndose observado este efecto en experiencias *in vitro* (en presencia de anticuerpos, complemento e IL-5) e *in vivo* (Rainbird *et al.*, 1998; Meeusen y Balic, 2000; Balic *et al.*, 2006). Estas células pueden incrementar su número en los tejidos tras la infección primaria asociado a la infección larvaria, aunque podrían no ser lo suficientemente eficaces al no poder activarse correctamente por la ausencia de anticuerpos específicos (Balic. *et al.*, 2000b).

El antígeno unido a la molécula MHC-II es reconocido por linfocitos T CD4⁺ (colaboradores), que pueden orientar, mediante la secreción de distintos perfiles de citoquinas, una respuesta tipo Th1, Th2 o Th17. Estas respuestas dependen del tipo y dosis del antígeno, el tipo de célula presentadora y las moléculas coestimuladoras presentes (Gibello, 2007). Estos linfocitos reconocen el complejo antígeno- MHC-II a través del CD4 y TCR, que en este caso está formado por una cadena α y otra β más el CD3 (Arjona, 2007), donde tras la formación del complejo TCR-MHC-II y posterior expresión y activación de moléculas coestimuladoras, como por ejemplo el CD28 (unido al CD86 de linfocitos B o al CD80 de células dendríticas o macrófagos) y el CD154 (ligado al CD40 de la célula presentadora de antígeno), junto con el estímulo de la IL-1 producida por la célula que presenta el antígeno y la IL-2 e IL-4 producidas bajo un mecanismo autocrino por los linfocitos Th vírgenes, se favorecerá la multiplicación, orientación y activación del linfocito, el cual orientará la respuesta a tipo Th2, caracterizada por la producción de las IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Tabla 3.8) (Gibello, 2007; Tizard, 2009) necesarias para la activación de células plasmáticas, producción y cambio del isotipo de inmunoglobulina, de la IgM (producida inicialmente) a IgE, IgG e IgA, y para la activación de la respuesta inmunitaria adquirida de eosinófilos y mastocitos (Balic *et al.*, 2000b; Salinas, 2007).

Respecto a las inmunoglobulinas, la IgG₁ presenta capacidad para neutralizar antígenos solubles y bloquear el poro anal (Bottjer *et al.*, 1985) u oral del parásito al formar inmunocomplejos con los antígenos de excreción/secreción (Salinas, 2007). La IgA está asociada al control de la longitud de los vermes (Stear *et al.*, 1995), aunque se ha visto que bloquea los órganos sexuales alterando la fecundidad (Salinas, 2007). Una vez inmunizado el animal, se crearan linfocitos de memoria, que activarán la respuesta más rápidamente en los sucesivos contactos con el mismo antígeno.

Descrita brevemente la respuesta inmunitaria generada por estos nematodos gastrointestinales, a continuación se hará referencia a los principales mecanismos de resistencia recogidos en la bibliografía, prestando especial énfasis a *H. contortus*. Hay que tener en consideración que a pesar de que *H. contortus*, *T. colubriformis* y *T. circumcincta* comparten

familia taxonómica y tienen morfología similar, inducen una inmunopatología distinta debido a los diferentes nichos y forma de alimentarse que presentan, algunos mecanismos de resistencia desarrollados para una, podría ser inefectivo contra las otras e incluso entre sus diferentes estadios de desarrollo (Balic *et al.*, 2000b). No obstante, estos mecanismos se desarrollan de forma similar para las tres especies. Actualmente hay descritos varias manifestaciones de resistencias contra nematodos gastrointestinales, dirigidos a estadios L3 y L4, y a estadios adultos (Balic *et al.*, 2000b; Preston, 2013; Preston *et al.*, 2015; Nisbet *et al.*, 2015).

3.4.1. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO L3

El fallo en el establecimiento de las L3 de *H. contortus*, se deben principalmente al mecanismos de expulsión rápida y tardía, siendo un requisito para ambas respuestas contactos previos con el parásito para que se desarrollen (Balic *et al.*, 2000b; Balic *et al.*, 2002).

La expulsión rápida está asociada a los continuos y repetidos contactos con la L3 en un breve periodo, responsables de una reacción de hipersensibilidad de tipo 1 en la mucosa por degranulación de los leucocitos globulares activados por IgE (Harrison *et al.*, 1999; Balic *et al.*, 2002), los cuales liberan su contenido incrementando la producción de mucus, permeabilidad vascular, contracción del tracto gastrointestinal (Tizard, 2009; Balic *et al.*, 2000b) e inhibición de la movilidad larvaria (Douch *et al.*, 1983; Douch *et al.*, 1996; Balic *et al.*, 2000b) con el fin de expulsar las larvas antes de que se implanten en los tejidos. Recientemente se han observado incrementos en la excreción de galectina-14 en el mucus, sugiriendo la posible implicación de los eosinófilos en este mecanismo (Kemp *et al.*, 2009). Miller *et al.*, 1983 observaron en algunos ensayos que el 90% de las larvas se habían expulsado dentro de las 48 horas del desafío con *H. contortus*, mientras que Harrison *et al.*, 1999 también comprobaron que algunas ovejas expulsaron las larvas dentro de 2 horas tras el desafío con *T. colubriformis*, lo que confirma la rapidez con la que se produce la expulsión. Esta respuesta, una vez iniciada afectaría inespecíficamente a cargas de adultos que habiten en el mismo nicho (Miller, 1984; Rothwell, 1989; Balic *et al.*, 2000b).

En el mecanismo de expulsión tardío, son los eosinófilos las células efectoras y tiene lugar cuando ha pasado el tiempo suficiente desde el último contacto con el parásito en animales hiperinmunizados (Balic *et al.*, 2002). Esta respuesta tardía se acompaña de incrementos de linfocitos CD4⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y linfocitos B (Balic *et al.*, 2002), probablemente en respuesta a la presentación antigénica. Esta activación de la respuesta adaptativa producirá las moléculas necesarias para la activación de los eosinófilos que se concentrarán alrededor de las larvas, degranulando su contenido sobre su superficie para ocasionarles daño en la cutícula, pudiendo

limitar su desarrollo o incluso provocarles la muerte, impidiendo o dificultando su posterior permanencia en el hospedador y afectando su acción patógena (Rainbird *et al.*, 1998; Meeusen y Balic, 2000; Balic *et al.*, 2006).

3.4.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO L4

Frente a este estadio está descrito el fenómeno de hipobiosis y el control de la longitud y fecundidad mediante la acción de la IgA y, posiblemente de la galectina-11 en el control del crecimiento de la L4 (Preston, 2013).

La hipobiosis se ha asociado a resistencia frente a varias especies parásitas en ovejas (Balic *et al.*, 2000b), como *H. contortus* (Barger *et al.*, 1985), *T. circumcincta* (Halliday *et al.*, 2007) y *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1993). El mecanismo inmune por el que se desarrolla la hipobiosis está poco estudiado. Sin embargo, Stear *et al.*, 1995 observaron asociación entre L4 hipobióticas con niveles de IgA específica de L4 e IgG₁ específica de L3 en mucus y con la carga de adultos. Otros estudios han comprobado el potencial factor inmunitario, puesto que los animales inmunizados desarrollaron hipobiosis y los no inmunizados no (Smith *et al.*, 1984; Stear *et al.*, 2004), y otros autores, observaron que al inmunodeprimir las ovejas con cortisona apenas se producía arresto larvario (Dunsmore, 1961; Stear *et al.*, 2004). No obstante, el arresto larvario también se ha relacionado a un mecanismo de supervivencia con el que los parásitos regulan su población en condiciones ambientales adversas (Balic *et al.*, 2000b).

Además del secuestro tisular que supone la hipobiosis, el estadio de L4 es susceptible de control afectando probablemente su ingesta (Nisbet *et al.*, 2015, Preston *et al.*, 2015). Se considera que el principal mecanismo de resistencia generado por ovinos frente a *T. circumcincta* es la producción de IgA específica de L4 que limita el crecimiento parasitario y por tanto su fecundidad (Stear *et al.*, 1995; 1996).

Hasta hace bien poco, casi toda la información de que se disponía sobre inmunidad frente al estadio L4 correspondía a *T. circumcincta*, sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que sugieren que también es una diana en la respuesta protectora frente a *H. contortus* (Nisbet *et al.*, 2015). Algunos trabajos recientes han demostrado que las células epiteliales de diversas especies de rumiantes producen galectina 11 que se incrementa en infecciones simples y tras inoculaciones seriadas por diversos parásitos (Dunphy *et al.*, 2000; Athanasiadou *et al.*, 2008; Hein *et al.*, 2010; Hoorens *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2011; Nisbet *et al.*, 2015). En estudios de cinética de la respuesta en infecciones con *H. contortus*, permitieron determinar que esta galectina aumentaba tanto los niveles de ARNm como de la proteína entre

los días 3-7 post-inoculación, es decir, en el momento en el que se producía la salida de las L4 a la luz del abomaso, al tiempo que aumentaba la viscosidad del mucus (**Robinson et al., 2011**). Se ha podido demostrar mediante ensayos *in vitro* con larvas de *H. contortus* que la galectina 11 dificulta la pérdida de la cutícula de L3 en su muda a L4 y que esta lectina es capaz de adherirse de forma selectiva a la región faríngea del estadio L4, reduciendo su tamaño, probablemente al dificultar la alimentación del parásito (**Preston et al., 2015**).

3.4.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ESTADIO ADULTO

La respuesta inmune frente a los estadios adultos se manifiesta a través de la expulsión, cambios en la morfología (reducción de la longitud) y reducción de la fecundidad de las hembras (**Balic et al., 2000b**).

Se ha observado la expulsión primaria, dosis dependiente, de los vermes adultos de *Nematodirus battus* en corderos (**Lee y Martin, 1976; Winter et al., 1997; Balic et al., 2000b**), sin embargo es más típico que se produzca la expulsión de nematodos gastrointestinales como *H. contortus* (**Barger et al., 1985**), *T. circumcincta* (**Seaton et al., 1989**) y *T. colubriformis* (**Barnes y Dobson, 1990**) por el desarrollo de respuesta inmune adquirida a estos parásitos tras infecciones larvarias repetidas, atribuyéndose a una respuesta inespecífica del mecanismo larvario de expulsión rápida, que incluso puede extenderse a otras especies de parásitos adultos que habiten el mismo nicho (**Balic et al., 2000b**). Sin embargo, también se ha asociado a inmunidad adquirida específica al estadio adulto independiente del desarrollo de resistencia larvaria, pues se ha visto que la expulsión de los adultos no se desarrolla simultáneamente con la expulsión del estadio larvario en animales continuamente infectados (**Barger et al., 1985; Balic et al., 2000b**) o por haberse observado esta expulsión, acompañado de daños en la cutícula y reducción de la fecundidad en vermes adultos de *T. colubriformis* implantados quirúrgicamente en ovinos en ausencia de infección larvaria (**Emery et al., 1992; Balic et al., 2000b**). En este sentido, si bien no fue una expulsión total de los vermes, **González et al., 2008** observaron reducción de la carga parasitaria (2.4 veces menor) a los 28 días post inoculación (dpi) en ovino Canarios de Pelo (resistente) comparados con ovinos Canarios (susceptibles) sin encontrar diferencias en establecimiento larvario (7 dpi) en animales inoculados con una única dosis de 20.000 L3 de *H. contortus*, por lo que sugiere que la diana de esta raza es el estadio adulto del parásito.

La reducción de la longitud y fecundidad de *H. contortus*, *T. circumcincta* y *T. colubriformis* se ha observado como una consecuencia de infecciones larvarias repetidas (**Balic et al., 2000b**). Se ha descrito a asociación entre longitud y fecundidad en *H. contortus* (**Lacroux et al., 2006; Rowe**

et al., 2008) y *T. circumcincta* (Stear *et al.*, 1995; 1997), lo que se traduce en que la reducción del tamaño producirá una reducción de la fecundidad. La reducción de la longitud y fecundidad de los adultos se ha asociado en *T. circumcincta* al efecto de la IgA local específica de L4 (Stear *et al.*, 1995; 1996), sugiriendo que el control de estas variables tendría lugar en estadios previos al adulto (Balic *et al.*, 2000b). Por otro lado, también se ha observado asociación de la longitud de las hembras adultas y el recuento de huevos en heces con la IgA local específica del estadio adulto de *H. contortus* en ovinos Canario de Pelo a los 28 dpi tras una única inoculación con 20.000 L3 de *H. contortus*, mientras que en el ovino Canario se observó asociación entre la IgA local específica de L3 y la longitud larvaria, similar a lo descrito para otras razas ovinas (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015). Por otro lado, en esta misma raza ovina CAP, está descrita asociación negativa entre los linfocitos $T\gamma\delta^+$ y eosinófilos con la fecundidad (González *et al.*, 2008; Hernández, 2011), por lo que esta sería la primera vez que se implican a esas poblaciones celulares y la IgA específica de adulto en el control de la fecundidad en vermes adultos.

Toda esta información recalca la complejidad de la respuesta inmune frente a los nematodos gastrointestinales, ya no solo frente a los diferentes estadios parasitarios y especies, sino incluso entre diferentes razas ovinas, siendo necesario estudios que aporten nueva información al respecto, que permitan esclarecer los mecanismos incluyendo las respuestas innatas que parecen tener un papel mayor del que se pensaba.

4. RESUMEN

Cubrir de manera sostenible la demanda mundial creciente de productos animales originados por el crecimiento demográfico y económico requiere mejorar los rendimientos productivos de los animales. Los nematodos gastrointestinales debido a su patogenicidad, producen pérdidas productivas, por lo que su control incrementaría los beneficios obtenidos por animal. Sin embargo, el uso indiscriminado de los antihelmínticos ha generado el desarrollo de resistencias, proponiéndose otras alternativas de control que recogen prácticas de manejo encaminadas a mejorar la resistencia/resiliencia del hospedador y a reducir las cargas contaminantes. El control a través de la vacunación supondría una alternativa sostenible, pues conferiría protección, no dejaría residuos en los productos y no se generarían resistencias. Sin embargo, dada la complejidad de la respuesta parásito-hospedador y las dificultades técnicas en su desarrollo y producción, hace que sea necesario realizar más estudios al respecto. Estudiar en profundidad los mecanismos inmunes de resistencia desarrollada por los hospedadores frente a los nematodos gastrointestinales, podrían proporcionar información para identificar nuevas dianas farmacológicas potenciales.

En este sentido, en una tesis previa de nuestro grupo de investigación se observó que la raza ovina Canaria de Pelo (CAP) era más resistente en inoculaciones experimentales a *Haemonchus contortus* que los ovinos de la raza Canaria (CAN), concluyendo que la diana de la respuesta inmune es el estadio adulto del parásito, pues se encontraron diferencias en parasitología (carga parasitaria, longitud y fecundidad de los vermes) a 28 días post-inoculación (dpi) y no a 7 dpi (González *et al.*, 2008; Hernández, 2011). En este novedoso mecanismo de protección, el control de la longitud y fecundidad parecía estar asociado a la IgA, eosinófilos y linfocitos $T\gamma\delta^+$ (González *et al.*, 2011a; Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015). Ratificar estos mecanismos, y profundizar más en la relación que se establece entre los parásitos (en este caso, nematodos gastrointestinales) y los ovinos resistentes/susceptibles fueron los principales detonantes del planteamiento de esta Tesis Doctoral.

Los resultados arrojados por este trabajo, indican en su primer capítulo que tanto adultos como corderos de la raza Canaria de Pelo son más resistente en infecciones naturales mixtas donde predominan *Trichostrongylus spp.* y *Teladorsagia circumcincta*, sugiriendo resistencia multiespecífica. En el segundo capítulo, en el que se comparan ovinos de ambas razas inoculados con 20.000 L3 de *Haemonchus contortus* y sacrificados a 0, 7 y 21 dpi, se observaron diferencias significativas en carga parasitaria a 21 dpi, pero no en longitud ni huevos en útero entre razas, lo que sugiere que el control de carga parasitaria en los ovinos de raza Canario de Pelo tiene lugar entre los días 7 y 21 dpi y que el control de la longitud tiene lugar entre los días 21 y 28

dpi. El análisis pormenorizado de la respuesta inmune y de sus asociaciones con las variables parasitarias sugieren que a 7 dpi la raza resistente (CAP) podría reconocer más antígenos parasitarios que la susceptible (CAN) a través de las células MHC-II⁺ localizadas en la mucosa de abomaso asociada negativamente con la carga parasitaria intramural. Esto podría desencadenar la posterior expulsión de los vermes a través de una respuesta coordinada aparentemente por los linfocitos CD4⁺, actuando los eosinófilos galectina 14⁺ como célula efectora.

Los capítulos tercero y cuarto, confirman la hipótesis de que los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y los eosinófilos controlan la fecundidad. Así, en el tercer capítulo se observó que los animales a los que se le administró el anticuerpo CC15 (anti-WC1, una subpoblación de los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺), lo que produjo una reducción significativa de la población de los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ tanto en sangre periférica como en la mucosa de abomaso, presentaron vermes significativamente más largos y prolíficos a pesar de que cuantitativamente no existieron diferencias en el recuento de eosinófilos e inmunoglobulina A (IgA), lo que sugiere que esta población linfocitaria podría estar actuando como coordinadora de la respuesta. Finalmente, en el cuarto capítulo, se analiza el efecto de la administración subcutánea de la interleuquina 5 recombinante ovina (rIL-5ov), tras la que se generó IgG específicas frente a dicha interleuquina. Los animales que recibieron dicha rIL-5ov, presentaron un mayor número de vermes, que fueron además significativamente más largos y prolíficos. Sin embargo, a pesar de estas diferencias parasitológicas, no se observaron diferencias significativas en los recuentos de eosinófilos sanguíneos o de mucosa abomasal y de los niveles de IgA entre grupos, lo que sugiere, por un lado la importancia de dicha interleuquina para la activación de los eosinófilos, y por otro el papel de dicha población en el control de la carga, longitud y fecundidad de los vermes. Hasta donde conocemos, es la primera vez que se administra una citoquina recombinante en ovinos con el fin de generar anticuerpos que permitan valorar su funcionalidad.

Estos resultados, en su conjunto, sugieren un mecanismo de control de *Haemonchus contortus*, no descrito hasta el momento, que tiene lugar frente a estadio adulto del parásito y en el que se controla inicialmente la carga parasitaria y posteriormente la longitud y fecundidad.

5. SUMMARY

Afford in a sustainable manner the growing global demand for animal products, caused by demographic and economic growth, requires improving animal production. Gastrointestinal nematodes, due to its pathogenesis, cause production losses, so their control would increase the productive profits of each animal. However, indiscriminate use of anthelmintics has generated the development of resistance, suggesting use of management of integrated control of helminth parasites that includes alternative practices to improve the host resistance/resilience, therefore reducing infective burdens. The control through vaccination would be a sustainable alternative because it would protect, without leaving residues in the products and resistance would not be generated easily against it. However, given the complexity of the parasite-host response and technical difficulties in its developments and productions; it will be need further studies. Deep analysis of the resistance immune mechanisms developed by the hosts against gastrointestinal nematodes could provide information to identify potential new drug targets.

In this sense, in a previous Thesis carried out within our research group it was showed that Canaria Hair Breed sheep (CHB) was more resistant, in experimental infections with *Haemonchus contortus*, than Canaria sheep (CAN), concluding that the target of this immune response was the adult stage of this parasite, because differences in parasitology (worm burden, length and fecundity) were found at 28 days post-inoculation (dpi) but not at 7 dpi (**González *et al.*, 2008; Hernández, 2011**). In this novel mechanism of protection, the control of worm length and fecundity seemed to be associated with IgA, eosinophils and $\gamma\delta^+$ T cells (**González *et al.*, 2011a; Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015**). To prove these mechanisms and deepen into the relationship established between parasites (in this case, gastrointestinal nematodes) and resistant/susceptible sheep were the main triggers of this Thesis.

Results presented on the first chapter of this study indicate that both CHB adults and lambs are more resistant in predominantly *Trichostrongylus spp.* and *Teladorsagia circumcincta* natural mixed infections suggesting multi-specific resistance. In the second chapter, animals of both breeds were inoculated with 20,000 L3 of *Haemonchus contortus* and slaughtered at 0, 7 and 21 dpi. Significant differences in worm burden at 21 dpi but not in length or eggs in uterus, were observed between breeds, it suggests that the CHB breed sheep control worm burden between 7 and 21 dpi and the worm length between 21 and 28 dpi. The detailed analysis of the immune response and their associations with parasitic variables suggest that the resistant breed (CHB) could recognize most parasite antigens that susceptible (CAN) through MHC-II⁺ cells

Summary

localized in the mucosa of abomasum and was negatively associated with the intramural larvae. This could trigger the subsequent expulsion of worms through a seemingly coordinated response by CD4⁺ T cells and where galectin 14⁺ eosinophils act as effector cell.

The third and fourth chapters confirm the hypothesis that both $\gamma\delta^+$ T cells and eosinophils control fecundity. So, in the third chapter, a successful and significant reduction of T $\gamma\delta$ /WC1⁺ lymphocytes population in peripheral blood and mucosal abomasum was observed in the animals in which CC15 antibody was administered. Worms were significantly longer and more prolific in depleted group, although no quantitative differences in eosinophil counts and immunoglobulin A levels were observed. All these suggest that this lymphocyte population may be acting as a coordinator of this response. Finally, in the fourth chapter the effect of subcutaneous administration of recombinant ovine interleukin-5 (rIL-5ov) was analyzed, through generating specific IgG against this interleukin. Animals that received rIL-5ov, showed a greater number of worms, which were also significantly longer and prolific. However, despite of these parasitological differences, no significant differences in blood and abomasal eosinophil counts and IgA levels were observed between groups. It suggests: on the one hand the importance of this interleukin for eosinophils activation and on the other hand the role of this population in control of worm burden, fecundity and length. As far as we know, this is the first time a recombinant sheep cytokine is administered on sheep in order to generate antibodies for evaluating its functionality.

These results, taken together, suggest a non-previously described control mechanism against the adult stage of *Haemonchus contortus* in which worm burden was controlled before worm length and fecundity.

**Material y
Métodos**

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se presentan a continuación los materiales y métodos que se han utilizado de rutina en la totalidad o mayoría de los experimentos que constituyen los cuatro capítulos de los que consta esta Tesis Doctoral. Los aspectos concretos como el diseño experimental, los animales o metodologías más específicas aplicadas en una o dos experiencias, se detallan en el capítulo correspondiente.

6.1 CEPA PARASITARIA

La cepa de *Haemonchus contortus* (Redmond y Knox, 2004) utilizada en los experimentos fue donada inicialmente por los Dres. Knox y Bartley (*Moredun Research Institute*, Edimburgo, Escocia) el año 2005 y se ha mantenido desde entonces mediante inoculaciones experimentales sucesivas en ovinos de raza Canaria en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

6.2 ANÁLISIS SANGUÍNEOS

Se extrajo 3 ml de sangre por punción yugular en tubos con EDTA tripotásico (VenoSafe™, TERUMO) de cada animal para los estudios hematológicos y para la citometría de flujo. También se extrajo 5 ml de sangre en tubos siliconados (Gel + Clot Act., Venosafe™) para obtener suero sanguíneo, tras la refrigeración previa a 4 °C durante como mínimo 30 min de los tubos con la sangre y la centrifugación posterior a 3500 rpm (Mixtasel, Selecta). Una vez recogido el suero, se conservó a -20 °C hasta su uso.

El hematocrito se determinó centrifugando a 8.000 rpm durante 10 min (Mixtasel, Selecta) la sangre en capilares de microhematocrito. La concentración de proteínas plasmáticas se determinó con un refractómetro (Comecta SA) utilizando el plasma obtenido en dichos capilares.

Para el recuento total de leucocitos se diluyó la sangre 1:20 en líquido de Türk (Panreac), -el cuál además provoca la lisis de los eritrocitos- y se contabilizaron los leucocitos con ayuda de una cámara de Neubauer (Zuzi), obteniéndose el número de leucocitos/ μ l de sangre. El recuento diferencial de leucocitos se realizó con ayuda de una extensión de sangre, que se tiñó con panóptico rápido (Panreac), contabilizándose de forma diferencial 100 leucocitos -neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos-, obteniendo el número total de cada tipo leucocitario/ μ l de sangre a partir del recuento leucocitario total.

6.3 ANÁLISIS COPROLÓGICOS

Las heces se tomaron directamente del recto para el recuento de huevos mediante la técnica de McMaster modificado, pesando para ello 2 gr de heces (MAFF, 1989).

6.4 MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Tras el sacrificio de los animales se aislaron los abomasos, se tomaron muestras de tejido de la curvatura mayor y se abrieron para recoger el contenido abomasal, mucus y mucosa.

6.4.1 MUESTRAS DE PARED DE ABOMASO

Para el estudio inmunohistoquímico e histológico se obtuvieron dos muestras de aproximadamente 2 x 2 cm de tejido de la región del fundus del abomaso de cada animal. La muestras recogidas para los análisis inmunohistoquímicos se cubrió con medio para la congelación de tejidos (*Tissue Freezing Medium*®, Jung, Leica Microsystems, Nussloch), se sumergieron en isopentano PRS (Panreac) a -80 °C y, una vez solidificado el medio, se conservaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Las muestras para los análisis histológicos se conservaron en formol tamponado diluido al 10 %.

6.4.2 CONTENIDO ABOMASAL

Tras la apertura del abomaso por la curvatura mayor, se recogió el contenido abomasal de cada animal del que se obtuvo una alícuota (300 ml; 10 % formol) que se utilizó para contabilizar los vermes y diferenciar por sexos los vermes maduros (Wood *et al.*, 1995), así como para determinar la longitud de las hembras y el número de huevos en útero, tal y como se explica posteriormente en el epígrafe “otras técnicas parasitológicas” de este capítulo de material y métodos.

6.4.3 MUCUS

El mucus del abomaso se recogió para determinar los niveles locales de IgA específica. Para ello se raspó ligeramente la superficie de toda la mucosa con ayuda de un portaobjetos, conservándose a -80 °C. Previo a su uso, se suspendió un gramo de mucus por cada 2,5 ml de tampón (Tabla 6.1), se homogeneizó y centrifugó la muestra a 18.000 g durante 30 min conservándose el sobrenadante a -20 °C (modificación de Amarante *et al.*, 2005).

Tabla 6.1 Reactivos para preparación del Buffer pH 7.1.

REACTIVO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Fosfato disódico (Merck)	Na ₂ HPO ₄	0.1M
Cloruro de sodio (VWR Chemicals)	NaCl	0.05M
Azida de Sodio (Sigma)	NaN ₃	3mM
PMSF (Sigma)	C ₇ H ₇ FO ₂ S	1mM
EDTA (Panreac)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	5mM

6.4.4 MUCOSA

La mucosa se obtuvo tras raspar vigorosamente la pared del abomaso con ayuda de un portaobjetos y se conservó a -20 °C hasta su digestión en solución de pepsina-HCl (Tabla 6.2) a razón de un gramo de mucosa por cada 2 ml de solución (**MAFF, 1989**). El tejido se incubó a 37 °C durante aproximadamente 30 min con dicha solución, frenándose la reacción con formol al 10 %, contabilizándose las larvas inmaduras en una alícuota de 20 ml con ayuda de una lupa (*Wild Heerbrugg*) a 160 aumentos.

Tabla 6.2 Solución Pepsina-HCl

REACTIVO	CANTIDAD
Cloruro de sodio (<i>VWR Chemicals</i>)	0.85g
Pepsina (<i>Sigma</i>)	0.8g
Ácido clorhídrico 37% (<i>Panreac</i>)	2ml
Agua destilada	Hasta completar 100ml

6.5 OTRAS TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

Además de la coprología, se realizaron otras técnicas parasitológicas utilizando las alícuotas obtenidas del contenido abomasal de cada animal. En concreto, se contabilizaron los vermes maduros, diferenciando también sexos (**Wood *et al.*, 1995**) y parásitos inmaduros (**Anderson, 1992**), extrapolando el resultado al volumen total del abomaso. Tras el recuento de vermes de cada alícuota, se midieron aleatoriamente 30 vermes inmaduros y/o 30 hembras adultas de cada animal utilizando una cámara de fotos digital (ProgRes C12PLUS) acoplada en un microscopio invertido (Olympus CKX41). Para el recuento de huevos en útero de las hembras se utilizó un microscopio a 100 aumentos, previa liberación de los huevos presentes en el útero al romper los parásitos hembras con ayuda de un cubreobjetos (**Strain y Stear, 2001**).

Tras la digestión de la mucosa se obtuvo una alícuota de 20 ml, de la que se contabilizaron las larvas inmaduras con ayuda de una lupa (*Wild Heerbrugg*) a 160 aumentos. La suma de las larvas obtenidas tras la digestión y las larvas localizadas en la luz del abomaso se expresaron como carga parasitaria.

6.6 ANTÍGENOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

A partir de ovinos de la raza Canaria donantes que habían sido primo-infectados con 7.000 L3 de *H. contortus* se obtuvieron los vermes adultos empleados en la preparación del antígeno somático adulto (SA), así como las larvas 3 (L3) empleadas para la elaboración de antígeno somático de L3.

Tras el coprocultivo de las heces de estos animales, transcurrido el periodo prepatente y tras comprobar la presencia de huevos en las heces de los corderos de raza Canaria inoculados, la obtención de las L3 de *H. contortus* se llevó a cabo mediante el método de Baermann. El antígeno somático L3 se obtuvo tras someter 10^6 L3 en PBS (Tabla 6.3) a tres ciclos de 20 min en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación a temperatura ambiente. Posteriormente se homogeneizaron con ultrasonidos (UP100H, Hielscher) y mecánicamente (Ultraturrax T8, IKA® Werke) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El homogeneizado resultante se centrifugó a 18.000 g (Centrifuge MPW-65R, MPW) durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, conservándose el sobrenadante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso como antígeno larvario (método adaptado de **Lacroux *et al.*, 2006**).

Con el fin de obtener antígeno somático de vermes adultos, tras el sacrificio de estos animales, se recogió el contenido abomasal y se mezcló con una solución de agar (Sigma) al 1,7 % (p/v) en agua destilada a $43\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta mezcla se vertió sobre un paño y, tras la gelificación, se incubaron verticalmente en una cubeta con PBS a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min. Los vermes viables fueron desprendiéndose del gel, recogiendo en el fondo de la cubeta. Posteriormente fueron sometidos a lavados con sucesivos pases en PBS para eliminar los posibles restos de agar. Finalmente, el antígeno SA de *H. contortus* se obtuvo tras la homogeneización mecánica (Ultraturrax T18, IKA® Werke) y con ultrasonidos (UP100H, Hielscher) de los vermes adultos en PBS a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El homogeneizado se centrifugó a 4.500 g (Centrifuge MPW-65R, MPW) durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, conservándose el sobrenadante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 6.3 Reactivos preparación PBS.

REACTIVO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Cloruro de sodio	NaCl (Sigma)	0.123M
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4 (Sigma)	0.003M
Fosfato disódico	Na_2HPO_4 (Sigma)	0.01M

En ambos antígenos la concentración de proteínas se determinó mediante el kit Pierce BCA (Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

6.7 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)

Los niveles de inmunoglobulinas específicas de mucus, suero y/o sobrenadante de cultivo linfocitario de cada animal, fueron determinados mediante el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* -ELISA). Las placas (*Costar 3369, Corning*) se incubaron con el antígeno SA o L3 diluido en tampón carbonato a pH 9,6 (Tabla 6.4) durante 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras esta incubación se realizaron tres lavados de 5 min con PBS - tween₂₀ (*Sigma*) al 0,05 % (v/v) para eliminar el antígeno no fijado.

Tabla 6.4 Reactivos para la preparación de buffer carbonato.

REACTIVO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	8,4%
Carbonato de sodio	NaCO ₃	18,2%
Agua destilada	H ₂ O	Hasta completar 100ml

El bloqueo de las reacciones inespecíficas se realizó mediante incubación durante 45 min a 37 °C con una solución de albúmina sérica bovina al 3 % (p/v) en PBS, tras lo que se repitieron los lavados. Las muestras se diluyeron en PBS azida de sodio (*Sigma*) al 0,02 % (p/v) incubándose 1 h a 37 °C, seguido posteriormente de otros tres lavados.

Para el revelado de la reacción, se añadió el conjugado *rabbit anti-sheep IgA* (Bethyl Laboratories INC or AVIVA System Biology Corp.) en PBS, y se incubó 45 min a 37 °C. Para eliminar el conjugado no fijado, se realizaron otros tres lavados. A continuación, se añadió el sustrato de la reacción, compuesto por 12,2 ml de ácido cítrico (*VWR*) al 2,1 % (p/v), 12,8 ml de fosfato sódico (*Merck*) al 2,8 % (p/v), 10 mg de OPD (*O-Phenylene Diamine, Sigma*) y 35 µl de H₂O₂ (*Panreac*), incubándose aproximadamente 8 min en oscuridad. Finalmente, la reacción se frenó mediante la adición de 50 µl de una solución de ácido sulfúrico (*Panreac*) 2 M, dejándolo actuar 5 min, procediéndose a la lectura de las placas en un lector de placas de ELISA (*Multiskan Ascent*) a una longitud de onda de 492 nm.

Como control negativo se utilizó la muestra, pertinente según el caso, de un animal no inoculado y, como control positivo, muestra de un animal previamente inoculado. Las condiciones de concentración de antígeno y diluciones de muestras y conjugado utilizadas, se describe en cada capítulo.

6.8 HISTOLOGÍA

Las muestras de abomaso se deshidrataron y se infiltraron con parafina mediante un procesador tisular (*Leica TP1050*), tras lo cual, se incluyeron en un bloque de parafina y se cortaron con un micrótopo con un grosor de 5 µm. Posteriormente, estos cortes se desparafinaron y se hidrataron mediante pases en una batería de xilol, etanol 100 °, 96° y 70 ° y por último en agua destilada. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (Tabla 6.5) para contabilizar los eosinófilos y los leucocitos globulares, y con azul de toluidina (Tabla 6.6) para contabilizar los mastocitos. Una vez teñidos se procedió nuevamente al deshidratado (dos pases de 2 min en etanol de 70 °, 96 ° y 100 ° y en Xilol) y al montaje en medio DPX (*Panreac*).

Las células de las distintas poblaciones celulares se contabilizaron en 20 campos de 0,0688 mm² a 400 aumentos (40x- 10x) (*Olympus BH2*) en una zona situada sobre lámina propia, para

Material y Métodos

los eosinófilos, y en la zona apical de la mucosa, para los leucocitos globulares (Figura 6.1). Los mastocitos se contabilizaron en 20 campos sobre la lámina propia y en 20 en la zona apical de la mucosa, considerándose en los análisis estadísticos la suma de ambas áreas. El resultado de cada población se expresó en células/mm².

Figura 6.1 Zonas delimitadas dónde se realizaron los recuentos.

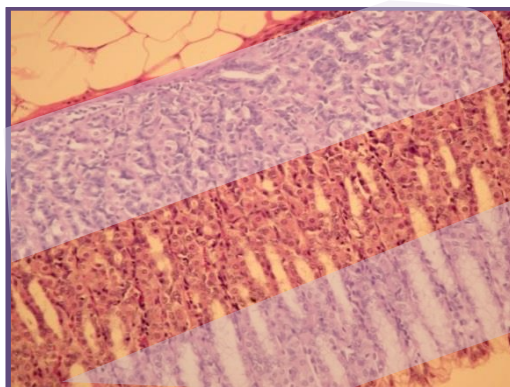


Tabla 6.5 Hematoxilina-eosina.

REACTIVO	TIEMPO
Hematoxilina de Harris	15 min
H ₂ O	ACLARADO
Alcohol clorhídrico	4 s
H ₂ O	ACLARADO
Agua Amoniacal	10 s
H ₂ O	15 min
Eosina	4 min

Tabla 6.6 Azul de Toluidina.

REACTIVO	TIEMPO
Azul de Toluidina (1%)	45 s
Alcohol 96°	Aclarado - Tiempo determinado por control positivo

6.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras congeladas a -20 °C fueron procesadas con un grosor de 4 µm con ayuda de un criomicrotomo (*Frigocut N 2800, Reichert Jung*). Estos cortes de tejidos fijados en portaobjetos tratados previamente con Poli-L- lisina, se dejaron secar durante 30 min y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Antes de empezar la técnica, los cortes se atemperaron a 4 °C durante 20 min y se fijaron en etanol 100 % (*Panreac*) – 1 % H₂O₂ (*Panreac*) durante 10 min en agitación. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min en agitación en PBS. Tras secar los portaobjetos, se procedió al bloqueo de las reacciones inespecíficas mediante 30 min de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de conejo (Dako) diluido en PBS al 1 %. Los

portaobjetos se incubaron posteriormente durante 90 min en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en RPMI 1640 (*BioWhittaker®*, *Lonza*) con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5 %. Posteriormente se repitieron los 3 lavados en PBS y se secaron los portaobjetos. A continuación se incubaron las muestras con anticuerpo secundario *polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (IgG) biotinylated (Dako)*, diluido a 1:20 en RPMI-SFB 5 %, y se incubó durante 30 min en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Se realizaron los 3 lavados en PBS y se secaron los portaobjetos, procediendo a continuación a incubar 60 min en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, *Vector*) al 1 % en PBS. Tras dos lavados en PBS, los cortes se incubaron 10 min con 1 parte de tampón TRIS y 9 partes de solución salina (Tabla 6.7) en agitación a temperatura ambiente y se revelaron con 3,3' – *diaminobenzidine tetra-hydrochloride hydrate (Sigma - Aldrich)*, diluida 0,035 % (p/v) en TRIS 0,1 % H₂O₂. La contratinción se realizó sumergiendo los portaobjetos durante 0.5 min en hematoxilina de Harris. Tras deshidratar los tejidos, se procedió al montaje de los mismos en medio DPX.

Las células de las distintas poblaciones celulares inmunomarcadas fueron contabilizadas por dos patólogos en 20 campos de 0,0688 mm² a 400 aumentos (40x - 10x) (*Olympus BH2*) en 20 campos sobre la lámina propia y 20 en la zona apical de la mucosa - zona delimitada en Figura 6.1. El resultado de cada población se expresó en células/mm². La expresión de galectina 11 se determinó a 10x en la zona apical de la mucosa, valorando con una escala de 0 a 4, dónde 0 no presenta células marcadas y 4 es el tejido con mayor marcaje.

Tabla 6.7 Composición tampón TRIS/Solución salina.

REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD
TRIS (Sigma)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	60,57gr – 500ml dH ₂ O
Ácido clorhídrico (Panreac) 1N	HCl	Añadir al anterior 350-400ml hasta ajustar a pH 7.6 y enrasar a 1 litro
Cloruro de Sodio	NaCl	8,5 gr – 1 litro dH ₂ O

6.10 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA – WESTERN BLOTTING

La electroinmunotransferencia se realizó con el fin de determinar el reconocimiento de las fracciones proteicas del antigénico somático adulto por parte de la IgA del mucus o sobrenadante de las células secretoras de anticuerpos (ASC) cultivadas *in vitro*. Para ello, se hicieron electroforesis del marcador LMW *Calibration Kit for SDS (Amersham Biosciences)* y del antígeno de SA de *H. contortus* en un gel SDS-PAGE bajo condiciones de reducción (tras someter las muestras durante 1 min a 100 °C) en geles de poliacrilamida al 10 % (Tabla 6.8), a 4 °C – 100 V constante utilizando una cubeta de electroforesis *Mini Protein® System Tetra Cell and PowerPac HV™* (BioRad) en tampón reservorio (Tabla 6.8). La transferencia se realizó sobre una

membrana de nitrocelulosa *BioTrace®NT* (Life Sciences, Pall Corporation) a 100 V constante durante 1 h a 4 °C (BioRad) en tampón de transferencia (Tabla 6.8). La transferencia se verificó tiñendo con solución de *Ponceau* (Sigma) la membrana. Posteriormente, la membrana se cortó en tiras de 6 mm y se lavaron 3 veces con PBS conteniendo tween₂₀ (Sigma) 0,05 % (v/v) durante 5 min. Tras estos lavados, se bloquearon las reacciones inespecíficas con albúmina sérica bovina (*Albumin Fraction V from bovine serum*, Merck) al 3 % (p/v) incubándose durante 1 h a 37 °C, seguido de 3 nuevos lavados. A continuación, se añadió la muestra (mucus o sobrenadante de cultivo linfocitario) y se incubó a 4 °C toda la noche en agitación, tras lo que se realizaron otros 3 lavados en PBS-tween₂₀ (Sigma). El conjugado (*rabbit anti-sheep IgA*, Aviva Systems Biology Corp) se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación. Para eliminar el conjugado no fijado a la membrana se realizaron 3 lavados en PBS y se procedió al revelado con el kit *AEC Staining* (Sigma) durante 10 min, de nuevo en agitación. La reacción se frenó sumergiendo las tiras en agua destilada. Se utilizaron muestras obtenidas de un animal inoculado como control positivo y un animal sin inocular como control negativo.

Material y Métodos

Tabla 6.8 Reactivos para la preparación de los geles y tampones necesarios para la electroinmunotransferencia.

PREPARACIÓN GELES			
REACTIVOS	FÓRMULA	GEL SEPARADOR 10 % (ML)	GEL CONCENTRADOR 5 % (ML)
Agua destilada	H ₂ O	7,37	3,4
Poliacrilamida 30%	-	6,25	0,83
Buffer Tris	-	4,75 (1.5M pH 8.8)	0,63 (1M pH6.8)
SDS (Sigma) 10%	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	0,187	0,05
APS (Merck) 10%	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,187	0,05
TEMED (Sigma)	C ₆ H ₁₆ N ₂	0,0075	0,005
POLIACRILAMIDA 30 %			
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD	
Acrilamida (Sigma)	C ₃ H ₅ NO	23,04 gr	
Bis- acrilamida (sigma)	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	0,64 gr	
Agua destilada	H ₂ O	80 ml	
BUFFER TRIS			
REACTIVO	FÓRMULA	1.5 M pH 8.8	1M pH 6.8
SDS (Sigma)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	1gr	1 gr
TRIS (Sigma)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	45,5 gr	15,1 gr
Agua destilada	H ₂ O	Enrasar 250 ml	Enrasar 250 ml
0.5 M TRIS – HCl pH6.8			
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD	
TRIS (Sigma)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	6 gr	
Agua destilada	H ₂ O	50 ml	
Ácido clorhídrico (Panreac) 1M	HCl	Hasta ajustar pH - enrasar con H ₂ O hasta 100ml	
TAMPÓN DE CARGA			
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD	
TRIS (Sigma)- HCl (Panreac)	-	2,,5 ml	
Glicerol (Sigma)	C ₃ H ₈ O ₃	2 ml	
2 β- Mercaptoetanol (Bio-Rad)	HOCH ₂ CH ₂ SH	1 ml	
SDS (Sigma) 10%	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	4 ml	
Azul de Bromofenol (Sigma) 0.05% p/v	C ₁₉ H ₉ Br ₄ NaO ₅ S	0.5 ml	
TAMPÓN RESERVORIO pH8.3			
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD	
Glicina (Sigma)	C ₂ H ₅ NO ₂	14.4 gr	
TRIS (Sigma)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	3 gr	
SDS (Sigma)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	1 gr	
Agua destilada	H ₂ O	1 l	
TAMPÓN TRANSFERENCIA			
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD	
Glicina (Sigma)	C ₂ H ₅ NO ₂	14.4 gr	
TRIS (Sigma)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	3 gr	
Agua destilada	H ₂ O	430 ml	
Metanol (Panreac)	CH ₄ O	200 ml	
Agua destilada	H ₂ O	372 ml	

6.11 PROCESADO DE IMAGEN

Se capturó la imagen de la electroinmunotrasferencia o *Western Blotting* con un sistema de documentación de geles (BioRad Molecular Image® GelDoc™ XR⁺ Imaging System) y posteriormente se procesaron con el programa Image Lab™ (Software versión 2.0.1 BioRad). El

recorte y organización de las tiras que se muestran en las distintas imágenes se realizó con el programa *Adobe Photoshop CS4 Extended Versión 11.0*.

6.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software *IBM SPSS Statistics* versión 17 para el análisis estadístico. Los datos correspondientes con el recuento de huevos fecales (HGH) se analizaron tras modificarlos mediante su transformación logarítmica ($\text{LOG}_{10}+1$). Las comparaciones de variables hematológicas entre grupos se realizaron utilizando el modelo general lineal (GLM) de medidas repetidas. Por su parte, los datos parasitológicos (carga de vermes, huevos en útero, HGH) y de las inmunoglobulinas específica se analizaron aplicando el modelo lineal generalizado considerando una distribución gamma logarítmica, añadiendo 0,1 a cada dato de la variable cuando algún dato tenía valor igual a 0 por requerimientos del análisis. La longitud de los vermes se analizó también con el modelo lineal generalizado pero considerando una distribución normal lineal. En el análisis estadístico de las variables longitud y huevos en útero se introdujo la variable animal como covariable. Se determinaron los coeficientes de correlación de Spearman y de regresión entre las variables parasitológicas, inmunológicas y/o celulares. Probabilidades con valores $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

CAPÍTULO I. DIFERENCIAS EN SUSCEPTIBILIDAD EN INFECCIONES NATURALES POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS CANARIOS DE PELO Y CANARIOS

1. RESUMEN

Conocer la epidemiología de los parásitos gastrointestinales permitirá establecer programas de control individualizados y sostenibles, optimizando el uso de tratamientos preventivos, llegando quizás, a prescindir de ellos en algunas situaciones epidemiológicas concretas. Actualmente, en numerosas partes del mundo, los tratamientos no son totalmente eficaces por las resistencias que han desarrollado los parásitos. Instaurar medidas de control alternativas o, en su defecto, tratamientos selectivos de aquellos animales que realmente lo necesitan, es una opción plausible, dejando que el resto de animales desarrollen la inmunidad adquirida y establezcan un equilibrio con los parásitos, permitiendo además poblaciones en refugio que diluyan los posibles genes resistentes a antihelmínticos de los parásitos. En la isla de Gran Canaria se explotan dos razas ovinas, la raza Canaria (CAN-susceptible) y la Canaria de Pelo (CAP-resistente), en las que se ha comprobado experimentalmente que tienen diferencias en términos de resistencia a la infección por *Haemonchus contortus* (*H. contortus*), lo que podría ser relevante a la hora de establecer tratamientos preventivos. Además, a pesar del pequeño tamaño de la isla, hay importantes diferencias climatológicas que podrían modular de forma importante la carga y la distribución de las distintas especies parasitarias entre las distintas explotaciones ovinas. Por todo ello, se realizó un estudio epidemiológico de las infecciones por nematodos gastrointestinales entre los años 2008 y 2010 en dos granjas donde conviven ambas razas ovinas, ubicadas una en el Este a una altitud de 380 m sobre el nivel del mar (“templado-moderada”) y la otra en el Sur a 147 m de altitud (“desierto seco”), por lo que se trata de dos áreas climáticas totalmente diferentes. En total, se realizaron 1.299 análisis coprológicos, con dos muestreos en cada estación del año. *Trichostrongylus* spp. fue el género predominante, seguido por las especies *Teladorsagia circumcincta* y, con menor prevalencia, *H. contortus* en ambas granjas.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre granjas en la dinámica de excreción de huevos y se observaron también diferencias significativas en los huevos eliminados entre razas, siendo también la raza CAP más resistente que la CAN en infecciones naturales.

2. INTRODUCCIÓN

El archipiélago canario está integrado por 7 islas situadas en el hemisferio norte cerca de las costas de Marruecos y del Sahara, entre las latitudes 27º 37' y 29º 25' Norte y longitudes 13º 20' y 18º 10' al Oeste de Greenwich. Este archipiélago de origen volcánico se caracteriza por tener altas montañas en una pequeña extensión de superficie rodeada de laderas y barrancos (**GEVIC-NaCul 1**). Esta peculiaridad geográfica le confiere gran variedad de microclimas, como si se tratase de un “continente en miniatura”, con diferencias entre el clima del norte -más húmedo y verde debido a la retención de los alisios por las montañas en esta vertiente y a la formación del mar de nubes (**GEVIC-NaCul 2**)(estratocúmulos formados por los alisios inferiores (húmedos y fríos) al chocar con los alisios superiores (secos y cálidos) (**GEVIC-NaCul 3**) en la zona de medianías, comprendida entre 600 y 1.500m de altura (**GEVIC-NaCul 2**), aunque hay diferencias según la orientación y altura de la isla (**GobCan 5**) que favorecen la retención de humedad en la zona y es responsable del fenómeno conocido como “lluvia horizontal” (condensación de la humedad en las hojas de los árboles) (**GEVIC-NaCul 3**)- y el del sur - caracterizado por ser más caluroso, seco y árido- (**GEVIC-NaCul 2**) fenómeno que va a determinar importantes diferencias en la actividad agropecuaria en cada zona.

La isla de Gran Canaria, tiene una superficie de 1.560,10km² y su pico más alto -Pico de las Nieves- tiene 1.949 metros de altura (**GEVIC-NaCul 1**), teniendo una marcada diferencia climática norte-sur. La cabaña ganadera de rumiantes de la isla en el año 2013 estaba integrada por 65.196 caprinos, 20.551 ovinos y 11.164 bovinos (**GobCan 1**). Generalmente el tipo de explotación es familiar, muy tradicional con infraestructuras precarias, bajo número de animales y vinculada a la actividad agrícola y forrajes locales suplementado con piensos (**GEVIC-NaCul 4**) y, donde frecuentemente conviven varias especies de animales para la obtención de leche para la elaboración de queso.

En esta isla conviven dos razas ovinas, la Canaria (CAN) de aptitud lechera y la Canaria de Pelo (CAP) de aptitud cárnica. El origen de la raza Canaria se cree que procede del cruce entre razas ovinas de lana larga y basta con ovinos llegados a las islas desde zonas del Mediterráneo y África. Por otro lado, el ovino Canario de Pelo se cree que procede del ovino peludo de África Occidental y Centro-Occidental, y estaba presente en las islas cuando llegaron los primeros colonos. En este sentido, la isla era un punto de parada en las rutas hacia América, por lo que hay testimonios escritos que sostienen que esta raza fue exportada a diferentes regiones del continente americano. Con el paso del tiempo esta raza fue desplazada por el ovino de lana en las islas por motivos zootécnicos. Sin embargo desde hace varios años, en particular tras una reintroducción de animales desde América a finales de los años 80, su censo ha ido aumentando

paulatinamente, sobre todo vinculada a la producción de estiércol destinado a cultivos agrícolas intensivos debido a la escasa mano de obra y requerimientos de la raza (**Delgado *et al.*, 1998; Esteban Muñoz, 2003**).

