

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



TESIS DOCTORAL

**RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL
EN LA OSTERTAGIOSIS EXPERIMENTAL CAPRINA**

JORGE FRANCISCO GONZÁLEZ PÉREZ

Las Palmas de Gran Canaria, 2002

52/2001-02

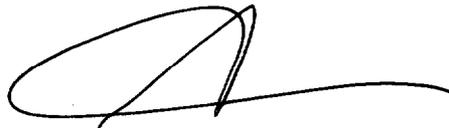
**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE CON LA PUNTA por unanimidad.

Las Palmas de Gran Canaria, a 12 de marzo de 2002.

El/a Presidente/a: Dr.D. Antonio J Fernández Rodríguez,



El/a Secretario/a: Dra.Dña. Eligia Rodríguez Ponce,



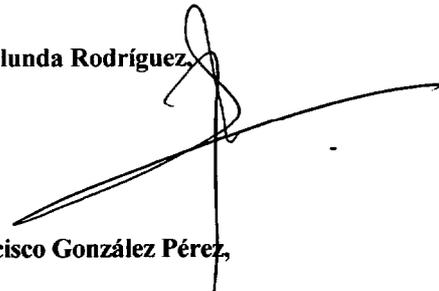
El/a Vocal: Dr.D. Francisco