Debido a las restricciones en la entrada de pequeños rumiantes al archipiélago -es zona libre de brucelosis- y al sistema de explotación muy tradicional; ambas razas se han mantenido en las islas sin sufrir un fuerte proceso de selección productivo con razas foráneas, manteniendo su rusticidad y adaptación al medio. Muchas razas nativas/locales prosperan en condiciones desfavorables tanto ambientales como de manejo en ausencia de tratamientos preventivos, siendo por tanto más resistentes que razas más seleccionadas (**Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013**). Aunque ambas razas ovinas se explotan en situaciones rústicas, los análisis rutinarios realizados por la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, muestran generalmente recuentos sensiblemente más elevados en la raza CAN que en la CAP, por lo que se realizó una inoculación experimental con *H. contortus* que permitió demostrar que la raza CAP es más resistente que la raza CAN a la infección por este nematodo gastrointestinal (**González *et al.*, 2008**). Uno de los objetivos de este trabajo es constatar si estas diferencias entre razas en inoculaciones experimentales son apreciables estadísticamente en condiciones de campo.

A pesar de que los datos previos sugieren que pueden haber diferencias en los géneros parasitarios y sus cargas en diferentes áreas climáticas de las islas, y que los resultados experimentales sugieren importantes diferencias entre razas en términos de resistencia a parásitos, la mayoría de los veterinarios clínicos que visitan explotaciones ovinas en la isla mantienen protocolos idénticos de control independientemente de la localización de la granja y la raza explotada. Este trabajo pretende valorar la epidemiología de las infecciones por nematodos gastrointestinales combinando diferencias climatológicas y dos razas ovinas con diferencias en resistencia/susceptibilidad, así como intentar definir los momentos de administración de antihelmínticos, preservando así su vida útil, atendiendo a estas diferencias climatológicas y raciales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO Y ANIMALES

La convivencia de las dos razas ovinas en una misma explotación es poco frecuente, pues se trata de dos razas con aptitudes diferentes. Las dos explotaciones seleccionadas en la isla de Gran Canaria aunaban las dos razas, puesto que sus propietarios se dedicaban al sector de la restauración y ofertaban productos de sus propias explotaciones en sus locales.

La granja 1, se localiza al Este de la isla con una temperatura media (máximo/mínimo) aproximada en los tres años del estudio de 22,4/16 °C y una media de precipitaciones de 7,81 mm (Tabla 3.4), se encuentra ubicada a una altura 380 m, latitud 28°0'55.26"N- Longitud 15°28'0.17"O en el municipio de Telde. La granja se sitúa en una región climática identificada como zona de temperatura "templada y suave" (López-Gómez y López-Gómez, 1959; Rodríguez-Ponce *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1997). La granja estaba constituida en el momento del estudio por 400 ovinos de raza Canaria y 80 ovinos Canario de Pelo. La recogida de heces de recto en la granja 1 se realizó desde abril de 2008 hasta julio de 2010 y en total se analizaron 910 muestras, 398 CAP y 512 de ovinos CAN.

Figura 3.1 Fotografías de los ovinos de raza Canaria (izquierda) y Canaria de Pelo (derecha) de la granja 1.



La granja 2, como ejemplo de granja situada al Sur de la isla y con microclima "desértico seco" (López-Gómez y López Gómez, 1959; Rodríguez-Ponce *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1997), tuvo una temperatura media aproximada (máximo/mínimo) de 26/18,9 °C y 1,42 mm de precipitaciones durante el año de estudio. Se encuentra situada a una altitud de 147 m, latitud 27°46'50.38"N longitud 15°37'04.22"O en el municipio de San Bartolomé de Tirajana. Constaba en este periodo de 70 ovinos Canarios y 50 ovinos Canarios de Pelo. La toma de muestras se realizó desde febrero hasta noviembre de 2008, analizándose 389 muestras, 177 CAP y 212 CAN. Por cuestiones ajenas a nuestro grupo de investigación, no fue posible continuar con el muestreo en los dos años siguientes.

Figura 3.2 Fotografía de los ovinos de raza Canaria y Canaria de Pelo de la granja 2.



Durante el periodo de muestreo los ganaderos no realizaron ningún tratamiento antiparasitario. Los muestreos se definieron en cada año por estaciones (Tabla 3.1), con aproximadamente dos muestreos por estación. Los animales fueron seleccionados al azar, no siendo siempre el mismo animal por la desorganización asociada al manejo de las granjas y a que la mayoría de los animales no estaban por entonces identificados. El tamaño muestral también fluctuó en función del acceso a los animales que teníamos cada día de muestreo (Tabla 3.2). Las condiciones de temperatura y humedad medias para el mes de muestreo se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.1 Definición de las estaciones.

DEFINICIÓN DE ESTACIONES	
Estación	Meses
Invierno	Enero a Marzo
Primavera	Abril a Junio
Verano	Julio a Septiembre
Otoño	Octubre a Diciembre

Tabla 3.2 Resumen del muestreo realizado en ambas granjas.

Estación	Raza	Edad	TAMAÑO MUESTRAL n			
			2008		2009	2010
			n Granja 1	n Granja 2	n Granja 1	n Granja 1
Invierno 1	CAP	Adultos	-	11	18	12
		Corderos	-	0	0	6
	CAN	Adultos	-	15	19	5
		Corderos	-	0	0	9
Invierno 2	CAP	Adultos	-	16	22	22
		Corderos	-	0	0	0
	CAN	Adultos	-	13	25	21
		Corderos	-	7	1	0
Primavera 1	CAP	Adultos	25	23	14	18
		Corderos	3	0	5	0
	CAN	Adultos	51	22	28	20
		Corderos	1	21	1	0
Primavera 2	CAP	Adultos	48	32	21	-
		Corderos	4	0	0	-
	CAN	Adultos	89	18	25	-
		Corderos	1	23	0	-
Verano 1	CAP	Adultos	16	28	-	19
		Corderos	3	0	-	0
	CAN	Adultos	21	10	-	20
		Corderos	0	18	-	0
Verano 2	CAP	Adultos	25	14	21	-
		Corderos	3	5	1	-
	CAN	Adultos	38	10	18	-
		Corderos	1	9	0	-
Otoño 1	CAP	Adultos	30	18	18	-
		Corderos	1	4	0	-
	CAN	Adultos	43	16	19	-
		Corderos	0	8	0	-
Otoño 2	CAP	Adultos	20	21	21	-
		Corderos	2	5	0	-
	CAN	Adultos	38	11	18	-
		Corderos	0	11	0	-

3.2 DATOS CLIMATOLÓGICOS

Los datos climatológicos fueron cedidos por la Agencia Española de Meteorología y las estimaciones de temperatura y pluviometría fueron calculadas mediante un análisis de regresión realizado por el Dr. Oscar González Díaz (Profesor Titular de Universidad de la ULPGC, Edificio de Ciencias Básicas, ULPGC). Las estaciones meteorológicas de dónde se obtuvieron los datos vienen recogidas en la tabla 3.3. Los datos meteorológicos utilizados se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.3 Identificación de las estaciones meteorológicas de donde proceden los datos climatológicos.

ESTACIONES METEOROLÓGICAS						
Granja	Estación	Ubicación	Altitud	Latitud	Longitud	Dato
1	C657E	Campo de Golf - Santa Brígida	450m	28°01'59''N	15°27'42.2''O	Precipitación
	C658K	El Tejar - Santa Brígida	390m	28°02'40''N	15°29'43.2''O	Temperatura
	C648N	Centro Forestal Doramas - Telde	344m	27°59'15''N	15°27'28.2''O	Precipitación Temperatura
2	C639M	Centro Insular de Turismo - San Bartolomé de Tirajana	45m	27°45'29''N	15°34'32.2''O	Precipitación Temperatura
	C639F	El Tablero - San Bartolomé de Tirajana	90m	27°46'15''N	15°36'10.2''O	Precipitación
	C639U	El Matorral - San Bartolomé de Tirajana	41m	27°48'45''N	15°27'12.2''O	Temperatura

Tabla 3.4 Condiciones estacionales de temperatura y humedad medias para el mes de muestreo para el año 2008 en ambas granjas y, para 2009 y 2010 en la granja 1.

2008						
Estación	Temperatura Máxima (°C)		Temperatura Mínima (°C)		Pluviometría Mensual (mm)	
	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2
Invierno 1	-	23,80	-	16,90	-	0,38
Invierno 2	-	25,40	-	16,90	-	0,00
Primavera 1	19,10	25,60	16,50	18,80	10,00	0,13
Primavera 2	21,30	27,80	16,00	19,40	8,00	0,00
Verano 1	23,80	28,50	18,60	21,90	0,00	0,00
Verano 2	23,50	28,50	18,60	21,80	9,00	5,80
Otoño 1	19,60	26,50	13,63	19,60	23,00	0,13
Otoño 2	19,60	24,60	13,63	17,40	23,00	0,40
2009						
Estación	Temperatura Máxima (°C)		Temperatura Mínima (°C)		Pluviometría Mensual (mm)	
	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2
Invierno 1	17,39		12,03		30,26	
Invierno 2	18,23		10,42		16,07	
Primavera 1	20,02		12,77		15,42	
Primavera 2	22,93		14,66		0,26	
Verano 2	24,73		18,88		5,46	
Otoño 1	24,94		17,79		1,23	
Otoño 2	21,43		15,25		15,81	
2010						
Estación	Temperatura Máxima (°C)		Temperatura Mínima (°C)		Pluviometría Mensual (mm)	
	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2	Granja 1	Granja 2
Invierno 1	19,91		12,64		7,69	
Invierno 2	21,21		13,97		0,13	
Primavera 1	21,89		15,49		2,26	
Verano 1	27,49		19,55		0,86	

3.3 PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE HECES

El recuento de huevos en heces se llevó a cabo por medio del método de McMaster modificado. En algunos muestreos, con las heces que sobraron de cada recuento se preparó un “pool” y se cultivaron a temperatura ambiente durante 12 días para conseguir la eclosión de los huevos y el desarrollo larvario hasta el estadio 3, controlando la humedad y removiendo regularmente para evitar la proliferación de hongos. La recuperación de las larvas se realizó por medio del método de Baermann, con un filtrado posterior (**modificado de MAFF, 1989**). La identificación larvaria de nematodos gastrointestinales se realizó siguiendo las guías descritas por **van Wyk et al., 2004**, utilizando para ello un microscopio invertido (Olympus CKX41) con cámara de fotos digital acoplada (ProgRes C12PLUS) que permitió tomar las medidas de longitud total y vaina de la cola y visualizar la forma de la “cabeza”. En total se identificaron en cada uno de los muestreos seleccionados, como mínimo 30 larvas elegidas al azar.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable Recuento de Huevos en Heces (HPG) se transformó mediante $\text{Log}_{10}+1$ para aproximar los datos a una distribución normal. El test estadístico usado para el análisis fue el Modelo Lineal General (GLM) Univariante, teniendo en cuenta como variables LogEPG o cada género/especie parásita (*Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia circumcincta*, o *Haemonchus contortus*) según el caso y, como factores fijos estación, raza y año (esta última variable solo en la granja 1). En la granja 2, la escasa producción de huevos en esta región más árida, supuso una menor cantidad de larvas identificadas, por los que no se pudo realizar el GLM para la identificación larvaria. Para la granja 1, con el fin de poder realizar el GLM de la identificación, se fusionaron los dos muestreos de cada estación en una sola variable. Probabilidades $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

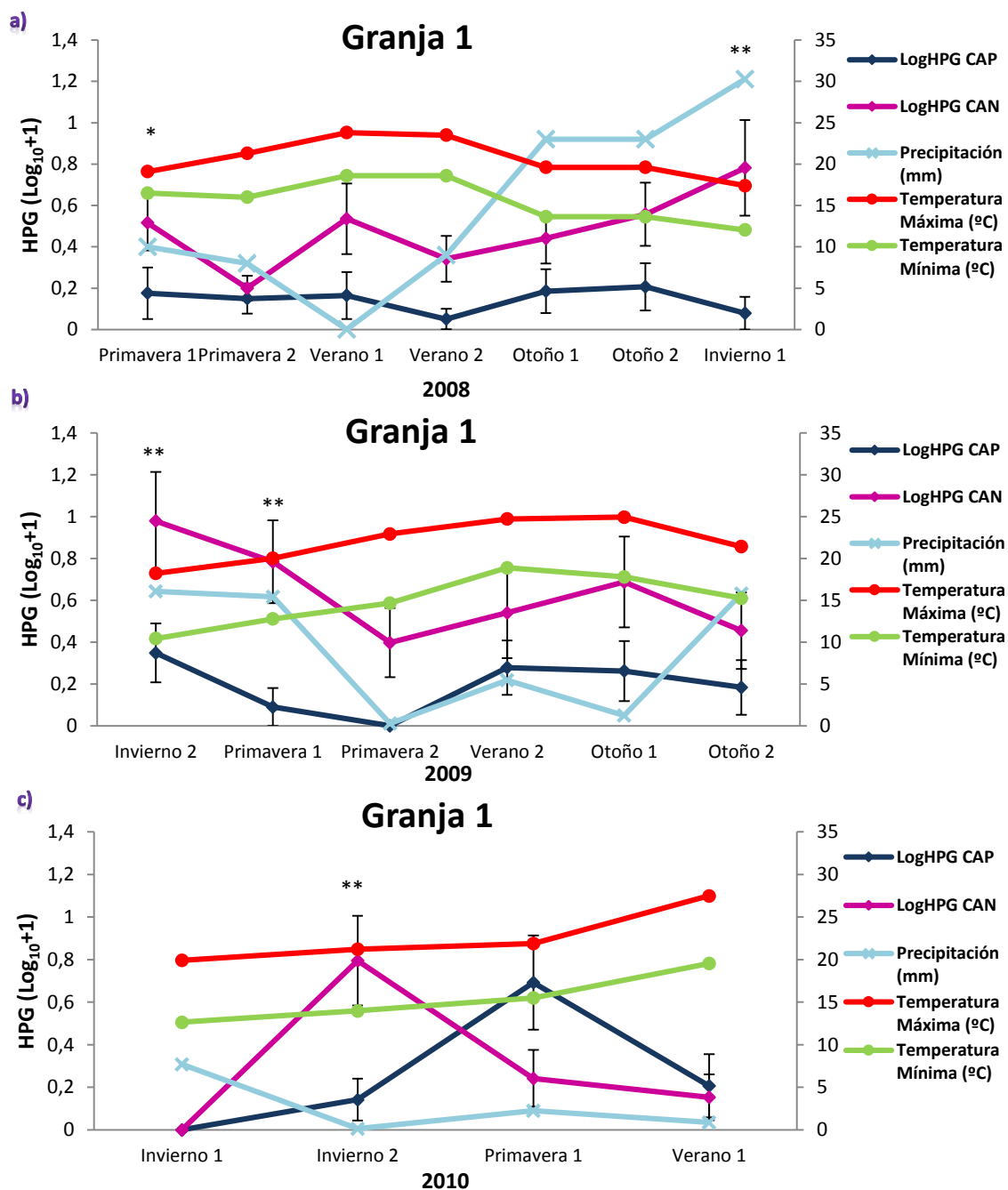
4. RESULTADOS

4.1 GRANJA 1

4.1.1 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas dentro de estación y de año

Se observó recuento de huevos en heces significativamente mayor en el ovino CAN con respecto a CAP en Primavera 1 y en Invierno 1 en 2008, en Invierno 2 y Primavera 1 en 2009 y en Invierno 2 en el año 2010 (Figura 4.1a, 4.1b, 4.1c).

Figura 4.1 Representación gráfica de los recuentos de huevos en heces transformados a $\text{Log}_{10}+1$ (HPG) de las distintas razas (CAP y CAN) junto con las condiciones de temperatura máxima-mínima y precipitaciones de la zona en el momento de la toma de muestras. * Indica $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.



4.1.2 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas entre años y estaciones

Sin distinción en años y estaciones, CAN presentó significativamente más huevos que CAP ($p=0,000$). A su vez, dentro de año, sin distinguir estaciones, CAN presentó significativamente más huevos en heces que CAP durante 2008 y 2009. Dentro de estaciones, diferenciando raza pero no año, se observó un incremento significativo en la producción de huevos en CAN con respecto a CAP, a lo largo de todo el otoño e invierno.

4.1.3 Diferencias en los recuentos de huevos dentro de razas

Dentro de raza, CAP no presenta diferencias significativas entre años. Dentro de estaciones sin considerar el año, en Primavera 1 se contabilizaron más huevos que el resto de estaciones, si bien estas diferencias no fueron significativas. Entre estaciones dentro de año, se observó un incremento significativo de los recuentos de huevos en Primavera 1 con respecto Invierno 1, Invierno 2 y Verano 1 en el año 2010. Es decir, el inicio de la primavera es el momento en el que suelen excretar más huevos de parásitos los animales de esta raza en esta explotación.

Por otro lado CAN presentó a modo general un recuento de huevos mayor en 2009 respecto a 2010. En cuanto a estaciones sin considerar el año como factor, presentó un mayor recuento de huevos Invierno 2, siendo solo estadísticamente significativo con respecto a Primavera 2. Sin embargo dentro de año, sólo se observó un incremento significativo de invierno 2 con respecto invierno 1 en el año 2010.

4.1.4 Identificación Larvaria

El género y especies de nematodos gastrointestinales predominantes fueron *Trichostrongylus* spp., *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus*. Dada la baja prevalencia (8-10%), no se tuvieron en cuenta en el análisis de los datos la identificación de larvas de *Cooperia curticei* (una ocasión) y de *Bunostomum* spp. (dos ocasiones). El género predominante fue *Trichostrongylus* spp. en todos los muestreos, con una prevalencia casi siempre superior al 50% (Figura 4.2), seguido por *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus*.

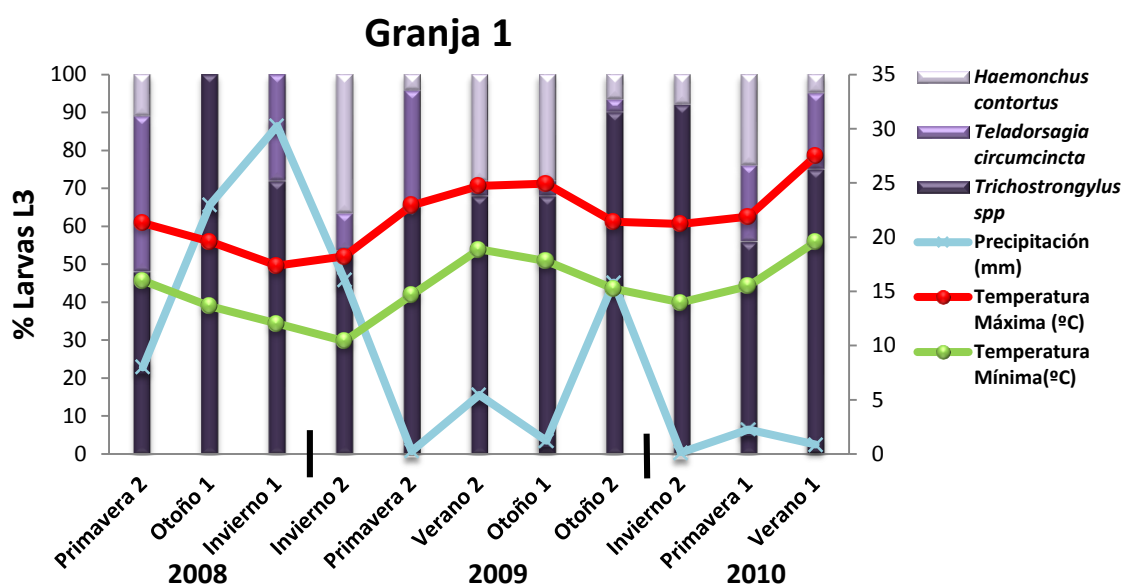
Trichostrongylus spp. globalmente, no presenta diferencias significativas en su frecuencia de aparición entre años y tampoco entre estaciones. Entre estaciones dentro de año tampoco presenta diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.

Teladorsagia circumcincta, sin considerar las estaciones como factor, mostró prevalencias significativamente mayores el año 2008, en comparación con los años 2009 y 2010. Aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0.092$), 2010 presentó mayor prevalencia que 2009. Es decir, la presencia del parásito varió significativamente entre años. Dentro de estaciones, sin

tener en cuenta el año, se observaron prevalencias significativamente mayores en Primavera. Tanto en Invierno como en Verano fueron también significativamente mayores que en Otoño, siendo por tanto esta estación en la que se detectó con menos frecuencia este parásito.

Haemonchus contortus no mostró diferencias significativas entre años sin considerar las estaciones. Del mismo modo, no mostró diferencias significativas entre estaciones sin tener en cuenta año. Tampoco mostró diferencias entre estaciones dentro de año. Es decir, estadísticamente no fueron significativas las pequeñas fluctuaciones en su prevalencia.

Figura 4.2 Representación gráfica en columnas del % de larvas del género *Trichostrongylus spp.*, y de las especies *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus* obtenidas tras la identificación larvaria de los coprocultivos de la granja 1 en los muestreos de los años 2008, 2009 y 2010, con representación en líneas y puntos de las condiciones de temperatura máxima-mínima (°C) y precipitaciones (mm) en el momento del muestreo. La barra negra en la base del gráfico indica la separación entre años.

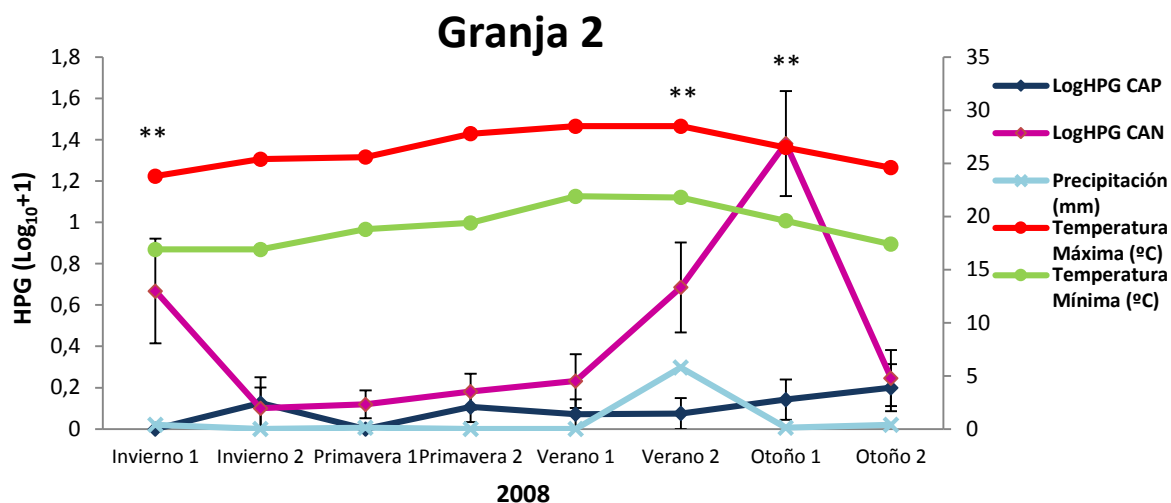


4.2 GRANJA 2

4.2.1 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas dentro de estación

Los recuentos de huevos en heces fueron significativamente mayores en el ovino CAN, con respecto a CAP, en Invierno 1, Verano 2 y Otoño 1. (Figura 4.3). Al analizar los datos de los recuentos de huevos en heces de los corderos, se observó un incremento significativo en la raza CAN con respecto a CAP en Verano 2 y Otoño 1.

Figura 4.3 Representación gráfica de los recuentos de huevos en heces transformados a $\text{Log}_{10}+1$ (HPG de las distintas razas (CAP y CAN) junto con las condiciones de temperatura máxima-mínima y precipitaciones de la zona en el momento de la toma de muestras. * Indica $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.



4.2.2 Diferencias en los recuentos de huevos entre razas y estaciones

Globalmente los ovinos de raza CAN presentaron mayores recuentos de huevos que los CAP ($p=0,000$). Entre estaciones, la que tiene un recuento mayor es Otoño 1, siendo este incremento significativo con respecto Invierno 2, Primavera 1, Primavera 2, Verano 1 y Otoño 2. Aunque la diferencia no es significativa estadísticamente, las estación que menor recuento presentó fue Primavera 1.

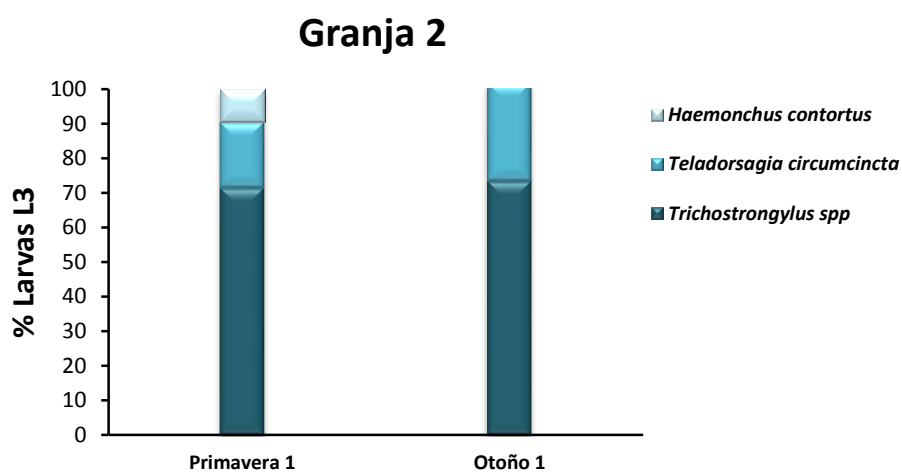
4.2.3 Diferencias en los recuentos de huevos dentro de razas

Dentro de raza, CAP - apenas excretaron huevos en esta explotación- no mostró diferencias significativas entre estaciones. Por otro lado, para CAN el Otoño 1 resultó ser la estación que mayores recuentos presentó, siendo estadísticamente superiores con respecto Invierno 2, Primavera 1, Primavera 2, Verano 1 y Otoño 2. Dentro de esta raza, Invierno 2 fue la estación en la que menor, aunque no estadísticamente significativo, recuento de huevos en heces se registró.

4.2.4 Identificación Larvaria

El género de nematodos gastrointestinal predominante fue *Trichostrongylus spp.* seguido de la especie *Teladorsagia circumcincta*. Mucho más vestigial fue la presencia de *Haemonchus contortus* (Figura 4.4).

Figura 4.4 Representación gráfica en columnas de la identificación larvaria obtenida tras el coprocultivo de las heces recogidas en la granja 2 en los muestreos del año 2008.



5. DISCUSIÓN

Los recuentos de huevos en heces (HGH) son utilizados como indicador de resistencia a parásitos por su relación con la carga parasitaria (**Macchioni et al., 2007**). En este sentido, en estudios comparados entre algunas razas ovinas se ha observado resistencia a nematodos gastrointestinales, ya sea en infecciones naturales o experimentales. Entre los ejemplos, se pueden destacar a la Red Maasai comparada con Dorper (**Mugambi et al. 1996, 1997, 2005; Baker et al. 2004**) St-Croix con Dorset (**Gamble y Zajac, 1992; Burke y Miller, 2004**), Santa Inés comparada con Ile France y Sulffolk (**Amarante et al. 2004**) Barbados Black Belly con INRA 401 (**Gruner et al. 2003; Aumont et al., 2003; Terefe et al., 2007a**), la Florida Native con Rambouillet (**Radhakrishnan et al., 1972; Amarante et al., 1999**), Texel con Suffolk (**Good et al., 2006**), Katahdin comparada con mestizos de Dorset y de Dorper (**Vanimisetti et al., 2004b**) Gulf Coast Native con Sulffolk (**Miller et al., 1998**) Lohi comparada con Thalli y Kachhi (**Saddiqi et al., 2010**) o Criolla Lanada con Corriedale (**Bricarello et al., 2004**). En esta línea, nuestro grupo demostró que los ovinos de la raza Canario de Pelo son más resistentes que los ovinos de la raza Canaria en inoculaciones experimentales con *Haemonchus contortus* (**González et al., 2008**). Con el fin de observar si estas diferencias entre razas también estaban presentes en infecciones naturales, se realizó este estudio de campo en el que, efectivamente, se observó que los ovinos de raza CAP presentaron menores HGH que los ovinos de la raza CAN, demostrándose que también son más resistentes en infecciones naturales. Esta diferencia en HGH no solo se observó en los individuos adultos, sino que también se observaron diferencias significativas en los HGH de los corderos, como se describió en el apartado de resultados de la granja 2, lo que sugiere que los corderos también son más resistentes. Este fenómeno también está descrito en corderos de otras razas resistentes como Barbados Black Belly (**Gruner et al., 2003**), Red Maasai (**Mugambi et al., 1996**), Florida Native (**Radhakrishnan et al., 1972**) y/o Gulf Coast Native (**Li et al., 2001**), lo que podría sugerir una respuesta más temprana a la infección por nematodos gastrointestinales de lo descrito en la bibliografía en razas comerciales (**Smith et al., 1985**).

Actualmente, las resistencias por parte de los parásitos a los diferentes tratamientos descritas en varios países (**van Wyk et al., 1999; Bartley et al., 2003; Čerňanská et al., 2006; Coles et al., 2006; Álvarez-Sánchez et al., 2006; Cezar et al., 2010; Saeed et al., 2010; Martínez-Valladares et al., 2013a; Lyndal-Murphy et al., 2014; Liébano-Hernández et al., 2015; Van den Brom et al., 2015**) están comprometiendo las producciones ganaderas, por lo que establecer un adecuado calendario de tratamiento y/o establecer medidas de control alternativas, entre los que se encuentra la selección de razas/individuos resistentes, podría permitir alargar la vida útil de los fármacos. Aplicar un tratamiento correcto tiene gran importancia y seleccionar los

criterios a seguir en estos tratamientos será fundamental. Así **Pedreira et al., 2006**, observaron que las granjas que administraban tratamientos antihelmínticos basados en la experiencia del granjero presentaron mayores recuentos de huevos en heces que aquellas que los aplican siguiendo el criterio veterinario o basados en la recomendación comercial.

Molina et al., 1997, basándose en el trabajo de **Rodríguez-Ponce et al., 1995** y **López-Gómez y López-Gómez, 1959**, describen 4 zonas con diferencias climatológicas en la isla en un estudio epidemiológico realizado en granjas de cabras de Gran Canaria. En base a esta descripción, la granja 1 encuadraría dentro de la zona de temperatura “templada y suave” y la granja 2 estaría ubicada en un clima de “desértico seco” con temperaturas más elevadas y menores precipitaciones. Observando la evolución de la parasitología a lo largo de los tres años de muestreo de la granja 1, sin tener en cuenta las estaciones, solo hubo diferencias en los recuentos de huevos entre razas en el año 2008 y 2009, quizás porque el muestreo del año 2010 no fue completo. En todo caso, y aunque debe validarse en el futuro, esto sugiere que los planes de tratamientos quimioprofilácticos deberían amoldarse a las condiciones concretas de cada año. Por otro lado, comparando razas dentro de estaciones sin tener en cuenta los tres años en la granja 1, CAN presentó recuentos significativamente mayores en Otoño e Invierno con respecto a CAP, correspondiendo con los periodos con mayores precipitaciones (Figura 4.1), lo que favorecería la parasitosis, haciendo más evidente la diferencia en la susceptibilidad/resistencia. Además, este periodo coincide con la época de partos en la raza CAN. Comparando las dos granjas en el año 2008, la raza CAP en la granja 2 tiene un recuento de 4 ± 2 hpg frente a los 10 ± 4 hpg de la granja 1, no obstante, a pesar de que son recuentos muy bajos por la resistencia de esta raza, y pese a no existir diferencias significativas por la variación individual, sugiere que las diferencias climáticas Norte-Sur favorecidas por la formación del mar de nubes que suavizan las temperaturas y favorecen la retención de la humedad y precipitaciones en la zona Norte de la isla, influyen en el ciclo de los parásitos. Estos resultados contrastan con los de **Molina et al., 1997**, que observaron que los animales de la zona desértica presentaron mayores cargas que los animales de la zona de temperaturas suaves, sin embargo no se puede hacer una comparativa directa con este estudio, pues los hospedadores y la variable parasitológica cuantificada -vermes adultos- son diferentes. Algo similar sucede con los ovinos de raza CAN en la granja 2, salvo un pico de excreción de huevos observado en esta granja más meridional, que podría atribuirse a la introducción de animales del municipio de Valleseco, con mucha más pluviometría. Estos movimientos de animales son una constante en los modelos de producción tradicionales arraigados en las islas.

Las diferencias entre razas observadas en ambas granjas en las prevalencias aparecen en los momentos en los que aumentan los recuentos de huevos de nematodos gastrointestinales en la raza CAN y coinciden con incrementos de las precipitaciones, con descensos de las temperaturas y con el parto (Figuras 4.1 y 4.3), por lo que tienen lugar cuando las condiciones son más favorables para los parásitos (**Procter y Gibbs, 1968; O'Connor et al., 2006**). Visualizando los recuentos en cada raza, los recuentos en la raza CAP se mantuvieron bajos (<50 huevos por gramo en la granja 1 – Figura 4.1– y <10 en la granja 2 – Figura 4.3) y no se observaron diferencias interanuales, lo que sugiere que los tratamientos en esta raza podrían limitarse, y se debería valorar si estas pequeñas cargas realmente producen pérdidas productivas que compensen los costes de los tratamientos en aquellas estaciones del año dónde se producen los picos puntuales (Figura 4.1) como es el caso de la Primavera en la granja 1 (2010) y, de la misma manera, es muy dudosa la necesidad de tratamientos en la granja 2. Es decir, dependiendo de la zona de cría del ganado, podría modificarse el plan quimioprofiláctico en granjas que exploten CAP.

Por el contrario en los ovinos CAN, los recuentos son algo más elevados, aunque también bastante bajos si se comparan con otros estudios realizados con otras razas en otras situaciones geográficas (**Mugambi et al., 1997; Baker et al., 2004; Amarante et al., 2004**). Aunque se deberían estimar las consecuencias que estas cargas pueden tener en los rendimientos productivos de los animales de esta raza, en caso de aplicar tratamientos convendría prevenir el incremento en los recuentos experimentados en la granja 1 – y por tanto en la región de clima “templado-suave” – a principios del invierno y, a finales del verano en la granja 2 – clima más seco. De todos modos, como se discutió anteriormente, conviene señalar que el pico que se observa en la Figura 4.3 en la granja 2, pudo favorecerse por la introducción de animales sin desparasitar procedentes de una explotación situada en un municipio de la zona Norte de la isla (más húmeda) en Verano 2 (inicio del pico – Figura 4.3), viéndose probablemente los parásitos favorecidos por las condiciones climáticas y fisiológicas (parto) de los animales. Otra observación que no debe pasar desapercibida, es la caída de recuentos en ambas razas en Invierno 1 de 2010 en la granja 1, que podría sugerir la administración de un tratamiento antihelmíntico que el ganadero no haya comunicado.

Los principales géneros/especies parásitas identificadas tras el coprocultivo fueron *Trichostrongylus spp.*, *T. circumcincta* y *H. contortus*. La presencia de estas tres especies en relación con los bajos recuentos de huevos en heces en CAP con respecto a CAN, sugieren que la raza CAP podría ser resistente también a *Trichostrongylus spp.* y a *Teladorsagia circumcincta*. En este sentido, **Gruner et al., 2003** demostraron que los corderos Barbados Black Belly, reconocidos como resistentes a infecciones por *Haemonchus contortus*, son también resistentes

a *Trichostrongylus colubrifformis* y, en menor medida, a *Teladorsagia circumcincta*. Trabajos experimentales futuros permitirán constatar si, tal y como estos datos sugieren, los ovinos de raza CAP son más resistentes que los CAN a infecciones experimentales por *Trichostrongylus spp* o por *T. circumcincta*.

Es bien conocido que la humedad y temperatura son factores determinantes para el desarrollo y supervivencia de los estadios de vida libre de estas especies parásitas. **O'Connor et al., 2006**, citan a modo de resumen como temperaturas óptimas para el desarrollo desde el huevo no embrionado hasta el estadio infectante L3 de *T. colubrifformis*, de 22 a 33°C, siendo aproximadamente entre 25 y 30°C el mejor rango; para *T. circumcincta* de 16 a 30°C, considerándose aproximadamente entre 21 y 25°C el mejor rango y, para *H. contortus* de 25 a 37°C, siendo aproximadamente el rango de temperaturas más adecuado entre 31 y 34°C; si bien las tres especies se ven afectadas por la desecación, los estadios pre-infectantes de *H. contortus* son los más susceptibles a esta (**O'Connor et al., 2006**). Por otro lado **Leathwick, 2013**, a través de un modelo matemático usando como base de datos varias referencias bibliográficas, estimó que la temperatura óptima de *T. colubrifformis* es 18°C, de *T. circumcincta* es 16°C y de *H. contortus* es 22°C. En este sentido, la granja 1 y la granja 2 siempre se mantuvieron dentro de estos rangos, si bien la granja 2 presentó siempre las mayores temperaturas y prácticamente sin precipitaciones todo el año, lo que viene reflejado en los bajos recuentos de huevos en heces en esta granja. La falta de heladas y la protección a la insolación que supone la bruma que producen los alisios, pueden explicar que existan parásitos todo el año en la granja 1, y por tanto, en explotaciones ubicadas en el área de temperaturas “templada y suave”. El principal factor que modula las cargas parasitarias en estas dos regiones geográficas ha sido la pluviosidad y como consecuencia la humedad, tal y como observaron **Martínez-Valladares et al., 2013b** o como sugieren **O'Connor et al., 2006**, quienes consideran que en regiones con climas de temperaturas cálidas, es la humedad el principal factor que modula el desarrollo de las fases de vida libre a la forma infectante.

En la granja 1 *Trichostrongylus spp.* fue el género predominante a lo largo de los muestreos, seguido por fluctuaciones en la prevalencia de *T. circumcincta* y *H. contortus* (Figura 4.2), si bien la única especie que mostró diferencias significativas entre años a lo largo del estudio fue *T. circumcincta*, siendo más frecuente en la estación de Primavera y en el año 2008, a lo largo de los otros dos años fluctúa, pareciendo que aumenta su prevalencia cuando las precipitaciones son bajas, similar a lo observado por **Molina et al., 1997**, quizás por la menor dependencia a la humedad en comparación con *H. contortus* y, en menor medida, *Trichostrongylus spp.* (**O'Connor et al., 2006**). Por otro lado, *H. contortus* parece fluctuar con las temperaturas y

precipitaciones, llegando a desaparecer con los descensos más pronunciados de temperatura, en particular las máximas (Figura 4.2). **Molina et al., 1997** recogen que esta especie parásita se detecta en cabras en zonas más cálidas y húmedas, similar a lo observado como patrón estacional en este estudio. Por otro lado, *Trichostrongylus spp.* tiene mayor prevalencia en Otoño – Invierno, y su mayor presencia parece que fluctúa con las precipitaciones (Figura 4.2), de nuevo similar a lo observado por **Molina et al., 1997**, que recogen que esta especie incrementa su prevalencia en cada zona de la isla al aumentar las precipitaciones. El patrón de temperaturas óptimas observadas corresponde con el mejor desarrollo en temperaturas más bajas de *T. circumcincta* y *T. colubriformis*, en relación a *H. contortus*, descrito previamente (**O'Connor et al., 2006**).

En la granja 2, las prevalencias de los distintos géneros/especies de nematodos gastrointestinales fueron similares a los descritos en la granja 1. El género predominante fue nuevamente *Trichostrongylus spp.*, seguido por *T. circumcincta* y por *H. contortus*. En esta granja no se pudo realizar análisis estadístico, ya que solo se consiguió realizar identificación larvaria de dos coprocultivos debido a los bajos recuentos de huevos y al volumen de heces recogidos. No obstante, hay que destacar que el pico de huevos que se observa en la raza CAN en Otoño 1 (Figura 4.3), está producido por las especies poco prolíficas (100-200 huevos al día/hembra) *Trichostrongylus spp.* y *T. circumcincta* (**Hansen y Perry, 1994**), resultando también llamativo que los ovinos de la raza CAP mantienen antes, durante y después del dicho pico de huevos, sus recuentos de huevos casi sin alteración, lo que nos sugiere, por un lado, que las condiciones climatológicas no son adecuadas para el mantenimiento de parásitos fuera del hospedador al no haber infección de los otros animales y, por otro, que la raza CAP podría desarrollar resistencia multiespecie.

En relación a la prevalencia de las distintas especies, **Molina et al., 1997** observaron en caprinos que la especie predominante fue *T. circumcincta*, seguida de *T. axei* y *H. contortus*; en la zona “desértica”, que corresponde con la zona de la granja 2 de este estudio, no se observó *H. contortus*, especie que también está ausente en uno de los dos puntos con datos de identificación larvaria de esta granja, si bien este estudio no aporta datos climatológicos concretos de los momentos de sacrificio, solo que tuvo lugar en las estaciones húmedas, las fluctuaciones de esta especie podría ser un fenómeno de adaptación del parásito a la condiciones desfavorables en esta zona. No obstante, hay que tener en cuenta que aunque haya similitudes, los dos estudios están realizados en hospedadores diferentes (caprino-ovino) y, aparte de las condiciones climáticas, esto puede ser un factor limitante en la presencia o

ausencia de una especie parásita por mayor susceptibilidad/resistencia del hospedador a dicha especie parásita.

Estas fluctuaciones estacionales observadas en las distintas especies parásitas (Figura 4.2 – 4.4), sugieren que podrían estar teniendo lugar fenómenos como la hipobiosis (**Miller et al., 1998; Ng'ang'a et al., 2004**), diferencias en la contaminación de los pastos o incluso un fenómeno como el descrito por **Waghorn et al., 2011**, que reportaron diferencias en la proporción de huevos que eclosionan y desarrollan a L3 en la superficie del pasto y los que están enterrados, sugiriendo que las larvas que eclosionan enterradas permanecen más protegidas de las condiciones climáticas adversas; estando también descrita la tolerancia a la desecación del estadio infectante de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, proceso en el que se produce una reducción de la permeabilidad de la vaina protectora (cutícula de la L2) que permite entrar a las L3 en un estado de anhidrobiosis que incrementa su supervivencia incluso a bajas temperaturas (0°C) (**Lettini y Sukhdeo 2006; Yang et al., 2015**). Estos aspectos deberían de estudiarse en el futuro para poder valorar su efecto en la epidemiología de las infecciones por nematodos gastrointestinales en explotaciones ovinas en la isla de Gran Canaria.

En resumen, CAP es más resistente a infecciones naturales que CAN, aunque considerando los bajos recuentos observados en la raza CAN, esta parece mostrar también resistencia a las infecciones. Dados los bajos recuentos observados en CAP y a la presencia de los tres géneros/especies parásitos observados, *Trichostrongylus* spp., *T. circumcincta* y *H. contortus*, CAP podría ser más resistente que el ovino CAN a los mismos. No obstante, habría que realizar inoculaciones experimentales con *Trichostrongylus* spp. y con *T. circumcincta* para confirmar este extremo. En este estudio, las prevalencias de estos parásitos se relacionan principalmente con el aumento de las precipitaciones y con el descenso de las temperaturas, por lo que los tratamientos deberían considerar la localización de la granja, la raza ovina, las condiciones fisiológicas (periparto) y la estación, valorándose su aplicación en las zonas y estaciones más húmedas, que generalmente corresponden en estas zonas con las más frías. No obstante, dado los bajos recuentos de huevos en heces en ambas razas y la ausencia de signos de enfermedad, sería necesario realizar estudios que permitan valorar el efecto nocivo de esos parásitos en los rendimientos productivos, pudiéndose seguir un modelo de producción más “ecológico” evitándose los tratamientos, o tratando únicamente los animales que presentan sintomatología, favoreciendo de este modo la vida útil de los fármacos y evitando los efectos adversos asociados a su uso.

CAPÍTULO II. EL OVINO RESISTENTE CANARIO DE PELO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON *HAEMONCHUS CONTORTUS* CONTROLA ANTES LA CARGA PARASITARIA QUE SU LONGITUD

1. RESUMEN

Haemonchus contortus es un parásito hematófago que ocasiona grandes pérdidas económicas, no solo productivas, sino también por tratamientos farmacológicos. Es bien conocido que los nematodos gastrointestinales han desarrollado resistencias a los fármacos existentes en el mercado, haciendo difícil su control. Implantar nuevos métodos de control e identificar nuevas dianas farmacológicas, son objetivos prioritarios para reducir el impacto negativo de estas parasitosis. Las razas locales, más resistentes generalmente que las comerciales, pueden ser recursos genéticos de gran valor (**Piedrafita *et al.*, 2010**). En Gran Canaria conviven dos razas ovinas con diferencias en susceptibilidad a la infección por *Haemonchus contortus*, la raza Canaria de Pelo (CAP), resistente, y la raza ovina Canaria (CAN), más susceptible. La particularidad de esta mayor resistencia es el estadio del parásito frente al que se desarrolla la misma, pues la diana en este caso sería el estadio adulto, produciendo una reducción de la carga parasitaria, fecundidad y longitud a los 28 días post-inoculación (dpi) (**González *et al.*, 2008; Hernández, 2011**). En este capítulo se demuestra que las ovejas de pelo desarrollan respuestas protectoras frente a *Haemonchus contortus* que le permiten controlar la carga parasitaria entre los días 7-21 pi, pero no la longitud ni la fecundidad de los vermes, que se controlaría entre los días 21-28 pi (**Hernández, 2011**). A diferencia de lo descrito en la bibliografía, la reducción de vermes es independiente del establecimiento larvario (no hay diferencias entre razas en los recuentos de parásitos a los 7 dpi) y de la población de leucocitos globulares en la mucosa del abomaso, por lo que se trata de un mecanismo de control de la carga parasitaria no descrito hasta ahora, en el que pudieran estar implicados los linfocitos CD4⁺. Aunque no hay diferencias entre razas en la longitud de las larvas, los niveles de IgA local específica nos sugieren distintas dianas en cada raza y que la generación de la respuesta local de IgA se vincula con estadios adultos en la raza resistente. Además, se presentan datos que sugieren que la raza resistente es capaz de reconocer más epítomos del parásito adulto, lo que podría explicar que sus respuestas protectoras sean más eficaces.

2. INTRODUCCIÓN

La resistencia frente a nematodos gastrointestinales se caracteriza por una reducción en la fecundidad, del tamaño de los vermes y de la carga parasitaria. La fecundidad se ha correlacionado positivamente con la longitud y carga parasitaria en *Teladorsagia circumcincta* (Stear *et al.*, 1995; Stear y Bishop, 1999; Stear *et al.*, 1999) con longitud en infecciones por *H. contortus* (Ractliffe y Lejambre, 1971; Lacroux *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2008). La reducción en la longitud de los vermes, y en consecuencia de su fecundidad (Stear y Bishop, 1999), está asociado principalmente a la producción local de IgA específica orientada a etapas larvarias del parásito en infecciones por *T. circumcincta* (Stear *et al.*, 1996; Martínez Valladares *et al.*, 2005). En infecciones por *H. contortus*, la IgA específica frente a estadios larvarios se asocia igualmente a reducciones en la longitud de los vermes (Lacroux *et al.*, 2006) y a la fecundidad (Gill *et al.*, 1993a; Strain y Stear, 2001; Amarante *et al.*, 2005). Sin embargo, las reducciones en las cargas parasitarias se suelen vincular con reducciones en el establecimiento larvario, ya sea mediante un rechazo tardío, mediado por los eosinófilos –probablemente mediante mecanismos ADCC (Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity)- (Rainbird *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2000a; 2000b; 2006; Nisbet *et al.*, 2015) u otro de respuesta más rápida, vinculado a los leucocitos globulares, que impediría a las larvas penetrar la mucosa, fenómeno conocido como autocuración (Balic *et al.*, 2000a; 2000b; 2002).

En estudios previos, se ha constatado que no hay diferencias en el desarrollo de la infección experimental con *H. contortus* a los 7 dpi entre dos razas ovinas autóctonas canarias, el ovino CAP y el CAN, que sí son evidentes, con diferencias significativas a los 28 dpi en carga parasitaria, longitud y fecundidad de los vermes (González *et al.*, 2008; Hernández, 2011). Esto contrasta con la información recopilada en otras razas ovinas comerciales, en las que se ha estipulado que es el estadio larvario (L3) contra el que se establece la respuesta protectora. El objetivo de este trabajo es constatar si en un punto anterior -21 dpi- de la infección experimental con 20.000 L3 de *H. contortus*, se observan diferencias entre razas en la evolución de la infección que permitan acotar mejor el momento en el que se establecen los mecanismos protectores de la raza resistente CAP, así como caracterizar esta respuesta protectora, incluyendo la producción de inmunoglobulinas en los nódulos linfáticos locales, las poblaciones celulares de la pared del abomaso y la capacidad del mucus del abomaso para reducir la movilidad de los parásitos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Diecinueve corderos machos de la raza CAP y dieciocho de la raza CAN fueron adquiridos en el momento del destete en granjas de Gran Canaria y alojados en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (España) hasta aproximadamente el año de edad. Los animales se alimentaron con una ración comercial de granulado para ovinos y agua *ad libitum* durante todo el periodo experimental. A su llegada a las instalaciones, se desparasitaron con levamisol (Cyver, Fort Dodge, España) a la dosis recomendada (1 ml/10 kg de peso corporal), manteniéndose libres de parásitos hasta el inicio de la experiencia. Catorce animales de la raza CAP y trece de la raza CAN fueron inoculados intrarruminalmente con 20.000 L3 de *H. contortus* con el fin de reproducir infecciones previas efectuadas por nuestro grupo (**González et al., 2008; Hernández, 2011**). Cinco animales sin infectar de cada raza fueron sacrificados como controles; 6 animales de la raza CAP y 5 de la raza CAN fueron sacrificados a los 7 dpi y, 8 animales de cada raza fueron sacrificados a los 21 dpi. Tal y como se ha descrito detalladamente en el capítulo de material y métodos, se utilizó la cepa de *H. contortus* donada por los Dres. Knox y Bartley (*Moredun Research Institute*, Edimburgo, Reino Unido).

3.2 MUESTRAS SANGUÍNEAS

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo general de Material y Métodos, se extrajo sangre a los animales los días 0, 7, 14 y 21 dpi para la hematología y la obtención de suero.

3.3 ANÁLISIS COPROLÓGICOS

Se tomaron heces directamente del recto desde el día 16 pi hasta el día previo al sacrificio para el recuento de huevos mediante la técnica de McMaster modificado (**MAFF, 1989**).

3.4 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO

Tras el sacrificio de los animales se aislaron los abomasos, se tomaron muestras de tejido de la curvatura mayor y se abrieron para recoger muestras de contenido abomasal, mucus y mucosa, tal y como se describe en el capítulo de Material y Métodos.

3.5 ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS

Se contabilizaron los vermes de las alícuotas y se midieron aleatoriamente 30 vermes a los 7 dpi y 30 vermes hembras a los 21 dpi, de las que también se contabilizaron los huevos intraútero, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de Material y Métodos. La suma de las larvas

obtenidas tras la digestión o intramurales y las larvas localizadas en la luz del abomaso corresponde con carga parasitaria de la Tabla 4.1.

3.6 CULTIVO DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS (ASC)

Tras observar asociaciones negativas entre la IgA de mucus específica de vermes adultos y la longitud en los ovinos Canarios de Pelo en una experiencia previa en la que se sacrificaron los animales a los 28 dpi (**Hernández, 2011**), se propone valorar si hay diferencias cuantitativas y cualitativas en el reconocimiento antigénico de los animales resistentes a partir de los sobrenadantes de cultivo de linfocitos de los nódulos linfáticos abomasaes en los dos momentos del sacrificio, que representan la producción específica de inmunoglobulinas frente a dos estadios parasitarios diferentes (larvarios/adultos). Para ello, tras el sacrificio de los animales se recogió un nódulo linfático abomasal para el cultivo linfocitario. Una vez que se retiró la grasa de los nódulos linfáticos, se maceraron con ayuda del émbolo de una jeringuilla y se lavaron tres veces en RPMI 1640 suplementado (Tabla 3.1) centrifugando a 250g (Mixtasel P Selecta®) durante 20 minutos, en condiciones de esterilidad. Posteriormente, tras ajustar la concentración a 5×10^6 células/ml, los linfocitos se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado durante 96 horas (37°C; 5% de CO₂) en placas de cultivo celular (Costar® 3526, *Corning Incorporated*) de 24 pocillos. Finalmente se recogió el sobrenadante, previa centrifugación a 1500g (Mixtasel P Selecta®) durante 3 minutos, y se almacenó a -20°C hasta su uso (mod. **Bowles et al. 1995**).

Tabla 3.1 Suplementación del medio RPMI 1640.

REACTIVO	PROPORCIÓN
Penicilina/estreptomicina	2%
L-glutamina	1%
Suero Fetal Bovino Inactivado (SFB)	10%

3.7 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)

Los niveles de IgA e IgG específicas en mucus y A.S.C., fueron determinados mediante el análisis de E.L.I.S.A. siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de Material y Métodos. Las condiciones específicas seguidas en este trabajo se recogen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado según determinación.

MUESTRA	INMUNOGLOBULINA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Mucus	IgA	10 µg/ml L3	1:2	1:100
		10 µg/ml SA	1:5	1:100
	IgG	5 µg/ml L3	1:5	1:1000
		5 µg/ml SA	1:5	1:1000
ASC	IgA	10 µg/ml L3	1:1	1:100
		10 µg/ml SA	1:1	1:100
	IgG	10 µg/ml L3	1:1	1:1000
		10 µg/ml SA	1:1	1:1000

3.8 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA

La electroinmunotransferencia de antígeno SA con los ASC se realizó con el fin de valorar el reconocimiento de fracciones proteicas del antígeno por parte de la IgA producida localmente. Para ello, se realizó la técnica tal y como está descrita en el capítulo de Material y Métodos. Las condiciones específicas seguidas en este capítulo se recogen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Sobrenadante de A.S.C.	1,5 µg/µl SA	1:1	1:500 IgA

3.9 PROCESADO DE IMAGEN

Se capturó la imagen de la electroinmunotransferencia con un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad Molecular Image® GelDoc™ XR+ Imaging System) y posteriormente se procesaron las imágenes con el programa *Image Lab™* (Software version 2.0.1 BioRad). El corte y organización de las tiras que se muestran en la figura 4.6 se realizó con el programa *Adobe Photoshop CS4 Extended Versión 11.0*.

3.10 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

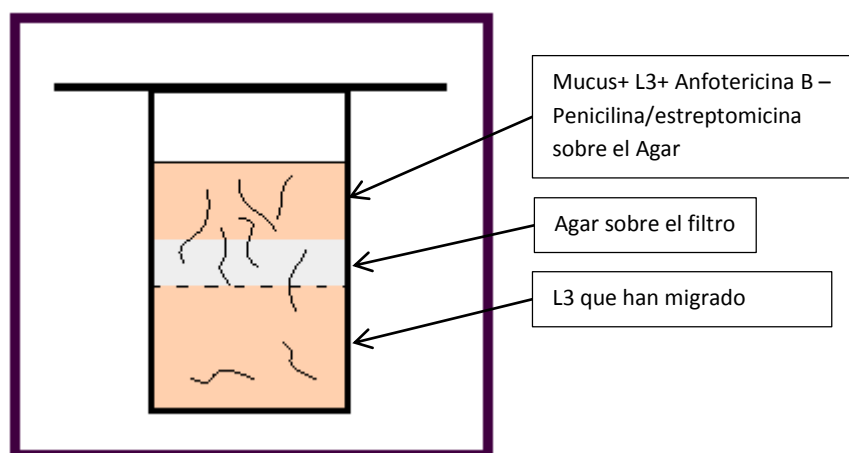
Las muestras de abomaso tomadas tras el sacrificio fueron procesadas (capítulo Material y Métodos) y se identificó y contabilizaron en la mucosa del abomaso los eosinófilos, leucocitos globulares, linfocitos $T\gamma\delta^+$, $WC1^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD1^+$, $CD2^+$, $CD5^+$, $MHC-II^+$, $CD45RA^+$, galectina 11^+ y galectina 14^+ .

3.11 ENSAYO DE MIGRACIÓN LARVARIA (LMIA)

El ensayo de migración larvaria (Kotze *et al.*, 2006) se realizó con el fin de valorar la actividad inhibitoria del mucus. Inicialmente se incubó durante 24 horas a 37°C con humedad, en una placa de 96 pocillos (Costar® 3596, Corning Incorporated) y por duplicado, 50 µl de una mezcla formada por las L3 de *H. contortus* (aproximadamente 50 larvas/25 µl) suplementada con anfotericina B (25 µg/ml) y penicilina/estreptomicina (100U/ml y 100 µg/ml) con el mucus (25 µl) – contabilizándose las larvas por pocillo antes de depositar el mucus. Paralelamente, se preparó y se mantuvo a temperatura ambiente la placa de lavado y, también a temperatura ambiente pero en condiciones de humedad, la placa de migración con filtro *Millipore Multiscreen®*- MESH 20 µm (Millipore). Los pocillos de la placa de lavado contenían 250 µl de una mezcla con las mismas condiciones que la placa de incubación a excepción de las larvas. En la placa de migración, sobre el filtro a través del cual van a migrar las larvas, se dispensó 75 µl/pocillo de agar (0.125% p/v, Sigma). Pasadas las 24 horas, se añadieron 170 µl de la solución

de cada pocillo de la placa de lavado en la base de la placa de migración. Se colocó la placa de los filtros sobre esta y se incubó a 37°C durante 2 horas con el fin de que el agar se equilibrara con la solución. Tras esta incubación, se añadió los 50 µl de la placa de incubación a la placa de los filtros con el agar, respetando por supuesto el orden de los pocillos, lavando posteriormente cada pocillo de la placa de incubación con 50 µl de la placa de lavado para recuperar las posibles larvas que hayan podido quedar en ellos. La placa de migración con las larvas se incubó 24 horas a 37°C con humedad. Pasadas las 24 horas de incubación, se realizó la lectura, contabilizando las larvas que hayan migrado a través del agar y filtro y, por tanto, se encuentren depositadas en la base de las placas de migración.

Figura 3.1 Representación final de un pocillo de la placa de migración.



3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software *IBM SPSS Statistics* versión 17 para el análisis estadístico. El animal CAP 52, perteneciente al grupo 7 dpi, se descartó del análisis estadístico por su desviación de la tendencia de la raza, valor atípico (*Outlier*). Los datos del recuento de huevos en heces a día 20 dpi (HGH20) se analizaron tras normalizarlos previa transformación a $\text{LOG}_{10}+1$. Los datos de carga parasitaria, huevos en útero, HGH20 y de las inmunoglobulinas se analizaron aplicando el modelo lineal generalizado considerando una distribución gamma logarítmica y el método de estimación Newton Raphson con escala X^2 de Pearson, salvo la IgA de mucus específica SA que se analizó con el método Híbrido. Para poder aplicar la distribución gamma, a aquellas variables en la que algún dato tuviera valor 0, se añadió 0.1 a todos los datos de la variable. En el modelo de la variable huevos en útero se introdujo la variable “animal” como covariable. La longitud de los vermes se analizó aplicando el modelo lineal generalizado sobre todas las mediciones efectuadas, pero considerando una distribución normal lineal y el método de estimación Híbrido e incorporando la variable “animal” como covariable. Los recuentos de células de los abomasos se analizaron por medio del modelo general lineal (GLM) univariante. Las comparaciones de

hematocrito, proteínas plasmáticas y eosinófilos en sangre se realizaron utilizando el GLM de medidas repetidas. LMIA fue analizado mediante una prueba no paramétrica, concretamente mediante la U de Mann Whitney. Las asociaciones entre las distintas variables se valoraron mediante la determinación de los coeficientes de correlación de Spearman entre datos parasitológicos, inmunológicos y/o celulares obtenidos y mediante análisis de regresiones entre variables. Probabilidades $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1 PARASITOLOGÍA

No se observaron diferencias significativas entre razas a los 7 dpi ni en las cargas ni en la longitud de las larvas (Tabla 4.1). A los 21 dpi los ovinos CAP mostraron reducciones significativas en los recuentos de vermes al compararlos con los CAN. Aunque inicialmente se observan diferencias raciales en longitud y fecundidad, estas parecen deberse a la variabilidad individual pues desaparecen estas diferencias entre razas cuando se incluye la variable categórica animal como covariable (Tabla 4.1).

Uno de los animales de raza CAP (#52) mostró una resistencia excepcional respecto al resto de animales que se puso especialmente de manifiesto con una extraordinaria reducción de la longitud de sus larvas a los 7 dpi que midieron en promedio, tan sólo 2.8 mm, mientras que la media del siguiente animal que albergó los vermes más cortos fue de 4.367 mm. Tal y como se señaló anteriormente, este animal se consideró un *outlier* y no se incluyó en el análisis estadístico.

Tabla 4.1 Parámetros parasitológicos (Media $\pm$ Error Estándar de la Media) obtenidos de muestras recogidas en el sacrificio a 7 y 21 dpi. HPG20= Recuento de huevos en heces $\text{Log}_{10}+1$ a los 20 dpi. Longitud (mm). * Indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

MEDIAS PARASITOLOGÍA			
Grupo	Variable Parasitológica	CAP	CAN
7dpi	Carga parasitaria (% dosis infectiva)	5005 $\pm$ 1291 (25 %)	5803 $\pm$ 546 (29%)
	Longitud	4,80 $\pm$ 0,04	5,04 $\pm$ 0,05
21dpi	Carga parasitaria (% dosis infectiva)	1110 $\pm$ 547*	3280 $\pm$ 848*
	Longitud	13,44 $\pm$ 0.22	14,30 $\pm$ 0.16
	HPG20	0**	1,6 $\pm$ 0,47**
	Huevos en útero	20 $\pm$ 3	63 $\pm$ 4

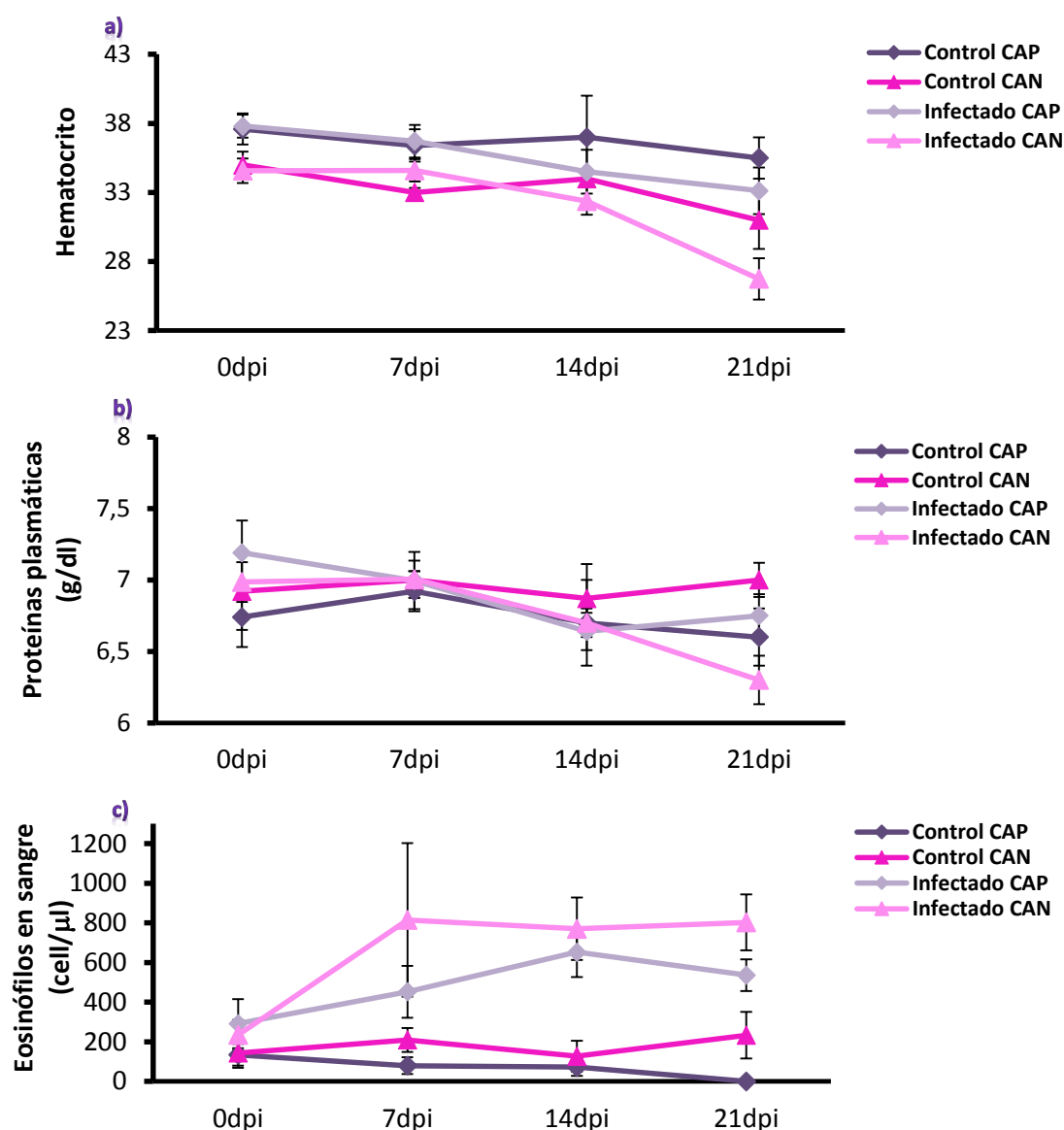
4.2 HEMATOLOGÍA

En general, se observa que los ovinos CAP tienen el hematocrito más elevado que los ovinos CAN incluso sin estar parasitados, siendo estas diferencias significativas a los 7 dpi en el grupo control y a los 0 y 21 dpi en el grupo inoculado (Figura 4.1a. Nota: no se representan estas diferencias en el gráfico). Las pérdidas en hematocrito fueron en promedio superiores (7%) en la raza más susceptible que en la raza resistente (3.5%) a los 21 dpi, pero fueron muy similares a los 7 y 14 dpi. De hecho, la reducción sólo fue significativa en la raza CAN. Los hematocritos de los animales de las dos razas a los 21 dpi se asociaron negativamente, aunque no significativamente, con la carga parasitaria (CAP, $r = -0.566$; CAN, $r = -0.683$), pero no con la longitud (CAP, $r = -0.096$; CAN $r = 0.259$).

Las proteínas (figura 4.1b) también experimentaron un descenso, aunque no estadísticamente significativo, que fue más pronunciado en la raza CAN que en la CAP a lo largo de la infección y se correlacionaron negativamente con la carga parasitaria (CAP $r=-0,749^*$; CAN $r=-0,567$) en vez de con la longitud.

Los eosinófilos (figura 4.1c) experimentaron un pico a los 7 dpi en la raza CAN y a los 14 dpi en la raza CAP. Los ovinos CAN mantuvieron una eosinofilia ligeramente superior que la raza CAP, si bien las diferencias entre las razas no fueron significativas.

Figura 4.1 Representación gráfica del hematocrito, proteínas plasmáticas (g/dl) y de los eosinófilos en sangre periférica (cel/ μ l), en ambos grupos control e infectados (7 y 21 dpi) para ambas razas.

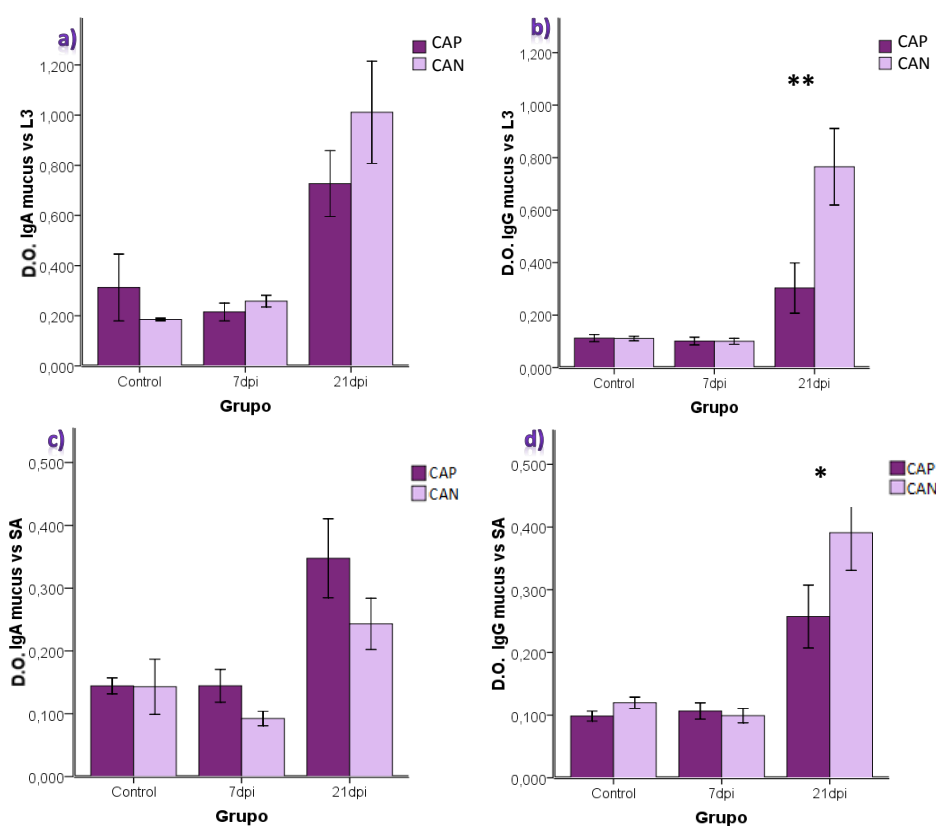


4.3 INMUNOGLOBULINAS (IgAm e IgGm) EN MUCUS

No se observaron diferencias significativas entre razas en los niveles de IgA del mucus (IgAm) con ninguno de los antígenos (L3 y SA) analizados (Figuras 4.2a y 4.2c), aunque se detectaron mayores absorbancias cuando se antigenaron las placas con antígeno de L3 en el ovino CAN mientras que en la raza CAP, estas fueron superiores al antigenar con antígeno SA. Sin embargo, sí se observaron incrementos significativos dentro de razas para la IgA específica de ambos antígenos, concretamente entre los 0 y 21 dpi (IgAmL3: $p_{CAP}=0,008$ $p_{CAN}=0,000$; IgAmSA: $p_{CAP}=0,000$ $p_{CAN}=0,024$) y también entre los 7 y 21 dpi (IgAmL3: $p_{CAP \text{ y } CAN}=0,000$; IgAmSA: $p_{CAP \text{ y } CAN}=0,000$) en ambas razas (Figura 4.2a y 4.2c).

Los ovinos de raza CAN produjeron significativamente más cantidad de IgG del mucus (IgGm) específica, tanto frente a antígenos L3 como SA, que los ovinos CAP a los 21 dpi (Figura 4.2b y 4.2d). Al igual que sucedió con la producción de IgAm, se incrementaron los niveles de ambas inmunoglobulinas dentro de raza a medida que progresaba la infección, observándose diferencias entre el día 0 y 21 dpi (IgGmL3 $p_{CAP}=0,003$ $p_{CAN}=0,000$; IgGmSA $p_{CAP \text{ y } CAN}=0,000$) y entre el 7 dpi y 21 dpi (IgGmL3 $p_{CAP}=0,001$ $p_{CAN}=0,000$; IgGmSA $p_{CAP \text{ y } CAN}=0,000$) (Figura 4.2b y 4.2d).

Figura 4.2 Nivel de IgAm (a y c) e IgGm (b y d) específica frente a antígeno L3 (a y b) y SA (c y d). * Indica diferencias significativas entre razas $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.



A los 7 dpi, la IgGmSA se asoció negativamente con larvas intramurales obtenidas tras la digestión de la mucosa en los ovinos CAP, no observándose dicha asociación en los CAN (Tabla

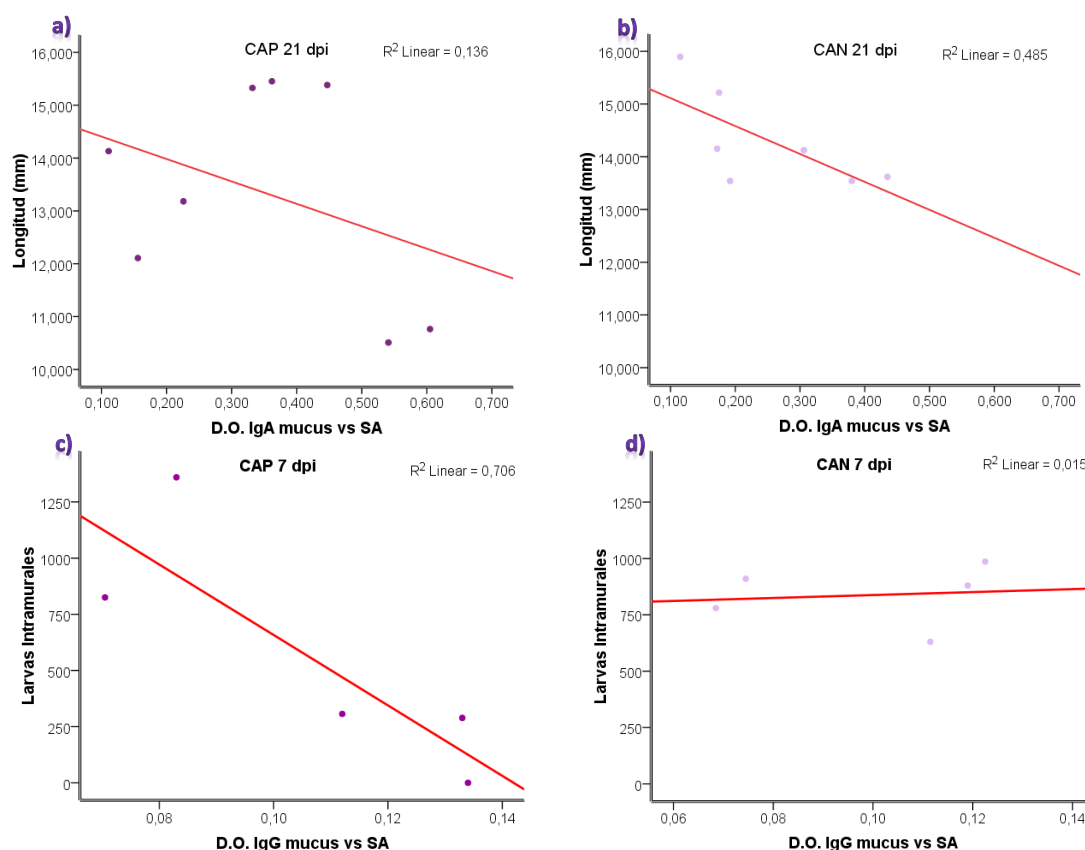
4.3- Figura 4.3c y 4.3d). Por el contrario, a los 21 dpi, IgAmSA e IgGmSA se asociaron negativamente con las variables longitud y huevos en útero sólo en los ovinos CAN (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Coeficiente de correlación de Spearman entre niveles IgAm e IgGm (L3 y SA) y variables parasitológicas en CAP y CAN a los 7 y 21 dpi. HPG= huevos por gramo. * Indica $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN									
		Carga Parasitaria		Lavias Intramurales		Larvas Luminales		Longitud	
		CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN
7dpi	IgAmL3	0,200	-0,300	-0,800	0,100	0,200	-0,400	0,700	-0,300
	IgAmSA	-0,500	-0,100	-0,100	0,000	-0,500	0,000	0,400	0,600
	IgGmL3	0,400	-0,100	-0,600	0,300	0,400	-0,200	-0,100	0,500
	IgGmSA	-0,100	-0,300	-0,900*	0,500	-0,100	-0,500	0,600	0,300

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN									
		Carga Parasitaria		Longitud		Huevos en Útero		HPG20	
		CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN
21dpi	IgAmL3	-0,214	0,429	0,048	-0,679	0,167	-0,571	.	0,454
	IgAmSA	-0,571	0,214	-0,238	-0,786*	-0,167	-0,893**	.	0,233
	IgGmL3	-0,048	0,190	0,286	-0,679	0,548	-0,679	.	0,415
	IgGmSA	-0,190	-0,095	0,262	-0,821*	0,476	-0,786*	.	0,073

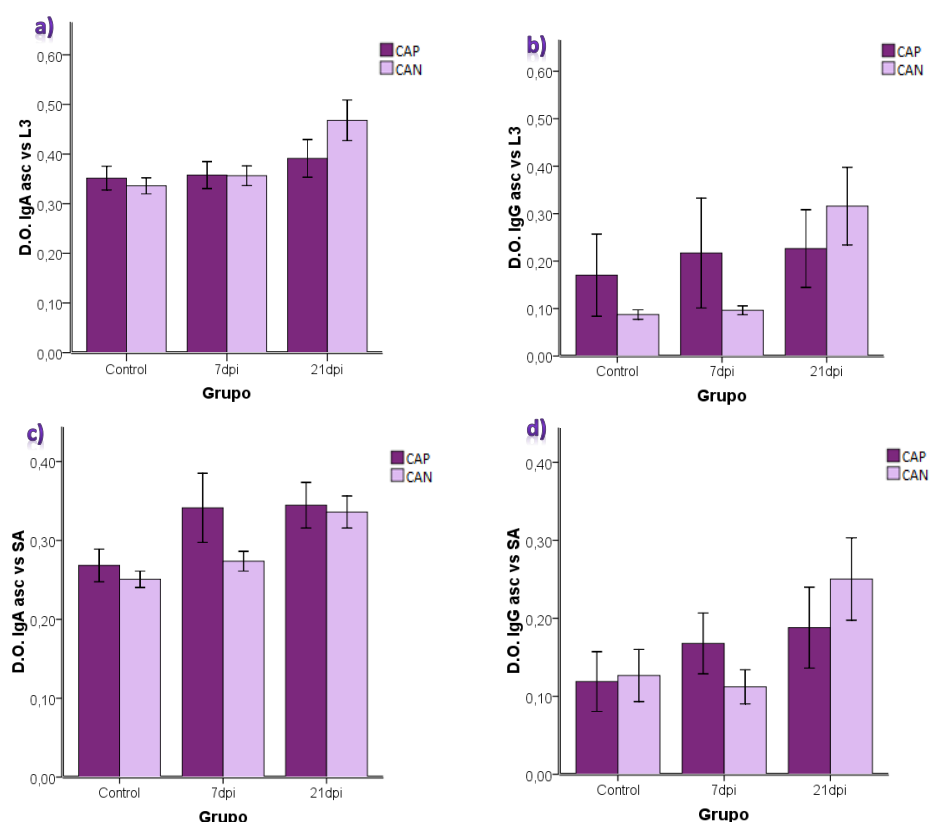
Figura 4.3 Dispersión gráfica entre IgAmSA y longitud de los vermes a los 21 dpi (a y b) e IgGmSA con larvas Intramurales a 7 dpi (c y d) en CAP y CAN, respectivamente.



4.4 SOBRENADANTES DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS (ASC)

No se observaron diferencias cuantitativas entre razas en los niveles de IgA o IgG específicas frente a los antígenos L3 y SA en los sobrenadantes de los cultivos linfocitarios del nódulo linfático abomasal (IgAasc o IgGasc) de ninguno de los grupos (Figura 4.4). Por el contrario, sí se observaron diferencias significativas dentro de raza en los niveles de IgAasc específica entre los días 0 y 21 pi (IgAascL3: $p_{CAN}=0,004$; IgAascSA: $p_{CAP}=0,021$ $p_{CAN}=0,007$) y entre los 7 dpi y 21 dpi (IgAmL3: $p_{CAN}=0,018$); se observaron también diferencias en la IgGasc específica entre los 0 dpi y 21 dpi (IgGascL3: $p_{CAN}=0,025$) y entre 7 dpi y 21 dpi (IgGascL3: $p_{CAN}=0,034$ IgGascSA: $P_{CAN}=0,032$).

Figura 4.4 Nivel de IgAasc (a y c) e IgGasc (b y d) específicas de antígeno L3 y SA



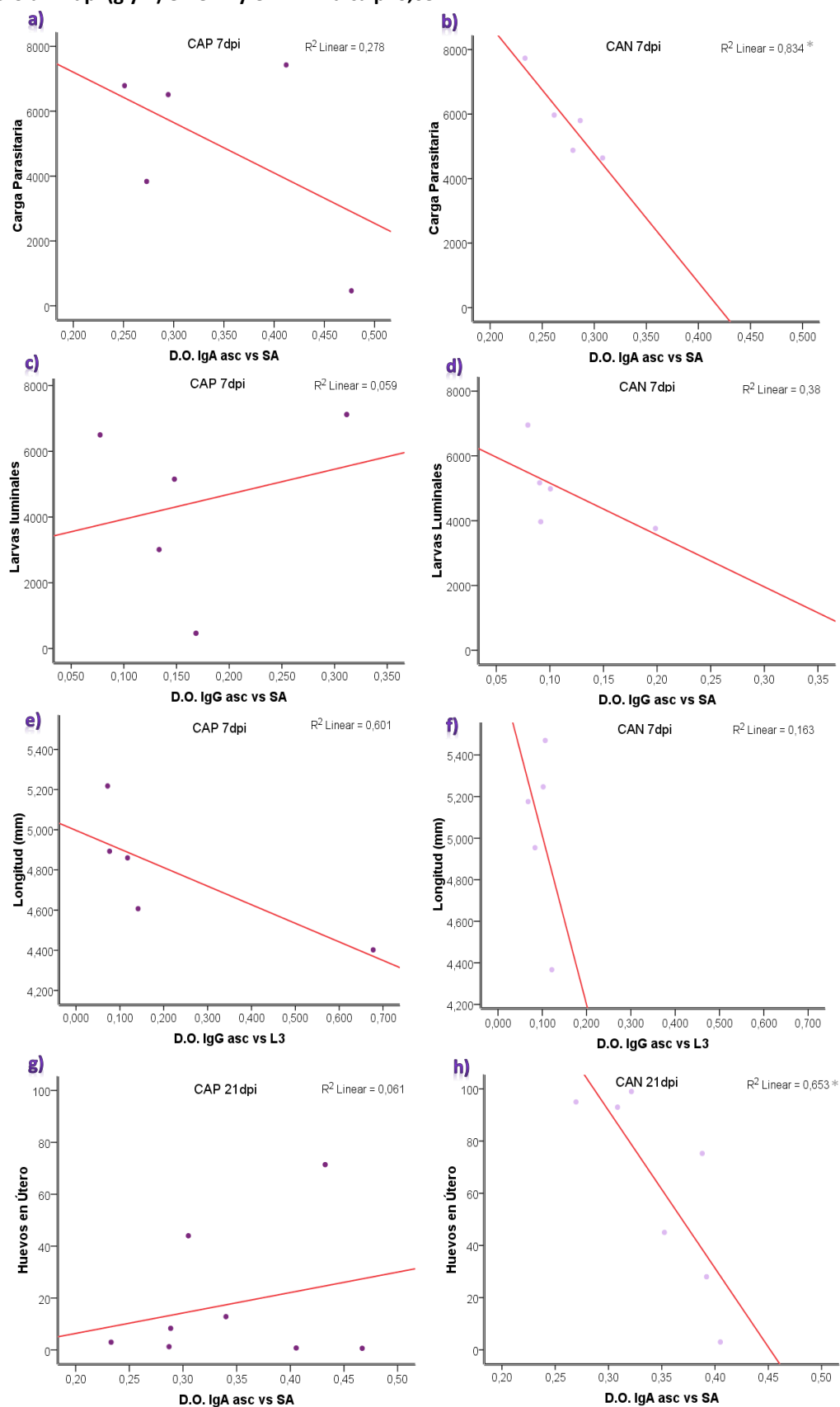
A los 7 dpi, se observaron asociaciones negativas entre las variables carga parasitaria e IgAascSA (Tabla 4.4 -Figura 4.5a y 4.5b) y entre las larvas contabilizadas en el lumen e IgGascSA (Tabla 4.4 - Figura 4.5c y 4.5d) en los ovinos de raza CAN y, aunque no estadísticamente significativa, también correlacionó con la IgGascL3 esa misma variable; esas asociaciones que no se observaron en CAP (Tabla 4.4). Por otro lado, en los CAP se correlacionó la longitud con IgGascL3 (Tabla 4.4 - Figura 4.5e y 4.5f), asociación no observada en CAN. A los 21 dpi, se observó asociación negativa entre IgAascSA y la variable huevos en útero en CAN (Tabla 4.4- 4.5g y 4.5h).

Tabla 4.4 Coeficiente de correlación de Spearman entre niveles de IgA e IgG en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos del nódulo linfático abomasal (ASC) específicas de los antígenos L3 y SA, y variables parasitológicas en CAP y CAN a los 7 y 21 dpi. HPG= huevos por gramo Log₁₀+1. * Indica p≤0.05, ** p≤0.01.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN									
		Carga Parasitaria		Larvas Intramurales		Larvas Luminales		Longitud	
		CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN
7 dpi	IgAascL3	0,000	-0,400	-0,200	-0,300	0,000	-0,300	-0,700	-0,500
	IgAascSA	-0,300	-0,900*	-0,300	-0,200	-0,300	-0,700	-0,300	-0,400
	IgGascL3	0,300	-0,500	0,500	0,700	0,300	-0,800	-1,000**	-0,100
	IgGascSA	0,100	-0,700	-0,100	0,600	0,100	-0,900*	-0,600	0,000

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN									
		Carga Parasitaria		Longitud		Huevos en Útero		HPG20	
		CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN	CAP	CAN
21 dpi	IgAascL3	-0,333	0,599	0,000	-0,631	0,000	-0,468	.	0,700
	IgAascSA	-0,524	0,000	-0,095	-0,464	-0,071	-0,857*	.	-0,098
	IgGascL3	-0,143	0,310	-0,238	-0,107	-0,238	-0,321	.	0,122
	IgGascSA	-0,286	0,333	-0,143	-0,143	-0,238	-0,357	.	0,146

Figura 4.5 Dispersión grafica entre IgAascSA y carga parasitaria a los 7 dpi (a y b), IgGascSA con Larvas luminales a 7 dpi (c y d), IgGascL3 y longitud de las larvas a los 7 dpi (e y f) e IgAascSA con Huevos en Útero a 21 dpi (g y h) en CAP y CAN. *Indica $p \leq 0,05$.



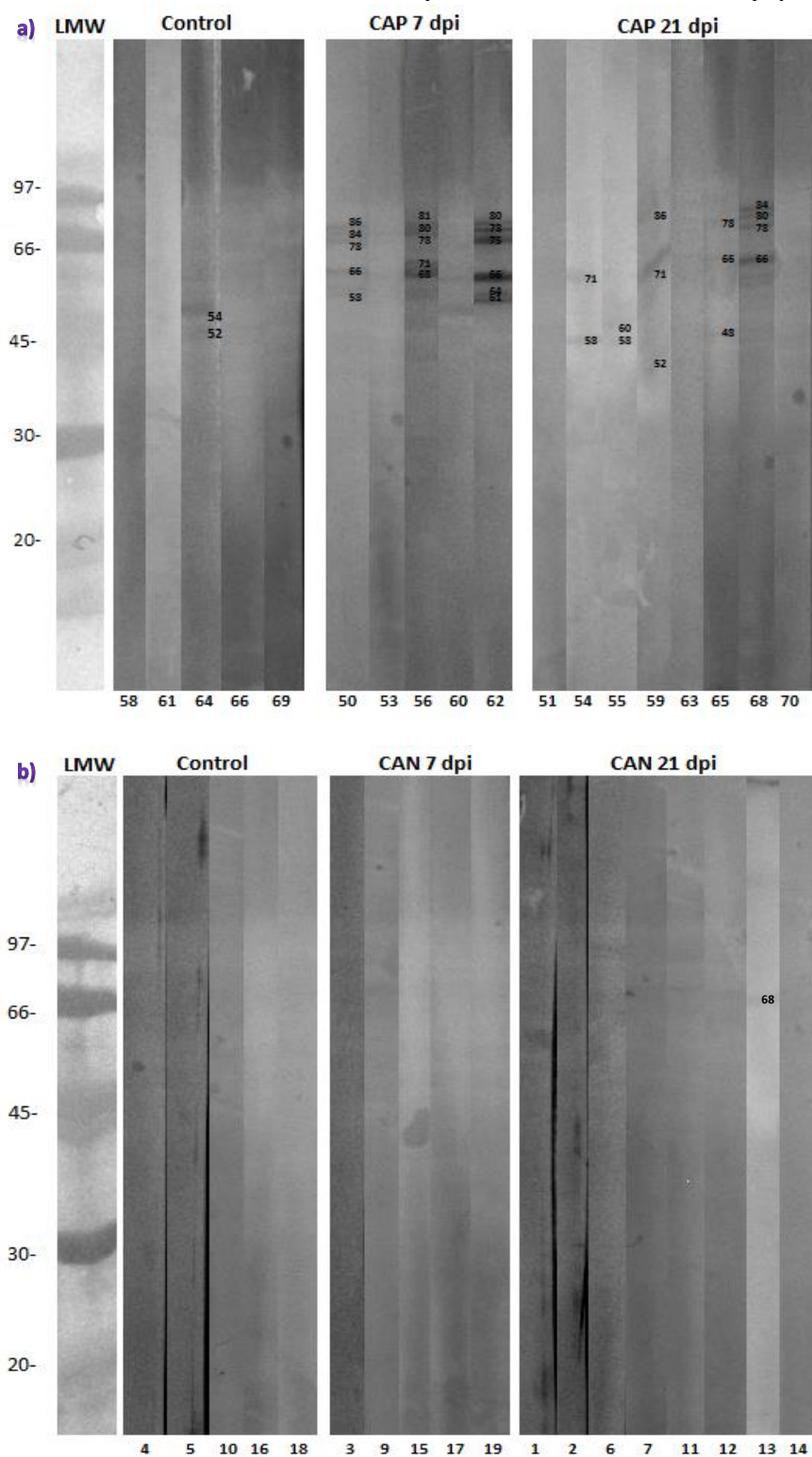
Por otro lado, al realizar la electroinmunoforesis de los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos sobre antígeno SA, se observaron patrones de reconocimiento diferentes entre las dos razas (Figuras 4.6a y 4.6b). Los ovinos CAP reconocieron bandas con peso molecular comprendido entre 48 y 86 kDa que no fueron reconocidas ni por CAN ni por los controles. Las excepciones fueron los sobrenadantes de CAN13, que reconoció débilmente una banda de 68 kDa, y el del control CAP64, que identificó dos bandas de 52 kDa y 54 kDa, respectivamente (Tabla 4.5).

Las bandas de 84 y 86 kDa parecen estar asociadas con la reducción en la longitud de los vermes, en particular a los 21 dpi y a los 7 dpi (Tabla 4.5). Sin embargo, otros animales que no reconocieron proteínas tuvieron también vermes cortos (Tabla 4.5)

Tabla 4.5 Reconocimiento individual de bandas proteicas SA de los sobrenadantes obtenidos de los nódulos linfáticos abomasales a los 0, 7 y 21 dpi. Los animales están ordenados atendiendo a la media de longitud de los vermes. También se incluye la variable carga parasitaria de cada animal.

Animal	Raza	Longitud	Carga Parasitaria	Proteínas (kDa)
7 dpi				
3	CAN	4,367	3760	--
50	CAP	4,402	7120	86; 84;78; 66; 58
56	CAP	4,607	3010	81;80;78; 71; 68
53	CAP	4,86	5152	--
62	CAP	4,893	464	80; 78; 75; 66; 64;61
15	CAN	4,954	6952	--
19	CAN	5,176	5168	--
60	CAP	5,218	6500	--
17	CAN	5,247	3966	--
9	CAN	5,47	4983	--
21 dpi				
59	CAP	10,51	54	86; 71; 52
68	CAP	10,764	184	84; 80; 78; 66
51	CAP	12,108	773	--
63	CAP	13,182	4170	--
2	CAN	13,541	3867	--
12	CAN	13,542	5488	--
6	CAN	13,619	779	--
7	CAN	14,124	6747	--
70	CAP	14,131	2837	--
11	CAN	14,153	3942	--
13	CAN	15,215	4279	68
55	CAP	15,327	22	60; 58
65	CAP	15,382	733	78; 66; 48
54	CAP	15,453	105	71; 58
1	CAN	15,896	1139	--
14	CAN	nada	3	--
Control				
4	CAN			--
5	CAN			--
10	CAN			--
16	CAN			--
18	CAN			--
61	CAP			--
58	CAP			--
64	CAP			54;52
66	CAP			--
69	CAP			--

Figura 4.6 Electroinmunotransferencia de antígeno SA e IgA de sobrenadante de los cultivos linfocitarios en ambas razas. 0 dpi o Control: Animales CAN4, CAN5, CAN10, CAN16, CAN18, CAP58, CAP61, CAP64, CAP66 y CAP69. Grupo 7 dpi: Animales CAN3, CAN9, CAN15, CAN17, CAN19, CAP50, CAP53, CAP56, CAP60 y CAP62. Grupo 21 dpi: Animales CAN1, CAN2, CAN6, CAN7, CAN11, CAN12, CAN13, CAN14, CAP51, CAP54, CAP55, CAP59, CAP63, CAP65, CAP68 y CAP70. LMW: Marcador de bajo peso molecular.



4.5 RESPUESTA INMUNE CELULAR

Los recuentos de células en el abomaso en las dos razas fueron prácticamente idénticos en los animales control (0 dpi), con la salvedad de las células CD1⁺, que estaban presente en mayor número en la raza resistente CAP (Tabla 4.6).

A los 7 dpi, sin embargo, desaparecen las diferencias entre razas en esta población celular (CD1). La raza resistente (CAP) mostró en este momento de la infección incrementos significativos en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD5⁺ en la pared del abomaso, así como de las células CD45RA⁺ (linfocitos B) (Tabla 4.6). En general, en las dos razas se producen incrementos importantes en las poblaciones celulares respecto a los controles. Es interesante que los recuentos de eosinófilos a los 7 dpi son más elevados en la raza susceptible (Tabla 4.6).

A los 21 dpi, los ovinos CAN tenían en la pared de su abomaso mayores poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺, CD2⁺ y células MHC-II⁺ (Tabla 4.6). Sin embargo, los recuentos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron significativamente mayores en la raza resistente en este momento de la infección (Tabla 4.6). Sorprendentemente, las poblaciones de leucocitos globulares no aumentaron a lo largo de la infección (Tabla 4.6). La cinética de reclutamiento de eosinófilos parece seguir dinámicas diferentes entre razas, y mientras que en la CAN su número desciende respecto de los 7 dpi, en la resistente CAP su número sigue aumentando de forma significativa respecto a 0 dpi (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Recuentos medios (media $\pm$ EEM) de las poblaciones celulares $\gamma\delta^+$, $\gamma\delta^+/\text{WC1}^+$, CD2^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD1^+ , CD5^+ , MHC-II^+ , CD45RA^+ , Eosinófilos, Galectina-14, Leucocitos Globulares y Galectina-11, de las muestras de tejido de abomaso obtenidas tras el sacrificio en ambos grupos. EEM: Error Estándar de la Media. Las diferencias significativas entre razas se representan con asteriscos, donde * indica $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$. Mismo color indica diferencias significativas entre grupos dentro de razas para cada población celular.

MEDIA POBLACIONES CELULARES ABOMASO											
Grupo	Raza		$\gamma\delta^+$			$T\gamma\delta/\text{WC1}^+$			CD5^+		
			Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total
Control	CAP	Media $\pm$ EEM	41 $\pm$ 9	17 $\pm$ 4	58 $\pm$ 9	11 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	18 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	17 $\pm$ 10	46 $\pm$ 15
	CAN		44 $\pm$ 15	14 $\pm$ 3	58 $\pm$ 13	14 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	29 $\pm$ 15	20 $\pm$ 6	49 $\pm$ 19
7 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	78 $\pm$ 19	49 $\pm$ 16	127 $\pm$ 32	28 $\pm$ 9	11 $\pm$ 1	39 $\pm$ 10	145 $\pm$ 51*	69 $\pm$ 13	213 $\pm$ 58
	CAN		70 $\pm$ 13	41 $\pm$ 10	111 $\pm$ 23	22 $\pm$ 9	15 $\pm$ 6	36 $\pm$ 12	63 $\pm$ 15*	65 $\pm$ 4	128 $\pm$ 16
21 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	52 $\pm$ 13*	46 $\pm$ 7	98 $\pm$ 14*	14 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4	30 $\pm$ 7	115 $\pm$ 18	83 $\pm$ 19	197 $\pm$ 35
	CAN		93 $\pm$ 8*	62 $\pm$ 9	155 $\pm$ 15*	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 4	25 $\pm$ 7	85 $\pm$ 22	49 $\pm$ 14	132 $\pm$ 33
Grupo	Raza		CD4^+			CD8^+			CD2^+		
			Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total
Control	CAP	Media $\pm$ EEM	7 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0	9 $\pm$ 4	130 $\pm$ 32	57 $\pm$ 16	187 $\pm$ 40	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
	CAN		4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	163 $\pm$ 43	69 $\pm$ 17	231 $\pm$ 59	8 $\pm$ 6	7 $\pm$ 5	15 $\pm$ 11
7 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	52 $\pm$ 11**	57 $\pm$ 8**	100 $\pm$ 16**	132 $\pm$ 26	87 $\pm$ 24	219 $\pm$ 50	36 $\pm$ 14	23 $\pm$ 15	59 $\pm$ 15
	CAN		13 $\pm$ 4**	8 $\pm$ 1**	21 $\pm$ 4**	113 $\pm$ 22	66 $\pm$ 10	179 $\pm$ 30	25 $\pm$ 6	17 $\pm$ 8	42 $\pm$ 11
21 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	24 $\pm$ 6*	22* $\pm$ 5*	45 $\pm$ 10*	245 $\pm$ 49*	97 $\pm$ 18**	343 $\pm$ 66*	52 $\pm$ 9	12 $\pm$ 3*	64 $\pm$ 10
	CAN		9 $\pm$ 2*	10* $\pm$ 1*	19 $\pm$ 3*	145 $\pm$ 36*	38 $\pm$ 4**	183 $\pm$ 39*	54 $\pm$ 7	37 $\pm$ 9*	91 $\pm$ 13
Grupo	Raza		CD1^+			MHC-II^+			CD45RA^+		
			Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total	Apical	Basal	Total
Control	CAP	Media $\pm$ EEM	56 $\pm$ 26*	56 $\pm$ 22	111 $\pm$ 47*	32 $\pm$ 9	19 $\pm$ 5	51 $\pm$ 14	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3
	CAN		20 $\pm$ 5*	29 $\pm$ 9	49 $\pm$ 14*	37 $\pm$ 13	35 $\pm$ 10	72 $\pm$ 22	7 $\pm$ 5	6 $\pm$ 4	12 $\pm$ 9
7 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	28 $\pm$ 9	34 $\pm$ 7	61 $\pm$ 14	91 $\pm$ 35	60 $\pm$ 19	151 $\pm$ 50	17 $\pm$ 7**	11 $\pm$ 4*	28 $\pm$ 10**
	CAN		12 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5	38 $\pm$ 4	62 $\pm$ 16	49 $\pm$ 15	111 $\pm$ 28	4 $\pm$ 1**	2 $\pm$ 1*	6 $\pm$ 2**
21 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	23 $\pm$ 5	30 $\pm$ 6	54 $\pm$ 9	47 $\pm$ 3	32 $\pm$ 2*	79 $\pm$ 4*	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2
	CAN		46 $\pm$ 7	41 $\pm$ 5	87 $\pm$ 11	78 $\pm$ 13	72 $\pm$ 13*	150 $\pm$ 23*	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2
Grupo	Raza		Eosinófilos			Galectina 14			Leucocitos		
			Basal	Apical		Apical	Basal	Total	Globulares	Galectina 11	
Control	CAP	Media $\pm$ EEM	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0		12 $\pm$ 7	4 $\pm$ 2	16 $\pm$ 9	3 $\pm$ 2		0,75 $\pm$ 0,25
	CAN		12 $\pm$ 10	3 $\pm$ 1		7 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	3 $\pm$ 0		0,80 $\pm$ 0,20
7 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	46 $\pm$ 7*	2 $\pm$ 1*		19 $\pm$ 4	17 $\pm$ 5	36 $\pm$ 6	4 $\pm$ 1		1,60 $\pm$ 0,25
	CAN		119 $\pm$ 38*	5 $\pm$ 2*		23 $\pm$ 8	36 $\pm$ 16	59 $\pm$ 23	3 $\pm$ 1		1,40 $\pm$ 0,51
21 dpi	CAP	Media $\pm$ EEM	93 $\pm$ 9	4 $\pm$ 1		16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 10	45 $\pm$ 12	4 $\pm$ 1		1,25 $\pm$ 0,25
	CAN		70 $\pm$ 18	4 $\pm$ 0		19 $\pm$ 4	46 $\pm$ 27	62 $\pm$ 29	5 $\pm$ 2		1,38 $\pm$ 0,26

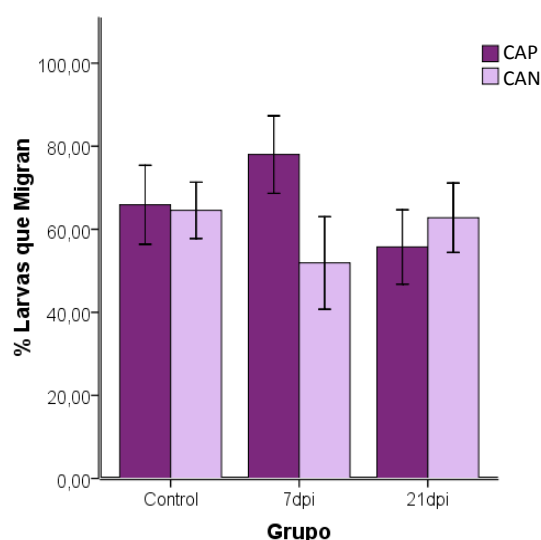
Al analizar las correlaciones entre las poblaciones celulares y las cargas parasitarias a los 7 dpi, se pueden destacar las asociaciones negativas y significativas observadas en la raza CAN entre los linfocitos CD4^+ (CAN, $r = -0.9^*$; CAP $r = 0.359$) y los linfocitos $\gamma\delta^+/\text{WC1}^+$ apicales (CAN, $r = -0.9^*$; CAP $r = -0.1$) y los recuentos intramurales de larvas, entre los CD2^+ basales y los recuentos lumbinales de larvas (CAN, $r = -1^{**}$; CAP, $r = 0.3$) y entre los CD1^+ y la longitud, también en la raza susceptible (CAN, $r = -1^{**}$; CAP $r = -0.5$). La única asociación negativa y significativa observada en esta fase de la infección por estadios inmaduros de *H. contortus* en la raza resistente CAP fue entre el MHC-II^+ basales y las cargas parasitarias intramurales (CAN, $r = -0.4$; CAP, $r = -1^{**}$).

A los 21 dpi, destacan las asociaciones negativas observadas en la raza CAP entre los linfocitos $T\gamma\delta^+$ (CAN, $r = -0.323$; CAP, $r = -0.738^*$) y los eosinófilos, concretamente la población galectina-14⁺ (CAN, $r = -0.429$; CAP, $r = -0.766^*$) y los huevos en útero. Las células galectina-14⁺, también se asociaron negativamente con la longitud de los vermes (CAN, $r = -0.029$; CAP, $r = -0.814^*$) y con la carga parasitaria (CAN, $r = 0.19$; CAP, $r = -0.826^*$) en la raza resistente CAP. En esta raza, los linfocitos $T\text{CD4}^+$ se correlacionaron de forma negativa con las cargas parasitarias (CAN, $r = -0.024$; CAP, $r = -0.929^*$). En la raza CAN, sólo los linfocitos $T\gamma\delta^+/\text{WC1}^+$ se asociaron negativamente con la longitud (CAN, $r = -0.757^*$; CAP, $r = -0.323$).

4.6 ENSAYO DE MIGRACIÓN LARVARIA (LMIA)

No se observaron diferencias entre razas en el número de larvas que atravesaron la membrana durante el ensayo (Figura 4.7), así como tampoco entre grupos dentro de raza.

Figura 4.7 Representación en diagrama de barras del porcentaje de larvas, incubadas durante 24 horas con mucus del abomaso obtenido tras el sacrificio de los animales a los 0, 7 y 21 dpi, que atraviesan el filtro de la placa de ensayo.



4. DISCUSIÓN

La resistencia frente a nematodos gastrointestinales se caracteriza por un bajo recuento de huevos en heces (HGH) asociado con una reducción de la longitud, carga parasitaria y huevos en útero en los vermes (**Ractliffe y Lejambre, 1971; Stear y Bishop, 1999; Lacroux et al., 2006**). En publicaciones previas de nuestro grupo (**González et al., 2008; 2011a**), se observó en ovinos de la raza CAP, en relación a los ovinos CAN, una reducción en la excreción de huevos y en el recuento y longitud de vermes a los 28 días tras la administración experimental de una única dosis de 20.000 L3 de *H. contortus*, considerando por ello a la CAP más resistente. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los recuentos ni en la longitud de larvas a los 7 dpi (**González et al., 2008; Hernández, 2011**). Estos resultados sugieren que el control de los parásitos en esta raza se establece entre los 7-28 dpi; lo que contrasta con la bibliografía previa, que sostiene que los estadios larvarios de *H. contortus* son la diana principal de los mecanismos de resistencia en los tejidos (**Balic et al., 2000a; 2002**). Con el fin de delimitar el momento del ciclo del parásito en el hospedador en el que se establece este control en la raza CAP, se realizó este segundo ensayo con sacrificios a los 0, 7 y 21 dpi siguiendo el mismo protocolo de infección. De modo que, al igual que la experiencia previa, no hubo diferencias en parasitología entre razas a los 7 dpi, pero sí disminuyó la carga parasitaria en la raza CAP a los 21 dpi, sugiriendo que el control de esta variable parasitológica tiene lugar entre los 7 y 21 dpi, controlando esta raza la longitud y la fecundidad entre los 21 y 28 dpi.

La bibliografía recoge la expulsión de los vermes adultos, cambios en la morfología y reducción de la fecundidad como mecanismos de resistencia frente al estadio adulto del parásito (**Balic et al., 2000b**). La expulsión de vermes adultos está descrita en *H. contortus* en rumiantes, sin embargo requiere de una determinada dosis de L3 e infecciones repetidas y generalmente está asociado a altos recuentos de leucocitos globulares en los tejidos, la creación por parte de las células efectoras de un microambiente con tóxicos y factores paralizantes que alteren la reproducción y motilidad de los parásitos, o por el daño que pudieran causar los eosinófilos en las larvas, considerándose, en cualquier caso, un efecto indirecto de la inmunidad adquirida generada frente las larvas (**Balic et al., 2000b**). Sin embargo, en esta experiencia no hubieron diferencias entre razas en el establecimiento larvario ni en su desarrollo (estimado por la longitud) pero sí en el número de vermes adultos a los 21 dpi. Curiosamente, dentro de razas, la reducción en el número de vermes no es significativa a los 21 dpi, pero sí lo fue a 28 dpi en la raza CAP en una experiencia anterior (**Hernández, 2011**; datos no publicados). Todo esto corrobora que la raza CAP es capaz de regular las cargas de vermes adultos antes que el

establecimiento larvario y al tratarse de inoculaciones únicas esta protección parece estar vinculada a la inmunidad innata.

Como se ha observado en otras razas resistentes (**Mugambi et al., 1996; Bahirathan et al., 1996; Amarante et al., 2004; Vanimisetti et al., 2004b**) la raza CAP presenta un mayor hematocrito que la CAN (Figura 4.1a) (**González et al., 2008; Hernández, 2011**), indicando mayor resiliencia a la infección por parásitos hematófagos, como *H. contortus*, lo que parece un mecanismo de adaptación fisiológica. El hematocrito y las proteínas plasmáticas se asociaron negativamente con la carga parasitaria y no con la longitud, lo que podría explicar que el control se establezca sobre la carga parasitaria en este periodo de la infección. Las pérdidas de sangre son significativamente mayores entre razas a los 21 dpi, por lo que si consideramos que las L4 son ya hematófagos, ratificaría que la diana en esta raza son los estadios adultos. La eosinofilia se asocia al desarrollo de inmunidad, por lo que, como era de esperar, los eosinófilos de sangre presentan recuentos superiores en los animales infectados que en los controles debidos a la parasitosis (**Gill, 1991; Balic et al., 2000b**). Los picos de eosinófilos observados en cada raza, a los 7 dpi en la raza CAN y a 14 dpi en la raza CAP, coinciden con los descritos en una experiencia anterior (**Hernández, 2011**), aunque en este trabajo la raza CAN presentó mayores recuentos de eosinófilos en sangre que la raza CAP. En todo caso, estas diferencias no fueron significativas en ninguno de los ensayos.

La respuesta inmune humoral frente a *H. contortus* está vinculada a la IgA e IgG₁ específicas (**Gill et al., 2000; Schallig et al., 2000**), donde los incrementos de estas inmunoglobulinas en las concentraciones en el suero y en el mucus se asocian con la resistencia a la haemonchosis (**Gill et al., 1993a**). Dado que este parásito habita la superficie de la mucosa del abomaso, verificar la respuesta local será más representativo que a nivel sistémico (**Schallig, 2000**), pues nos permitirá valorar el reconocimiento de los antígenos etapa-específicos del parásito, expresados durante ese momento de la infección (**Bowles et al., 1995**), si bien la IgA se absorbe y alcanza la circulación (**de Cisneros et al., 2014**).

Aunque la IgG presenta mayor concentración en la sangre, su pequeño tamaño le permite penetrar en los tejidos inflamados para contactar con facilidad con los antígenos extraños (**Tizard, 2002**). Esta inmunoglobulina alcanza la mucosa del abomaso y entra en contacto con el parásito, por lo que los niveles de esta inmunoglobulina en el mucus podrían reflejar aún mejor su respuesta que en el plasma (**Curtain y Anderson, 1971; Muñoz-Guzman et al., 2006**). Aun así, la IgG sérica se ha asociado con reducciones en cargas parasitarias y huevos en heces en infecciones por *H. contortus* (**Muñoz-Guzman et al., 2006**). Aunque el mecanismo de protección

no está del todo claro, se ha observado que la IgG de sueros de cabras inmunizadas es capaz de unirse selectivamente a la cutícula, estoma y poro excretor de *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*, por lo que podría comprometer la alimentación de los parásitos (Bottjer *et al.*, 1985). Uno de los antígenos a los que se une esta inmunoglobulina podría ser el denominado CarLa, pues tras la incubación de L3 de *T. colubriformis* con suero o mucus de animales inmunizados y su posterior inoculación en animales no inmunizados produjo reducción del establecimiento larvario, observándose la unión de la IgG en dicho antígeno; sin embargo este efecto no se reprodujo con L3 de *H. contortus* o *T. circumcincta* (Harrison *et al.*, 2008), lo que evidencia la complejidad de las respuestas inmunes protectoras frente a los trichostrongilidos.

Aunque en esta experiencia los ovinos CAP presentaron menores cargas parasitarias, los ovinos CAN produjeron más cantidad de IgG específica de antígenos L3 y SA a los 21 dpi en el mucus. La producción en los nódulos linfáticos de esta inmunoglobulina frente a los dos antígenos no varió entre razas. Este resultado parece descartar que esta inmunoglobulina sea la responsable del control de la carga parasitaria en esta raza y en estas inoculaciones únicas. Sin embargo, se observa una asociación negativa entre la IgGmSA y los recuentos de larvas intramurales en la raza CAP (Tabla 4.3) que podrían sugerir que cualitativamente, los animales de esta raza reconocen epítomos que se vinculan específicamente con la protección, aunque este aspecto no se pueda constatar en esta experiencia. Además, no se observa esta misma asociación con las larvas lumenales. En las dos razas se observaron asociaciones negativas entre IgG específicas y longitud; en la raza de pelo a los 7 dpi al analizar la IgG específica de las L3 obtenida tras el cultivo de los nódulos linfáticos y, en la raza más susceptible la asociación negativa de la IgG no sólo con la longitud de los vermes, sino también con los huevos intrauterinos a los 21 dpi, estando en este caso implicada la IgG específica de vermes adultos del mucus. La presencia de receptores en superficie para las Igs en los eosinófilos favorecería su degranulación alrededor de las larvas en la mucosa gástrica causándoles alteraciones funcionales/morfológicas (Rainbird *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2000b; 2006) que explicarían la reducción en su número (CAP) o la asociación negativa de la longitud de los vermes. En el futuro, convendría analizar específicamente el isotipo IgG₁ –vinculado a protección (Gill *et al.*, 1993a)– además de la IgG total que hemos estudiado en este trabajo, con el fin de precisar más su papel en las respuestas protectoras de la raza CAP.

El control de la longitud de los parásitos se ha asociado a la IgA del mucus específica de estadios larvarios, tanto en *T. circumcincta* (Smith *et al.*, 1985; Stear *et al.*, 1995) como en *H. contortus* (Strain y Stear, 2001), parásito en el que también se ha vinculado con reducciones en las cargas parasitarias tanto en razas resistentes (Santa Inés) como susceptibles (Ile de France)

(Amarante *et al.*, 2005). Una mayor producción de IgA específica está asociada a resistencia a *T. circumcincta* (Strain *et al.*, 2002). Al cuantificar tanto la IgA específica en mucus como la obtenida en los sobrenadantes del cultivo de los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos abomasales (L3 y SA) para ambas razas, no se observaron diferencias significativas entre razas a los 21 dpi, que si fueron evidentes -en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación- a los 28 dpi en la IgAmSA, cuando los vermes recogidos en la raza CAP eran más cortos (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015). Sin embargo, parece que la IgA específica de la raza CAN presenta mayor afinidad por el antígeno L3 y la IgA específica de la raza CAP por el antígeno SA (Figura 4.2 y 4.4), tal y como sucedió en el experimento anterior (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015).

A los 7 dpi, la única asociación negativa significativa que se observó fue entre la IgA de antígeno SA obtenida de los sobrenadantes de los linfocitos de los nódulos linfáticos abomasales de la raza susceptible CAN y la carga parasitaria. Este dato es similar al descrito por Amarante *et al.*, 2005 y sugiere que el establecimiento de la respuesta inmunitaria en la raza susceptible CAN es similar al descrito en otras razas ovinas frente al estadio L3.

A los 21 dpi, la IgA específica SA, se asoció negativamente con las variables longitud y huevos en útero únicamente en la raza CAN. Es posible que en este momento de la infección, en la primera etapa de los vermes adultos, estas asociaciones se deban al efecto de una inmunidad dirigida frente al estadio parasitario L4 (Stear *et al.*, 1995; 1999), probablemente por reconocimiento de antígenos compartidos entre ambos estadios parasitarios (Keith *et al.*, 1990). Resulta muy interesante que en la raza resistente, a los 21 dpi, no se observaran asociaciones entre IgA específica SA -tanto del mucus como de los sobrenadantes de los cultivos de los linfocitos de nódulos linfáticos abomasales- y la longitud a diferencia de la fuerte asociación negativa encontrada a los 28 dpi en animales de esta misma raza sometidos a una inoculación experimental idéntica (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015). Esto parece reflejar que el control de la longitud -hay diferencias significativas entre razas a los 28 dpi pero no a los 21 dpi- se establece con posterioridad al día 21 pi, y parece consolidar que el estadio adulto es la diana de la respuesta en la infección por *H. contortus* en la raza CAP.

Las diferencias observadas en las asociaciones entre IgA de mucus específico de vermes adultos (somático y excretor secretor) y la longitud de los vermes a los 28 dpi en ambas razas (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015), sugieren un patrón de reconocimiento antigénico diferente entre razas, especialmente interesante en la respuesta frente al antígeno SA, que no se había vinculado previamente con protección. Para comprobarlo, se realizó una

electroinmunotransferencia de antígeno SA de *H. contortus*, utilizando para ello los sobrenadantes obtenidos tras el cultivo de los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos en esta experiencia. La Figura 4.6 muestra un patrón de reconocimiento de proteínas antigénicas diferente entre razas; siendo los ovinos de la raza resistente CAP los que presentan un mayor número de bandas, tanto a los 7 como a los 21 dpi, reconociendo específicamente proteínas de entre 48 y 86kDa (Tabla 4.5), no reconocidas por los CAN o los controles, con la excepción de la proteína 68kDa que fue reconocida por el animal #CAN13, y las proteínas 52 y 54kDa, reconocidas por el control #CAP64. **Bowles et al., 1995** obtuvieron sobrenadantes de nódulos linfáticos locales en animales inoculados y posteriormente desafiados, que reconocieron proteínas de 50 y 55 KDa del antígeno SA de *H. contortus*. Por tanto, los animales de raza CAP parecen reconocer más proteínas de antígeno SA que los ovinos CAN y que lo observado por otros autores en otras razas, lo que es consistente con los datos previos que sugerían que el estadio adulto es la diana en la respuesta protectora de esta raza y podría deberse en parte a una mayor capacidad de reconocimiento de epítomos por parte de los animales de esta raza. Además, los animales que han reconocido proteínas con pesos moleculares de 84 y 86kDa, albergaban los vermes más cortos a los 7 y 21 dpi. También, algunos de los animales que reconocieron esas dos bandas, presentaron una carga parasitaria menor. El reconocimiento de bandas a los 7 dpi en la raza resistente utilizando un antígeno somático de verme adulto, sugiere puedan haber epítomos compartidos entre estadios parasitarios (**Keith et al., 1990**), pudiendo ser proteínas altamente conservadas, lo que podría explicar su reconocimiento en una única inoculación.

Estos resultados indican que no sólo es importante la cantidad de IgA específica, sino también reconocer las proteínas correctas para producir una respuesta inmunitaria adecuada, siendo relevante la variabilidad individual dentro de la raza (**Zajac et al., 1990; Balic et al., 2000b**). En este experimento, la variabilidad individual se refleja cuando en la estadística se observaban diferencias en longitud de los vermes entre razas cuando se descarta la covariable "animal".

Zhou et al., 2005 han sugerido que variaciones genéticas en la IgA se podría asociar a protección/susceptibilidad. Otros autores han encontrado resultados similares dentro de rebaño en estudios de campo, aunque luego esta variabilidad genética explica poco las variaciones en los HGH, al menos en infecciones mixtas con *Nematodirus spp.* y nematodos del Orden Strongylida cuando el análisis se realiza entre rebaños (**Lin et al., 2009**). En infecciones por *T. circumcincta* es la variación en la cantidad de IgA específica producida, la que modula la longitud (**Stear et al., 1995**) y, por tanto, la fecundidad. Considerando estos resultados, algunas proteínas podrían ser útiles en la identificación precoz de animales resistentes dentro de un

rebaño, incluso en inoculaciones únicas, antes de que se establezcan diferencias cuantitativas en la producción de la IgA específica en infecciones por *H. contortus*.

Es posible que las dos inmunoglobulinas, IgA e IgG, actúen conjuntamente, quizás mediante la neutralización o inactivación de enzimas metabólicas que comprometan el metabolismo, capacidad motora, crecimiento o reproducción de los vermes (Gill *et al.*, 1993a) o por la formación de inmunocomplejos en el estoma (Bottjer *et al.*, 1985).

Balic *et al.*, 2000a observaron que la respuesta inmune celular frente a la infección primaria –en la que no se genera protección en razas comerciales– con *H. contortus*, está caracterizada durante el estadio larvario por el reclutamiento de eosinófilos, linfocitos CD4⁺ y Tγδ/WC1⁺ y células B, mientras que durante la infección con el estadio adulto se incrementa el número de mastocitos. En este estudio, dónde se analizaron varias poblaciones celulares (Tabla 4.6), antes de la inoculación sólo se observaron diferencias significativas en los recuentos entre razas en las células CD1⁺ (moléculas presentadoras de antígenos presente en células dendríticas), lo que podría indicar una mayor capacidad innata de la raza CAP a la hora de reconocer antígenos. Sin embargo, estas diferencias raciales desaparecen a medida que avanza la infección.

En general, tras la inoculación las poblaciones celulares se incrementaron en ambos grupos. La raza CAP mostró un incremento de los linfocitos CD4⁺ y CD45RA⁺, incrementos observados en inoculaciones similares en ovinos CAP (Hernández, 2011) y en otras razas ovinas (Balic *et al.*, 2000a; 2002). Los aumentos experimentados por estas poblaciones celulares a los 7 dpi en los ovinos CAN no fueron, sin embargo, significativos. No se disponía de anticuerpos que reconocieran la molécula de superficie CD25⁺ (marcador de activación de linfocitos T y B (Tizard, 2002; 2009), por lo que no se puede confirmar que estas células estuviesen activas. De hecho, no se correlacionaron negativamente con ninguna de las variables parasitológicas analizadas a los 7 dpi. El incremento observado en la población CD5⁺ de la mucosa del abomaso en la raza resistente probablemente refleja el incremento de la subpoblación CD4⁺ al presentarse esta molécula de diferenciación celular en esa subpoblación linfocitaria (Tizard, 2002; 2009). Curiosamente en la raza susceptible si se observaron asociaciones negativas entre los CD4⁺ y Tγδ/WC1⁺ apicales con las larvas intramurales y entre las células CD2⁺ basales con las larvas lumbinales. Si bien entre razas no se observaron diferencias para estas variables parasitológicas, está descrito el papel de los linfocitos CD4⁺ en la expresión de resistencia genética frente *H. contortus*, viéndose afectado el control de la carga y de huevos en heces al reducir esta población celular en animales en los que la respuesta protectora se orienta al estadio larvario L3 (Gill *et al.*, 1993b). La posible participación activa de los linfocitos CD4⁺ en esta raza

susceptible podrían explicar la eosinofilia (Tabla 4.6). A los 7 dpi, CAP solo mostró asociación negativa entre MHC-II⁺ basales (molécula vinculada con la presentación de antígenos) y las cargas parasitarias intramurales, asociación que también observó **Hernández, 2011**, aunque en su caso no fue significativa ($r=-0,5$). Este dato puede ser interesante porque permite relacionar esa asociación con las interacciones observadas en el mismo momento de la infección entre la variable parasitológica larvas intramurales con la IgA y la IgG específicas del mucus. De hecho, la IgGmSA, la IgAmL3 y IgAmSA se asocian positiva y fuertemente con las células MHC-II⁺ ($r=1^{**}$ -dato no mostrado anteriormente), lo que podría sugerir que se produce una presentación de antígenos en el momento intramural del estadio larvario que va a condicionar posteriormente la carga parasitaria.

A los 21 dpi también se observaron diferencias entre razas en los recuentos de las poblaciones celulares. En la raza CAN se incrementaron los T $\gamma\delta^+$, MHC-II y CD2⁺, sin embargo estas poblaciones no se correlacionaron negativamente con las distintas variables parasitológicas estudiadas. La raza CAP, por el contrario, mostró recuentos significativamente mayores que la raza susceptible de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, estando la población CD4⁺ asociada negativamente con la carga parasitaria, además en esta etapa se produjo un incremento significativo (dentro de raza) de los eosinófilos en abomaso, los cuales, a través del recuento de la galectina 14⁺ - proteína específica de eosinófilos, considerada marcador de actividad de los mismos (**Young et al., 2009**)- se asociaron negativamente con las variables carga parasitaria, longitud y huevos en útero. Los eosinófilos galectina 14⁺ basales y los linfocitos CD4⁺ apicales asociaron positivamente entre sí ($r=0,898^{**}$ -no publicado), lo que refuerza el papel de estas dos poblaciones en el control de la carga en una respuesta conjunta. La variable parasitológica huevos en útero también asoció negativamente con los linfocitos T $\gamma\delta^+$. Esta asociación entre la fecundidad y los linfocitos T $\gamma\delta^+$ y eosinófilos han sido descritas en esta raza (**Hernández, 2011; González et al., 2011a**). La galectina 14 puede promover la adhesión celular y cambiar las propiedades del mucus (**Young y Meeusen, 2004; Young et al., 2009**), lo que facilitaría la eliminación de los vermes, estando implicadas en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa (**Young y Meeusen, 2004**) frente *H. contortus*. Están descritas asociación negativas de esta lectina con carga parasitaria a los 2 dpi en ovejas de razas susceptibles tras inoculaciones seriadas y desafío con *H. contortus*, si bien su papel no está aún del todo claro (**Robinson et al., 2011**).

Las asociaciones observadas entre las poblaciones celulares y las dos razas, sugieren una vez más que la CAN orienta sus respuestas en etapas más tempranas de la infección, mientras que la raza resistente la dirige frente a estadios preadultos-adultos (**González et al., 2008**) en animales primoinfectados mediante un mecanismo inmune único no descrito en la bibliografía,

pues los leucocitos globulares, población celular que no presentó incrementos ni asociación con los resultados parasitológicos en este experimento ni en estudios previos de nuestro grupo (**Hernández, 2011**), han sido vinculados con la expulsión rápida de los vermes en animales inmunizados (**Balic et al., 2000b; Balic et al., 2002**).

Igualmente importante resulta la cinética de los eosinófilos en el abomaso, pues estos aumentan en la mucosa del abomaso a los 7 dpi en la raza susceptible para posteriormente disminuir, ajustándose a lo descrito en la bibliografía (**Balic et al., 2000b**), mientras que en la raza resistente su número se incrementa hasta los 21 dpi y se mantienen constantes a los 28 dpi (**González et al., 2011a; Hernández, 2011**) acorde a la diana parasitológica propuesta para cada raza. Aunque se ha vinculado a estas células con la expulsión larvaria en ovejas sensibilizadas (**Balic et al., 2002**), los resultados de este estudio sugieren que en la raza CAP también serían importantes en inoculaciones simples.

Es conocido el efecto del mucus en los mecanismos de expulsión de los nematodos gastrointestinales (**Balic et al., 2000b**). Con el fin de determinar su efecto en este modelo se realizó el ensayo de inhibición de la migración larvaria del mucus. Sin embargo, ni a los 7 ni a los 21 dpi se observaron diferencias entre razas. No obstante, la tendencia fue diferente entre razas, con mayor inhibición de migración larvaria a los 7 dpi en la raza CAN y mayor inhibición a los 21 dpi en la raza CAP, lo que parece coherente con su estadio parasitario diana, tal y como se ha sugerido hasta ahora. El porcentaje de larvas con motilidad inhibida en la raza CAN a los 7 dpi fue del 48%, frente al 22% de CAP; a 21 días la inhibición en CAP fue del 44% y en CAN del 37%. En un ensayo anterior (**González et al., 2011b**) sí se observaron diferencias entre razas en la inhibición larvaria por parte del mucus a los 28 dpi, por lo que quizás la modificación del ambiente del abomaso podría ser responsable de protección en la raza CAP. Es posible que estos cambios dificulten, no solo la permanencia del verme en el abomaso, sino también la reproducción y el desarrollo, consiguiendo, que las cargas en la raza CAP sean más bajas y los vermes menos largos y fecundos (**Balic et al., 2000b; González et al 2008; Hernández, 2011**). Un mecanismo que se ha descrito involucra a la galectina-11, producida específicamente por las células epiteliales, que es capaz de unirse específicamente a la región faríngea de las L4 de *H. contortus*, comprometiendo probablemente, su alimentación y desarrollo (**Preston, 2013; González et al., 2015**).

En conclusión, la raza CAP es capaz de controlar la carga parasitaria entre los días 7 y 21 pi, mientras que la longitud y fecundidad de los vermes entre los 21 y 28 dpi tras una única inoculación de 20.000 L3 de *H. contortus*, lo que sugiere que en este mecanismo de resistencia

estarían actuando factores innatos de la raza. A tenor de los resultados obtenidos, podemos intuir que la carga parasitaria en la raza CAP parece estar controlada por un reconocimiento antigénico a los 7 dpi más eficaz que en CAN a través de las células MHC-II⁺ y CD45RA⁺ que, unidos a la activación CD4⁺, darán lugar a la producción de IgG e IgA específicas que, ya sea por acción directa sobre los vermes intramurales como por activación de los eosinófilos y su degranulación, estarían desencadenado daños en los vermes y/o alteración de las condiciones del mucus que limitarían su permanencia en el huésped a lo largo del tiempo, pues en el establecimiento larvario no hay diferencias entre razas. Por supuesto, se requieren estudios posteriores para constatar si esta hipótesis es correcta. **Guo et al., 2015**, que han realizado recientemente la secuenciación transcriptómica de ARN procedente del abomaso de estos mismos animales, observaron diferencias en la expresión de genes por la infección de *H. contortus*, sobreexpresándose en CAP 711 genes frente a 50 en CAN. Algunos de estos genes sobreexpresados en CAP podrían estar relacionados con el control de la carga parasitaria, destacando un mejor mantenimiento de la inflamación local, mejor capacidad en la producción de mucina y en la remodelación-reparación de la matriz extracelular, así como una migración de leucocitos acelerada, que hacen que los individuos de esta raza resistente estén mejor adaptados fisiológicamente, respondiendo mejor a la infección por *H. contortus* que la raza susceptible. Esta ventaja genética, junto con las diferencias en la respuesta inmune celular y humoral, supone una combinación que no se había valorado anteriormente en la raza, y que al estudiarse con mayor profundidad podrían dar respuesta a los vacíos existentes en el mecanismo de resistencia de esta raza rústica. Estos resultados avalan el interés que tienen las razas locales, poco caracterizadas, como modelos de resistencia a enfermedades (**Piedrafito et al., 2010**) y el papel que la fisiología/metabolismo y quizás otros factores ecológicos, como la microbiota, podrían tener en el complejo equilibrio que se establece entre el parásito y su hospedador.

CAPÍTULO III. REDUCCIÓN *IN VIVO* DE LINFOCITOS $T\gamma\delta$ EN OVINOS DE LA RAZA RESISTENTE CANARIA DE PELO INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON *HAEMONCHUS CONTORTUS*

1. RESUMEN

En la isla de Gran Canaria conviven dos razas ovinas con diferente susceptibilidad a la infección por *Haemonchus contortus*, la raza ovina Canaria de Pelo (CAP), resistente, y la raza ovina Canaria (CAN), más susceptible. Atendiendo a resultados previos, y a diferencia de lo que sucede en otras razas ovinas, la diana de esta resistencia en la raza CAP sería el estadio adulto del parásito, reduciéndose la carga parasitaria, así como la longitud y fecundidad de los vermes (González *et al.*, 2008). El estudio de la respuesta inmune celular en la raza CAP, reveló correlaciones negativas significativas entre los eosinófilos y los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ con la fecundidad de los vermes adultos, lo que sugería que estas células podrían jugar un papel novedoso en el control de estos helmintos (González *et al.*, 2011a). Por otro lado, el estudio demostró que la respuesta inmune humoral local, manifestada por la presencia de IgA específica en el mucus frente al antígeno somático adulto (SA) de *H. contortus*, se relaciona negativamente con la longitud de los parásitos. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la reducción de los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ en los ovinos de la raza CAP durante la infección experimental por *H. contortus*. La reducción, que se logró con éxito tanto en sangre periférica como en abomaso, se llevó a cabo administrando por vía intravenosa 2,8 mg del anticuerpo monoclonal anti-WC1 (CC15) que reconoce antígenos de superficie de los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$. El grupo de animales al que se administró el anticuerpo (en adelante, AntiWC1), presentó menor número de vermes y un menor recuento de huevos en heces (HGH), sin embargo, los parásitos fueron significativamente más largos y prolíficos que los del grupo Control, perdiéndose en el grupo antiWC1, las asociaciones negativas entre la IgA del mucus y los eosinófilos de la mucosa del abomaso con los datos parasitológicos. En su conjunto, estos resultados sugieren que los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ juegan un papel en el control de la fecundidad, regulando la longitud y el número de huevos en útero (EIU), probablemente coordinando las respuestas locales de IgA y la infiltración y funcionalidad de los eosinófilos.

2. INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$, es una población de linfocitos T que constan de un receptor antigénico (TCR) formado por una cadena gamma (γ) y otra delta (δ) unido a la molécula CD3 (**Brenner *et al.*, 1986**), a diferencia de la otra población de linfocitos T $\alpha\beta^+$, cuyas cadenas son α y β . A esta población celular, caracterizada por su rápida activación (**Evans *et al.*, 1994**), se le han atribuido numerosas funciones, como por ejemplo el reconocimiento de antígenos no peptídicos sin necesidad de células presentadoras de antígeno (**Kronenberg, 1994; Boismenu y Havran, 1997**), capacidad de presentadora de antígenos (**Brandes *et al.*, 2005**), el reconocimiento de antígenos autólogos, la producción de citoquinas y actividad citolítica (**Haas *et al.*, 1993; Hayday 2000**), considerándoles un nexo entre la inmunidad innata y la adquirida (**Beard *et al.*, 2000; Modlin y Sieling, 2005**).

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ en ovinos suponen entre el 30-60% (**Mackay *et al.*, 1989**) de sus linfocitos circulantes, siendo esta proporción mayor en animales jóvenes (**Ayoub y Young, 1996**). La alta proporción de estos linfocitos en el ganado ovino, en comparación con otros mamíferos, como roedores y el hombre, se debe a la presencia de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1 $^+$ (**Conrad *et al.*, 2007**). Este antígeno de superficie se corresponde con una glicoproteína transmembrana miembro de la superfamilia de receptores *scavenger* ricos en cisteína (SRCR) de 215-220 kDa (**Wijngaard *et al.*, 1992**) a los que se le atribuye un papel común en la activación y regulación de la respuesta celular, actuando como correceptores (**Kanan *et al.*, 1997; Hsu, 2013; Hsu *et al.*, 2015**).

Tradicionalmente, la respuesta inmunitaria protectora frente a *H. contortus* está vinculada a los linfocitos T $\alpha\beta$ /CD4 $^+$, población que responde a través de la producción de citoquinas que activan e inducen proliferación y diferenciación de mastocitos, leucocitos globulares, eosinófilos y plasmocitos (**Gill *et al.*, 1993b**). Sin embargo, conviene remarcar que, pese a no haberse determinado su papel, también se ha observado un incremento de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en las paredes del abomaso de ovinos primoinfectados, sugiriendo un papel en la respuesta inmune frente a *H. contortus* (**Balic *et al.*, 2000a**). En infecciones de ovinos con *Trichostrongylus colubriformis* también se observaron incrementos de los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1 $^+$ en el intestino (**McClure *et al.*, 1992**). Sin embargo, **McClure *et al.*, 1995** encontraron menos vermes y HGH en el grupo de animales en los que se redujo selectivamente esta población celular, lo que cuestionó su papel en la resistencia a la infección. **González *et al.*, 2011a**, observaron correlaciones negativas entre los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1 $^+$ y los eosinófilos de la mucosa abomasal con la variable huevos en útero en ovinos de la raza CAP inoculados con una única dosis de *H. contortus*. Además, estas dos

poblaciones celulares se correlacionaron positivamente entre sí sugiriendo una acción conjunta. Otra variable que ejerce control en la fecundidad de *H. contortus* en esta raza es la IgA local específica de antígeno somático adulto, observándose asociación negativa con la carga parasitaria, fecundidad y longitud a diferente momento de la infección, tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior. Por tanto, con el fin de contribuir al conocimiento del papel de esta población celular en el particular mecanismo de resistencia de esta raza frente a este parásito, nos propusimos reducir *in vivo* los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Once corderos machos de la raza Canaria de Pelo fueron adquiridos en el momento del destete, procedentes de varias granjas ovinas de la isla de Gran Canaria, permaneciendo en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (España) hasta que tuvieron aproximadamente un año de edad. Los animales se alimentaron con una ración comercial de granulado para ovinos y agua *ad libitum* durante todo el periodo experimental. A su llegada a las instalaciones, se desparasitaron con fenbendazol (Panacur® 2.5, Intervet, France) a la dosis recomendada por el fabricante (2ml/10kg de peso corporal), manteniéndose libres de parásitos hasta el inicio de la experiencia. Todos los animales fueron inoculados intrarruminalmente con 10.000 L3 de *H. contortus* y se sacrificaron a los 23 dpi.

3.2 ANTICUERPO CC15 ANTI-WC1

Para el estudio y bajo la supervisión del Dr. Piedrafita (Universidad de Monash, Melbourne, Australia) se produjeron, a lo largo de unos seis meses, en total 100,8 mg del anticuerpo monoclonal WC1 (CC15) en las instalaciones de las que dispone el *Animal Biotechnology Research Laboratory* de la Universidad de Monash a partir del cultivo del clon celular. Este anticuerpo, correspondiente con el isotipo murino IgG2a, induce citólisis de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ a través de la activación del complemento (Naessens *et al.*, 1998). El objetivo, tal y como se señaló anteriormente, era reducir esta población celular de forma similar a los ensayos realizados por el grupo del Dr. Emery (CSIRO, Sidney, Australia) en ovinos infectados con *Trichostrongylus colubriformis*, en los que también se utilizó satisfactoriamente este anticuerpo con este propósito (McClure *et al.*, 1995).

Seis de los corderos seleccionados al azar formaron el grupo AntiWC1, a los que se les administró por vía intravascular 2,8 mg de anticuerpo CC15 (algo inferior a los 4 mg que administraron a los corderos en el estudio de McClure *et al.*, 1995)- antiWC1- diluido en suero fisiológico hasta completar un volumen de 10 ml. El grupo control estaba formado por cinco corderos a los que se les administró por la misma vía 10 ml de suero fisiológico. Las inoculaciones en ambos lotes se realizaron los días 6, 8, 10, 14, 17 y 21 posteriores a la infección.

3.3 MUESTRAS SANGUÍNEAS

Los días 0, 7, 13 y 20 post- inoculación se extrajo sangre (ver capítulo general de Material y Métodos) para los recuentos de las diferentes subpoblaciones celulares por citometría de flujo, para los estudios hematológicos y para la obtención de suero.

3.4 ANÁLISIS COPROLÓGICOS

Se tomaron heces directamente del recto de todos los animales para el recuento de huevos (HGH) mediante la técnica de McMaster modificado (**MAFF 1989**) desde el 19 dpi hasta el sacrificio.

3.5 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO

Tras el sacrificio de los animales se aislaron los abomasos, se tomaron muestras de tejido de la región de la curvatura mayor de este órgano y se abrieron para recoger muestras del contenido abomasal, mucus y mucosa (ver capítulo general de Material y Métodos).

3.6 ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS

Se contabilizaron los vermes de las alícuotas y se midieron aleatoriamente 30 vermes hembras y se contabilizaron los huevos intrauterinos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (ver capítulo general de Material y Métodos).

3.7 CITOMETRÍA

Inicialmente se eliminaron los eritrocitos de las muestras de sangre, para lo que se realizó una incubación de la muestra diluida al 33% con tampón de lisis, a 37 °C durante 5 minutos (Tabla 3.1). Las muestras se centrifugaron posteriormente durante 5 min a 300g (*Universal 320, Hettich Zentrifugen*). Se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres ciclos de 5 min de centrifugado a 300g, eliminando el sobrenadante de nuevo y resuspendiendo en PBS EDTA (Panreac) 8mM en cada lavado. Tras calcular la concentración de linfocitos viables con ayuda de una cámara de Neubauer (Zuzi), se ajustó la suspensión a una concentración de 10⁶ células/45 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos (Costar® 3596, Corning Incorporated, USA) y se añadió 10 µl del anticuerpo primario (Tabla 3.2). Después de homogeneizar la suspensión, se incubó 15 min a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se volvió a centrifugar a 300g durante 5 min (*Centrifuge MPW-65R, MPW*), se retiró el sobrenadante, y se resuspendió en 55 µl de PBS-EDTA añadiendo 2 µl de anticuerpo marcado con FITC (*IgG Rabbit anti-mouse FITC, Thermo Scientific*), se homogenizó de nuevo, y se incubó en oscuridad 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 300g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 57 µl de PBS-EDTA, añadiéndose 10 µl de *Propidium Iodide* (Biotium), se mezcló y se incubó 1 min en oscuridad. A continuación, se le añadió 10 µl de fluoroesferas (*Flow Count™ Fluorospheres, Beckman Coulter®*) con el fin de calcular el número de células y 140 µl de suero fisiológico, se mezcló convenientemente y se incubó otros 15 minutos a temperatura ambiente

en oscuridad. Finalmente se procedió a la lectura en el citómetro de flujo (*Cytomics FC 500MPL*, *Beckman Coulter*®) con ayuda del software MXP.

Tabla 3.1 Composición del tampón de lisis pH 7,2.

REACTIVO	FÓRMULA	PROPORCIÓN	BUFFER
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl (Merck)	90%	0,83% (p/v)
TRIS	C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Sigma)	10%	2,37% (p/v)

Tabla 3.2 Anticuerpos primarios.

ANTÍCUEPO	CLON	CÉLULAS IDENTIFICADAS	DILUCIÓN
CD2	36F	Linfocitos T, <i>Natural Killer</i>	1:5,5
CD4	SBU-T4	Linfocitos T <i>helper</i>	1:5,5
CD5	SBU-T1; 25.91	Linfocitos T WC1 ⁻ , Subpoblación Linfocitos B	1:5,5
CD8	SBU-T8 38.65	Linfocitos T citotóxicos	1:5,5
CD45RA	SBU-P220; 20.96	Linfocitos B y Linfocitos T $\alpha\beta$ <i>naïve</i>	1:5,5
$\gamma\delta$	86D	Linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺	1:5,5
WC1	19.19	Linfocitos T $\gamma\delta$ / WC1 ⁺	1:5,5
IgG	Pierce® Antibody, Rabbit Anti-sheep IgG, Thermo Scientific	Plasmocitos IgG ⁺	1:5,5

3.8 PROCESADO DE LOS RESULTADOS DE LA CITOMETRÍA

Los resultados obtenidos fueron procesados con el programa *Cyfflogic* versión 1.2.1. Para ello, se seleccionó primero la población de “células viables” en un histograma FL2 Log, descartando las células necróticas/apoptóticas marcadas con *Propidium Iodide* (segundo pico del gráfico) (Figura 3.1a). Posteriormente se seleccionó la población de linfocitos en un gráfico *dot plot Forward Scatter (FS)/ Side Scatter (SS)* (Figura 3.1a) y se visualizó la población “células viables” para poder definir una nueva *gate* (puerta) con las dos poblaciones, “células viables” y “linfocitos” (Figura 3.1b). Esta definición de las dos poblaciones a la vez, se utilizó para representar solamente los linfocitos viables (Figura 3.1c) en un histograma FL1 Log desde dónde se visualiza el FITC o células marcadas. Para determinar los linfocitos marcados con el anticuerpo, creamos una nueva *gate* definiendo para ello el segundo pico, determinando de este modo el número y % de células marcadas dentro de la población total de linfocitos viables (Figura 3.1d). Para determinar el número de células/ μ l, se estimó la cantidad de fluoroesferas (Histograma FL5 Log) contadas por el citómetro (Figura 3.1e) y se aplicó la fórmula propuesta por el fabricante.

Figura 3.1a. Histograma FL2 Log con definición de células vivas (primer pico rojo) y *dot plot* FS/SS con definición de linfocitos (amarillo).

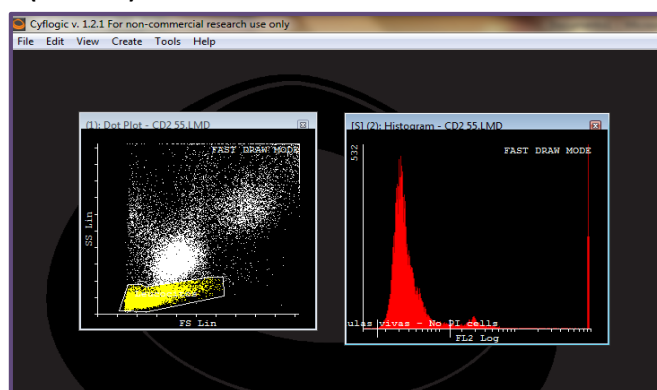


Figura 3.1 Histograma FL2 Log con definición de células vivas (primer pico rojo) y *dot plot* FS/SS con definición de linfocitos (amarillo) (b), definición de linfocitos vivos (violeta) (c).

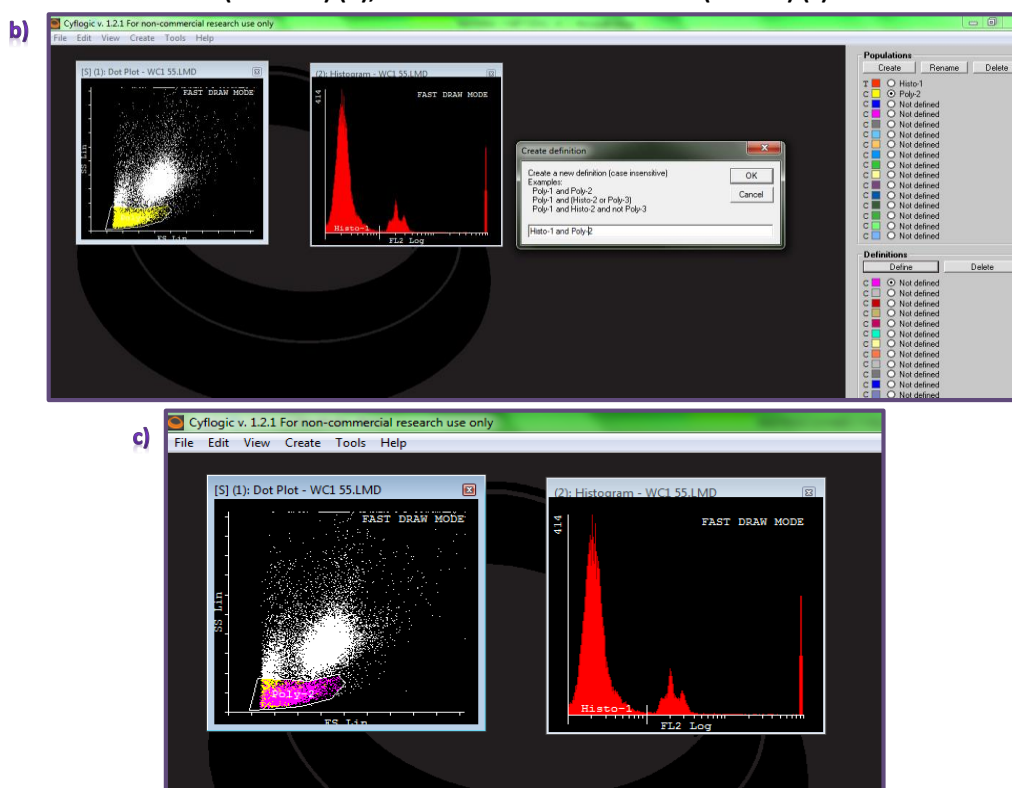


Figura 3.1d. Histograma FL1 log con definición (segundo pico rojo) de Linfocitos vivos marcados con el anticuerpo y cuadro con valores numéricos.

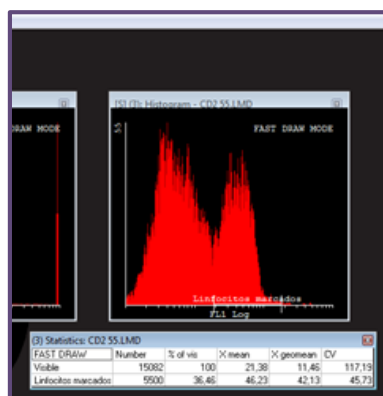
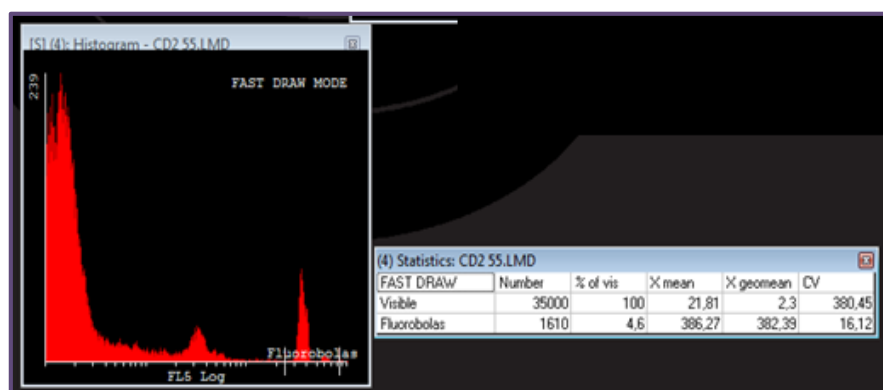


Figura 3.1e. Histograma FL5 log con definición de las fluoroesferas y cuadro numérico.



Fórmula del fabricante:

$$\text{Células}/\mu\text{l} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de fluoroesferas contadas}} \times \text{concentración de fluoroesferas del vial.}$$

3.9 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de abomaso tomadas tras el sacrificio fueron procesadas (Capítulo general de Material y Métodos) y se identificó y contabilizó los eosinófilos, leucocitos globulares, mastocitos, linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺, T $\gamma\delta$ /WC1⁺, CD4⁺, CD8⁺, MHC-II⁺, CD45RA⁺, y galectina 14⁺ por mm², así como la producción de galectina 11⁺ en la región apical de la mucosa del abomaso.

3.10 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)

Los niveles de IgA específicas en mucus e IgG específica en suero frente a antígeno SA fueron determinados mediante E.L.I.S.A. siguiendo el protocolo descrito en el capítulo general de Material y Métodos. Las condiciones de las muestras se recogen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado.

MUESTRA	INMUNOGLOBULINA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Mucus	IgA	10 µg/ml SA	1:5	1:100
Suero	IgG	5 µg/ml SA	1:100	1:3000

3.11 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA

La electroinmunotransferencia sobre antígeno SA de las muestras de mucus se realizó con el fin de valorar el reconocimiento de fracciones proteicas del antígeno SA por parte de la IgA específica local. Para ello, se llevó a cabo el protocolo recogido en el capítulo general de Material y Métodos. Las condiciones de concentración de los reactivos utilizados y muestras se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Mucus	1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ SA	1:5	1:500 IgA

3.12 PROCESADO DE IMAGEN

Una vez capturada la imagen de la electroinmunotransferencia con un sistema de documentación de geles (BioRad *Molecular Image*® GelDoc™ XR + *Imaging System*), se procesaron las imágenes con el programa *Image Lab*™ (*Software version 2.0.1 BioRad*). El recorte y organización de las tiras que se muestran en las distintas imágenes, se realizó con el programa *Adobe Photoshop CS4 Extended Versión 11.0*.

3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo dicho análisis, se utilizó el software *IBM SPSS Statistics* versión 17. Los datos recuentos de huevos en heces (HGH) acumulado y HGH23 se analizaron tras normalizarlos previa transformación a $\text{Log}_{10}+1$. Los datos de carga parasitaria, huevos en útero, HGH y de la IgA se analizaron aplicando el modelo lineal generalizado, considerando una distribución gamma logarítmica y el método de estimación Newton Raphson con escala χ^2 de Pearson. Para poder realizar ese método estadístico, se añadió 0,1 a cada dato cuando algún dato fue "0". En el caso de los HGH se utilizó el modelo general lineal de medidas repetidas. La longitud de los vermes se analizó también aplicando el modelo lineal generalizado pero considerando una distribución normal lineal y el método de estimación Híbrido. Tanto la variable huevos en útero como longitud se analizaron incorporando la covariable animal. Los resultados de citometría se analizaron por medio de la comparación de medias mediante prueba no paramétrica U de Mann-Whitney al igual que los recuentos de células de los abomasos. Las comparaciones de hematocrito, proteínas plasmáticas y eosinófilos en sangre se realizando utilizando el modelo general lineal (GLM). Las asociaciones entre las distintas variables se valoró mediante la determinación de los coeficientes de correlación de Spearman entre datos parasitológicos y/o inmunológicos obtenidos. Las relaciones entre variables se analizaron también mediante regresión lineal utilizando la ecuación de regresión múltiple $y = a + bx_1 + cx_2 + \dots nx_n$. Probabilidades de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1 CITOMETRÍA

Tras la administración intravenosa del anticuerpo monoclonal anti-WC1 (CC15) se observó una reducción significativa en sangre periférica para las poblaciones celulares $T\gamma\delta^+$ y $T\gamma\delta/WC1^+$, lográndose una reducción respectivamente del 81% y del 88% a los 7dpi, del 82% y del 86% a los 13dpi y del 85% y del 90% a los 20dpi en el grupo de animales a los que se administró el anticuerpo AntiWC1 (Figura 4.1 y Tabla 4.1).

En relación a la cinética sanguínea de las otras subpoblaciones celulares, se observaron algunas pequeñas diferencias, aunque significativas, entre las poblaciones de linfocitos $CD4^+$ a los 20dpi (Control: 4.219 ± 1.115 ; AntiWC1: 7.272 ± 1.364 ; $p=0,05$), $CD5^+$ a los 7dpi (Control: 8.140 ± 516 ; AntiWC1: 4.929 ± 939 ; $p=0,05$) y para el anticuerpo $CD45RA^+$ antes de iniciar la experiencia (0dpi) (Control: 15.202 ± 607 ; AntiWC1: 6.907 ± 1.219 ; $p=0,006$) y 13dpi (Control: 14.611 ± 3.344 ; AntiWC1: 6.845 ± 584 ; $p=0,045$) (Tabla 4.1).

Figura 4.1 Representación gráfica de la citometría de flujo de sangre periférica de un animal representativo de cada grupo para el anticuerpo monoclonal WC1. Población de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ /*Propidium Iodide*

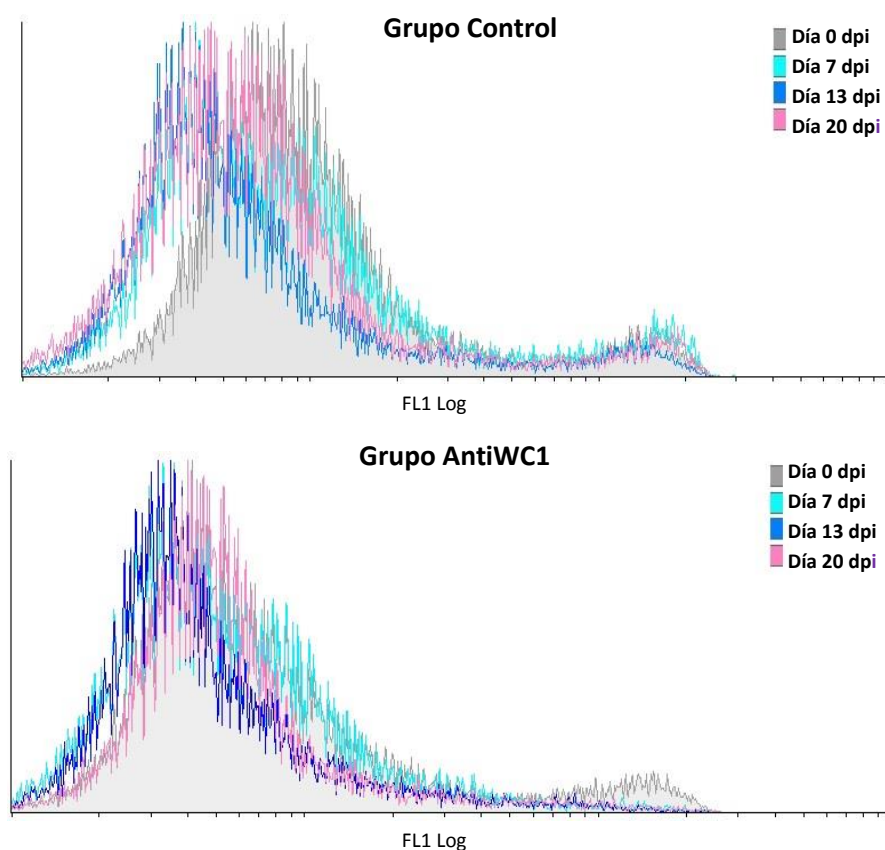


Tabla 4.1 Recuentos medios (media $\pm$ EEM) de diversas subpoblaciones celulares en sangre periférica en el grupo control y en el grupo al que se administró el anticuerpo (anti-WC1) recogidas los días 0, 7, 13 y 20 pi. EEM: Error estándar de la media. * indica $p \leq 0,05$ ** indica $p \leq 0,01$.

MEDIAS CÉLULAS CITOMETRÍA									
		$\gamma\delta$ 0dpi	$\gamma\delta$ 7dpi	$\gamma\delta$ 13 dpi	$\gamma\delta$ 20dpi	WC1 0dpi	WC1 7dpi	WC1 13dpi	WC1 20dpi
Control	Media	2403	2528**	1982*	2341**	1821	1655**	1374*	1072**
	$\pm$ EEM	± 420	± 572	± 355	± 332	± 423	± 195	± 324	± 136
AntiWC1	Media	2770	516**	492*	404**	2559	299**	342*	257**
	$\pm$ EEM	± 629	± 48	± 141	± 109	± 956	± 56	± 139	± 68
		CD4 0dpi	CD4 7dpi	CD4 13dpi	CD4 20dpi	CD8 0dpi	CD8 7dpi	CD8 13dpi	CD8 20dpi
Control	Media	4607	3018	3785	4219*	1274	1389	2102	1820
	$\pm$ EEM	± 820	± 371	± 883	± 1115	± 223	± 480	± 557	± 657
AntiWC1	Media	3102	3015	3760	7272*	1289	1187	1194	2020
	$\pm$ EEM	± 517	± 477	± 671	± 1364	± 188	± 362	± 160	± 407
		CD2 0dpi	CD2 7dpi	CD2 13dpi	CD2 20dpi	CD5 0dpi	CD5 7dpi	CD5 13dpi	CD5 20dpi
Control	Media	6673	5439	6690	6083	1088	8140*	9574	10275
	$\pm$ EEM	± 1063	± 214	± 1388	± 1807	± 16592	± 516	± 1424	± 3084
AntiWC1	Media	3911	5486	6492	8797	6868	4929*	7662	10039
	$\pm$ EEM	± 742	± 1426	± 1178	± 259	± 1459	± 939	± 1643	± 1194
		CD45RA 0dpi	CD45RA 7dpi	CD45RA 13dpi	CD45RA 20dpi	IgG 0dpi	IgG 7dpi	IgG 13dpi	IgG 20dpi
Control	Media	15202**	7370	14611*	12694	9212	2590	4453	6634
	$\pm$ EEM	± 607	± 1786	± 3344	± 3950	± 1962	± 794	± 1261	± 1882
AntiWC1	Media	6907**	6607	6845*	10251	4027	1701	3325	4765
	$\pm$ EEM	± 1219	± 1489	± 584	± 2073	± 1700	± 539	± 1007	± 511

4.2 PARASITOLOGÍA

El grupo AntiWC1 presentó menores HGH entre los días 19-23 post-inoculación y menor carga parasitaria (Tabla 4.2) que el grupo Control, aunque estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, los vermes fueron significativamente más largos y más prolíficos en el grupo AntiWC1 (Tabla 4.2). En uno de los animales del grupo control (#67) no se observaron vermes ni en los lavados ni tras las digestiones de abomaso.

Tabla 4.2 Recuentos de huevos en heces (HGH), carga parasitaria, longitud y huevos en útero (Media $\pm$ EEM) obtenidos en el momento del sacrificio de los animales a los 23 dpi. EEM: Error Estándar de la Media. Huevos por gramo de heces, corresponde con los datos transformados mediante $\text{Log}_{10} + 1$. ** indica $p \leq 0,01$.

MEDIAS PARASITOLOGÍA									
		HGH 19 dpi	HGH 20 dpi	HGH 21 dpi	HGH 22 dpi	HGH 23 dpi	Carga parasitaria	Longitud (mm)	Huevos en útero
Control	Media	1,14	1,74	1,91	2,42	2,52	2428	14,91**	197**
	$\pm$ EEM	$\pm 0,75$	$\pm 0,75$	$\pm 0,82$	$\pm 0,70$	$\pm 0,74$	± 790	$\pm 0,18$	± 13
AntiWC1	Media	0,60	1,31	1,96	2,08	2,07	1373	16,70**	332**
	$\pm$ EEM	$\pm 0,60$	$\pm 0,63$	$\pm 0,68$	$\pm 0,70$	$\pm 0,72$	± 634	$\pm 0,18$	± 14

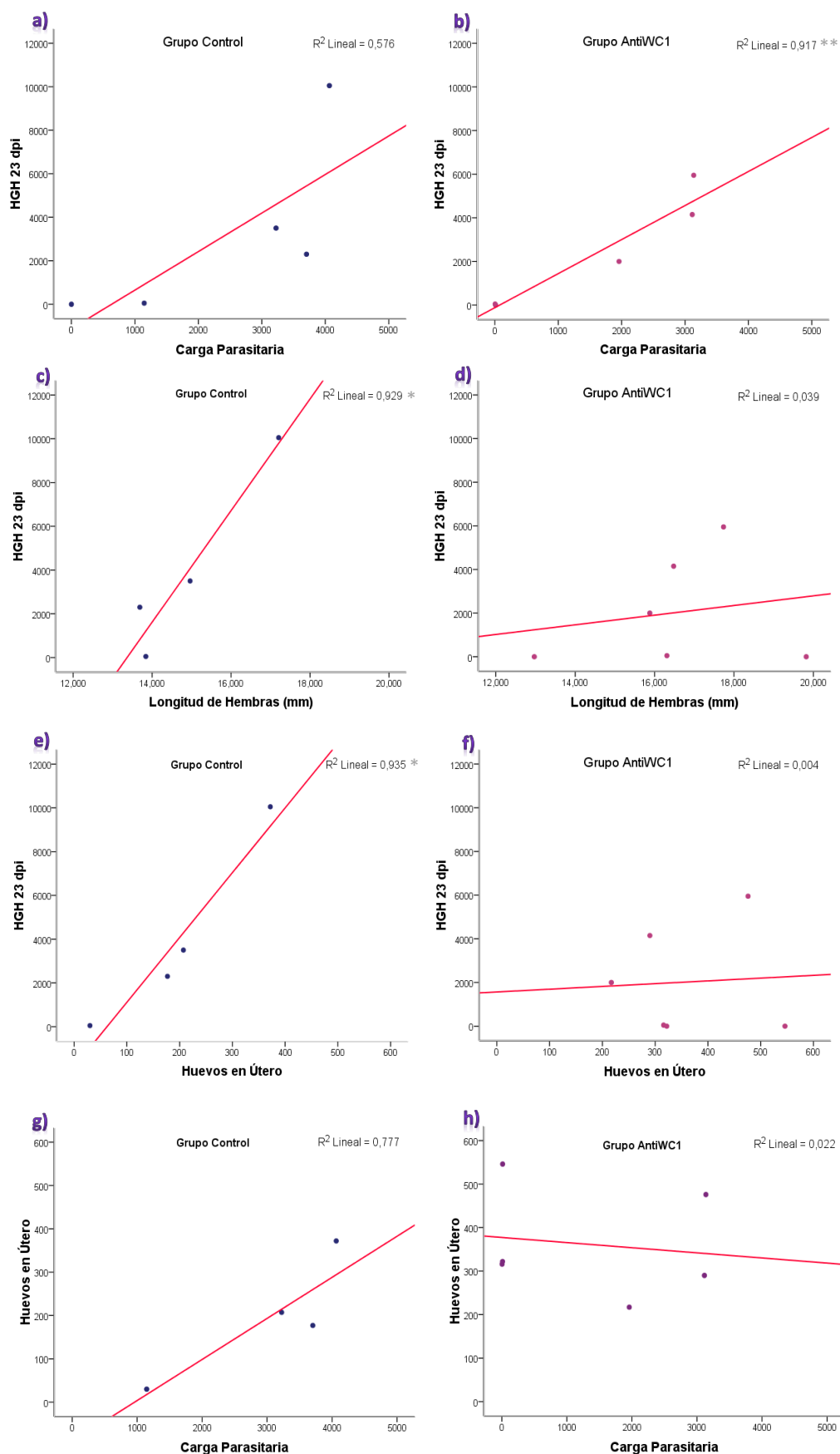
Al comparar las asociaciones entre las variables parasitológicas en los dos grupos experimentales se observó que los HGH a los 23 días post-inoculación en el grupo Control se

correlacionaban significativamente con el resto de variables parasitológicas (Tabla 4.3), tales como carga parasitaria (Figura 4.2a), longitud (Figura 4.2c) y huevos en útero (Figura 4.2e), mientras que en el grupo AntiWC1 se asoció únicamente con carga parasitaria (Tabla 4.3 -Figura 4.2b, 4.2d y 4.2f). De forma similar, las variables huevos en útero y carga parasitaria sólo correlacionaron positivamente en el grupo control (Tabla 4.2 y Figura 4.2g y 4.2h).

Tabla 4.3 Coeficiente de correlación de Spearman entre huevos en heces a 23 días post-inoculación (HGH 23dpi), carga parasitaria, longitud y huevos en útero. * indica $p \leq 0,05$ ** indica $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN					
		HGH 23dpi	Carga parasitaria	Longitud (mm)	Huevos en útero
HGH 23dpi	Control		,900*	,800	1,000**
	AntiWc1		,812*	,232	-,319
Carga parasitaria	Control	,900*		,400	,800
	AntiWC1	,812*		,429	-,029
Longitud (mm)	Control	,800	,400		,800
	AntiWC1	,232	,429		,600
Huevos en útero	Control	1,000**	,800	,800	
	AntiWC1	-,319	-,029	,600	

Figura 4.2 Dispersión gráfica de las variable carga parasitaria, longitud y huevos en útero con huevos en heces (HGH) a los 23 días post-inoculación y, de la variable carga parasitaria con huevos en útero. * indica $p \leq 0,05$ ** indica $p \leq 0,01$.



4.3 HEMATOLOGÍA

No se observaron diferencias significativas en el hematocrito, proteínas plasmáticas y eosinófilos en sangre periférica entre los grupos Control y AntiWC1 (Tabla 4.3). Sin embargo, la media de los hematocritos obtenido el día 20pi, se asoció negativamente (Tabla 4.4) con carga parasitaria ($p=0,037$) (Figura 4.3a), longitud (Figura 4.3c) y huevos en útero (Figura 4.3e) en el grupo Control, mientras que en el grupo AntiWC1, la asociación con la carga parasitaria y longitud fue algo más débil (Tabla 4.4 y Figuras 4.3b y 4.3d), siendo incluso positiva con número de huevos en útero (Tabla 4.4 y Figura 4.3f).

Tabla 4.3 Recuentos medios (Media $\pm$ EEM) de hematocrito (Hto), proteínas plasmáticas (PP) y eosinófilos de sangre periférica (EOS) obtenidos los días 0, 7, 13 y 20pi. EEM: Error Estándar de la Media.

MEDIAS HEMATOLOGÍA													
		Hto 0 dpi	Hto 7 dpi	Hto 13 dpi	Hto 20 dpi	PP 0 dpi	PP 7 dpi	PP 13 dpi	PP 20 dpi	EOS 0 dpi	EOS 7 dpi	EOS 13 dpi	EOS 20 dpi
Control	Media	38,60	37,60	37,80	34,20	7,38	7,28	7,28	7,12	0,00	351	545	131
	$\pm$ EEM	$\pm 0,40$	$\pm 1,29$	$\pm 0,92$	$\pm 1,36$	$\pm 0,17$	$\pm 0,23$	$\pm 0,12$	$\pm 0,12$	$\pm 0,00$	± 38	± 218	± 19
AntiWC1	Media	37,50	37,50	36,50	33,00	7,20	7,20	7,03	6,73	16,08	444	393	219
	$\pm$ EEM	$\pm 0,81$	$\pm 0,85$	$\pm 1,38$	$\pm 1,53$	$\pm 0,07$	$\pm 0,13$	$\pm 0,03$	$\pm 0,14$	$\pm 16,08$	± 200	± 86	± 62

Respecto a los niveles de proteínas plasmáticas detectadas a los 20 dpi, estos se correlacionaron significativamente con las determinaciones de IgG específicas frente a antígeno somático adulto observadas en los sueros en ese momento de la infección ($r=0.677^*$) en ambos grupos.

Aunque no se observaron diferencias en las poblaciones sanguíneas de eosinófilos en los dos grupos, sí se asociaron a los 13 dpi negativamente con la longitud, HGH y número de huevos en útero en el grupo control (Tabla 4.4 y Figura 4.4).

Tabla 4.4 Coeficiente de correlación de Spearman entre hematocrito a 20 días post-inoculación (Hto 20dpi) y eosinófilos en sangre del día 13 post-inoculación (EOS 13dpi) con las variables parasitológicas huevos en heces (HGH), carga parasitaria, longitud y huevos en útero en ambos grupos. * indica $p \leq 0,05$ ** indica $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN					
		HGH 23 dpi	Carga Parasitaria	Longitud	Huevos en Útero
Hto 20 dpi	Control	-0,800	-0,900*	-0,400	-0,800
	AntiWC1	-0,870*	-0,543	-0,086	0,429
EOS 13 dpi	Control	-0,900*	-0,800	-0,800	-1,000**
	AntiWC1	-0,319	-0,486	0,429	0,657

Figura 4.3 Dispersión gráfica de las variables carga parasitaria, longitud y huevos en útero con hematocrito 20 dpi en ambos grupos. * indica $p \leq 0,05$.

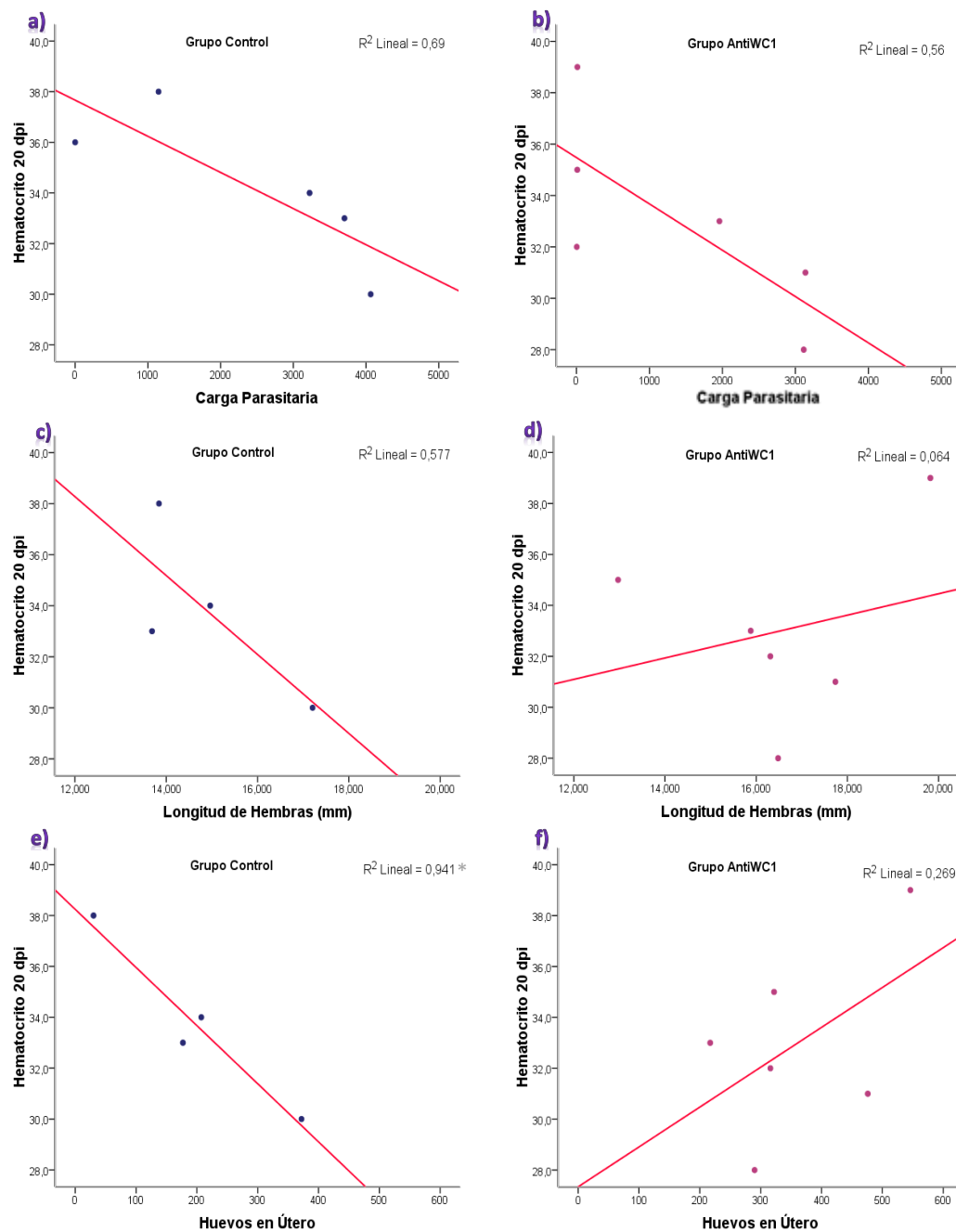
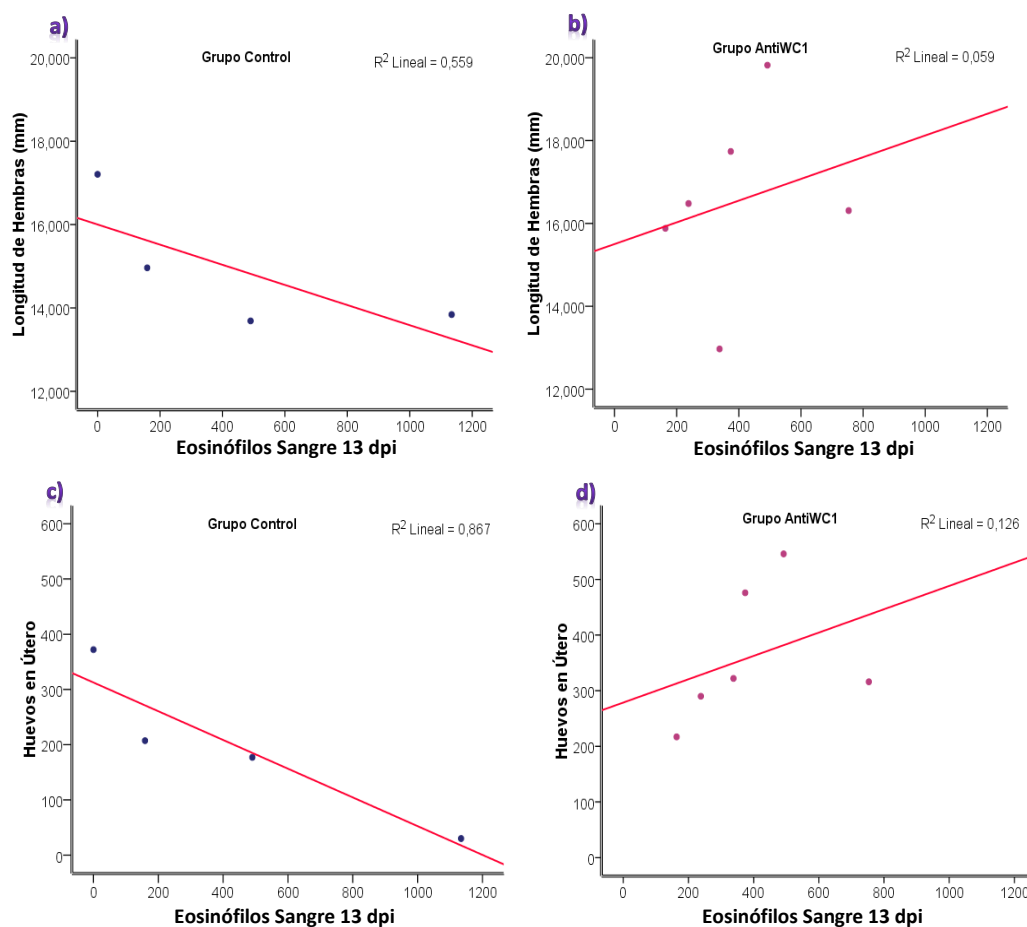


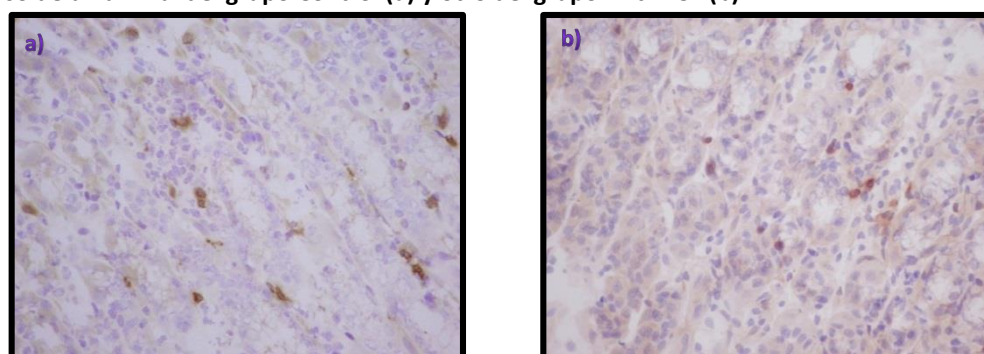
Figura 4.4 Dispersión gráfica de la variable eosinófilos en sangre periférica del día 13 post-inoculación con las variables parasitológicas longitud de las hembras y huevos en útero en ambos grupos.



4.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR LOCAL

Tras la administración de los anticuerpos en sangre periférica y el posterior sacrificio de los animales, se observó una reducción tisular de las poblaciones celulares de linfocitos $T\gamma\delta^+$ y linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ del abomaso en el grupo AntiWC1 (Tabla 4.5 y Figura 4.5), siendo estadísticamente significativa la reducción de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ en la zona basal de la mucosa ($p=0,017$).

Figura 4.5 Imagen representativa del marcaje inmunohistoquímico de los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ del abomaso de un animal del grupo Control (a) y otro del grupo AntiWC1 (b).



Aunque en el grupo AntiWC1 se contabilizaron de media más eosinófilos, células galectina 14⁺ y leucocitos globulares y un menor número de mastocitos, CD4⁺, CD8⁺ y MHC-II⁺ en el abomaso que el grupo Control (Tabla 4.5), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, salvo en las poblaciones del tercio inferior de la mucosa de CD45RA⁺. Tampoco se observaron diferencias en la producción de galectina 11⁺ (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Recuentos medios (media $\pm$ EEM) de Linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺, T $\gamma\delta$ /WC1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, MHC-II⁺, Galectina-11⁺ (Gal-11), Galectina-14⁺ (Gal-14), Eosinófilos, Mastocitos y Leucocitos Globulares (Leuco. Glob.) de las muestras de tejido de abomaso obtenidas tras el sacrificio en ambos grupos. EEM: Error Estándar de la Media. * indica $p \leq 0,05$.

MEDIAS													
		$\gamma\delta$ Basal	$\gamma\delta$ Apical	$\gamma\delta$ Total	WC1 Basal	WC1 Apical	WC1 Total	CD4 Basal	CD4 Apical	CD4 Total	CD8 Basal	CD8 Apical	CD8 Total
Control	Media	58	59	117	52*	101	153	244	179	423	215	327	542
	$\pm$ EEM	± 27	± 22	± 48	± 10	± 46	± 55	± 94	± 59	± 150	± 79	± 103	± 181
AntiWC1	Media	25	40	65	20*	36	56	117	128	245	120	225	345
	$\pm$ EEM	± 5	± 11	± 15	± 5	± 11	± 14	± 37	± 44	± 79	± 27	± 65	± 89
		Eosinófilos		Leuco. Glob.	Mastocitos		Gal-14 Basal		Gal-14 Apical		Gal-14 Total		Gal-11
Control	Media	22		2	127		20		4		24		2,8
	$\pm$ EEM	± 9		± 1	± 21		± 7		± 1		± 7		$\pm 0,4$
AntiWC1	Media	38		6	94		37		6		43		2,5
	$\pm$ EEM	± 17		± 6	± 20		± 13		± 2		± 14		$\pm 0,4$
		MHC-II Basal		MHC-II Apical	MHC-II Total		CD45RA Basal		CD45RA Apical		CD45RA Total		
Control	Media	270		170	440		265*		114		379*		
	$\pm$ EEM	± 46		± 44	± 82		± 40		± 27		± 60		
AntiWC1	Media	232		141	373		129*		73		202*		
	$\pm$ EEM	± 46		± 27	± 66		± 31		± 10		± 37		

Al analizar las correlaciones entre las células efectoras del abomaso y las distintas variables parasitológicas estudiadas, se destacan algunas asociaciones que se presentan en la Tabla 4.6. Se observó que los eosinófilos de la pared del abomaso en el grupo Control se asociaban negativa y significativamente con longitud (Figura 4.6a) y negativamente con huevos en útero (Figura 4.6c), mientras que el grupo AntiWC1 solo correlacionaban negativamente con la variable huevos en útero (Tabla 4.6), pero de forma mucho más débil (Figura 4.6d). En este grupo AntiWC1 sin embargo, se observó una fuerte asociación positiva entre los eosinófilos del abomaso y los HGH a los 23 dpi y la carga parasitaria (Tabla 4.6). La galectina-14⁺ se asoció negativamente en el grupo control con las variables longitud y huevos en útero, no observándose dicha asociación en el grupo AntiWC1 (Tabla 4.6).

Las células galectina 11⁺ asociaron negativamente en ambos grupos, adquiriendo mayor intensidad su asociación con longitud y huevos en útero en el grupo AntiWC1 (Tabla 4.6).

Finalmente, las células MHC-II⁺ basal y apical, asociaron negativamente, aunque no significativamente, con las diferentes variables parasitológicas en el grupo Control, asociaciones que no se observaron en el grupo AntiWC1 (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Coeficiente de correlación de Spearman entre eosinófilos, leucocitos globulares, Galectina-11 (Gal-11), Galectina-14 (Gal-14) basal y apical y MHC-II basal y apical del abomaso con HGH 23 dpi, carga parasitaria, longitud, huevos en útero. * indica $p \leq 0,05$ ** indica $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN					
HGH 23dpi Carga Parasitaria Longitud (mm) Huevos en Útero					
Eosinófilos	Control	0,100	0,300	-1,000**	-0,800
	AntiWC1	0,928**	0,771	0,257	-0,314
Leucocitos Globulares	Control	0,000	0,158	-0,949	-0,632
	AntiWC1	0,034	-0,304	-0,439	-0,676
Gal-11	Control	-0,211	-0,053	-0,632	-0,105
	AntiWC1	-0,015	-0,324	-0,883*	-0,736
Gal-14 Basal	Control	0,051	0,205	-0,738	-0,949
	AntiWC1	0,928**	0,657	0,429	-0,143
Gal -14 Apical	Control	0,154	0,410	-0,949	-0,738
	AntiWC1	0,406	0,143	0,429	0,029
MHC-II Basal	Control	-0,200	-0,100	-0,800	-0,400
	AntiWC1	0,667	0,371	0,600	0,200
MHC-II Apical	Control	-0,700	-0,600	-0,800	-0,400
	AntiWC1	-0,058	-0,371	0,086	0,486

Figura 4.6 Dispersión gráfica entre los eosinófilos del abomaso y las variables parasitológicas: longitud (a y b) y huevos en útero (c y d) para ambos grupos. ** indica $p \leq 0,01$.

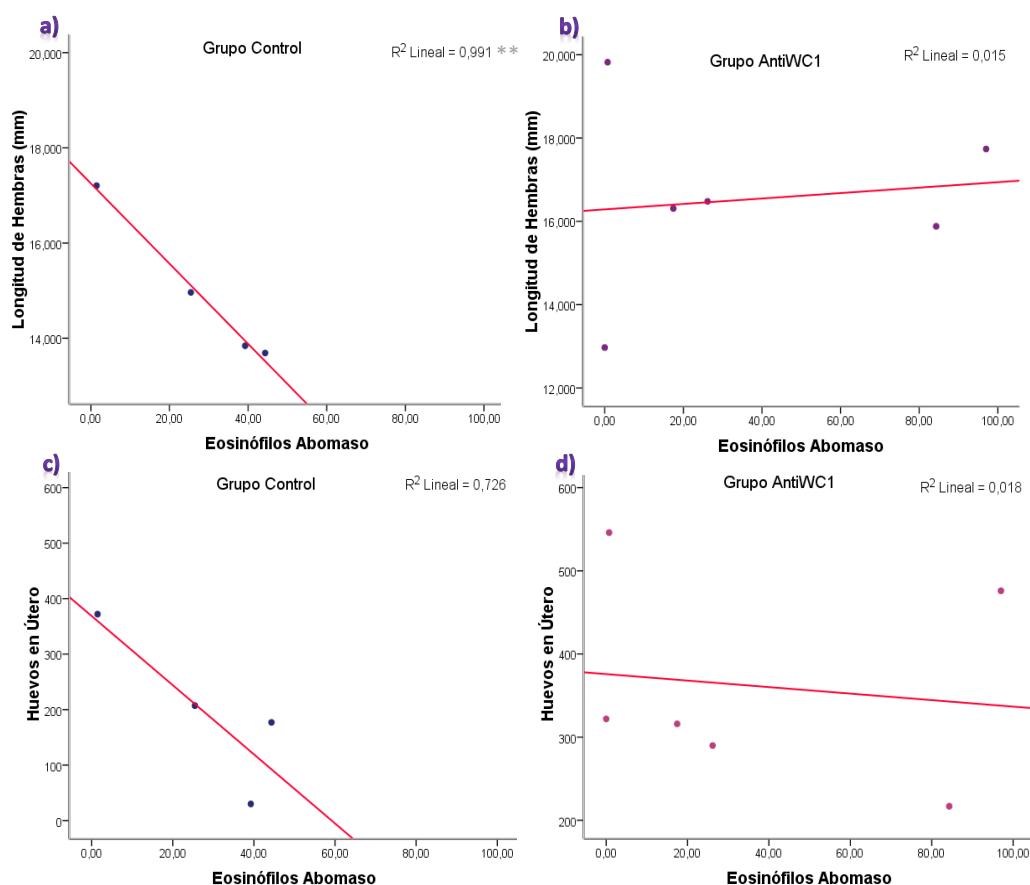
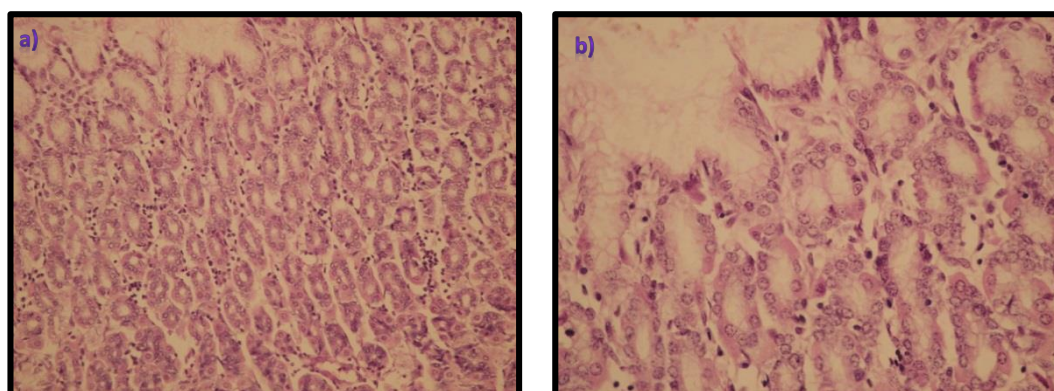


Figura 4.7 Imagen representativa de la tinción con hematoxilina y eosina para el marcaje de leucocitos globulares, donde se observa la ausencia de esta población celular en la región apical de la mucosa del abomaso a 200x (a) y 400x (b) en el animal #67, en el que no progresó la infección.



4.5 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Aunque no se detectaron diferencias en los niveles de IgA local específica frente a antígeno de verme adulto (IgAmSA) entre grupos (Tabla 4.7), sí se observaron diferencias en la forma en que la IgAmSA se asoció con las variables parasitológicas entre grupos. Así, en el grupo Control, la IgAmSA se asocia negativamente con longitud y huevos en útero, mientras que el grupo AntiWC1 pierde completamente la correlación negativa con longitud (Tabla 4.8 y Figura 4.8).

Tabla 4.7 Densidad óptica de la Inmunoglobulina A del mucus específica de antígeno somático adulto de *H. contortus* (IgAmSA) en ambos grupos (Media $\pm$ EEM). EEM: Error Estándar de la Media.

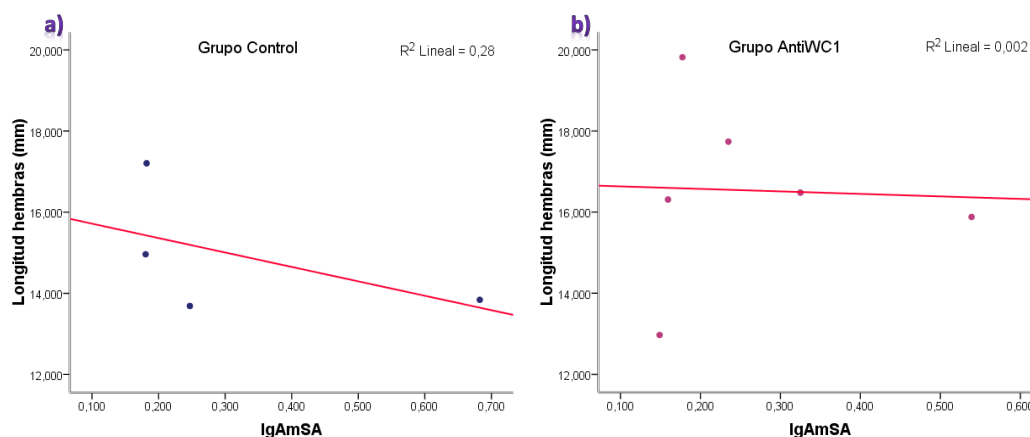
MEDIAS		
Control	Media $\pm$ EEM	0,29 $\pm$ 0,101
AntiWC1	Media $\pm$ EEM	0,26 $\pm$ 0,061

Por otra parte, la IgAmSA se asoció positivamente con las poblaciones de eosinófilos y leucocitos globulares del abomaso en los dos grupos experimentales (Tabla 4.8). Las células galectina 14⁺ de la región basal de la mucosa de abomaso asociaron positivamente con IgAmSA en ambos grupos (Tabla 4.8). Sin embargo, solo en el grupo Control, IgAmSA correlacionó con las células galectina 14⁺ apicales (Tabla 4.8).

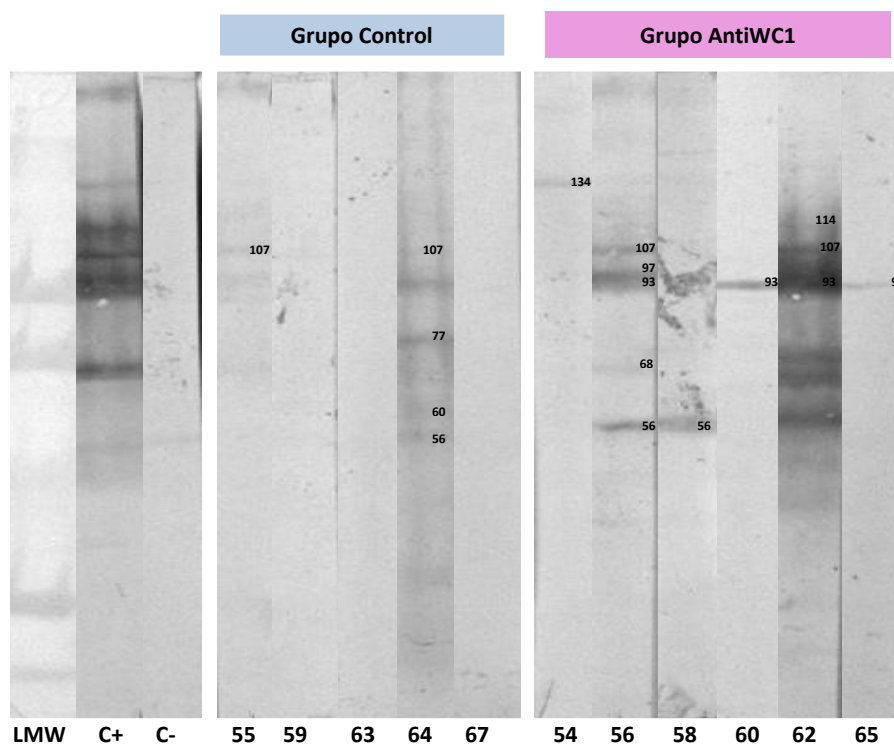
Tabla 4.8 Coeficiente de correlación de Spearman entre la densidad óptica de la IgA de mucus específica de antígeno somático adulto de *H. contortus* (IgAmSA) y las variables huevos en heces (HGH), carga parasitaria, longitud, huevos en útero, eosinófilos de abomaso (EOS. AB.), leucocitos globulares (Leuco. Glob.) y la galectina-14 (Gal-14) basal y apical. ** indica $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN									
		HGH	Carga Parasitaria	Longitud (mm)	Huevos en útero	EOS. AB.	Leuco. Glob.	Gal-14 Basal	Gal-14 Apical
IgAmSA	Control	0,100	0,300	-0,600	-0,800	0,800	0,580	0,975**	0,872
	AntiWC1	0,667	0,714	0,200	-0,543	0,771	0,338	0,486	-0,029

Figura 4.8 Dispersión gráfica entre IgAmSA y longitud de los vermes para ambos grupos.



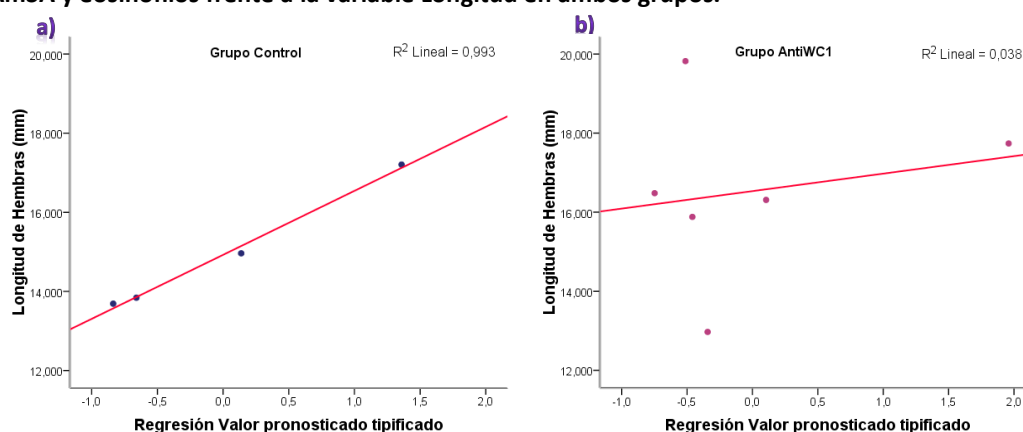
En la electroinmunotransferencia (Figura 4.9), realizada con el fin de determinar si había diferencias entre grupos en el reconocimiento del antígeno somático adulto de *H. contortus* por parte de la IgA del mucus, se observaron un mayor número de bandas en los animales del grupo AntiWC1. Sin embargo, observando los datos parasitológicos individuales de cada animal, este mayor reconocimiento antigénico no se corresponde con una respuesta más efectiva frente al parásito. Si bien, los animales con mayor número de bandas correspondieron con los animales con una mayor densidad óptica de IgA del mucus frente al dicho antígeno.

Figura 4.9 Imagen del resultado de la electroinmunotransferencia de la IgA del mucus frente al antígeno somático adulto (IgAmSA) de *H. contortus* de los ovinos de cada grupo.

4.6 REGRESIÓN MÚLTIPLE DE LA VARIABLE LONGITUD EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES EOSINÓFILOS DE ABOMASO (EOS AB.) E IgA DE MUCUS ESPECÍFICA DE ANTÍGENO SOMÁTICO ADULTO (IgAmSA)

Se observó un elevado coeficiente de regresión entre el valor pronosticado tipificado (IgAmSA y eosinófilos del abomaso) y la longitud en el grupo control ($R^2 = 0,993$ y Figura 4.10a) que se pierde claramente en el grupo AntiWC1 ($R^2 = 0,038$ – Figura 4.10b). La ecuación para el grupo control es $y = -0,308 (\text{IgAmSA}) - 0,082 (\text{EOS. AB.}) + 17,298$ y para el grupo AntiWC1 $y = -2,971(\text{IgAmSA}) + 0,013 (\text{EOS. AB.}) + 16,824$.

Figura 4.10 Dispersión gráfica de la regresión múltiple a través del valor pronosticado tipificado de la IgAmSA y eosinófilos frente a la variable Longitud en ambos grupos.



5. DISCUSIÓN

5.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LAS POBLACIONES SISTÉMICAS Y LOCALES DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ /WC1⁺

Con el presente estudio se pretendió aclarar el papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ en el control de la fecundidad de *H. contortus* en los ovinos CAP (González *et al.*, 2011a; Hernández, 2011). En estudios previos, en los que se compararon dos razas canarias (CAP y CAN) infectadas experimentalmente con un inóculo único de 20.000 L3 de *H. contortus*, se observó que los recuentos de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y de eosinófilos de la mucosa del abomaso se asociaban negativamente con la fecundidad de los parásitos en los animales de la raza resistente CAP (González *et al.*, 2011a), sugiriendo que estas células podrían jugar un papel novedoso en su control (Piedrafita *et al.*, 2010).

Para ello, se siguió una modificación del protocolo desarrollado por McClure *et al.*, 1995. Se administraron por vía intravenosa 2,8 mg, en lugar de 4 mg, del anticuerpo monoclonal (mAb) CC15 dirigido a la población de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺. Además, las inoculaciones intravenosas en días alternos del anticuerpo comenzaron el día 6 post-inoculación, en vez del día previo a iniciar la infección, con el fin de permitir que el desarrollo larvario en sus primeras fases en los grupos Control y AntiWC1 fuera idéntico. De este modo, se podía valorar el efecto de la disminución de esta subpoblación celular en los estadios adultos, considerados los elementos diana de esta población celular (González *et al.*, 2011a). Todos los animales, al igual que sucedió en el trabajo de McClure *et al.*, 1995, toleraron muy bien la administración del anticuerpo.

Se observó una reducción significativa de las poblaciones sanguíneas de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y T $\gamma\delta$ /WC1⁺, siendo del 81% y del 88% a los 7 dpi, del 82% y del 86% a los 13 dpi y del 85% y del 90% a los 20 dpi, respectivamente, algo inferior a los descritos por McClure *et al.*, 1995, probablemente por la menor dosis de anticuerpo utilizado en cada administración. Sin embargo, en la mucosa del abomaso se consiguió una reducción, comparado con los controles, del 44% de los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ totales y del 63% de los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ totales, siendo las diferencias significativas entre grupos en el recuento de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ basal ($p=0,017$) (Tabla 4.5). Este dato contrasta con la ausencia de diferencias en los recuentos de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ en la lámina propia y epitelio del yeyuno observadas por McClure *et al.*, 1995. Es posible que sea consecuencia de la zona del epitelio utilizada en los recuentos en su estudio, no especificada en los artículos publicados por el grupo Australiano del CSIRO, puesto que en nuestro trabajo sólo se observan diferencias en la región basal. Alternativamente, podría reflejar diferencias en la infiltración de estas células en el abomaso en relación al yeyuno.

5.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LOS DATOS PARASITOLÓGICOS

La reducción de los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ en los ovinos de raza CAP, afectó favorablemente al grupo AntiWC1 respecto al grupo Control en términos de excreción de huevos y carga parasitaria. Se observó una reducción del 27% del HGH acumulado y del 43% de la carga parasitaria, muy similar a lo descrito por **McClure et al., 1995** en inoculaciones con *T. colubriformis* (reducciones del 20% y del 44%, respectivamente). Es decir, a tenor de estos resultados, esta subpoblación celular favorecería al parásito en vez de perjudicarlo. **McClure et al., 1995; 1996**, sugirieron dos explicaciones a este fenómeno; una opción sería que la falta de linfocitos $T\gamma\delta^+$ no interfiriera las respuestas de hipersensibilidad retardada que generalmente se asocian con la protección a estos parásitos. Otra explicación es que se tratase de un artefacto que acompaña a la citólisis (en este caso los linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$). En contra de esta última hipótesis **McClure et al., 1995** sugieren el hecho de que se han realizado estudios similares utilizando anticuerpos monoclonales citotóxicos como este: $CD4^+$ y $CD8^+$, y sólo afectó la infección, sugiriendo un papel protector de esta población linfocitaria, el anticuerpo CD4 (**Gill et al., 1993b; Peña et al., 2006**). Además, en nuestro estudio llevamos a cabo un análisis pormenorizado de las poblaciones celulares en el abomaso, y prácticamente no hay diferencias significativas entre grupos en los recuentos celulares y, en todo caso, los recuentos son generalmente inferiores en el grupo AntiWC1. Esto tampoco parece sustentar esta última teoría, aunque también es cierto que sólo disponemos de los datos del día 23 post-inoculación y no sabemos qué ha podido suceder en el transcurso de la infección (Tabla 4.5).

No se debe menospreciar el hecho de que los cambios en las cargas parasitarias se producen después de que las larvas hayan colonizado la mucosa como L3 y regresen a la luz como L4. Es decir, esto confirma que, a diferencia de lo aceptado por la comunidad científica hasta que se iniciaron estos trabajos con el ovino CAP, es posible que estadios posteriores a la L3 sean diana de la respuesta inmune protectora en ovinos resistentes (**Piedrafita et al., 2010**) e incluso en razas más susceptibles, como el Merino Australiano (**Preston, 2013**).

En todo caso, los datos que dieron origen a este trabajo, sugerían que esta población celular podría condicionar la fecundidad y no la carga del parásito (**González et al., 2011a**). Por ello, resulta extraordinariamente interesante que los vermes fueron, tal y como preveíamos, significativamente más prolíficos (135 huevos en útero más) y largos (1,79 mm mayor) en el grupo AntiWC1 que en los vermes hembra del grupo Control (Tabla 4.2). Es decir, efectivamente los linfocitos $T\gamma\delta^+$ parecen ser capaces de modular la longitud y la fecundidad de estos nematodos.

En contra de esta hipótesis de control ejercido por esta población celular, existe el dato opuesto en los HGH. No obstante, al analizar las asociaciones entre las variable parasitológicas (Tabla 4.3 y Figura 4.2) que regulan la fecundidad, observamos que en el grupo control, HGH23 está asociada positivamente con carga parasitaria, longitud y huevos en útero, sin embargo en el grupo AntiWC1, esta asociación solo se mantiene con la carga parasitaria, produciéndose una pérdida en el control de la fecundidad a través de la longitud y huevos en útero. Estos datos explicarían que, a pesar de tener más huevos en útero y ser más largos los vermes en este grupo, los recuentos de huevos en heces fueron menores debido a una menor carga parasitaria. Estos resultados ahondan en la complejidad de la relación parásito-hospedador y plantea la existencia de efectos diversos de una misma población celular. El hospedador, desde el punto de vista evolutivo, ha conseguido instaurar en etapas tempranas una respuesta inmune que disminuya el efecto nocivo del parásito en el hospedador (menor ingesta de sangre) y en el entorno (menos huevos en el pasto), al tiempo que mantendría la estimulación del sistema inmune al permitir la implantación de los parásitos, lo que conllevaría una respuesta adquirida, probablemente más eficaz.

Como dato de interés, remarcar que un animal del grupo control no permitió el establecimiento de los vermes, no observándose ni larvas tras las digestiones del abomaso ni adultos, sugiriendo que este animal generó un rechazo temprano, generalmente vinculado a incrementos en la población de leucocitos globulares en la pared del abomaso (Balic *et al.*, 2002), sin embargo, en este animal apenas se contabilizaron estas células en su abomaso (figura 4.7).

5.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LOS DATOS HEMATOLÓGICOS

La reducción del hematocrito en la haemonchosis se asocia tanto a la carga parasitaria (Miller *et al.*, 1998; Bricarello *et al.*, 2004; Amarante *et al.*, 2004; Kelkele *et al.*, 2012), como a la longitud de los vermes (Terefe *et al.*, 2005) y suele asociarse negativamente, por su relación directa con la carga parasitaria, a los HGH (Amarante *et al.*, 2004; Yacob *et al.*, 2009). En este estudio, pese a no observarse diferencias en el hematocrito entre grupos, el grupo AntiWC1, perdió la asociación negativa entre hematocrito a los 20 dpi y las variables parasitológicas longitud (Figura 4.3d) y número de huevos en útero (Figura 4.3f), manteniéndose con la carga parasitaria en ambos grupos (Figura 4.3a y 4.3b). Estos datos sugieren que la pérdida del control sobre la longitud y huevos en útero por parte del sistema inmune de los ovinos CAP al reducir la población de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺, también afecta la interacción parásito-hospedador, estando condicionada la pérdida de sangre únicamente a la carga parasitaria.

La asociación entre proteínas plasmáticas (PP) a los 20 dpi y los niveles de IgG específica de antígeno somático adulto en ambos grupos, indican que esta variable no se comportó como indicador de resiliencia en esta experiencia sino que se asoció a la producción de esta inmunoglobulina. La asociación negativa observada entre eosinófilos en sangre periférica a los 13 dpi con las variables huevos en útero y longitud en el grupo control sugiere un papel de estas células en el control de la fecundidad. Al eliminar del estudio estadístico el animal #67 en el que no desarrolló la infección, se observa una correlación positiva ($r=0,800$) de estos eosinófilos en sangre a los 13 dpi con los recuentos de eosinófilos obtenidos en el abomaso a los 23 dpi.

5.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-WC1 EN LA RESPUESTA INMUNE

Las células efectoras del abomaso a las que se les atribuye los mecanismos de expulsión parasitaria frente al estadio L3 de *H. contortus*, eosinófilos (vinculados a una expulsión tardía), mastocitos y leucocitos globulares (expulsión rápida) (Balic *et al.*, 2002), no mostraron diferencias cuantitativas significativas entre grupos en este estudio. Tampoco los niveles de IgAmSA local, que se ha asociado a protección en estudios previos (Hernández, 2011) y en el capítulo anterior de esta tesis doctoral.

En experiencias previas (Hernández, 2011; González *et al.*, 2011a) los eosinófilos, y la galectina 14 producida por ellos, parecen jugar un papel importante en el mecanismo singular de resistencia de los ovinos CAP por su posible control de los huevos en útero de los vermes, al asociarse negativamente con la fecundidad. Esta acción podría estar coordinada por los linfocitos $T\gamma\delta^+$ al estar las dos células positivamente asociadas en la raza CAP (González *et al.*, 2011a).

Los resultados obtenidos en este ensayo parecen confirmar esta teoría. Así, en el grupo control, los eosinófilos de la pared del abomaso se asociaron negativamente con la longitud y con el número de huevos en útero, al igual que en trabajos previos realizados con esta raza, mientras que en el grupo AntiWC1, se perdió la asociación negativa con longitud y con el número de huevos en útero se hizo más débil. Bao *et al.*, 1996 describió la capacidad de producir IL-5 por parte de los linfocitos $T\gamma\delta^+$, por otro lado, Robinson *et al.*, 2010 sugirieron que los eosinófilos son recluidos por los linfocitos $T\gamma\delta^+$ en una etapa temprana de la infección. Es posible que al no reducir las poblaciones de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ en los primeros días de infección en este ensayo, el número de eosinófilos fue similar en ambos grupos, aunque sí parece perderse la acción de los eosinófilos en el control de la fecundidad.

La galectina 14, considerada un buen marcador de actividad de los eosinófilos (Young *et al.*, 2009), presenta asociación negativa con longitud y huevos en útero en el grupo control que no se observa en el grupo AntiWC1, a pesar de que no hay diferencias significativas en los recuentos de estas células. Estos eosinófilos galectina 14⁺ de nuevo, parecen no ser funcionales o no haber recibido el estímulo que les haga liberarla (Young *et al.*, 2009). Los eosinófilos ovinos activados expresan más cantidad de receptores de la fracción Fc de las inmunoglobulinas y la unión de estos receptores con los anticuerpos que reconocen las L3 parecen ser indispensables para la acción efectora de esta célula (Rainbird *et al.*, 1998), por lo que una posible explicación a la falta de funcionalidad de estas células podría estar en la producción de inmunoglobulinas funcionales.

La IgA del mucus, se ha vinculado con la protección en esta raza en estudios anteriores cuando reconocía antígenos somáticos adultos (IgAmSA), por lo que se estudió esta inmunoglobulina tras la reducción celular. En el hombre y algunos roedores se ha demostrado que la IgA es un activador de los eosinófilos a través de la presencia de receptores para esta inmunoglobulina en los eosinófilos (Motegi *et al.*, 2000; Decot *et al.*, 2005), aunque no está confirmada su existencia en ovinos (Henderson y Stear, 2006). En este ensayo, no se observaron diferencias cuantitativas de esta IgAmSA entre grupos, sin embargo, su funcionalidad también pareció verse afectada porque la IgAmSA solo se asoció negativamente con longitud parasitaria en el grupo control y, además, este grupo también presentó una asociación más fuerte con huevos en útero que el grupo AntiWC1.

Aunque son necesarios estudios adicionales, es posible que no se estén reconociendo los epítomos específicos que permitan desarrollar una respuesta inmune protectora al reducir la población de los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺. En favor de la misma, puede estar el hecho de que las células MHC-II⁺ mostraran asociaciones negativas idénticas a los eosinófilos y la IgAmSA en el grupo control, y de que el grupo AntiWC1 presentara recuentos significativamente menores de CD45RA⁺ (Linfocitos B) en la zona basal del epitelio del abomaso. Sin embargo, al realizar una electroinmunotransferencia frente al antígeno somático del parásito adulto enfrentado al mucus, no se observaron elementos que sustentaran esta teoría. Serán necesarios estudios más detallados, por ejemplo empleando los sobrenadantes de cultivos de células productoras de anticuerpos (ASC) y realizando las electroinmunotransferencias sobre electroforesis bidimensional para clarificar esta teoría, ya que los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ pueden estar orquestando complejas relaciones en el reconocimiento-presentación de antígenos o en la producción de citoquinas en esta raza.

En resumen, estos datos sugieren que la reducción de linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ afecta al control de la fecundidad de *H. contortus* en los ovinos CAP a través de la pérdida del control de la longitud y huevos en útero y que, aunque no hay diferencias en el reclutamiento de eosinófilos y en la producción de la IgAmSA, tanto la célula como la inmunoglobulina pierden su acción efectora. En el futuro, se deberá clarificar si esto se debe a que no se reconocen los antígenos correctos al reducirse las poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ locales o si se debe a la ausencia de algún otro mediador de la respuesta inmune. Estos resultados suponen un mecanismo diferente al recogido en la bibliografía en la que los linfocitos CD4⁺ son los que inducen esta respuesta dirigida frente al estadio larvario (Gill *et al.*, 1993b; Peña *et al.*, 2006). Además, la misma reducción en esta población celular supone un efecto beneficioso al establecimiento de los vermes, lo que podría añadir datos muy interesantes en la relación parásito- hospedador. Finalmente, se demuestra que el hospedador puede modular la carga parasitaria, la longitud y fecundidad de los vermes tras el establecimiento de los parásitos, por lo que los estadios luminales (L4-adultos) pueden ser la diana de la protección, a diferencia de lo descrito previamente en otras razas ovinas, lo que también puede tener repercusiones en el futuro control de estos parásitos, por ejemplo, abriendo la posibilidad de desarrollar vacunas que actúen en diferentes etapas de desarrollo parasitario.

CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA REDUCCIÓN *IN VIVO* DE LA INTERLEUQUINA 5 SOBRE EL PAPEL DE LOS EOSINÓFILOS EN EL CONTROL DE LA FECUNDIDAD DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* EN EL OVINO CANARIO DE PELO

1. RESUMEN

La raza ovina Canaria de Pelo (CAP) está considerada una raza resistente a infecciones por el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus*. La diana de resistencia sería el estadio adulto del parásito, observándose a los 28 días post-inoculación una reducción de la carga parasitaria, así como de la longitud y fecundidad de los vermes con respecto a los ovinos de la raza ovina Canaria más susceptibles (González *et al.*, 2008). En el control de la fecundidad de los vermes parecen estar implicadas dos poblaciones celulares, los eosinófilos y los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1⁺ (González *et al.*, 2011a), mientras que en el control de su longitud participaría la IgA local específica frente antígenos de vermes adultos (SA) (Hernández *et al.*, 2015). El papel de la IgA y de los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ han sido estudiados en los capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral, así como en una tesis precedente (Hernández, 2011). El objetivo de este estudio fue valorar el efecto que tendría en la infección experimental por *H. contortus* la administración subcutánea de tres dosis de la interleuquina 5 recombinante ovina (rIL-5ov) con Quil A como adyuvante, administradas cada dos semanas empezando cuatro semanas antes de la inoculación con L3 del parásito, tratando con ello modificar la actividad de esta interleuquina que resulta fundamental tanto para promover la eosinofilia como para la activación posterior de los eosinófilos (Rainbird *et al.*, 1998; Meeusen y Balic, 2000). Tras la primera inmunización se observó un incremento de los niveles séricos de IgG específica frente a rIL-5ov en el grupo inmunizado. En el grupo de animales en el que se administró el inmunógeno (en adelante grupo IL5) se duplicó el número de vermes, siendo estos significativamente más largos y prolíficos. Por otro lado, no se observaron diferencias entre este grupo IL5 y el grupo control en lo que se refiere a los niveles de IgA específica local, ni en su patrón de reconocimiento antigénico, ni tampoco en los recuentos de poblaciones celulares de abomaso (eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares). Si bien en sangre periférica no se observaron diferencias significativas entre grupos en los recuentos de eosinófilos, sí se detectó que el grupo IL5 no respondió con eosinofilia a la parasitación, aunque los recuentos de eosinófilos se igualaron entre grupos al final del estudio. Estos resultados sugieren que los eosinófilos juegan un papel primordial en el control de las cargas, fecundidad y longitud de los vermes en infecciones por *H. contortus* y que este efecto es independiente de la producción local de IgA y de la presencia de otras células inmunitarias en la mucosa. La administración de esta citoquina recombinante en las condiciones ensayadas en esta

experiencia, generó anticuerpos específicos de forma transitoria que pudieron comprometer la funcionalidad de los eosinófilos. Esta metodología, que se ha desarrollado por vez primera en ovino en el presente trabajo, podría ser muy prometedora en futuros ensayos experimentales sobre el control de la actividad de los eosinófilos, no sólo frente a parásitos sino a otras patologías de interés en medicina veterinaria y humana.

2. INTRODUCCIÓN

Haemonchus contortus es un parásito hematófago que habita el abomaso de los pequeños rumiantes, produciéndoles anemia, pérdida de peso, retraso en el crecimiento e incluso muerte, lo cual se traduce en pérdidas económicas para la producción ganadera y en la necesidad de implantar medidas de control y manejo que en ocasiones son infructuosas. El estudio de la respuesta inmune por parte del hospedador es importante, pues los resultados obtenidos nos podrían brindar nuevas dianas farmacológicas o promover mejoras genéticas en resistencia a parásitos de los animales (**Piedrafita et al., 2010**). En la respuesta inmune de los ovinos a la infección por *H. contortus* se han visto implicados varios componentes de la respuesta inmune, tales como los linfocitos T CD4⁺ y $\gamma\delta$ /WC1⁺, linfocitos B e Inmunoglobulinas A, G, E, eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares (**Gill, 1991; Gill et al., 1993a; 1993b; 2000; Balic et al., 2000a; 2000b; 2002; Schallig et al., 2000; González et al., 2011a; Saddiqi et al., 2011; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzman, 2013**).

Los eosinófilos son células mieloides de núcleo bilobulado con dos tipos de gránulos en su interior, los gránulos cristaloides que contienen neurotoxina derivada de eosinófilos, proteína básica mayor y proteína catiónica y peroxidasa eosinofílica; y los gránulos primarios que contienen peroxidasa, arilsulfatasa y fosfatasa ácida (**Balic et al., 2000b; Tizard, 2002; 2009**). Una vez que esta célula alcanza la madurez, migra desde la médula ósea a través de la sangre a los tejidos donde tiene una vida media de 12 días (**Balic et al., 2000b; Tizard, 2002; 2009**). Si bien su número en sangre es bajo, en los tejidos del tracto gastrointestinal ocurre totalmente lo opuesto; incrementándose su población tanto en sangre como en el tejido ante la presencia de parásitos (**Balic et al., 2000b**). Esta respuesta de eosinófilos se conoce como eosinofilia y se considera un indicador de resistencia a nematodos gastrointestinales por la asociación negativa que generalmente presenta con los recuentos de huevos en heces (**Buddle et al., 1992; Hohenhaus et al., 1998**).

Cuando se activan, los eosinófilos pueden producir metabolitos tóxicos derivados del oxígeno, sintetizar mediadores lipídicos como las prostaglandinas y los leucotrienos, así como un amplio rango de citoquinas como las Interleuquinas (IL) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, y 10, GM-CSF, TNF- α , TGF- β , INF- γ y quimioquinas como MIP-1 α , RANTES, eotaxin, que entre otras funciones favorecen su activación, migración y persistencia en los tejidos (**Balic et al., 2000b; Tizard, 2002; 2009**). También producen cuando están activos galectina 14, que es una lectina con afinidad por los β -galactósidos y con similitud en el sitio de unión a carbohidratos (**Leffler et al., 2004**) capaz de modificar el mucus incrementando su viscosidad (**Young et al., 2009**).

Si bien, los niveles de eosinófilos pueden mantenerse por la IL-3 y el GM-CSF (Factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos), es la IL-5, producida mayoritariamente por los linfocitos CD4⁺, la que actúa como factor específico de crecimiento y de diferenciación responsable de la generación de eosinófilos en la médula ósea, así como de la eosinofilia en sangre y tejidos después de las infecciones por helmintos (**Sanderson, 1992; Balic et al., 2000b; Meeusen y Balic, 2000**). Estas células son consideradas efectoras en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales, pues son capaces de ocasionar daños a las larvas de los parásitos mediante la degranulación de su contenido sobre la superficie de las mismas, habiéndose observado este efecto tanto en experiencias *in vitro* (en presencia de anticuerpos, complemento e IL-5) como *in vivo* (**Rainbird et al., 1998; Meeusen y Balic, 2000; Balic et al., 2006**).

Nuestro grupo de investigación observó que los eosinófilos de la pared abomasal en ovinos Canario de Pelo infectados experimentalmente con *H. contortus*, presentaban una asociación negativa con la fecundidad de los vermes (**González et al., 2011a**), asociación que también se observó en el grupo de ovinos utilizados como control del capítulo 3 (infectados con el parásito) y con los recuentos de eosinófilos galectina 14⁺ (lectina específica de eosinófilos ovinos) en el capítulo 2 de esta tesis doctoral. Dada la relevancia de la IL-5 sobre los eosinófilos, y la eosinofilia desarrollada durante las infecciones por helmintos, se propone en este capítulo reducir los niveles de dicha interleuquina. El efecto de la reducción de la IL-5 sobre la eosinofilia fue estudiado previamente en ratones inoculados con *Nippostrongylus brasiliensis* y *Schistosoma mansoni*, administrando un anticuerpo monoclonal anti-IL-5 (TRFK-5) observándose una reducción del recuento de eosinófilos con respecto a los controles (**Coffman et al., 1989; Sher et al., 1990**). Por otro lado, también se ha observado el efecto de la IL-5 sobre la infección por parásitos en ratones IL-5 transgénicos, que presentaban niveles superiores de eosinófilos tras la inoculación con *N. brasiliensis* que los controles; lo que les confirió una mayor resistencia, presentando menor carga parasitaria con vermes más pequeños y menos fecundos (**Dent et al., 1999**). Sin embargo, no se han realizado estudios similares que permitan valorar la funcionalidad de los eosinófilos en ovinos. En nuestro estudio, dada la complejidad de obtener el anticuerpo anti IL-5, se optó por administrar 3 dosis subcutáneas de IL-5 recombinante ovina (rIL-5ov) con el objetivo de que los animales generasen inmunoglobulinas específicas que reduzcan los niveles de la IL-5 en los ovinos Canario de Pelo infectados con *H. contortus* y poder así observar su efecto sobre la eosinofilia y, por tanto, sobre la respuesta generada frente al parásito en ovinos. Hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se logra modular las poblaciones de eosinófilos en mamíferos superiores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Doce corderos machos de la raza Canaria de Pelo fueron adquiridos al destete procedentes de varias granjas ovinas de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España), permaneciendo en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria hasta que tuvieron aproximadamente un año de edad. Los animales se alimentaron con una ración comercial de granulado para ovinos y agua *ad libitum* durante todo el periodo experimental. A su llegada a las instalaciones, se desparasitaron con fenbendazol (Panacur® 2.5, Intervet) a la dosis recomendada por el fabricante (2ml/10kg de peso corporal) manteniéndose libres de parásitos hasta el inicio de la experiencia. Todos los animales fueron inoculados intrarruminalmente con 10.000 L3 de *H. contortus* cedidas por los Dres. Knox y Bartley (*Moredun Research Institute*, Edimburgo, Reino Unido). Los animales fueron sacrificados a los 28 días post-inoculación (dpi).

3.2 IL-5 RECOMBINANTE OVINA

Para el estudio, y bajo la supervisión del Dr. Piedrafito (Universidad de Monash, Melbourne, Australia), se produjeron a lo largo de unos seis meses, aproximadamente 14 mg de IL-5 recombinante ovina (rIL-5ov) en las instalaciones del *Animal Biotechnology Research Laboratory* de la Universidad de Monash a partir de la inserción del vector pET28a que contenía el gen de la IL-5 ovina en una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Esta molécula fue utilizada como inmunógeno con el objetivo de generar en los animales anticuerpos específicos contra su propia IL-5 y, de este modo, conseguir la reducción transitoria de dicha interleuquina, y analizar su papel en la eosinofilia y en la activación de los eosinófilos en el curso de la infección experimental con el parásito.

3.3 ENSAYOS EN ANIMALES

Seis animales seleccionados al azar formaron el grupo IL-5, a los que se les administró subcutáneamente aproximadamente 0.7 mg de la rIL-5ov junto con el adyuvante Quil A (8 mg en la primera inmunización y 0.93 mg en las dos subsiguientes) (cedida por Brenntag Biosector, Denmark) diluido en 1 ml de suero fisiológico. Los otros 6 animales formaron el grupo Control, al que se le administró subcutáneamente el adyuvante Quil A diluido en 1 ml de suero fisiológico más el volumen correspondiente de suero fisiológico que sustituye al volumen del antígeno. Se realizaron tres inmunizaciones, correspondiendo cada una con los días 28 y 14 pre-inoculación y en el mismo día de la inoculación con el parásito.

3.4 MUESTRAS SANGUÍNEAS

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo general de Material y Métodos, se extrajo sangre a los animales los días 32, 26, 22, 19, 15, 12, 8, 5 y 1 pre-inoculación y los días 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23 y 27 post-inoculación para llevar a cabo los análisis hematológicos y la obtención de suero.

3.5 ANÁLISIS COPROLÓGICOS

Se tomaron heces directamente del recto, desde el día 16 post-inoculación hasta el día previo al sacrificio, para el recuento de huevos mediante la técnica de McMaster modificado (MAFF, 1989).

3.6 RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO

Tras el sacrificio de los animales se aislaron los abomasos, se tomaron muestras de tejido de la curvatura mayor y se abrieron para recoger el contenido abomasal, mucus y mucosa, como se describe en el capítulo de Material y Métodos.

3.7 ANÁLISIS PARASITOLÓGICO

Se contabilizaron los vermes de las alícuotas y se midieron aleatoriamente 30 vermes hembras obtenidas tras el sacrificio a los 28 dpi, de las que también se contabilizaron los huevos del útero, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de Material y Métodos.

3.8 ANÁLISIS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (E.L.I.S.A.)

Los niveles de IgA de mucus específicas frente a antígeno somático adulto (SA) y larvario (L3) de *H. contortus*, así como los niveles de IgG anti rIL-5ov en suero, se determinaron mediante un ensayo de E.L.I.S.A. siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de Material y Métodos. Las condiciones específicas seguidas en este trabajo se recogen en la Tabla 3.1. Para estandarizar los resultados entre placas en el caso de la IgG de suero específica frente rIL-5ov, se aplicó la siguiente fórmula de ajuste, transformándolos en densidades ópticas relativas (ODI, *optical density index*, Strain y Stear, 2001) a un control positivo y otro negativo incluido en todas las placas:

$$ODI_n = \frac{(OD_n - OD \text{ control negativo})}{(OD \text{ control positivo} - OD \text{ control negativo})}$$

ODI_n= Índice de Densidad óptica del Animal “n”; OD_n= Densidad óptica del Animal “n”; OD= densidad óptica.

Tabla 3.1 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado según determinación.

MUESTRA	INMUNOGLOBULINA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Mucus	IgA	10 µg/ml L3	1:2	1:100
		10 µg/ml SA	1:5	1:100
Suero	IgG	5 µg/ml rIL-5ov	1:100	1:1000

3.9 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA

La electrotransferencia del antígeno SA, y la posterior inmunorreacción con las muestras de mucus se realizó con el fin de valorar el reconocimiento de fracciones proteicas del antígeno por parte de las IgA específicas a nivel local. Para ello, se realizó la técnica y procesamiento posterior de la imagen, tal y como quedó recogido en el capítulo general de Material y Métodos. Las condiciones específicas de este ensayo se han consignado en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Relación de condiciones para el antígeno, muestra y conjugado.

MUESTRA	INMUNOGLOBULINA	CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	DILUCIÓN MUESTRA	DILUCIÓN CONJUGADO
Mucus	IgA	1,5 µg/µl SA	1:5	1:500 IgA

3.10 HISTOLOGÍA

Las muestras de abomaso obtenidas tras el sacrificio fueron procesadas, llevándose a cabo la identificación y recuento en la mucosa del abomaso de los eosinófilos, leucocitos globulares y mastocitos (capítulo Material y Métodos).

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software *IBM SPSS Statistics* versión 17 para el análisis estadístico. Los datos correspondientes a los recuentos fecales (HGH) se analizaron tras normalizarlos previa transformación mediante $\text{LOG}_{10}+1$. El animal identificado con el número 50 se descartó del análisis estadístico por su falta de respuesta a la inmunización. Los datos referidos a los recuentos de vermes, EIU, HGH27 y de IgA se analizaron aplicando el modelo lineal generalizado (GENLIN), considerando una distribución gamma logarítmica y el método de estimación Newton Raphson con escala χ^2 de Pearson. Para poder realizar ese método estadístico se añadió 0,1 a todos los datos de la variable cuando algún dato tenía el valor igual a 0. La longitud de los vermes se analizó también aplicando el modelo lineal generalizado pero considerando una distribución normal lineal y el método de estimación Híbrido. Tanto para la variable longitud como huevos en útero se introdujo en el modelo la covariable animal. Para las comparaciones de hematocrito, proteínas plasmáticas, eosinófilos, leucocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre, HGH e IgG se utilizó el modelo general lineal de medidas repetidas (GLM). Los resultados de los recuentos de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares de abomaso se analizaron por medio de la

comparación de medias mediante prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Las asociaciones entre las distintas variables se valoraron mediante la determinación de los coeficientes de correlación de Spearman. Probabilidades de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1 INMUNOGLOBINA G ANTI-RIL-5OV

Se observó un incremento significativo en los niveles de IgG específica frente rIL-5ov de suero (IgGsiL5) en el grupo IL-5 tras las inmunizaciones, fenómeno que se mantuvo a lo largo de toda la experiencia (Figura 4.1), si bien descendió ligeramente la última semana post-inoculación. En las figuras 4.2a y 4.2b se representa para cada grupo, Control e IL5, la cinética de la IgGsiL5 y los eosinófilos en sangre tras las inmunizaciones, observándose en el grupo IL5, un incremento de los niveles de IgGsiL5 y la ausencia de respuesta ante el parásito en los recuentos de eosinófilos.

Figura 4.1 Representación gráfica del valor medio $\pm$ error estándar de la media de los niveles de IgG específica frente rIL-5ov de suero en los días 32, 22, 15, 8 y 1 pre-inoculación y 6, 13, 20 y 27 post-inoculación del grupo Control y del grupo IL5. ** indica $p \leq 0,01$.

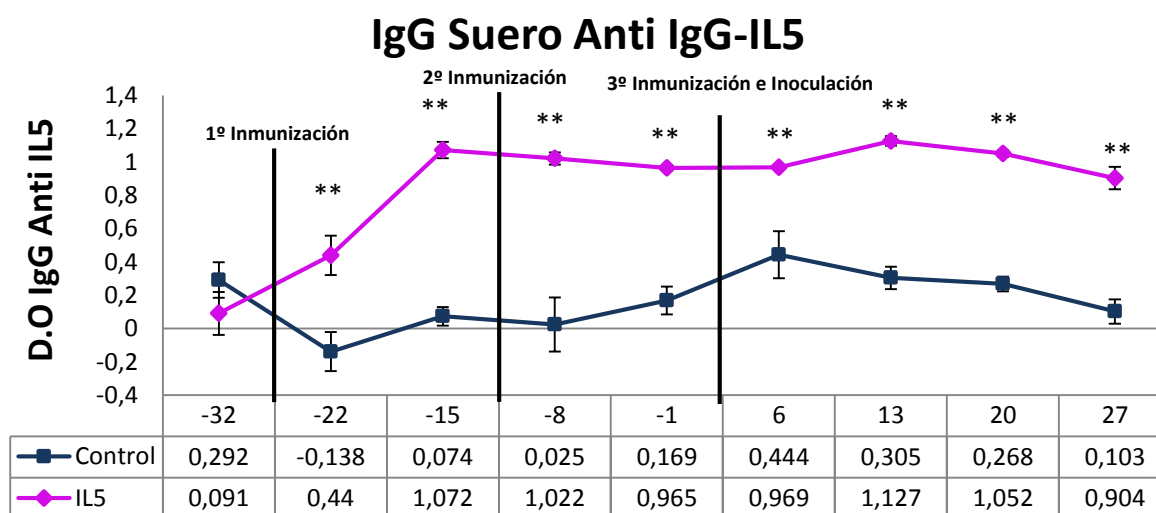
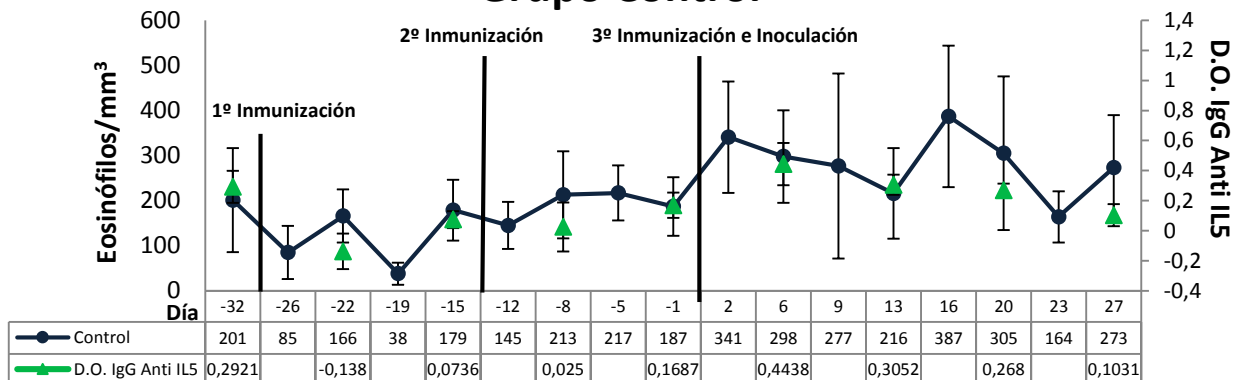


Figura 4.2 Representación gráfica de la media $\pm$ error estándar de la media de los niveles de IgG específica de rIL-5 α de suero en los días 32, 22, 15, 8 y 1 pre-inoculación y 6, 13, 20 y 27 post-inoculación y de los recuentos de eosinófilos en sangre de los días 32, 26, 22, 19, 15, 12, 8, 5, y 1 pre-inoculación y 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23 y 27 post-inoculación del grupo Control (a) y del grupo IL5 (b).

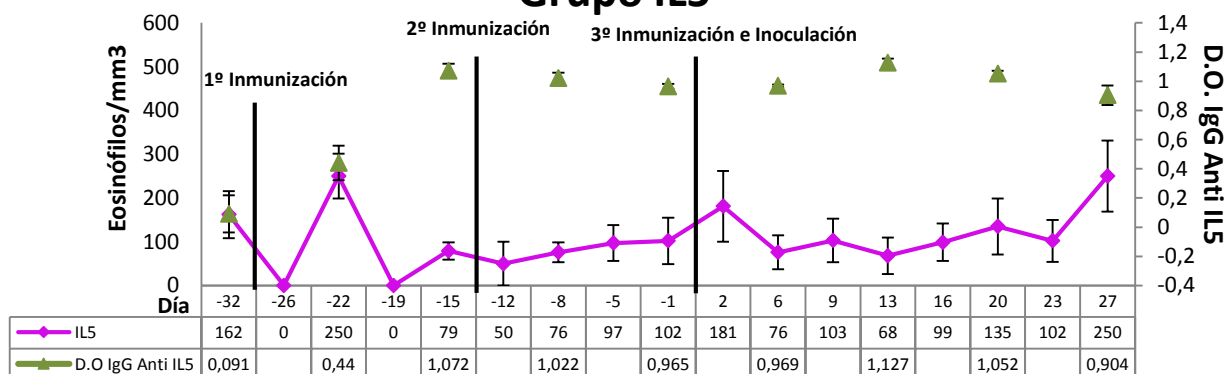
a)

Grupo Control



b)

Grupo IL5



4.2 PARASITOLOGÍA

A pesar de que no fue estadísticamente significativo, el grupo IL5 presentó más del doble de vermes que el grupo Control ($p=0,053$), siendo además significativamente más largos y fecundos (Tabla 4.1 y Figura 4.3). Ambos grupos presentaron asociaciones similares entre las variables parasitológicas (Tabla 4.2).

Tabla 4.1 Parámetros parasitológicos (Media $\pm$ Error Estándar de la Media) obtenidos de muestras recogidas en el sacrificio a los 28 dpi. HPG27= Recuento de huevos en heces. Longitud (mm). ** Indica $p \leq 0.01$.

	MEDIAS		
	Carga parasitaria	Longitud	Huevos en Útero
Control	1937 $\pm$ 669	14,52 $\pm$ 0,11**	162 $\pm$ 6**
IL5	4785 $\pm$ 457	15,40 $\pm$ 0,14**	229 $\pm$ 13**

Figura 4.3 Representación gráfica de la media $\pm$ error estándar de la media de los recuentos de huevos ($\text{Log}_{10}+1$) en heces desde el día 16 al 27 post-inoculación para ambos grupos. * Indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

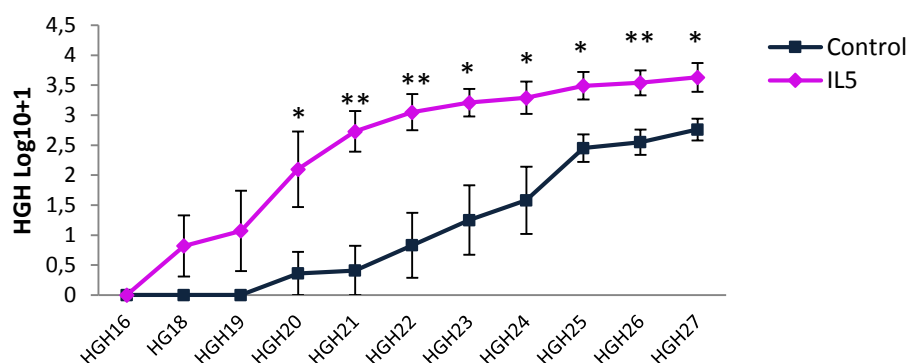


Tabla 4.2 Coeficiente de correlación de Spearman entre variables parasitológicas en ambos grupos. HPG= huevos por gramo. Longitud (mm). * Indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN								
	Carga parasitaria		Longitud		Huevos en útero		HGH27	
	Control	IL5	Control	IL5	Control	IL5	Control	IL5
Carga parasitaria	1,000	1,000	-0,029	0,200	-0,543	0,200	0,290	0,200
Longitud	-0,029	0,200	1,000	1,000	0,510**	0,657**	0,696	1,000**
Huevos en útero	-0,543	0,200	0,510**	0,657**	1,000	1,000	0,464	1,000**
HGH27	0,290	0,200	0,696	1,000**	0,464	1,000**	1,000	1,000

4.3 HEMATOLOGÍA

Sólo se observaron diferencias significativas en los hematocritos en el día 6 dpi, siendo más bajo en el grupo IL5 (Figura 4.4a). El análisis estadístico del hematocrito dentro de grupo a lo largo del tiempo, permitió, tomando como referencia el hematocrito del día 1 pre-inoculación, observar una reducción significativa de este parámetro en los días 13 (Control $p=0,016$; IL5 $p=0,006$) y 16 (Control $p=0,008$) post-inoculación.

Las proteínas plasmáticas por el contrario, presentaron valores más bajos en el grupo Control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los días 19, 8 y 5 pre-inoculación y en los días 2 y 6 post-inoculación (Figura 4.4b). Tomando como valor basal las proteínas plasmáticas del día 32 pre-inoculación, no se observó variación significativa de las proteínas plasmáticas a lo largo del tiempo dentro de grupo.

Tras la administración de las inmunizaciones con rIL-5ov, los recuentos de eosinófilos en sangre entre los días 8 pre-inoculación y 23 post-inoculación fueron menores en el grupo IL5, sin embargo no fueron estadísticamente significativas las diferencias entre grupos. En particular, no se observó la eosinofilia experimentada por los animales del grupo control tras la inoculación

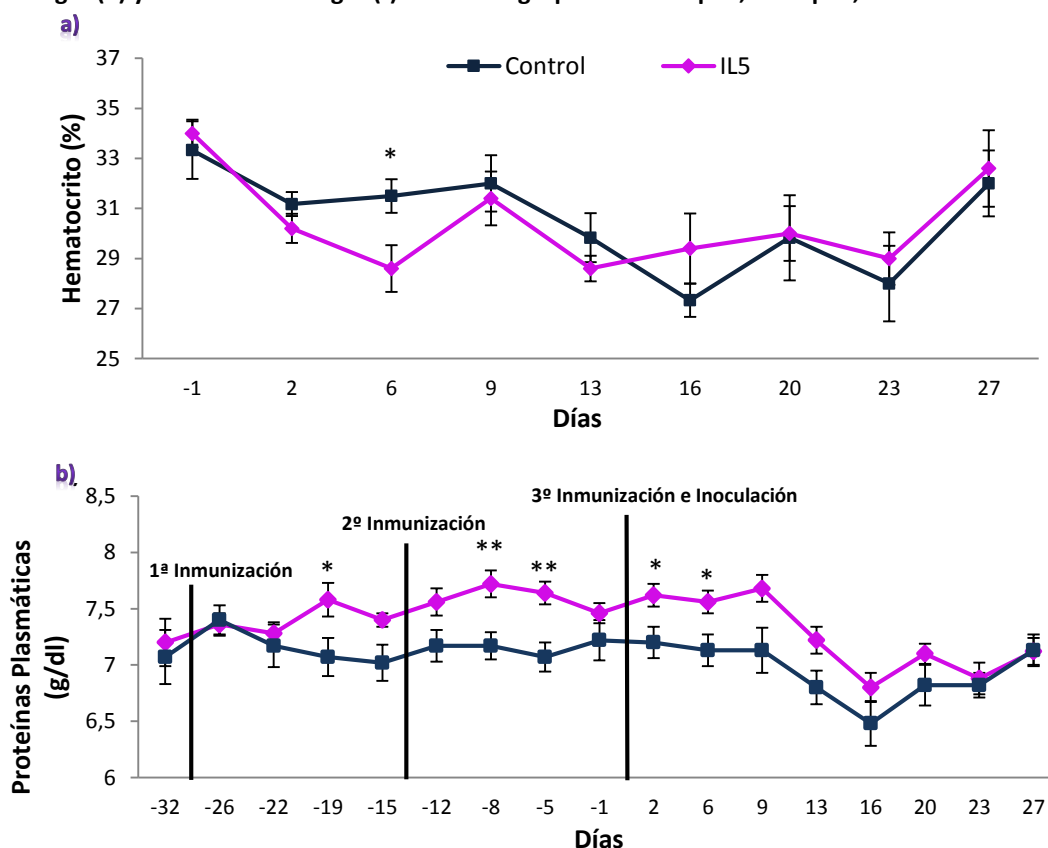
de las L3 de *H. contortus* (Figura 4.4c). No se observó variación significativa de recuentos de eosinófilos a lo largo del tiempo dentro de grupo.

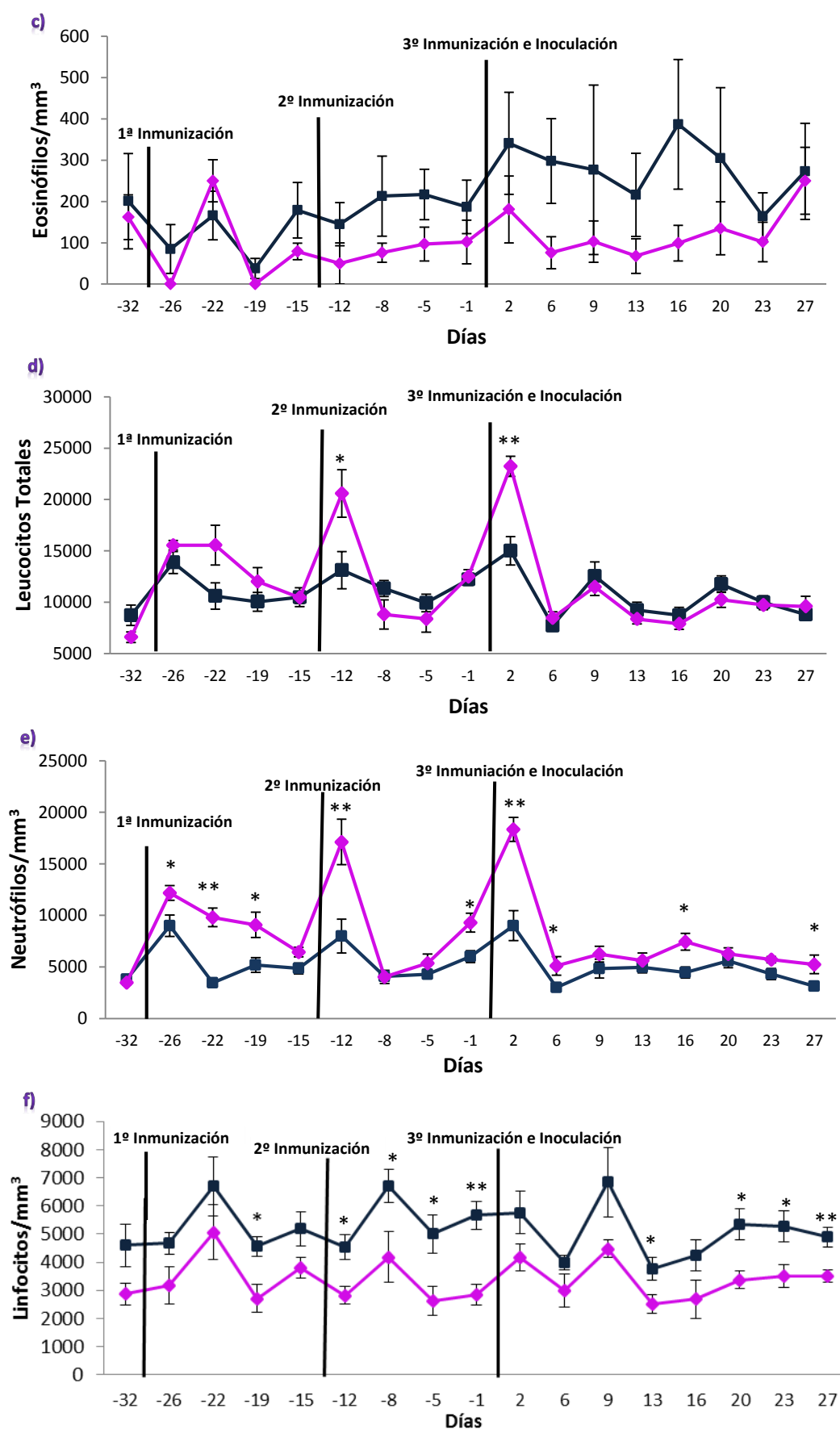
Los recuentos de leucocitos totales en sangre periférica fueron similares en ambos grupos, salvo tras la administración de la proteínas recombinante, produciéndose un incremento de los recuentos de leucocitos inmediatamente posterior a la inmunización en el grupo IL5 (Figura 4.4d). Se observó un incremento significativo dentro del grupo IL5 de los leucocitos totales en los días 26 pre-inoculación ($p=0,020$) y 2 post-inoculación ($p=0,002$).

Los recuentos de neutrófilos siguieron un patrón similar a los leucocitos totales (Figura 4.4e). Además, se observó un incremento significativo dentro del grupo IL5 de los neutrófilos en los días 26 pre-inoculación ($p=0,025$) y 2 post-inoculación ($p=0,024$).

Los recuentos de linfocitos, si bien siguieron un mismo patrón en ambos grupos, fueron siempre menores en el grupo IL5, siendo dicha reducción estadísticamente significativa (Figura 4.4f). No se observó variación significativa en los recuentos de los linfocitos a lo largo del tiempo dentro de cada grupo

Figura 4.4 Representación gráfica del valor medio $\pm$ error estándar de la media del hematocrito (a), proteínas plasmáticas (b), eosinófilos en sangre (c), leucocitos totales en sangre (d), neutrófilos en sangre (e) y linfocitos en sangre (f) de ambos grupos. * indica $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$.





Se observaron asociaciones positivas entre los recuentos de leucocitos totales y neutrófilos en ambos grupos, siendo estas significativas en los días 26 y 12 pre-inoculación en el grupo control, en los días 32, 22 y 19 pre-inoculación en el grupo IL5, así como en el día 2 post-inoculación en los dos grupos (Tabla 4.3), estas fechas son las inmediatamente posteriores a la administración del inmunógeno. También se observaron asociaciones positivas entre los linfocitos y los leucocitos totales en diferentes momentos de la experiencia en ambos grupos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Coeficiente de correlación de Spearman entre los recuentos de neutrófilos o leucocitos y leucocitos totales y, entre neutrófilos y linfocitos de sangre para ambos grupos. * indica $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN						
			Neutrófilos		Linfocitos	
			Control	IL5	Control	IL5
Leucocitos totales	Pre-inoculación	32	0,543	0,900*	0,714	0,900*
		26	0,943**	0,359	-0,486	0,051
		22	0,543	0,900*	0,943**	1,000**
		19	0,771	1,000**	0,543	0,400
		15	0,600	0,400	0,886*	0,600
		12	0,943**	0,700	0,714	0,700
		8	0,714	0,700	0,886*	0,700
		5	0,543	0,800	1,000**	0,900*
		1	0,314	0,800	0,371	0,000
	Post-inoculación	2	0,829*	0,900*	0,086	0,300
		6	0,714	0,500	1,000**	0,200
		9	0,200	0,700	0,771	0,100
		13	0,829*	0,900*	0,657	0,100
		16	0,257	0,800	0,943**	-0,400
		20	-0,029	0,900*	0,886*	0,200
		23	0,429	0,300	0,600	0,900*
		27	0,771	1,000**	0,886*	0,500

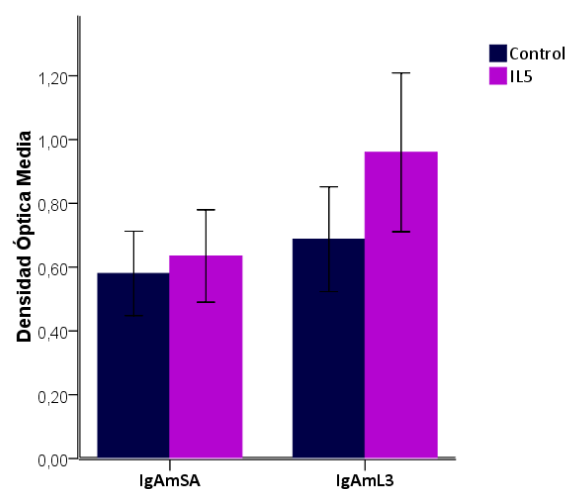
4.4 RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE ANTÍGENOS DEL PARÁSITO

La respuesta inmune humoral se valoró mediante el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (E.L.I.S.A.) de la Inmunoglobulina A del mucus específica para antígeno somático adulto (IgAmSA) y larvario (IgAmL3), y además por medio de la electroinmunotrasferencia de IgAmSA frente al antígeno somático adulto.

4.4.1 Inmunoglobulinas del mucus

No se observaron diferencias en los niveles de IgA del mucus específica de SA y L3 en los dos grupos experimentales (Figura 4.5).

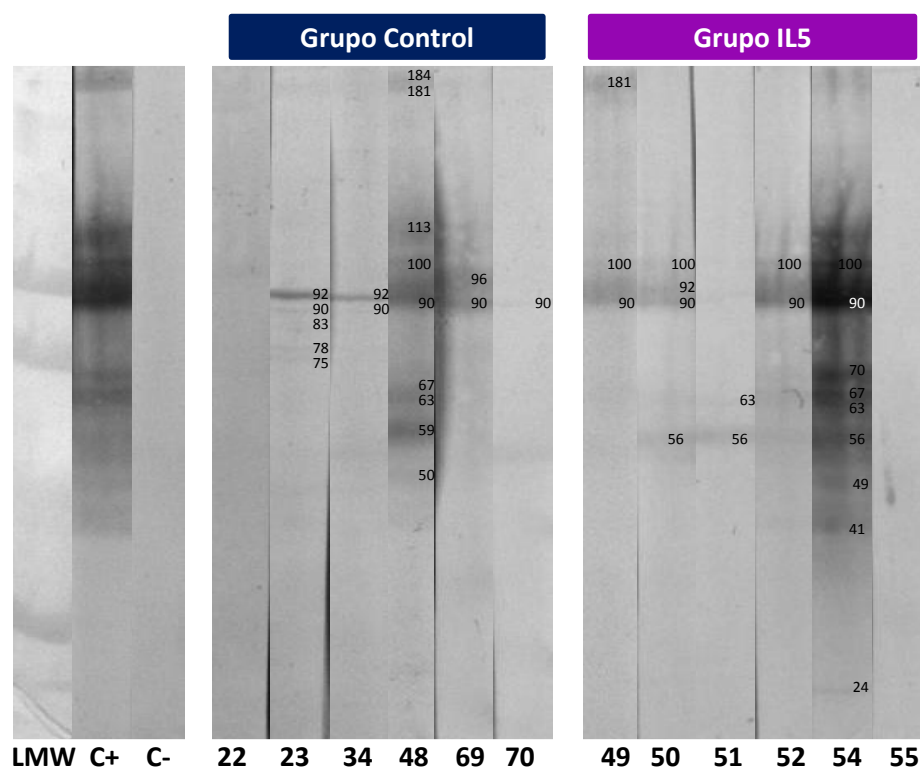
Figura 4.5 Representación gráfica del valor medio $\pm$ error estándar de la media de los niveles de IgA específica de antígeno Adulto (IgAmSA) y Larvario (IgAmL3) de *H. contortus* de los grupos Control e IL5.



4.4.2 Electroinmunotransferencia

En la electroinmunotransferencia de la IgA de mucus específica frente al antígeno SA no se observaron patrones diferentes entre grupos experimentales (Figura 4.6).

Figura 4.6 Electroinmunotrasferencia de la IgA del mucus frente al antígeno somático adulto (IgAmSA) de *H. contortus* de los ovinos de cada grupo. LMW: marcador de peso molecular bajo. C+ mucus control positivo. C- mucus control negativo.



4.5 RESPUESTA INMUNE CELULAR

No se observaron diferencias significativas entre grupos para las tres poblaciones celulares analizadas: eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Recuentos medios (media $\pm$ EEM) de las poblaciones de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares de las muestras de tejido de abomaso obtenidas tras el sacrificio en ambos grupos.

	MEDIAS				
	Eosinófilos abomaso	Mastocitos Basal	Mastocitos Apical	Mastocitos Total	Leucocitos Globulares
Control	57 $\pm$ 22	52 $\pm$ 6	23 $\pm$ 3	76 $\pm$ 7	13 $\pm$ 8
IL5	72 $\pm$ 25	41 $\pm$ 9	45 $\pm$ 23	86 $\pm$ 32	26 $\pm$ 8

Al analizar la asociación de eosinófilos de sangre periférica con eosinófilos en abomaso, se observó una asociación positiva en el grupo IL5 en los días 20 y 23 post-inoculación (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Coeficiente de correlación de Spearman entre los recuentos de eosinófilos en sangre periférica en los días 1 pre-inoculación y 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23 y 27 post-inoculación y el recuento de eosinófilos en abomaso de las muestras de tejido recogidas tras el sacrificio en ambos grupos. ** indica $p \leq 0,01$.

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN				
			EOSINÓFILOS ABOMASO	
			día	
EOSINÓFILOS SANGRE	Pre- inoculación	1	0,435	0,821
	Post- inoculación	2	0,257	0,205
		6	0,657	0,359
		9	0,516	0,564
		13	0,087	-0,671
		16	-0,029	0,462
		20	0,395	0,975**
		23	0,551	0,975**
		27	0,714	0,400

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue verificar el papel protector de los eosinófilos en las infecciones por *H. contortus*, utilizando una raza resistente (Canaria de Pelo) en la que estas células parecen controlar la fecundidad de los gusanos adultos (**González *et al.*, 2011a**), para lo cual se administró la interleuquina 5 recombinante ovina, utilizando Quil A como adyuvante, con el fin de inducir la producción de anticuerpos que bloquearan la IL-5 endógena.

La interleuquina 5 es una glicoproteína homodimérica unida por un puente disulfuro que presenta homología entre especies (**Sanderson, 1992; Ovington y Behm, 1997**), que es producida principalmente por linfocitos CD4⁺ tras la infección por helmintos y que se ha demostrado que participa en el crecimiento, reclutamiento, supervivencia, proliferación y activación de los eosinófilos (**Sanderson, 1992; Stevenson y Jones, 1997; Rainbird *et al.*, 1998; Meeusen y Balic, 2000, Mukherjee *et al.*, 2014**). Algunos autores, para constatar el papel de los eosinófilos en infecciones murinas por helmintos, han administrado directamente un anticuerpo monoclonal contra la IL-5 capaz de neutralizar la eosinofilia propia de este tipo de infecciones (**Coffman *et al.*, 1989; Sher *et al.*, 1990; Korenaga *et al.*, 1991; Herndon y Kayes, 1992; Yang *et al.*, 1997; Betts y Else, 1999**). Sin embargo, en este ensayo se optó por la administración subcutánea de IL-5 recombinante ovina (rIL-5ov) directamente junto con el adyuvante Quil A, de modo que los anticuerpos específicos frente la IL-5 recombinante ovina pudieran reconocer y neutralizar la IL-5 propia. Este experimento constituye pues un procedimiento novedoso que aporta información metodológica de gran interés para futuras investigaciones tanto para animales como para el hombre.

5.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS

Tras la administración de las 3 dosis de esta rIL-5ov usada como antígeno en el grupo IL5, se observó un incremento en las inmunoglobulinas G específicas anti-rIL-5ov en suero (IgGslL5) en dicho grupo con respecto al grupo control, confirmándose de este modo que se había generado una respuesta eficaz frente a la inmunización. Al comparar entre grupos dichos niveles de anticuerpos conjuntamente con los recuentos de eosinófilos en sangre, pudimos visualizar su efecto en el control de la eosinofilia tras la inoculación de *H. contortus* (Figura 4.2a y 4.2b).

5.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN RELACIÓN CON LOS DATOS PARASITOLÓGICOS

La administración subcutánea de la rIL-5ov en el grupo IL5, supuso, con respecto al grupo Control, una pérdida del control de la parasitosis por parte de estos ovinos, albergando en su abomaso aproximadamente el doble de vermes, que fueron además significativamente más

largos y prolíficos, originando mayores recuentos de huevos en heces (HGH) desde el día 20 post-inoculación hasta el final de la experiencia. Las diferencias en los recuentos de vermes se aproximaron a la significación estadística ($p=0,053$), dato probablemente afectado por la variabilidad individual dentro de la raza (Zajac *et al.*, 1990; Balic *et al.*, 2000b). Estos resultados sugieren indirectamente por una parte que, probablemente se logró modificar con éxito los niveles de IL-5 y, por otro, el propio efecto de la reducción de dicha interleuquina que, dado su papel sobre los eosinófilos, permitió confirmar la importancia de esta población celular en el mecanismo de control de la carga parasitaria, así como la fecundidad y longitud de *H. contortus* en el ovino Canario de Pelo.

Los resultados obtenidos en experimentos previos realizados en ratones para estudiar el papel de la IL-5 y de los eosinófilos en diferentes infecciones parasitarias, ya sea tras la administración de anticuerpos monoclonales anti-IL-5 (IL-5mAb) o anti-receptor IL-5 (IL5-RmAb), por el uso de animales IL-5 transgénicos (IL5T), IL-5 Knock-out (IL5KO), IL-5 receptor deficiente (IL5R) o IL-5 deficientes (IL5D), no fueron homogéneos en relación al papel de la IL-5 o de los eosinófilos en las parasitosis, pues en algunos de estos estudios no observaron diferencias en carga parasitaria, longitud y/o fecundidad, como por ejemplo en ratones inoculados con *Heligmosomoides polygyrus* (IL5mAb Urban *et al.*, 1991), *Schistosoma mansoni* (IL5mAb Sher *et al.*, 1990), *Toxocara canis* (IL5 Dent *et al.*, 1999), *Trichinella spiralis* (IL5mAb Herndon y Kayes, 1992; IL5T Hokibara *et al.*, 1997) *Trichuris muris* (IL5mAb Betts y Else, 1999), mientras que por el contrario, en otros si se observaron, como por ejemplo *Angylostrongylus cantonensis* (IL5mAb Sasaki *et al.*, 1993; IL5R Yoshida *et al.*, 1996), *N. brasiliensis* (IL5T Shin *et al.*, 1997; IL5T Dent *et al.*, 1999) *Onchocerca volvulus* (IL5mAb Lange *et al.*, 1994), *Strongyloides ratti* (IL5D Ovington *et al.*, 1998) o *Strongyloides stercoralis* (IL5KO, IL5T Herbert *et al.*, 2000); lo que sugiere que la importancia de los eosinófilos e IL-5 en la protección frente a la infección podría estar afectada por la especie parásita o el hospedador (Ovington *et al.*, 1998; Herbert *et al.*, 2000). Cabría sin embargo hacer notar que todos esos estudios fueron llevados a cabo en ratones, que no es el hospedador natural para algunos de esos parásitos, por lo que podría estar teniendo lugar una respuesta inflamatoria no específica, iniciada por mastocitos, que podría estar favoreciendo y sesgando la respuesta inmune observada (Meeusen y Balic, 2000). Del mismo modo, debería considerarse la posible existencia de eosinófilos innatos, IL-5-independientes, que pueden llegar rápidamente al parásito estimulados por IL-3 y GM-CSF, y que podrían estar desarrollando cierta actividad antihelmíntica (Ovington y Behm, 1997; Meeusen y Balic, 2000) ajena al objeto de estudio. Otro factor que podría influir en los resultados obtenidos en alguno de estos estudios, es el hecho de introducir un anticuerpo extraño en el organismo de los ratones, lo cual podría

tener efecto en la respuesta del hospedador al estimular otras células inmunitarias (**Ovington y Behm, 1997**). Por todo ello, dadas las diferencias en la metodología empleada a la hora de realizar la reducción/abolición de IL-5, así como por las distintas especies parásitas y la especie y genotipo del hospedador, la comparación de este estudio con la bibliografía referida a roedores se tendría que hacer con prudencia.

Entre los trabajos en los que se observaron diferencias en parámetros parasitológicos en modelos murinos, de forma similar a los obtenidos en nuestro estudio, cabría resaltar los proporcionados por **Ovington et al., 1998**, quienes tras inocular animales genéticamente deficientes en la producción de IL-5 y animales controles con *S. ratti*, observaron un incremento en la carga y la fecundidad de las hembras del grupo genéticamente modificado. **Yoshida et al., 1996** por su parte, también observaron en infecciones con *A. cantonensis* mayores cargas y mayor longitud en los vermes de los ratones modificados genéticamente deficientes para el receptor IL-5. Por su parte, también observaron en ratones transgénicos IL-5, una menor carga y vermes más cortos que el grupo control. Del mismo modo, **Dent et al., 1999**, tras inocular ratones IL-5 transgénicos con *N. brasiliensis*, observaron que estos desarrollaron un menor número de vermes, los cuales fueron más cortos y menos fecundos que los recuperados en los grupos control. Estos resultados, parecen confirmar el papel de la IL-5 y/o eosinófilos en el control de la carga, la longitud y fecundidad de los vermes, tal y como sugieren nuestros resultados.

5.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA rIL-5OV EN LOS DATOS HEMATOLÓGICOS

Las infecciones producidas por helmintos van acompañadas por eosinofilia e infiltración de eosinófilos en los tejidos (**Schallig, 2000; Balic et al., 2000b**). Las producidas por *H. contortus* se caracterizan además por descenso del hematocrito (**Dargie y Allonby, 1975**) y pérdida de proteínas por gastropatías producidas por los vermes adultos (**Strain y Stear, 2001**).

Tras la administración de la rIL-5ov en el grupo IL5, a pesar de no existir diferencias significativas ni dentro ni entre grupos, no se apreció el incremento de eosinófilos (eosinofilia) en sangre tras la inoculación de *H. contortus*, sí observado en el grupo Control. Esta ausencia de significación, fue debida a la variabilidad individual en los recuentos observada en los animales experimentales, que pudo estar también influenciada por la propia variabilidad o sensibilidad de esta población celular al estrés generado en el animal durante el manejo (**Hohenhaus et al., 1998**). En varios estudios previos en modelos murinos, que tenían como objetivo la reducción de eosinofilia utilizando como diana la IL-5, se consiguió esta reducción en sangre de eosinófilos tras la infección con varios parásitos como *Angiostrongylus cantonensis* (**Sasaki et al., 1993**),

Heligmosomoides polygyrus (Urban *et al.*, 1991), *Nippostrongylus brasiliensis* (Coffman *et al.*, 1989), *Onchocerca lienalis* (Hogarth *et al.*, 1998), *Schistosoma mansoni* (Sher *et al.*, 1990), *Strongyloides venezuelensis* (Korenaga *et al.*, 1991), *Trichinella spiralis* (Herndon y Kayes, 1992), *Trichuris muris* (Betts y Else, 1999) sin embargo, estos resultados no son directamente comparables con los de este experimento, pues se emplearon anticuerpos monoclonales IgG₁ anti-IL-5 (TRFK-5 o NC17) o anti-receptor IL-5 (H7) y ratones como animal de estudio, pertenecientes en su mayoría, a líneas o sublíneas consanguíneas que presentan como características isogenicidad, homocigosis, uniformidad fenotípica y estabilidad genética a largo plazo (Benavides y Guénet, 2003); cualidades difícilmente conseguibles en razas no caracterizadas o poco seleccionadas como el ovino Canario de Pelo (Piedrafita *et al.*, 2010). No obstante, a pesar de carecer de diferencias significativas en los recuentos de eosinófilos, se observaron las diferencias en parámetros parasitológicos confirmando de este modo, tal y como se citó anteriormente, la necesidad de esta interleuquina en la actividad de los eosinófilos (Rainbird *et al.*, 1998) y por tanto el papel de estos en el control de la fecundidad de *H. contortus* descrito en mecanismo de resistencia de los ovinos Canarios de Pelo (González *et al.*, 2011a).

Como era de esperar, el hematocrito de ambos grupos se vio reducido a lo largo del tiempo para cada grupo individualmente, alcanzando una reducción significativa con respecto al valor basal en ambos grupos el día 13 pi (Control $p=0,016$; IL5 $p=0,006$) y en el grupo Control el día 16 pi ($p=0,008$), recuperándose a valores casi basales al final de la experiencia. Si bien, la tendencia dibujada por el hematocrito entre grupos fue similar, se observó una reducción significativa del hematocrito del día 6 post-inoculación en el grupo IL5 con respecto al grupo Control, producido probablemente por la presencia en el abomaso de las fases hematófagas del parásito y por la ausencia de eosinofilia que permitió probablemente un mayor establecimiento. Por otro lado, ambos grupos presentaron una reducción no significativa dentro de grupo de las proteínas plasmáticas del día 16 post-inoculación, momento en el que se encuentran en el abomaso los estadios preadultos/adultos; observándose además diferencias entre grupos en los días 19, 8 y 5 pre-inoculación y en los días 2 y 6 post-inoculación, donde el grupo IL5 presentó valores más altos, coincidentes con la administración del inmunógeno. Aunque no se observaron correlaciones entre los niveles de proteínas plasmáticas e IgG séricas totales anti rIL-5ov, no es descartable que esta asociación existiera con otros isotipos de inmunoglobulinas específicas.

Respecto a los leucocitos totales y neutrófilos, el grupo IL5 mostró incrementos, dentro de grupo, de ambos recuentos los días 26 pre-inoculación (leucocitos $p=0,020$; neutrófilos $p=0,025$) y 2 post-inoculación (leucocitos $p=0,002$; neutrófilos $p=0,024$), que no se observaron en el grupo Control. Sin embargo, los recuentos de dichas poblaciones celulares dibujaron una tendencia

similar en ambos grupos. Además, dichas variables presentaron asociación positiva entre sí en ambos grupos, siendo esa asociación significativa, en los días inmediatamente posteriores a la inmunización, es decir, los días 26 y 12 pre-inoculación en el grupo Control y, en el día 2 post-inoculación en ambos; por lo que ese incremento de los leucocitos totales son probablemente consecuencia del incremento de los neutrófilos. El hecho de que los picos que se producen para ambos recuentos celulares en sangre son inmediatamente posteriores a la “vacunación”, sugiere que pudieran ser inducidos por la respuesta generada tras la aplicación del adyuvante Quil A y potenciada por la presencia de la rIL-5ov, lo que concuerda con que a lo largo de la experiencia en varias ocasiones se observaron recuentos significativamente mayores de dichas poblaciones en este grupo con respecto al grupo Control. También se observaron asociaciones positivas entre los leucocitos totales y los linfocitos, por lo que estos últimos también contribuyeron al incremento de dichos recuentos en determinados momentos de la experiencia. Probablemente, esta cinética de las distintas poblaciones leucocitarias en sangre periférica responden a los granulomas locales que se observaron en el lugar de administración del adyuvante, independientemente de que se acompañara de la rIL-5ov (Rajput *et al.*, 2007).

5.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA RIL-5OV EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

La administración subcutánea de las tres dosis de rIL-5ov no produjo diferencias cualitativas o cuantitativas en la inmunoglobulina A de mucus específica de antígenos somáticos larvarios (L3) y adulto (SA). Tal como se ha discutido anteriormente, la IgA parece estar involucrada en el control de la fecundidad y longitud de *H. contortus* en el ovino CAP, en una acción conjunta con los linfocitos $T\gamma\delta^+$ y de los eosinófilos, control que tiene lugar entre los días 21-28 post-inoculación (Hernández, 2011; Hernández *et al.*, 2015). Los eosinófilos presentan receptores $Fc\alpha$ a los que se podrían unir los complejos antígeno-IgA, produciendo la degranulación de los mismos sobre los parásitos, sin embargo la expresión de estos receptores en la membrana de los eosinófilos dependen de la activación de la célula (Kanobana *et al.*, 2002). Es muy posible que la disponibilidad reducida de la IL-5 en los animales del grupo inmunizado haya comprometido este mecanismo de control.

Respecto a los recuentos de eosinófilos en abomaso a 28 dpi, no se observaron diferencias significativas entre grupos, presentando el grupo IL5 mayores recuentos. Sin embargo, en otros estudios en los que se administraron anticuerpos monoclonales frente a IL-5, sí se consiguió esta reducción de eosinofilia en los tejidos de ratones (Coffman *et al.*, 1989; Sher *et al.*, 1990; Korenaga *et al.*, 1991; Betts y Else, 1999). Dado que parece que la tendencia de la IgG específica de IL-5 es disminuir hacia el final de la experiencia (figura 4.2b), es posible que se haya producido

un cierto “agotamiento” de las IgG de suero específicas de rIL-5ov (IgGslIL5) y que paulatinamente se hayan recuperado los niveles de la IL-5, produciéndose una eosinofilia tardía (27 dpi y Figura 4.4c), favoreciendo con ello un mayor reclutamiento de eosinófilos en el tejido. Esto podría explicar las asociaciones positivas entre los eosinófilos en abomaso con los eosinófilos de sangre periférica en los días previos al sacrificio (Tabla 4.5).

Los eosinófilos y la IL-5 se han asociado con la expulsión tardía y alteraciones en las larvas de *H. contortus* en ovinos inmunizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, necesitando al parecer este mecanismo de anticuerpos, complemento y, especialmente, de IL-5 para que la activación de los eosinófilos (Rainbird *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2000a, 2000b; Meeusen y Balic, 2000; Meeusen *et al.*, 2005; Balic *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007b). En capítulos anteriores de esta tesis doctoral observamos como los eosinófilos parecen estar involucrados en el control no solo de la fecundidad, a través del control de la longitud y huevos en útero, sino también de la carga parasitaria, en una acción conjunta con los linfocitos CD4⁺, linfocitos Tγδ/WC1⁺ y células MHC-II⁺ tras una única inoculación con L3 de *H. contortus* dirigida a estadios preadultos/adultos. En este sentido, Terefe *et al.*, 2007b observaron tras la incubación de las larvas de *H. contortus* con eosinófilos y suero inmune, y posterior inoculación en corderos, una menor carga y recuentos de huevos en heces, aunque estas reducciones no estuvieron acompañadas de diferencias en longitud y huevos intrauterinos de los vermes. Otra molécula que podría jugar un papel importante es la galectina 14, lectina producida por los eosinófilos y liberada por el mismo estímulo que los degranula, que podría participar favoreciendo la adhesión y modificando las características del mucus (Young *et al.*, 2009), algo que se podría constatar en el futuro.

Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en las poblaciones del abomaso de mastocitos y leucocitos globulares, células involucradas en el control de los nematodos gastrointestinales en animales inmunizados, y que intervendrían en la expulsión rápida de las larvas antes de que estas se establezcan en los tejidos (Balic *et al.*, 2000b; Balic *et al.*, 2002). Esta ausencia de diferencias entre grupos en los recuentos celulares de la pared de abomaso a los 28 días post-inoculación, ha sido descrita por otros autores en intestino de ratones parasitados tras administrar el anticuerpo anti-IL-5 (Betts y Else, 1999). No obstante, esta ausencia de diferencias era previsible, puesto que la IL-5 no parecer tener ningún papel sobre estas poblaciones celulares. Además estas poblaciones no estaban involucradas en el mecanismo de resistencia frente *H. contortus* de los ovinos de la raza resistente CAP tras una única inoculación (Hernández, 2011) tal y como se confirmó en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral.

En resumen, tras la administración subcutánea de interleuquina 5 recombinante ovina en el grupo IL5, se generaron anticuerpos específicos anti rIL-5ov, así como una reducción de la eosinofilia en sangre periférica tras la inoculación de L3 de *H. contortus*. La presencia de inmunoglobulinas capaces de reconocer la IL-5 y, probablemente, neutralizarla, se tradujo en un incremento de la fecundidad y longitud de los vermes, así como un incremento considerable, aunque no significativo, de la carga parasitaria con respecto al grupo Control. Es probable que impidiera la correcta activación de esta población celular o que comprometiera su reclutamiento en fases tempranas de la infección, lo que interfirió en el control del parásito. Estudios futuros permitirán caracterizar mejor el fenotipo que acompaña a estas respuestas por su interés biotecnológico potencial.

Finalmente, esta estrategia puede ser muy útil para el estudio de esta y otras enfermedades inmunomediadas del hombre y los animales en las que los eosinófilos tienen un papel relevante, tales como reacciones de hipersensibilidad, alergia o el asma (**Mukherjee *et al.*, 2014**).

**Discusión
General**

8. DISCUSIÓN GENERAL. MECANISMO NOVEDOSO DE RESISTENCIA FRENTE A *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Nuestro grupo, en una Tesis Doctoral previa (**Hernández, 2011**) demostró que la raza ovina Canaria de Pelo (CAP) era más resistente que la raza Canaria (CAN) en inoculaciones experimentales con *Haemonchus contortus*. A pesar de que no se observaron diferencias en la infección -datos parasitológicos- en los primeros 7 días post-inoculación (dpi), la raza CAP presentó a los 28 dpi un menor número de vermes, los cuales también fueron más cortos y menos prolíficos que en la raza más sensible (CAN), sugiriendo que la diana de la respuesta inmune es el estadio adulto del parásito, en vez del estadio L3 tal y como recogía la bibliografía (**González et al., 2008; Hernández, 2011; Piedrafita et al., 2010; Nisbet et al., 2015**). Al analizar las correlaciones entre los parámetros parasitológicos e inmunológicos en distintos periodos de la infección, se concluyó que el control de la longitud y de la fecundidad del parásito en esta respuesta inmune parecía estar asociado a la IgA, los eosinófilos y los linfocitos $T\gamma\delta^+$ (**González et al., 2011a; Hernández, 2011; Hernández et al., 2015**). Estos resultados indican la existencia de un mecanismo de resistencia novedoso no descrito hasta el momento. Profundizar en el estudio de este nuevo mecanismo de resistencia fue el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral.

El primer capítulo de esta tesis evidenció que los ovinos de raza CAP eran también más resistentes que los ovinos de la raza CAN en infecciones naturales mixtas, en las que resultaron predominantes el género *Trichostrongylus spp.* y la especie *Teladorsagia circumcincta*. Esto insinúa que los animales de esta raza pueden desarrollar una resistencia frente a diversas especies de nematodos gastrointestinales, en los que se pueden desarrollar mecanismos similares de protección frente a distintos parásitos del tracto gastrointestinal. Es de resaltar que esta resistencia no solo se observó en ovinos adultos, sino también entre corderos de ambas razas, lo que sugiere que estas razas rústicas quizás son capaces de responder de forma más precoz a la infección, pues los animales jóvenes de las razas ovinas comerciales estudiadas son más susceptibles, vinculándose el desarrollo de una respuesta eficaz a la maduración del sistema inmune y a una respuesta inmune adquirida tras múltiples contactos con el parásito (**Balic et al., 2000b; Nisbet et al., 2015**). Una posible causa que justifique la respuesta temprana frente a la infección parasitaria en estas razas de regiones tropicales-subtropicales, puede radicar en que las cargas parasitarias medioambientales son mucho más elevadas que en climas templados (donde habitan las razas comerciales en las que se habían estudiado mayoritariamente los mecanismos protectores) y se mantienen en el tiempo, lo que incrementa exponencialmente la exposición de los corderos a los parásitos. Estos deben ser capaces de controlar rápidamente las

parasitosis para poder sobrevivir (**Greer et al., 2015**), lo que podría haber llevado a la selección natural de estos individuos más resistentes. Una fórmula plausible que podría facilitar el desarrollar una respuesta rápida como la descrita, sería por tanto el disponer de mecanismos innatos que favorezcan la rápida recuperación del hospedador, la expulsión de los vermes y la reducción en la propagación y/o contaminación de los campos. Los datos previos que parecían involucrar una célula tradicionalmente vinculada con la respuesta innata, los linfocitos $T\gamma\delta^+$, así como la capacidad de respuesta tras una única exposición a las larvas del parásito (en los experimentos previos siempre se trataba de inoculaciones únicas) nos sugerían esta posibilidad.

El mecanismo inmune por el que esta raza controla la carga no está del todo claro pero, a tenor de los resultados presentados en el capítulo II, parece que tiene lugar entre los días 7 y 21 pi. Una vez que se realiza la muda a L4 el parásito comienza a ingerir sangre y a ser, por tanto, más patógeno; por lo que resulta muy importante en este contexto controlar la carga parasitaria, simplemente para sobrevivir. El hecho de que a los 7 dpi no existieran diferencias entre razas podría deberse a un intento de facilitar la estimulación del sistema inmune permitiendo la entrada en la mucosa de las larvas L3, menos patógenas. Con posterioridad, en el mantenimiento y desarrollo de la respuesta adquirida descrita en la bibliografía (**Balic et al., 2000b; Nisbet et al., 2015**), actuarían estas larvas como “inmunización-vacunación” natural. Es reseñable que parece sustentar esta hipótesis el que a los 7 dpi se observó asociación entre estas larvas intramurales y el recuento de células MHC-II⁺, lo que sugería un mayor reconocimiento antigénico (que también se manifestó en el estudio comparado del reconocimiento de proteínas en electroinmunotransferencias del sobrenadante de cultivo de linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos abomasales de animales de ambas razas) lo que acompañado con un aumento en las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD45RA⁺ en la mucosa, explicaría el posterior incremento de eosinófilos y la asociación negativa de los eosinófilos galectina 14⁺ con la carga parasitaria, longitud y huevos en útero a los 21 dpi, asociaciones que parecen conferirle a los eosinófilos una acción efectora que también sugieren los resultados obtenidos tras la administración de la rIL-5ov en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral. Este planteamiento supone que los linfocitos CD4⁺ actuarían como células coordinadoras y los eosinófilos galectina 14⁺ como células efectoras en el control específico de la carga parasitaria, pues estas células, además, se asociaron fuerte y positivamente entre sí ($r= 0.898^{**}$). Es probable que actúen tras degranular su contenido sobre la superficie del parásito, dañando su cutícula (**Rainbird et al., 1998; Balic y Meeusen, 2000; Balic et al., 2006**). Es posible que esta acción sea complementaria a las modificaciones que se producen en el mucus, como por ejemplo el incremento de la viscosidad, que podría ser consecuencia de la excreción de la propia

galectina 14, tal y como han sugerido otros autores (Young *et al.*, 2009). Todos estos mecanismos podrían participar en la expulsión de los vermes.

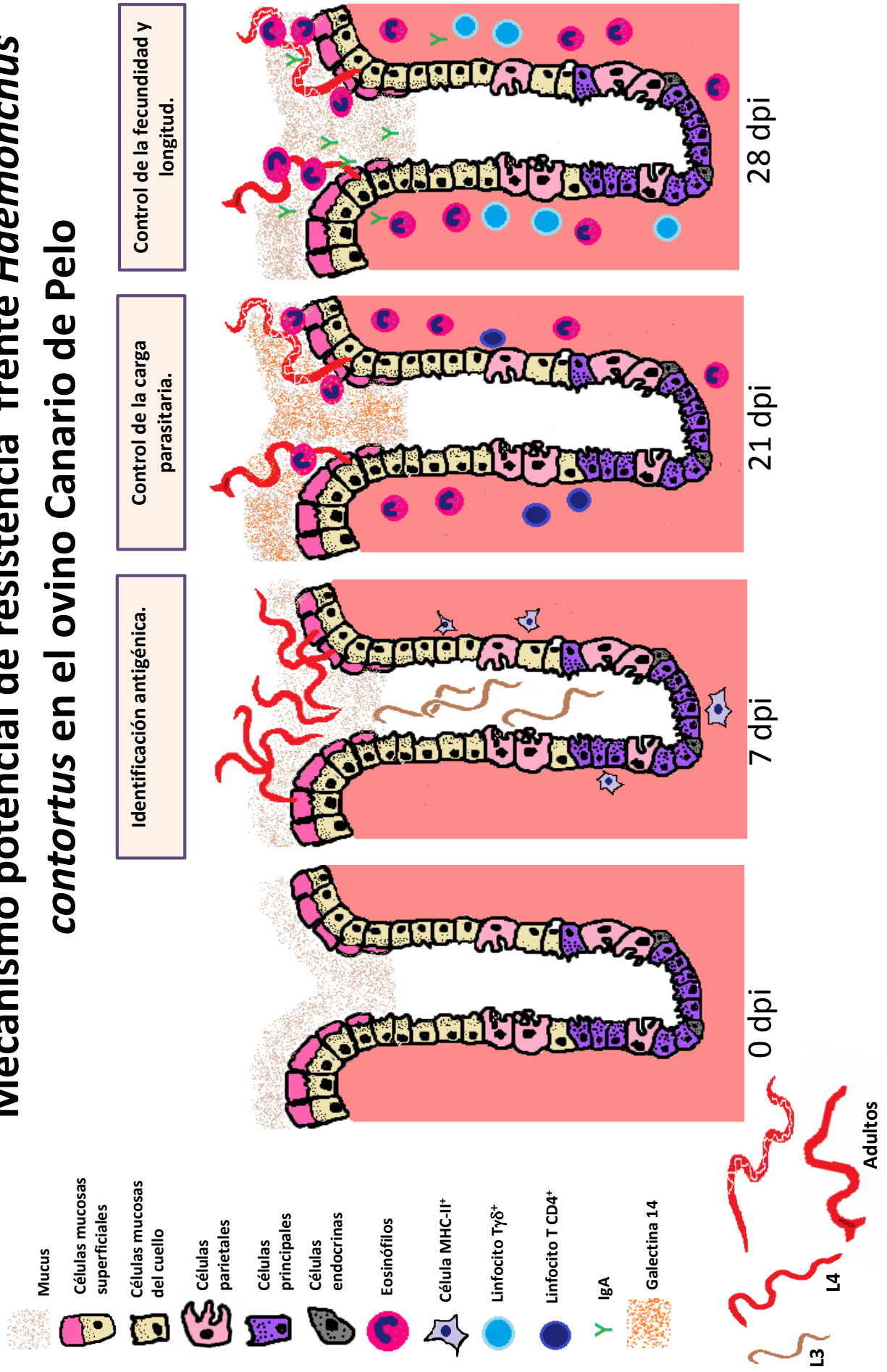
En todo caso, el control de las cargas parasitarias podría ser no exclusivamente inmuno-mediado y podrían participar otros mecanismos. En este sentido, la secuenciación transcriptómica de ARN de tejido de abomaso de los animales de este estudio, permitió observar que los ovinos de la raza CAP durante la infección con *H. contortus* son capaces de expresar 14 veces más genes que la raza CAN. Centenares de estos genes parecen estar relacionados con el control de la carga parasitaria a través de la inducción rápida de la respuesta inflamatoria, activación del complemento, proliferación celular acelerada y reparación de tejidos, modificación del pH, entre otros, que indicarían una mejor adaptación fisiológica innata para combatir a los parásitos (Guo *et al.*, 2015).

El control de la longitud y la fecundidad, sin embargo, tendría lugar entre los días 21 y 28 pi, pues una vez reducida la carga, ahora parece que interesa al hospedador dos cosas: (1) por un lado alterar el crecimiento y hacer menos patógenos a esos vermes preadultos/adultos, de modo que ingieran menos sangre (reducir la biomasa parasitaria controlando su carga y longitud), y (2) disminuir su capacidad reproductiva para reducir la contaminación del pasto. En el control de estas dos variables nuestros datos previos sugerían que participaban los linfocitos $T\gamma\delta^+$, la inmunoglobulina A (IgA) y los eosinófilos (Hernández, 2011). Los resultados obtenidos en las dos experiencias que conforman los capítulos III y IV de este trabajo ratifican esta hipótesis. Por una parte, al reducirse la población de linfocitos $T\gamma\delta/WC1^+$ tras la administración vía sanguínea del anticuerpo CC15 (anti WC1), se perdió el control sobre la longitud y la fecundidad, a pesar de no haber diferencias cuantitativas de IgA y eosinófilos, lo que sugiere que los linfocitos $T\gamma\delta^+$ tendrían algún papel en la coordinación de la respuesta inmune encargada del control de dichas variables parasitológicas, quizás a través del reconocimiento y presentación antigénica descrito en esta población celular y/o a la producción de moléculas mediadores por parte de esta célula. Por otro lado, la inmunización con IL-5 recombinante, con el fin de generar anticuerpo que inactivaran dicha interleuquina nativa necesaria tanto para inducir la eosinofilia como para la activación de esta célula, permitió observar el potente papel efector de los eosinófilos, pues los animales que recibieron dicho antígeno presentaron mayor número de vermes, los cuales fueron más largos y prolíficos, lo que permitió valorar la importancia de la activación de esta población celular en la respuesta inmune frente nematodos gastrointestinales en la raza CAP, confirmando su papel en el control de la fecundidad y longitud, así como en la regulación de las poblaciones parasitarias.

Toda esta información obtenida en esta tesis doctoral nos podría sugerir un nuevo mecanismo de resistencia, en el que los animales que viven en entornos favorables para el desarrollo de los parásitos, por ejemplo, por la exposición durante todo el año -lo que probablemente no sería compatible con la supervivencia en ausencia de respuestas rápidas- son capaces de responder tras una única dosis infectiva. En este escenario se permitiría la penetración de las L3 que estimularía al sistema inmune para el desarrollo de una respuesta posterior adquirida, mientras se controla rápidamente las cargas parasitarias y posteriormente la longitud y fecundidad. En esta respuesta parece que podrían estar implicados los linfocitos CD4⁺ y los eosinófilos en el control de la carga parasitaria, quizás con la implicación de mecanismos no inmunitarios (modificaciones del ecosistema gastrointestinal que perjudicarían a los vermes), precisándose en cualquier caso más estudios al respecto, y por otro lado se confirma el papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺, la IgA y los eosinófilos en el control de la longitud y la fecundidad.

Las evidencias acumuladas que sugieren diferencias entre razas a la hora de relacionarse con los parásitos (**Piedrafita *et al.*, 2010; Keane *et al.*, 2015**) así como la coexistencia potencial de respuestas inmunitarias innatas y adquiridas en estas razas locales, y la organización secuencial de las respuestas frente a distintos estadios parasitarios y con diferentes fines (control de la patogenicidad mediante cargas/longitud y de la epidemiología mediante longitud y fecundidad) confirman, una vez más, la gran complejidad que subyace a las interacciones entre hospedadores y nematodos gastrointestinales. Implementar nuestro conocimiento en estos ámbitos, nos brindará sin duda, nuevas herramientas que nos permitan mejorar el control de estos parasitismos.

Mecanismo potencial de resistencia frente *Haemonchus contortus* en el ovino Canario de Pelo



Conclusiones

9. CONCLUSIONES

1. Los ovinos de la raza Canaria de Pelo, tanto adultos como corderos, presentaron, en infecciones naturales mixtas por nematodos gastrointestinales, menores recuentos de huevos en heces que los ovinos de raza Canaria, lo que sugiere una mayor resistencia de la raza CAP.
2. Los géneros/especies de nematodos gastrointestinales que mostraron mayores prevalencias en los análisis coprológicos realizados en las explotaciones fueron, por orden, *Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus*. La mayor resistencia de los ovinos Canarios de Pelo durante infecciones mixtas parece indicar que esta raza desarrolla resistencia frente a diversas especies de parásitos.
3. Las variaciones climáticas estacionales de la isla de Gran Canaria producen importantes diferencias en la prevalencia y en los recuentos de huevos en heces a lo largo del año, lo que aconseja por tanto que la administración profiláctica de fármacos debería ser diferente en función de la zona.
4. Los ovinos de la raza Canaria de Pelo inoculados con 20.000 L3 de *H. contortus* controlan la carga parasitaria antes que la longitud y la fecundidad comparado con ovinos de raza Canaria. El control de la carga parasitaria tuvo lugar entre los días 7 y 21 post-inoculación (pi) y en ello parece estar implicados los linfocitos CD4⁺ y los eosinófilos. Asimismo, estos animales presentaron un hematocrito significativamente mayor incluso antes de padecer la infección. Estos datos señalan por un lado una mayor adaptación innata de esta raza y por otro, el desarrollo de mecanismos de protección más rápida y eficaz que controlan inicialmente la carga parasitaria y, de este modo, la anemia.
5. La IgA obtenida del sobrenadante del cultivo de células secretoras de anticuerpos de los nódulos linfáticos abomasales de ovinos Canarios de Pelo, reconoce un mayor número de fracciones proteicas del antígeno somático del estadio adulto de *H. contortus* que el ovino Canario a los 7 y 21 dpi. Este resultado apunta hacia un reconocimiento más eficaz de proteínas del parásito que podría explicar el control de la longitud de los vermes en momentos posteriores de la infección, probablemente con la participación de la IgA local específica.
6. El protocolo de administración del anticuerpo CC15 (anti WC1), produce la reducción significativa de los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y T $\gamma\delta$ /WC1⁺ en sangre y, de esta última población celular, en el tercio basal de la mucosa del abomaso.

Conclusiones

7. Los ovinos Canarios de Pelo inoculados con *H. contortus* que recibieron el anticuerpo CC15 presentaron vermes significativamente más largos y prolíficos que el grupo control de ovinos Canarios de Pelo, perdiéndose la asociación negativa de esas variables con los niveles de IgA específica y los eosinófilos que se establecen en condiciones normales. Estos datos sugieren que los linfocitos $T\gamma\delta^+$ desempeñan un papel en el control de la fecundidad del parásito, independiente de los estadios larvarios tempranos, y en el reclutamiento de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas en la mucosa gástrica.

8. La inmunización con interleuquina 5 (IL-5) recombinante ovina de los animales de raza Canaria de Pelo estuvo acompañada de un incremento de IgG sérica específica anti-IL-5, así como del aumento del número, tamaño y prolificidad de los vermes tras la infección experimental. Estos resultados explican la relevancia de la IL-5 en la activación de los eosinófilos en los mecanismos que desarrolla esta raza ovina frente *H. contortus*.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alba-Hurtado F. y Munoz-Guzmán M.A. (2013) Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in sheep. *Biomed Research International* 2013, 162158.

Altaif K.I. y Dargie J.D. (1978) Genetic resistance to helminths: the influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 77, 161-175.

Álvarez-Sánchez M.A., Pérez-García J., Cruz-Rojo M.A., Rojo-Vazquez F.A. (2006) Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitology Research* 99, 78-83.

Amarante A.F.T., Craig T.M., Ramsey W.S., El-Sayed N.M., Desouki A.Y., Bazer F.W. (1999) Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and crossbreed ewes. *Veterinary Parasitology* 85, 61-69.

Amarante A.F.T., 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. *Veterinary Parasitology* 120, 91-106.

Amarante A.F.T., 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. *Veterinary Parasitology* 128, 99–107.

Amarante A.F.T., Susin I., Rocha R.A., Silva M.B., Mendes C.Q., Pires A.V. (2009) Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 165, 273-280.

Anderson R.C. (1992) Nematode parasites of vertebrates. Wallingford, UK. *CAB International*.

Andlauer W. y Fürst P. (2002) Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook. *Food Research International* 35, 171-176.

Arjona A. (2007) Células implicadas en la respuesta inmune. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

Athanasiadou S., Pemberton A., Jackson F., Inglis N., Miller, H. R. P., Thevenod., F., Mackellar, A., Huntley, J.F. (2008) Proteomic approach to identify candidate effector molecules during the

Bibliografía

in vitro immune exclusion of infective *Teladorsagia circumcincta* in the abomasum of sheep. *Veterinary Research* 39:58.

Aumont G., Gruner L., Hostache G. (2003) Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadalupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Veterinary Parasitology* 116, 139-150.

Ayoub I.A. y Yang T.J. (1996) Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 353-63.

Bahirathan M., Miller J.E., Barras S.R., Kearney M.T. (1996) Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongyle nematode infection. *Veterinary Parasitology* 65, 259-268.

Bain R.K. (1999) Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *International Journal for Parasitology* 29, 185–191.

Baker R.L., Mugambi J.M., Audho O., Carles A.B., Thorpe W. (2004) Genotype by environment interactions for productivity and resistance to gastrointestinal nematode parasites in Red Maasai and Dorper sheep. *Animal Science* 79, 343-353.

Bakker N., Vervelde L., Kanobana K., Knox D.P., Cornelissen A.W., de Vries E., Yatsuda A.P. (2004) Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22, 618-628.

Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T. (2000a) Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 75, 109-120.

Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T. (2000b) The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology* 45, 181-241.

Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T. (2002) Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology* 24, 39-46.

Balic A., Cunningham C.P., Meeusen E.N.T. (2006) Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunology* 28, 107-115.

Bibliografía

Bao S., McClure S.J., Emery D.L., Husband A.J. (1996) Interleukin-5 mRNA expressed by eosinophils and γ/δ Tcells in parasite-immune sheep. *European Journal of Immunology* 26, 552-556.

Barger I.A. (1999) The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology* 29, 41-47.

Barger I.A., Lejambre L.F., Georgi J.R., Davies H.I. (1985) Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *International Journal for Parasitology* 15, 529-533.

Barnes E.H. y Dobson R.J. (1990) Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: model to predict the worm population over time as a function of infection rate and host age. *International Journal for Parasitology* 20, 365-373.

Barnes E.H. y Dobson R.J. (1993) Persistence of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *International Journal for Parasitology* 20, 365-373.

Barnes E.H., Dobson R.J., Barger I.A. (1995) Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11, 56-63.

Bartley D.J., Jackson E., Johnson K., Coop R.L., Mitchell G.B.B., Sales J., Jackson F. (2003) A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks. *Veterinary Parasitology* 117, 61-71.

Barton N.J., Trainor B.L., Urie J.S., Atkins J.W., Pyman M.F., Wolstencroft I.R. (1985) Anthelmintic resistance in nematode parasites of goats. *Australian Veterinary Journal* 62, 224-227.

Bath G.F., Malan F.S., Van Wyk J.A. (1996) The "FAMACHA[®]" Ovine Anaemia Guide to assist with the control of haemonchosis. In: Proceedings of the 7th Annual Congress of the Livestock Health and Production Group of the South African Veterinary Association.

Bath G.F. y van Wyk J.A. (2009) The Five Point Check[®] for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research* 86, 6-13.

Bibliografía

Bautista C. R. (2010) Respuesta Inmune contra parásitos. En: Gutiérrez Cabello J.A. Inmunología veterinaria. Editorial El Manual Moderno, 2010. México. ISBN: 978-607-448-057-3.

Beard P.M., Rhind S.M., Sinclair M.C., Wildblood L.A., Stevenson K., McKendrick I.J., Sharp J.M., Jones D.G. (2000) Modulation of $\gamma\delta$ T cells and CD1 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77, 311-319.

Benavides F.J. y Guénet J.L. (2003) Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá de Henares, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. España. ISBN 978-848-138-584-7.

Betts C.J. y Else K.J. (1999) Mast cells, eosinophils and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to *Trichuris muris*. *Parasite Immunology* 21, 45-52.

Biffa D., Jobre Y., Chakka H. (2007) Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Animal Health Research Reviews* 7, 107-118.

Bishop S.C. (2012) Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal* 6, 741-747.

Bishop S.C. y Stear M.J. (2003) Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. *Veterinary Parasitology* 115, 147-166.

Bisset S.A. y Morris C.A. (1996) Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *International Journal for Parasitology* 26, 857-868.

Boersema J.H. y Pandey V.S. (1997) Anthelmintic resistance of trichostrongylids in sheep in the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Parasitology* 68, 383-388.

Boismenu R. y Havrant W.L. (1997) An innate view of $\gamma\delta$ T cells. *Current Opinion in Immunology* 9, 57-63.

Borgsteede F.H.M., Pekelder J.J.H., Dercksen D.P., Sol J., Vellema P. (1997) A survey of anthelmintic resistance in nematodes of sheep in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 19, 167-172.

Bottjer K.P., Klesius P.H., Bone L.W. (1985) Effects of host serum on feeding by *Trichostrongylus colubriformis* (nematode). *Parasite Immunology* 7, 1-9.

Bibliografía

- Bowles V.M., Brandon M.R., Meeusen E. (1995)** Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunology* 84, 669–674.
- Brandes M., Willimann K., Moser B. (2005)** Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T cells. *Science* 309, 264-268.
- Brenner M.B., McLean J., Dialynas D.P., Strominger J.L., Smith J.A., Owen F.L., Seidman J.G., Ip S., Rosen F., Krangel M.S. (1986)** Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145-149.
- Bricarello P.A., Gennari S.M., Oliveira-Sequeira T.C.G., Vaz C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves I., Echevarria F.A.M. (2004)** Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanuda sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 51, 75-83.
- Buddle B.M., Jowett G., Green R.S., Douch P.G.C., Risdon P.L. (1992)** Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *International Journal for Parasitology* 22, 995-960.
- Burke J.M. y Miller J.E. (2004)** Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper, Katahdin, and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United States. *Small Ruminant Research* 54, 43-51.
- CabGC. Cabildo de Gran Canaria.** Área de Desarrollo Insular. Plan de Desarrollo Rural y de Medianías y cumbres de Gran Canaria. Sector Primario-Ganadería. <http://www.grancanaria.com/cabgc/areas/areadesarrolloinsu/pdrgc/indice.htm> [Consulta: 10-08-2015]
- Čerňanská D., Várady M., Čorba J. (2006)** A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in the Slovak Republic. *Veterinary Parasitology* 135, 39-45.
- Cezar A.S., Toscan G., Camillo G., Sangioni L. A., Olmedo H., Flores F.S. (2010)** Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology* 173, 157–160.
- Coffman R.L., Seymour B.W.P., Hudak S., Jackson J., Rennick D. (1989)** Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308-310.

Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruysse J. (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136, 167–185.

Coltman D.W., Wilson K., Pilkington J.G., Stear M.J., Pemberton J.M. (2001) A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally- parasitized population of Soay sheep. *Parasitology* 122, 571-582.

Conrad M.L., Davis W.C., Koop B.F. (2007) TCR and CD3 antibody cross-reactivity in 44 species. *Cytometry A* 71, 925-33.

Contreras J. (2007) Alimentación y religión. Observatorio de la alimentación. Parc Científic de Barcelona. Universidad de Barcelona. Humanidades Médicas nº 16, junio 2007. <http://www.fundacionmhm.org/tema0716/articulo.pdf> [consulta: 06-08-2015].

Crawford A.M., Paterson K.A., Dodds K.G., Tascon C.D., Williamson P.A., Thomson M.R., Bisset S.A., Beattie A.E., Greer G.J., Green R.S., Wheeler R., Shaw R.J., Knowler K., McEwan J. (2006) Discovery of quantitative trait loci for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC Genomics*, 7:178.

Curtain C.C. y Anderson N. (1971) Immunocytochemical localization of the ovine immunoglobulins IgA, IgG1, IgG1_a and IgG2: Effect of gastrointestinal parasitism in the sheep. *Clinical & Experimental Immunology* 8. 151-162.

Cutuli M.T. (2007) Inmunidad innata. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

Dargie J.D. y Allonby E.W. (1975) Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the “self-cure” phenomenon. *The International Journal of Parasitology* 5, 147-157.

de Cisneros J.P., Matthews, L., Mair, C., Stefan, T., Stear, M.J. (2014) The transfer of IgA from mucus to plasma and the implications for diagnosis and control of nematode infections. *Parasitology* 141, 875-879.

Bibliografía

- de Marez T., Cox E., Vercruysse J., Godderis B.M. (2000)** Identification of *Ostertagia ostertagi* specific cells in bovine abomasal lymph nodes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73, 145-154.
- de Veer M.J., Kemp J.M., Meeusen E.N.T. (2007)** The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology* 29, 1-9.
- de Vries E., Bakker N., Krijgsveld J., Knox D.P., Heck A.J., Yatsuda A.P. (2009)** An AC-5 cathepsin B-like protease purified from *Haemonchus contortus* excretory secretory products shows protective antigen potential for lambs. *Veterinary Research* 40:41.
- Decot V., Woerly G., Loyens M., Loiseau S., Quatannens B., Capron M., Dombrowicz D. (2005)** Heterogeneity of Expression of IgA Receptors by Human, Mouse and Rat eosinophils. *The Journal of Immunology* 174, 628-635.
- Delgado J.V., Fresno M.R., Camacho M.E., Rodero E., Barba C. (1998)** Origen e Influencias del ovino Canario. *Archivos de Zootecnia* 47, 511-516.
- Dent L.A., Daly C.M., Mayrhofer G., Zimmerman T., Hallett A., Bignold L.P., Creaney J., Parsons J.C. (1999)** Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. *Infection and Immunity* 67, 989-993.
- Díez-Baños P., Pedreira J., Sánchez-Andrade R., Francisco I., Suárez J.L., Díaz P., Panadero R., Arias M., Paineira A., Paz-Silva A., Morrondo P. (2008)** Field evaluation for anthelmintic-resistance ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. *The Journal of Parasitology* 94, 925-928.
- Dominik S. (2005)** Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep: a review. *Genetic Selection Evolution* 37, s83-s96.
- Donaldson J. (1997)** The effect of dietary protein on the establishment and maturation of nematode populations in adult sheep. In: Barrell GK, editor. Sustainable control of internal parasites in ruminants. Canterbury: Lincoln University, 193-201.
- Douch P.G.C., Harrison G.B., Buchanan L.L., Greer K.S. (1983)** *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *International Journal for Parasitology* 13, 207-212.

Bibliografía

Douch P.G.C., Morum P.E., Rabel B. (1996) Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. *International Journal for Parasitology* 26, 205-211.

Dunphy J.L., Balic A., Barcham G., Horvath A.J., Nash A.D., Meeusen E.N.T. (2000) Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 32106-32113.

Dunsmore J. D. (1961) Effect of whole-body irradiation and cortisone on the development of *Ostertagia* species in sheep. *Nature* 192, 139–140.

Emery D.L., McClure S.J., Wagland B.M., Jones W.O. (1992) Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: immunization by normal and truncated infections. *International Journal for Parasitology* 22, 215-220.

Emery D.L., McClure S.J., Davey R.J., Bendixsen, T. (1999) Induction of protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in neonatal merino lambs. *International Journal for Parasitology* 29, 1037– 1046.

Esteban Muñoz C. (2003) *Razas Ganaderas Españolas. II. Ovinas*. Cayo Esteban Muñoz, FEAGAS y MAPA, 2003. ISBN: 84-491-0580-3.

EUROSTAT. Europa, Estadísticas y Sondeos. Sheep population. http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mt_1ssheep&lang=en [Consulta: 09-08-2015].

Evans C.W., Lund B.T., McConnel I., Bujdoso R. (1994) Antigen recognition and activation of ovine $\gamma\delta$ T cells. *Immunology* 82, 229–237.

Falzon G., Schneider D., Trotter M., Lamb D.W. (2013) A relationship between faecal egg counts and the distance travelled by sheep. *Small Ruminant Research* 111, 171-174.

FAO 1. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Noticias. 2050: un tercio más de bocas que alimentar. <http://www.fao.org/news/story/es/item/35675/icode/> [Consulta: 17-08-2015].

FAO 2. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Hacia una alimentación y agricultura sostenible. Principio 1. <http://www.fao.org/sustainability/background/principle-1/es/> [Consulta: 04-08-2015].

Bibliografía

FAO 3. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Hacia una alimentación y agricultura sostenible. Principio 2. <http://www.fao.org/sustainability/background/principle-2/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 4. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Hacia una alimentación y agricultura sostenible. Principio 3. <http://www.fao.org/sustainability/background/principle-3/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 5. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Hacia una alimentación y agricultura sostenible. Principio 4. <http://www.fao.org/sustainability/background/principle-4/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 6. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Hacia una alimentación y agricultura sostenible. Principio 5. <http://www.fao.org/sustainability/background/principle-5/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 7. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Modelo de evaluación ambiental de la ganadería mundial. <http://www.fao.org/gleam/model-description/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 8. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Recursos zoogenéticos. Animales, Una red de seguridad para el futuro. <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cthemas/animals/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 9. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Biodiversidad para la seguridad alimentaria y la nutrición. <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cgrfa-home/es/> [Consulta: 04-08-2015].

FAO 10. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Enfoques 2006. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm> [Consulta: 07-08-2015].

FAO (2003) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Dirección de Producción Animal y Sanidad Animal. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Roma 2003. ISSN 1014-1200 <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y4813S/y4813S00.pdf> [Consulta: 14-08-2015].

Bibliografía

FAO (2009) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. La larga sombra del ganado, problemas ambientales y opciones. Roma. ISBN 978-92-5-305571-5. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a0701s/a0701s.pdf> [Consulta: 07-08-2015].

FAO (2010) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. ISBN 978-92-5-305762-7. <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s00.htm> [Consulta: 05-08-2015].

FAO (2013) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. *World Livestock 2013 – Changing disease landscapes*. Roma. E-ISBN 978-92-5-107928-7. http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/World_livestock/2013.htm [Consulta: 04-08-2015].

FAO (2015) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Construyendo una visión común para la agricultura y alimentación sostenibles 2015. Principios y Enfoques. Roma. E-ISBN 978-92-5-308472-2. <http://www.fao.org/publications/card/es/c/9539da19-caf4-48e8-bbfe-19cbc2c969f7/> [Consulta: 04-08-2015].

FAOSTAT. Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. División de estadística. Producción- Ganadería. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E> [Consulta: 06-08-2015].

Fawzi E.M., González-Sánchez M.E., Corral M.J., Cuquerella M., Alunda J.M. (2014) Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *International Journal for Parasitology* 44, 429-436.

Fawzi E.M., González-Sánchez M.E., Corral M.J., Alunda J.M., Cuquerella M. (2015) Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Veterinary Parasitology* 211, 54-59.

Fitzpatrick J.L. (2013) Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary Parasitology* 195, 233-248.

Fleming M.W. (1993) Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 50, 109-15.

Bibliografía

Frenkel M.J., Dopheide T.A.A., Wagland B.M., Ward C.W. (1992) The isolation, characterization and cloning of a globin-like, host-protective antigen from the excretory-secretory products of *Trichostrongylus colubriformis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50, 27-36.

Gamble H.R. y Zajac A.M. (1992) Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Veterinary Parasitology* 41, 211-225.

García J.A. (2007) Citoquinas. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

George S.D., George A.J., Stein P.A., Rolfe P.F., Hosking B.C., Seewald W. (2012) The comparative efficacy of abamectin, monepantel and an abamectin/derquantel combination against fourth-stage larvae of a macrocyclic lactone-resistant *Teladorsagia spp.* isolate infecting sheep. *Veterinary Parasitology* 188, 190-193.

GEVIC-NaCul 1. Natura y Cultura, Gran Enciclopedia Virtual de las Islas Canarias. Fisiografía de Canarias.

http://www.gevic.net/info/contenidos/mostrar_contenidos.php?idcat=22&idcap=91&idcon=526 [Consulta: 30-04-2015].

GEVIC-NaCul 2. Natura y Cultura, Gran Enciclopedia Virtual de las Islas Canarias. Climatología de Canarias. Características del clima canario.

http://www.gevic.net/info/contenidos/mostrar_contenidos.php?idcat=22&idcap=92&idcon=532 [Consulta: 30-04-2015].

GEVIC-NaCul 3. Natura y Cultura, Gran Enciclopedia Virtual de las Islas Canarias. Climatología de Canarias. Condicionantes del clima canario.

http://www.gevic.net/info/contenidos/mostrar_contenidos.php?idcomarca=-1&idcat=22&idcap=92&idcon=531#termica [Consulta: 30-04-2015].

GEVIC-NaCul 4. Natura y Cultura, Gran Enciclopedia Virtual de las Islas Canarias. La Ganadería en Canarias.

http://www.gevic.net/info/contenidos/mostrar_contenidos.php?idcat=21&idcap=207&idcon=843 [Consulta: 30-04-2015].

Bibliografía

Gibello A. (2007) Mecanismos de activación de la respuesta inmune humoral. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

Gill B.B. (1996) Anthelmintic resistance in India. *Veterinary Parasitology* 63, 173-176.

Gill H.S. (1991) Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunology* 13, 617-628.

Gill H.S., Gray G.D., Watson D.L., Husband A.J. (1993a) Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunology* 15, 61-67.

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

Gill H.S., Altmann K., Cross M.L., Husband A.J. (2000) Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 99, 458-463.

GobCan 1. Gobierno de Canarias. Estadísticas Agrarias ovinas en Las Palmas y Santa Cruz de Tenerife año 2007 y 2013. <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/otros/estadistica/> [Consulta: 10-08-2015].

GobCan 2. Gobierno de Canarias. Ganadería. Razas Autóctonas ovinas. El ovino Canario, el ovino Canario de Pelo y el ovino Palmero. <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/ganaderia/razasautoctonas/> [Consulta: 10-08-2015].

GobCan 3. Gobierno de Canarias. Programa del Plan de Desarrollo Rural de Canarias 2003-2007. http://www.pdrcanarias.org/2007/images/stories/pdr_2013_vigente_nov.pdf [Consulta: 10-08-2015].

GobCan 4. Gobierno de Canarias. Plan director de actuaciones para el desarrollo de un Plan Ganadero Integral en las Islas Canarias. Capítulo XIII Subsectores ovino de leche y ovino de carne. <http://www.gobcan.es/agricultura/doc/ganaderia/planganadero/capituloXIII.pdf> [Consulta: 10-08-2015].

GobCan 5. Gobierno de Canarias. Clima de Canarias. Relieve. <http://www.gobiernodecanarias.org/educacion/4/Medusa/GCMWeb/DocsUp/Recursos/43646960K/Ecosistemas/EcosistemasMarinos/PSD/relieve.html> [Consulta: 20-09-2015]

Bibliografía

González J.F. (2007) Inmunidad adaptativa. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

González J.F., Hernández A., Molina J.M., Fernández A., Raadsma H.W.R., Meeusen E.N.T., Piedrafita, D. (2008) Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. *Veterinary Parasitology* 153, 374-378.

González J.F., Hernández A., Meeusen E.N., Rodríguez F., Molina J.M., Jaber J.R., Raadsma H.W., Piedrafita D. (2011a) Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. *Veterinary Parasitology* 178, 286-92.

González J.F., Hernández A., Hernández J.N., Meeusen E.N.T., Molina J.M., Rodríguez F., Jaber J.R., Rodríguez E., Piedrafita D. (2011b) Papel del mucus en la resistencia del Canario de Pelo frente a *Haemonchus contortus*. En: XII Congreso Ibérico de Parasitología, 5 -8 Julio 2011. Zaragoza, España, Pag. 113.

González, J.F., Hernández, J.N., Preston, S.M., Meeusen, E.N.T., Piedrafita, D. (2015) Stage-specific immunity against *Haemonchus contortus* in sheep. In: Proceeding WAAVP, Liverpool, United Kingdom, 16–20 August 2015, p. 208.

Good B., Hantahan J.P., Crowley B.A., Mulcany G. (2006) Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden. *Veterinary Parasitology* 136, 317-327.

Gray G.D. (1997) The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. *Veterinary Parasitology* 72, 345-366.

Gray G.D., Presson B.L., Albers G.A.A., Le Jambre L.F., Piper L.R., Barker J.S.F. (1987) Comparison of within- and between-breed variation in resistance to haemonchosis in sheep. In: Merino Improvement Programs in Australia. Ed. MCGuirk, B. J., pp. 365–369. Australian Wool Corporation, Melbourne, Australia.

Green P.E., Forsyth B.A., Rowan K.J., Payne G. (1981) The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. *Australian Veterinary Journal* 57, 79-84.

Bibliografía

Greer A.W., Kenyon F., Bartley D.J., Jackson E.B., Gordon Y., Donnan A.A., McBean D.W., Jackson F. (2009) Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of targeted selective treatment (TST) regime in lambs. *Veterinary Parasitology* 164, 12-20.

Greer A.W., McAnulty R.W., Logan C.M., Hoskin S.O. (2010) Suitability of the Happy Factor decision support model as part of targeted selective anthelmintic treatment in Coopworth sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 70, 213-216.

Greer A., Iposu S., Hogan A., McAnulty R. (2015) Relative maturity and immunity to parasites: comparison of resistant and resilient Romney lambs. In: Proceeding WAAVP, Liverpool, United Kingdom, 16–20 August 2015, p. 185.

Gruner L., Aumont G., Getachew T., Brunel J.C., Pery C., Cognié Y., Guérin Y. (2003) Experimental infection of Black Belly and INRA401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Veterinary Parasitology* 116, 239-249.

Guo Z., González J.F., Hernández J.N., McNeilly T., Morrison T., Yu P., Li R.W. (2015) Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. (En Preparación).

Haas W., Pereira P., Tonegawa S. (1993) Gamma/Delta Cells. *Annual Review of Immunology* 11, 637-85.

Halliday A.M. y Smith W.D. (2011) Attempts to immunize sheep against *Teladorsagia circumcincta* using fourth-stage larval extracts. *Parasite Immunology* 33, 554-560.

Halliday A.M., Routledge C.M., Smith S.K., Matthews J.B., Smith W.D. (2007) Parasite loss and inhibited development of *Teladorsagia circumcincta* in relation to the kinetics of the local IgA response in sheep. *Parasite Immunology* 29, 425- 434.

Hansen J. y Perry B. (1994) The epidemiology of helminth parasites. En: The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. International Laboratory for Research on Animal Diseases, P.O. Box 30709, Nairobi, Kenya. ISBN 92-9055-703-1. <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5492e/x5492e00.htm> [Consulta: 14-05-2015]

Harrison G.B., Pulford H.D., Gatehouse T.K., Shaw R.J., Pfeffer A., Shoemaker C.B. (1999) Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reactions during rejection of

Bibliografía

Trichostrongylus colubriformis from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *International Journal for Parasitology* 29, 459-468.

Harrison G.B.L., Pulford H.D., Hein W.R., Severn W.B., Shoemaker C.B. (2003) Characterization of a 25kDa carbohydrate larval antigen (CarLA) from *Trichostrongylus colubriformis*; a potential target for host immunity. *Parasite Immunology* 25, 79-86.

Harrison G.B.L., Pulford H.D., Doolin E.E., Pernthaner A., Shoemaker C.B., Hein W.R. (2008) Antibodies to surface epitopes of the carbohydrate larval antigen CarLA are associated with passive protection in strongylid nematode challenge infections. *Parasite Immunology* 30, 577-584.

Hayday A.C. (2000) $\gamma\delta$ T CELLS: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. *Annual Review of Immunology* 18, 975-1026.

Hayward A.D. (2013) Causes and consequences of intra- and inter-host heterogeneity in defence against nematodes. *Parasite Immunology* 35, 362-373.

Hein W.R., Pernthaner A., Piedrafita D., Meeusen E.N. (2010) Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunology* 32, 541-548.

Henderson N.G. y Stear M.J. (2006) Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, 62-66.

Herbert D.R., Lee J.J., Lee N.A., Nolan T.J., Schad G.A., Abraham D. (2000) Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *The Journal of Immunology* 165, 4544-4551.

Hernández A. (2011) *Estudio de la respuesta immune frente a Haemonchus contortus en dos razas ovinas canarias*. Tesis Doctoral. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Arucas, España.

Hernández J.N., Hernández A., Stear M., Conde de Felipe M., Rodríguez E., Piedrafita D., González J.F. (2015) A potential role for Mucosal IgA in modulating *Haemonchus contortus* adult worms in sheep (enviado).

Herndon F.J. y Kayes S.G. (1992) Depletion of eosinophils by Anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *The Journal of Immunology* 149, 3642-3647.

Bibliografía

Hielscher A., Brandt H., Erhardt G., Gauly M. (2006) Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhoen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. *Veterinary Parasitology* 141, 279-284.

Hogarth P.J., Taylor M.J., Bianco A.E. (1998) IL-5-Dependent immunity to Microfilariae is independent of IL-4 in mouse model of onchocerciasis. *The Journal of Parasitology* 160, 5436-5440.

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 behavior in sheep. *Immunology and Cell Biology* 76, 153-158.

Hokibara S., Takamoto M., Tominaga A., Takatsu K., Sugane K. (1997) Marked eosinophilia in interleukin-5 transgenic mice fails to prevent *Trichinella spiralis* infection. *The Journal of Parasitology* 83, 1186-1189.

Hoorens P., Rinaldi M., Mihi B., Dreesen L., Grit G., Meeusen E., Li R.W., Geldhof P. (2011) Galectin-11 induction in the gastrointestinal tract of cattle following nematode and protozoan infections. *Parasite Immunology* 33, 669-678.

Hosté H., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Mueller-Harvey I., Sotiraki S., Louvandini H., Thamsborg S.M., Terrill T.H. (2015) Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* 212, 5-17.

Hsu H.T. (2013) WC1 functions as a co-receptor and a pattern recognition receptor in bovine gammadelta T cells. (January 1, 2013). *Doctoral Dissertations Available from Proquest*. Paper AAI3603100. <http://scholarworks.umass.edu/dissertations/AAI3603100/> [Consulta: 23-09-2015].

Hsu H., Chen C., Nenninger A., Holz L., Baldiwn C.L., Telfer J.C. (2015) WC1 is a hybrid $\gamma\delta$ TCR co-receptor and pattern recognition receptor for pathogenic bacteria. *Journal of Immunology* 194, 2280- 2288.

Jacobs H.J., Wiltshire C., Ashman K., Meeusen E.N.T. (1999) Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-368.

Bibliografía

Jarrett W.F.H., Jennings F.W., McIntyre W.I.M., Mulligan W., Urquhart G.M. (1960) Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection immunity produced by the administration of irradiated larvae. *Immunology* 3, 145-151.

Jasmer D.P., Perryman L.E., McGuire T.C. (1996) *Haemonchus contortus* GA1 antigens: related, phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polypeptide and released from the nematode during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 8642-8647.

Jovanovic M., Sokolic A., Movsesijan M., Cuperlovic K. (1965) Immunization of sheep with irradiated larvae of *Dictyocaulus filaria*. *The British Veterinary Journal* 121, 119-131.

Kahn L.P. y Woodgate R.G. (2012) Integrated parasite management: Products for adoption by the Australian sheep industry. *Veterinary Parasitology* 186, 58-64.

Kambara T., McFarlane R. G., Abell T. J., McAnulty R. W., Sykes A. R. (1993) The effect of age and dietary protein on immunity and resistance in lambs vaccinated with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 23, 471-476.

Kaminsky R., Bapst B., Stein P.A., Strehlau G.A., Allan B.A., Hosking B.C., Rolfe P.F., Sager H. (2011) Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research* 109, 19-23.

Kanan J.H., Nayeem N., Binns R.M., Chain B.M. (1997) Mechanisms for variability in a member of the scavenger-receptor cysteine-rich superfamily. *Immunogenetics* 46, 276-82.

Kanobana K., Ploeger H.W., Vervelde L. (2002) Immune expulsion of trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. *International Journal for Parasitology* 32, 1389-1398.

Kassai T. (1999) Veterinary Helminthology. Oxford. *Butterworth-Heinemann*. ISBN: 0-7506-3563-0.

Kassai T., Fésüs L., Hendrikx W.M., Takáts C., Fok E., Redl P., Takács E., Nilsson P.R., van Leeuwen M.A., Jansen J. (1990) Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs?. *Veterinary Parasitology* 37, 61-77.

Bibliografía

- Keane O., Good B., McRae K. (2015)** Host response and differential gene expression in Scottish Blackface lambs with divergent phenotypes for resistance to gastrointestinal nematodes. In: Proceeding WAAVP, Liverpool, United Kingdom, 16–20 August 2015, p. 184.
- Keith K.A., Duncan M.C., Murray M., Bairden K., Tait A. (1990)** Stage specific cuticular proteins of *Ostertagia circumcincta* and *Ostertagia ostertagi*. *International Journal for Parasitology* 20, 1037-1045.
- Kelkele F.A., Tolossa Y.H., Kassa G.M. (2012)** Experimental infection of Ethiopian highland sheep by different infective doses of *Haemonchus contortus*: Haematological and parasitological parameters, serum protein concentrations and clinical responses. *Ethiopian Veterinary Journal* 16, 41-57.
- Kemp J.M., Robinson N.A., Meeusen E.N.Y., Piedrafita D.M. (2009)** The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *International Journal for Parasitology* 39, 1589-1594.
- Kemper K.E., Emery D.L., Bishop S.C., Oddy H., Hayes B.J., Dominik S., Henshall J.M., Goddard M.E. (2011)** The distribution of SNP marker effects for faecal worm egg count in sheep, and the feasibility of using these markers to predict genetic merit for resistance to worm infections. *Genetics Research* 93, 203-219.
- Klei T.R. (1997)** Immunological control of gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 72, 507-523.
- Klein S.L. (2004)** Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* 26, 247-264.
- Knox D.P. (2000)** Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 120, s43-s61.
- Knox D.P. y Smith W.D. (2001)** Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary Parasitology* 100, 21-32.
- Knox D.P., Smith S.K., Smith W.D. (1999)** Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*. *Parasite immunology* 21, 201-210.

Bibliografía

- Knox D.P., Redmond D.L., Newlands G.F., Skuce P.J., Pettit D., Smith W.D. (2003)** The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology* 33, 1129–1137.
- Knox M.R. (1996)** Integrated control programs using medicated blocks. Proceedings of Sustainable Control of Parasites in Small Ruminants Workshop. Bogor, Indonesia, April 1996, ACIAR, pp. 141-145.
- Knox M., Healey K., Lawlor C., Lamb J., Chambers M., Groves P. (2013)** BioWorma® for control of nematode parasites of livestock. In: Proceeding WAAVP, Perth, Australia, 25–29 August 2013, p. 223.
- Korenaga M., Hitoshi Y., Yamaguchi N., Sato Y., Takatsu K., Tada I. (1991)** The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 72, 502-507.
- Koski K. G. y Scott M. E. (2003)** Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 16, 237-251.
- Kotze A.C., Le Jambre L.F., O’Grady J. (2006)** A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology* 137, 294-305.
- Kronenberg M. (1994)** Antigens recognized by $\gamma\delta$ T cells. *Current Opinion in Immunology* 6, 64–71.
- Lacroux C., Nguyen T.H.C., 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. *Veterinary Research* 37, 607–622.
- Lange A.M., Yutanawiboonchai W., Scott P., Abraham D. (1994)** IL-4 and IL-5-dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. *The Journal of Immunology* 153, 205-211.
- Lantz C.S., Boesiger J., Song C.H., Mach N., Kobayashi T., Mulligan R.C. Nawa Y., Drnoff G., Galli S.J. (1998)** Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90-93.

Bibliografía

Larsen M., Wolstrup J., Heriksen S., Grønvold J., Nansen P. (1992) *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of Helminthology* 66, 137-141.

Leathwick D.M. (2013) The influence of temperature on the development and survival of the pre-infective free-living stages of nematode parasite of sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 61, 32-40.

Lee C.Y., Munyard K.A., Gregg K., Wetherall J.D., Stear M.J., Groth D.M. (2011) The influence of MHC and Immunoglobulins A and E on host resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *Journal of Parasitology Research*. Article ID 101848, 11 pages.

Lee D.L. y Martin J. (1976) Changes in *Nematodirus battus* associated with the development of immunity to this nematode in lambs. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships* (H. van den Bossche, ed.), pp. 311-318. Amsterdam: Elsevier North Holland.

Lee D.L. (2002) Cuticle, Moulting and Exsheathment. En: *The biology of nematodes*. Edited by Donald L. Lee. Taylor & Francis Inc., New York. ISBN: 0-203-26116-X

Leffler H., Carlsson S., Hedlund M., Qian Y., Poirier F. (2004) Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* 19, 433-440.

Lettini S.E. y Sukhdeo M.V.K. (2006) Anhydrobiosis increases survival of Trichostrongyle nematodes. *Journal of Parasitology* 92, 1002-1009.

Levine N.D. (1978) *Tratado de Parasitología Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. ISBN 84-200-0518-5.

Li Y., Miller J.E., Franke D.E. (2001) Epidemiological observations and heterosis analysis of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk, Gulf Coast Native and crossbred lambs. *Veterinary Parasitology* 98, 273-283.

Liébano-Hernández E., González-Olvera M., Vázquez-Peláez C., Mendoza-de-Gives P., Ramírez-Vargas G., Peralta-Lailson M., Reyes-García M.E., Osorio J., Sánchez-Pineda H., López-Arellano M.E. (2015) Benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in indigenous Chiapas and Pelibuey sheep breeds from Chiapas, México. *Journal of Helminthology* 89, 80-85.

Bibliografía

Lin Y.S., Zhou, H., Forrest R.H.J., Frampton C.M., Hickford J.G.H. (2009) Association between variation in faecal egg count for mixed field-challenge of nematode parasites and *IGHA* gene polymorphism. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 389-394.

López-Gómez, A. y López-Gómez, J. (1959) El Clima de Canarias según la clasificación de Köppen. *Estudios Geográficos* 75, 167-188.

Love S.C., Johns W.J., Coverdale O.R. (1992) Anthelmintic resistance in sheep nematodes in New England region of New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 69, 196-197.

Lyndal-Murphy M., Ehrlich W.K., Mayer D.G. (2014) Anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in inland southern Queensland. *Australian Veterinary Journal* 92, 415-420.

Macaldowie C.N., Huntley J.F., Mackellar A., McInnes C., Haig D.M. (1997) The effects of recombinant ovine interleukin-3 and recombinant ovine stem cell factor on the growth and mediator expression of caprine and ovine bone marrow-derived mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 60, 97- 110.

Macchioni F., Cecchi F., Ciampolini R., Biagetti M., Ciani E., Filippini G., Papa P., Sebastiani C., Ciani D. (2007) The genetic resistance to gastrointestinal strongylids in Appenninica sheep: preliminary results. *Parassitologia* 49, 65-69.

Mackay C.R., Beya M.F., Matzinger P. (1989) Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *European Journal of Immunology* 19, 1477-83.

MAFF (1989) Ministry of Agriculture Fisheries and Food. *Helminthology*. London: Her Majesty's Stationery Office. Reino Unido, 1-68.

MAGRAMA 1. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ganadería. Programa de conservación de la raza ovina Canaria. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa_de_Conseleccion_para_la_Oveja_Canaria_1_tcm7-298679.pdf [Consulta: 06-08-2015]

MAGRAMA 2. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ganadería. Programa de conservación de la raza ovina Canaria de Pelo. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/PROGRAMA_DE_SELECCION_y_mejora_tcm7-298737.pdf [Consulta: 06-08-2015]

Bibliografía

MAGRAMA 3. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ganado Ovino. <http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/ganado-ovino.aspx> [Consulta: 07-08-2015].

MAGRAMA 4. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Análisis de la evolución del sector ovino español. Impacto de los regímenes de ayudas y estrategias para impulsar 2006-2012. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/An%C3%A1lisis_de_la_evoluci%C3%B3n_del_sector_ovino_espa%C3%B1ol_tcm7-328355.pdf [Consulta: 07-08-2015].

MAGRAMA 5. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ganadería. Programa de conservación de la raza ovina Palmera. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa_Conseervacion_oveja_Palmera_1__tcm7-300282.pdf [Consulta: 10-08-2015].

MAGRAMA 6. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Catálogo Oficial de Razas. Raza ovina Canaria. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/ovino/canaria/default.aspx> [Consulta: 10-08-2015].

MAGRAMA 7. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Catálogo Oficial de Razas. Raza ovina Canaria de Pelo. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/ovino/canaria-pelo/default.aspx> [Consulta: 10-08-2015].

MAGRAMA (2013) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Caracterización del sector ovino y caprino en España 2013. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/CARACTERIZACI%C3%93N_DEL_SECTOR_OVINO_Y_CAPRINO_EN_ESPA%C3%91A_2013__tcm7-271704.pdf [Consulta: 07-08-2015].

MAGRAMA (2014a) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Encuestas ganaderas. Resultados e Informes de ganadería 2014. Ovinos. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas->

Bibliografía

agrarias/resultados_definitivos_nov14_ovino-caprino_parawebmagrama2_tcm7-387439.pdf

[Consulta: 06-08-2015]

MAGRAMA (2014b) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe de Consumo y Alimentación en España 2014. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014_tcm7-382148.pdf [Consulta: 06-08-2015]

MAGRAMA (2014c) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Información del sector ovino y caprino. Indicadores económicos. El sector de la carne de ovino y caprino en cifras. Principales indicadores económicos 2014. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/elsectordelacarnedeovinoycaprinoencifras2014_versionparapublicar_tcm7-270866.pdf [Consulta: 28-09-2015].

Martínez- Valladares M. (2006) Estudios sobre la infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovinos de raza churra: criterios y métodos para la identificación de animales resistentes. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. León, España.

Martínez-Valladares M., Vara-del Río M. P., Cruz-Rojo M. A., Rojo-Vázquez F. A. (2005) Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunology* 27, 213–218.

Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., Cordero-Pérez C., Famularo M.R., Fernández-Pato N., Castañón-Ordóñez L., Rojo-Vázquez F.A. (2013a) The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by *in vivo* and *in vitro* techniques. *Veterinary Parasitology* 191, 177-181.

Martínez-Valladares M., Robles-Pérez D., Martínez-Pérez J.M., Cordero-Pérez C., Famularo M.R., Fernández-Pato N., González-Lanza C., Castañón-Ordóñez L., Rojo-Vázquez F.A. (2013b) Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepática* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites and Vectors* 6, 282-291.

Bibliografía

- McClure S.J., Emery D.L., Wagland B.M., Jones W.O. (1992)** A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *International Journal for Parasitology* 22, 227-234.
- McClure S.J., Davey R.J., Lloyd J.B., Emery D.L. (1995)** Depletion of IFN- γ CD8⁺ or TCR $\gamma\delta$ cells *in vivo* during primary infection with an enteric parasite (*Trichostrongylus colubriformis*) enhances protective immunity. *Immunology and Cell Biology* 73, 552–555.
- McClure S.J., Davey R.L., Emery D.L., Colditz I.G., Lloyd J.B. (1996)** *In vivo* depletion of T-cells and cytokines during primary exposure of sheep to parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 83-90.
- McGillivray D.J., Yong W.K., Adler B., Riffkin G.G. (1992)** A purified stage-specific 31kDa antigen as a potential protective antigen against *Ostertagia circumcincta* infection in lambs. *Vaccine* 10, 607-613.
- McManus C., do Prado Paim T., Barros de Melo C., Brasil B.S.A.F., Paiva S.R (2014)** Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. *Parasite* 21, 56.
- McRae K.M., McEwan C., Dodds K.G., Gemmell N.J. (2014)** Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics*, 15, 637.
- Meana A. y Rojo F.A. (1999)** Parasitosis de los rumiantes. Trichostrongilidosis y otras nematodosis. En: Cordero del Campillo M. *et al.* Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. ISBN: 84-486-0236-6.
- Meeusen E.N.T. y Balic A. (2000)** Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? *Parasitology Today* 16, 95-101.
- Meeusen E.N.T. y Piedrafita D. (2003)** Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *International Journal for Parasitology* 33, 1285–1290.
- Meeusen E.N.T., Balic A., Bowles V. (2005)** Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108, 121-125.
- Miller H.R., (1984)** The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 6, 167-259.

Bibliografía

Miller H.R.P. (1987) Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94, s77-s100.

Miller H.R., Jackson F., Newlands G., Appleyard W.T. (1983) Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 35, 357-363.

Miller J.E., Bahirathan M., Lemarie S.L., Hembry F.G., Kearny M.T., Barras 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. *Veterinary Parasitology* 74, 55-74.

Modlin R.L. y Sieling P.A. (2005) Now presenting: gammadelta T cells. *Science* 309, 252-253.

Molina J.M., Gutiérrez A.C., Rodríguez-Ponce E., Viera J.A., Hernández S. (1997) Abomasal nematodes in goats from the subtropical island of Grand Canary (Spain). *Veterinary Research* 28, 259-270.

Morton R.E., Yong W.K., Riffkin G.G., Bozas S.E., Spithill T.W., Adler B., Parsons J.C. (1995) Inability to reproduce protection against *Teladorsagia circumcincta* in sheep with a purified stage-specific 31kDa antigen complex. *Vaccine* 13, 1482.

Motegi Y., Kita H., Kato M., Morikawa A. (2000) Role of Secretory IgA, Secretory Component, and Eosinophils in Mucosal Inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology* 122, 25-27.

Mugambi J.M., Wanyangu S.W., Bain R.K. (1996) Response of Dorper and Red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Research in Veterinary Science* 61, 218-221.

Mugambi J.M., Bain R.K., Wanyangu S.W., Ihiga M.A., Duncan J.L., Murray M., Stear M.J. (1997) Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology* 69, 265-273.

Mugambi J.M., Audho J.O., Njomo S., Baker R.L. (2005) Evaluation of phenotypic performance of Red Maasai and Dorper double backcross resource population: indoor trickle challenge with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 127, 263-275.

Mukherjee M., Sehmi R., Nair P. (2014) Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. *World Allergy Organization Journal* 7, 32.

Bibliografía

Muñoz-Guzman 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. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 363-371.

Naciones Unidas (2015) Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2015. World Population Prospects: The 2015 revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.24. http://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf [Consulta: 04-08-2015].

Naessens J., Scheerlinck J.P., De Buysscher E.V., Kennedy D., Sileghem M. (1998) Effective *in vivo* depletion of T cell subpopulations and loss of memory cells in cattle using monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64, 219-234.

Newton S.E. y Munn E.A. (1999) The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today* 15, 116–122.

Newton S.E. y Meeusen E.N.T. (2003) Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunology* 25, 283-296.

Ng'ang'a C.J., Maingi N., Munyua W.K., Kanyari P.W.N. (2004) Epidemiology of gastrointestinal helminths infections in Dorper sheep in a semi-arid area of Kenya. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 71, 219-226.

Nieuwhof G.J. y Bishop S.C. (2005) Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science* 81, 23-29.

Nisbet A.J., McNeilly T.N., Wildblood L.A., Morrison A.A., Bartley D.J., Bartley Y., Longhi C., McKendrick I.J., Palarea-Albaladejo J., Matthews J.B. (2013) Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine* 31, 4017- 4023.

Nisbet A.J., Meeusen E.N.T., González J.F., Piedrafita D. (2015) Immunobiology of *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Advances in Parasitology* (enviado).

O'Connor L.J., Walkden-Brown S.W., Kahn L.P. (2006) Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 142, 1-15.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Alimentar mejor al planeta luchando contra las enfermedades. <http://www.oie.int/doc/ged/D5739.PDF> o <http://www.oie.int/es/para-los->

Bibliografía

periodistas/editoriales/detalle/article/feeding-the-world-better-by-controlling-animal-diseases/ [Consulta: 11-08-2015].

Ovington K.S. y Behm C.A. (1997) The enigmatic eosinophil: Investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 2, 93-104.

Ovington K.S., Mckie K., Matthaei K.I., Young I.G., Behm C.A. (1998) Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology* 95, 488-493.

Paul S., Mandal M., Boral R. (2010) Integrated parasite management for livestock- alternative control methods. *Veterinary World* 3, 431-435.

Pedreira J., Paz-Silva A., Sánchez-Andrade R., Suárez J.L., Arias M., Lomba C., Díaz P., López C., Díez Baños P., Morrondo P. (2006) Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 75, 56-62.

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

Piedrafita D., Raadsma H., González J., Meeusen E.N.T. (2010) Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? *Trends in Parasitology* 26, 12, 568-573.

Piedrafita D., de Veer M.J., Sherrard J., Kraska T., Elhay M., Meeusen E.N.T. (2012) Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. *Vaccine* 30, 7199-7204.

Piedrafita D., Preston S., Kemp J., de Veer M., Sherrard J., Kraska T., Elhay M., Meeusen E.N.T. (2013) The Effect of Different Adjuvants on Immune Parameters and Protection following Vaccination of Sheep with a Larval-Specific Antigen of the Gastrointestinal Nematode, *Haemonchus contortus*. *PLoS One* 21 8(10)e78357.

Preston S.J.M. (2013) Investigation of markers associated with resistance to gastrointestinal nematode parasite in sheep. PhD Thesis. Monash University, Melbourne, Australia.

Bibliografía

Preston S.J.M., Sandeman M., González J., Piedrafita D. (2014) Current status for gastrointestinal nematode diagnosis in small ruminants: Where are we and where are we going? *Journal of Immunology Research*. Article ID 210350, 12 pages.

Preston S.J.M., Beddoe T., Walkden-Brown S., Meeusen E.N.T., Piedrafita D. (2015) *Galectin-11: A novel host mediator targeting specific stages of the gastrointestinal nematode parasite, Haemonchus contortus. International Journal for Parasitology (in press)* doi:10.1016/j.ijpara.2015.06.003.

Procter B.G. y Gibbs H.C. (1968) Studies on the Spring Rise Phenomenon in Ovine Helminthiasis I. Spring Rise in Stabled Sheep. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 32, 359-365.

Ractliffe L.H. y Lejambre L.F. (1971) Increase of rate of egg production with growth in some intestinal nematodes of sheep and horses. *International Journal Parasitology* 1, 153-156.

Radhakrishnan C.V., Bradley B.E., Loggins P.E. (1972) Host responses of worm-free Florida Native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *American Journal of Veterinary Research* 33, 817-823.

Rainbird M.A., MacMillan D., Meeusen E.N.T. (1998) Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunology* 20, 93-103.

Rajput Z.I., Hu S-H, Xiao C-W., Arijo A.G. (2007) Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8, 153-161. ISSN 1862-1783.

Raleigh J.M. y Meeusen E.N.T. (1996) Developmentally regulated expression of a *Haemonchus contortus* surface antigen. *International Journal for Parasitology* 26, 673-675.

Redmond D.L. y Knox D.P. (2004) Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252-4261.

Rhind S.M., Dutia B.M., Howard C.J., Hopkins J. (1996) Discrimination of two subsets of CD1 molecules in the sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52, 265-270.

Robinson N., Piedrafita D., Snibson K., Harrison P., Meeusen E.N. (2010) Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunization and challenge with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* 41:37.

Bibliografía

- Robinson N., Pleasance J., Piedrafita D., Meeusen E.N.T. (2011)** The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 41, 487-493.
- Rodríguez E.F. (2007)** Inmunidad en las mucosas. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.
- Rodríguez-Ponce E., Molina J.M., Hernández S. (1995)** Seroprevalence of goat toxoplasmosis on Grand Canary Island (Spain). *Preventive Veterinary Medicine* 24, 229-234.
- Rothwell T.L.W. (1989)** Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *International Journal for Parasitology* 19, 139-168.
- Rowe A., McMaster K., Emery D., Sangster N. (2008)** *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Veterinary Parasitology* 153, 285-293.
- Sackett D, Holmes P, Sackett H, Abbott K, Sturt C (2006)** Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. Meat & Livestock Australia Limited ABN 39 081 678 364 (MLA).
- Saddiqi H.A., Iqbal Z., Khan M.N., Sarwar M., Muhammad G., Yaseen M., Jabbar A. (2010)** Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 168, 141-145.
- 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*. *Parasitology Research* 109, 1483-1500.
- Saeed M., Iqbal Z., Jabbar A., Masood S., Babar W., Saddiqi H.A., Yaseen M., Sarwar M., Arshad M. (2010)** Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in Beetal goats in an irrigated area (Pakistan). *Research in Veterinary Science* 88, 2, 267-272
- Salinas J. (2007)** Inmunidad frente a agentes eucariotas patógenos. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.
- Sanderson C.J. (1992)** Interleukin-5, Eosinophils, and Disease. *Blood* 79, 3101-3109.

Bibliografía

- Sasaki O., Sugaya H., Ishida K., Yoshimura K. (1993)** Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunology* 15, 349-354.
- Sayers G. y Sweeney T. (2005)** Gastrointestinal nematode infection in sheep-a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Animal Health Research Reviews*. 6, 159-171.
- Schallig H.D.F.H. (2000)** Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120, S63-S72.
- Schallig H.D.F.H. y van Leeuwen M.A.W. (1997)** Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology* 114, 293-299.
- Schallig H.D.F.H., van Leeuwen M.A.W., Hendrikx W.M.L. (1994)** Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 108, 351-357.
- Schallig H.D.F.H., van Leeuwen M.A.W., Cornelissen A.W.C.A. (1997)** Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunology* 19, 447-453.
- Scheuerle M.C., Mahling M., Pfister K. (2009)** Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. *Wien Klin Wochenschr* 121, Suppl. 3: 46-49.
- Schwaiger F.W., Gostomski D., Stear M.J., Duncan J.L., McKellar Q.A., Epplen J.T., Buitkamp J. (1995)** An ovine Major Histocompatibility Complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *International Journal for Parasitology* 25, 815-822.
- Scott I., Pomroy W.E., Kenyon P.R., Smith G., Adlington B., Moss A. (2013)** Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 198, 166-171.
- Seaton D.S., Jackson F., Smith W.D., Angus, K.W. (1989)** Development of immunity to incoming radiolabelled larvae continuously infected with *Ostertagia circumcincta*. *Research in Veterinary Science* 46, 241-246.

Bibliografía

Serrano E. y Úceda A. (2007) Hipersensibilidad. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinadores: Gómez Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. Editorial Pearson Educación SA. Madrid, España. ISBN: 978-84-8322-358-1.

Sher A., Coffman R.L., Hieny S., Scott P., Cheever A.W. (1990) Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 61-65.

Shin E.H., Osada Y., Chai J.Y., Matsumoto N., Takatsu K., Kojima S. (1997) Protective roles of eosinophils in *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *International Archives of Allergy and Immunology* 114, 45-50.

Smith D., Newlands G., Dobson R., Kahn L., Fitzpatrick J., Besier B. (2015) First season performance of Barbervax, a novel vaccine for *Haemonchus contortus*, now commercially available in Australia. In: Proceeding WAAVP, Liverpool, United Kingdom, 16–20 August 2015, p. 227.

Smith S.K. y Smith W.D. (1996) Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. *Research in Veterinary Science* 60, 1–6.

Smith S.K., Pettit D., Newlands G.F., Redmond D.L., Knox D.P., Smith W.D. (1999) Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 21, 187–199.

Smith T.S., Munn E.A., Graham M., Tavernor A.S., Greenwood C.A.(1993) Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 23, 271–280.

Smith W.D. y Zarlenga D.S. (2006) Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 347-359.

Smith W.D., Jackson F., Jackson E., Williams J., Miller H. R. P. (1984) Manifestations of resistance to ovine ostertagiasis associated with immunological responses in the gastric lymph. *Journal of Comparative Pathology* 94, 591–601.

Bibliografía

- Smith W.D., Jackson F., Jackson E., Williams J. (1985)** Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: Comparison of the local immune responses of 4 ½- and 10-month-old lambs. *Journal of Comparative Pathology* 95, 235-245.
- Smith W.D., Smith S.K., Murray J.M. (1994)** Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 16, 231-241.
- Smith W.D., Smith S.K., Pettit D., Newlands G.F., Skuce P.J. (2000)** Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 22, 63–71.
- Smith W.D., Smith S.K., Pettit D. (2001)** Cross protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunology* 23, 203–211.
- Smith W.D., Newlands G.F., Smith S.K., Pettit D., Skuce P.J. (2003)** Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunology* 25, 313-323.
- Soulsby E.J.L. (1987)** Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7ª Edición. *McGraw Hill Interamericana*. México. ISBN: 968-25-7371-5.
- Stear M.J. y Wakelin D. (1998)** Genetic resistance to parasitic infection. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) 17, 143-153.
- Stear M.J. y Bishop S.C. (1999)** The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* 29, 777-780.
- Stear M.J., Bishop S.C., Doligalska M., Duncan J.L., Holmes P.H., Irvine J., McCririe L., McKellar Q.A., Sinski E., Murray M. (1995)** Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunology* 17, 643-652.
- Stear M.J., Park M., Bishop S.C. (1996)** The key components of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Parasitology Today* 12, 438-441.
- Stear M.J., Bairden K., Duncan J.L., Holmes P.H., McKellar Q.A., Park M., Strain S., Murray M., Bishop S.C., Gettinby G. (1997)** How hosts control worms. *Nature* 389, 27.

Bibliografía

Stear M. J., Strain S., Bishop S.C. (1999) Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *International Journal for Parasitology* 29, 51-56.

Stear M.J., Bairden K., Innocent G.T., Mitchell S., Strain S., Bishop S.C. (2004) The relationship between IgA activity against 4th-stage larvae and density-dependent effects on the number of 4th-stage larvae of *Teladorsagia circumcincta* in naturally infected sheep. *Parasitology* 129, 363-369.

Stear M.J., Doligalska M., Donskow-Schmelter K. (2007a) Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134, 139-151.

Stear M.J., Belch A., Donskow-Schmelter K., Fitton L.A., Innocent G.T., Ishikane C., Mateus A., Murphy L., Rennie K., Smith A., Sayers G. (2007b) Detection of genes with moderate effects on disease resistance using ovine mhc and resistance to nematodes as an example. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120, 3-9.

Stevenson L.M. y Jones D.G. (1997) Observations on the biological reactivity of recombinant ovine interleukin-5 (rovIL-5). *Biochemical Society Transactions* 25, 289s.

Strain S.A.J. y Stear M.J. (2001) The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 23, 523-531.

Strain S.A.J., Bishop S.C., Henderson N.G., Kerr A., Mckellar Q.A., Mitchell S., Stear M.J. (2002) The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 124, 545-552.

Taylor M.A., Learmount J., Lunn E., Morgan C., Craig B.H. (2009) Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. *Small Ruminant Research* 86, 67-70.

Terefe G., Yacob H.T., Grisez C., Prevot F., Dumas E., Bergeaud J.P., Hoste H., Jacquet P. (2005) *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* larvae. *Veterinary Parasitology* 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., Dorchie P., Jacquet P. (2007a) Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunology* 29, 415-424.

Bibliografía

Terefe G., Grisez C., Prevot F., Bergeaud J.P., Dorchie P., Brunel J.C., François D., Fourquaux I., Jacquet P. (2007b) *In vitro* pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Veterinary Research* 38, 647-654.

Tizard, I.R. (2002) *Inmunología Veterinaria*. 6ª edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. ISBN 970-10-3562-3.

Tizard I.R. (2009) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. Editado por Elsevier España SL. Barcelona, España. ISBN: 978-84-8086-431-2.

Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C., Cámara-Sarmiento R., Aguilar-Caballero A.J. (2012) Métodos alternativos para el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes: Estado del arte. *Avances de Investigación en producción animal en Iberoamérica*. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. ISBN: 978-607-8191-42-0.

Urban J.F., Katona I.M., Paul W.E., Finkelman F.D. (1991) Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5513-5517.

van den Brom R., Moll L., Kappert C., Vellema P. (2015) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology* 209, 278-280.

van Wyk J.A. (2001) Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68, 55-67.

van Wyk J.A. y Bath G.F. (2002) The FAMACHA® system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33, 509-529.

van Wyk J.A. y Mayhew E. (2013) Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 80, Art. 539, 14 pages.

van Wyk J.A., Stenson M.O., Van der Merwe J.S., Vorster R.J., Viljoen P.G. (1999) Anthelmintic resistance in South Africa: Surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 66, 273-284.

Bibliografia

- van Wyk J.A., Cabaret J., Michael L.M. (2004)** Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology* 119, 277-306. 2004
- 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? *Veterinary Parasitology* 139, 336-346.
- Vanimisetti H.B., Andrew S.L., Zajac A.M., Notter D.R. (2004a)** Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Science* 82, 1602-1611.
- Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004b)** Performance of hair sheep composite breeds: Resistance of lambs to *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Science* 82, 595-604.
- Veglia F. (1915)** The Anatomy and Life History of *Haemonchus contortus* (Rud.), 3rd and 4th Reports of the Director of Veterinary Research. South Africa. pp. 347-500.
- Vervelde L., Kooyman F.N., Van Leeuwen M.A., Schallig H.D., MacKellar A., Huntley J.F., Cornelissen A.W. (2001)** Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. *Parasite Immunology* 23, 419-426.
- Vervelde L., van Leeuwen M.A.W., Kruidenier M., Kooyman F.N., Van Die I., Cornelissen A.W. (2002)** Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 24, 189-201.
- Vieira, L. S., Berne, M. E., Cavalcante, A. C. y Costa, C. A. (1992)** *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. *Veterinary Parasitology* 45, 111-116.
- Vlassoff A., Leathwick D. M., Heath A. C. G. (2001)** The epidemiology of nematode infections of sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 49, 213-221.
- Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Chen, L.-Y., Gray, R. A. J., Skipp, R. A. (2002)** Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* in New Zealand. *Veterinary Parasitology* 104, 119-129.
- Waghorn T.S., Reynecke D.P., Oliver A.M.B., Miller C.M., Vlassoff A., Koolaard J.P., Leathwick D.M. (2011)** Dynamics of the free-living stages of sheep intestinal parasites on pasture in the

Bibliografía

North Island of New Zealand. 1. Patterns of seasonal development. *New Zealand Veterinary Journal* 59, 279-286.

Walker, A.R., Benavides E., Betancourt, A. (1988) Uso del concepto del manejo integrado de plagas para el control de garrapatas. *Carta Ganadera* 25: 52-57.

Waller P.J. (1997a) Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412.

Waller P.J., (1997b) Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Veterinary Parasitology* 71, 195-207.

Waller P.J. (1999) International approaches to concept of integrated control of nematodes parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 29, 155-164.

Waller P.J. y Chandrawathani P. (2005) *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine* 22, 131-137.

Waller P.J., Schwan O., Ljungström B.L., Rydzik A., Yeates G.W. (2004) Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Veterinary Parasitology* 126, 299-315.

Wedrychowicz H., Bairden K., Tait A., Holmes P.H. (1992) Immune responses of sheep to surface antigens of infective larvae of *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunology* 14, 249-266.

Wijngaard P.L., Metzelaar M.J., MacHugh N.D., Morrison W.I., Clevers H.C. (1992) Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma delta T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 149, 3273-3277.

Williams B. y Warren J. (2004) Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103, 237-243.

Winter M.D., Wright C., Lee D.L. (1997) The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitology* 114, 189-193.

Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocumbe O., Taylor S.M., Vercruyse J. (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating

Bibliografía

the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine) *Veterinary Parasitology* 58, 181-213.

Yacob H.T., Mistre Ch., Adem A.H., Basu A.K. (2009) Parasitological and clinical responses of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* with and without ivermectin treatment. *Veterinary Parasitology* 166, 119-123.

Yadav C.L., Uppal R.P., Kalra S. (1993) An outbreak of haemonchosis associated with anthelmintic resistance in sheep. *International Journal for Parasitology* 23, 411-413.

Yang J., Torio A., Donoff R.B., Gallagher G.T., Egan R., Weller P.F., Wong D.T.W. (1997) Depletion of eosinophil infiltration by Anti-IL-5 monoclonal antibody (TRFK-5) accelerates open skin wound epithelial closure. *American Journal of Pathology* 151, 813-819.

Yang Y., Ma Y., Chen X., Guo X., Yan B., Du A. (2015) Screening and analysis of *Hc-ubq* and *Hc-gst* related to desiccation survival of infective *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology* 210, 179-185.

Yoshida T., Ikuta K., Sugaya H., Maki K., Takagi M., Kanazawa H., Sunaga S., Kinashi T., Yoshimura K., Miyazaki J., Takaki S., Takatsu K. (1996) Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R α -deficient mice. *Immunity* 4, 483-494.

Young A.R. y Meeusen E.N.T. (2004) Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconjugate Journal* 19, 601-606.

Young A.R., Barcham G.J., Kemp J.M., Dunphy J.L., Nash A., Meeusen E.N.T. (2009) Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconjugate Journal* 26, 423-432.

Zajac A.M., Krakowka S., Herd R.P., McClure K.E. (1990) Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology* 36, 221-235.

Zhou H., Hickford J.G.H., Fang Q. (2005) Polymorphism of the IGHA gene in sheep. *Immunogenetics* 57, 453-457.

Agradecimientos

11. AGRADECIMIENTOS

No sé si te acordarás de ese momento en el que decidiste que ibas a ser de mayor, en mi caso yo era tan pequeñita que montaba en un triciclo, en el que una cuerda amarrada al volante hacía de riendas de “mi caballo”; desde tan pequeñita decidí ser “médico de animales”. Durante todos los años de mi formación recibí el apoyo de mi familia, de mi padre y de mi madre que con su esfuerzo me ayudaron a que ese sueño se hiciera realidad y a los que estoy enormemente agradecida, muchísimas gracias.

Son muchas las personas que de un modo u otro me han ayudado o apoyado durante el desarrollo de mi tesis doctoral así que espero no olvidarme de nadie.

Durante estos años no solo crecí profesionalmente, sino también crecí en lo personal; aquí tengo que agradecerle a mi director Dr. Jorge Francisco González Pérez el tiempo que me ha dedicado, los consejos y palabras de apoyo cuando la situación se torcía o el reconocimiento cuando las cosas salían bien. Gracias por ayudarme y escucharme siempre que te necesité, gracias por confiar en mí.

A mis codirectores, el Dr. Jose Manuel Molina Caballero y el Dr. Francisco Rodríguez Guisado quiero agradecerles el conocimiento que me aportaron y la ayuda prestada cuando requerí de su experiencia, gracias.

Agradecer a las “chicas del laboratorio”, que si bien parece un título de película, realmente podría serlo con todas las vivencias que tuvimos entre esas cuatro paredes y fuera de ellas, muchas gracias por todo Adassa, Arantzazu, Davinia, Jessica, Leire, Lorena, Soraya y Yaiza. Y como era de esperar, no puede haber chicas, sin “chicos del laboratorio”, Aridany, Alejandro, Álvaro, Fernando, Sergio y Yeray, quienes además de darme apoyo “logístico” cuando hacía falta, siempre tenían un chiste para amenizar la mañana, gracias por todo. También tengo que agradecer a Sara, Carlos y Roberto por la ayuda prestada.

A Lita, María, Marisol y Tata que con su cariño y preocupación hacían que en los pasillos me sintiera como en casa. Bernardo, Juan, Luis, Santiago, Serafín y Ventura que siempre me ayudaron en todo lo que estuvo en sus manos cuando los necesité con los animales. Carmelo, Carmen, Loli y Luisa que con solo una llamada me daban soluciones a cualquier cosa que necesitara de las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. A Pedro Castro, Esther y Estrella por prepararme disoluciones, realizarme los pedidos y un sinfín de cosas con las que me ayudaron, gracias.

Agradecimientos

A la Dra. Magnolia quiero darle las gracias por su ayuda y consejos con las electroinmunotransferencias; por esas tardes cortando tiras de 0,6 cm y controlando la eterna electroforesis. Del mismo modo quiero agradecer el apoyo e interés de la Dra. Eligia Rodríguez Ponce, Dra. Otilia Ferrer Quintana, Dra. Mari Carmen Muñoz Ojeda y del Dr. Antonio Ruíz Reyes; al Dr. Oscar González Pérez y a la Agencia Estatal de Meteorología por los datos meteorológicos; y a la empresa Brenntag Biosector (Denmark) por la suministración gratuita del adyuvante Quil A.

También quiero dar las gracias a la Dra. Els Meeusen y al Dr. David Piedrafita por cedernos los anticuerpos monoclonales utilizados en esta tesis doctoral y por su asesoramiento en el diseño y análisis de los experimentos. Al Dr. Michael Stear por sus aportaciones, en especial en los análisis estadísticos, y a los doctores David Bartley y David Knox por las larvas de *Haemonchus contortus* utilizadas en este trabajo.

Agradecer al veterinario Alejandro Benito Rodríguez Rivero, por proporcionarnos los animales para las distintas experiencias y cuidar que siempre estuvieran sanos; pero sobre todo gracias por esas charlas delante de los corrales con las que siempre aprendía algo nuevo.

Irene, muchas gracias por tu apoyo y amistad dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme cada vez que te necesité, aunque eso supusiera horas extras para ti en algunas ocasiones.

Gracias Jose, por tu paciencia, por intentar entender cuando te explicaba todo lo que hacía cada día y por mantener la calma por los dos al final de este camino, gracias.

Por último, y no por ello menos importante, agradecer a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) del Gobierno de Canarias y al Fondo Social Europeo (F.S.E) por concederme la ayuda de personal investigador para la realización de tesis doctoral en la convocatoria de 2010, sin la cual hubiese sido complicado realizarla. Al Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2009-09985) y a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (F.E.D.E.R.) (PI 2007/036) por la financiación de los proyectos de investigación.

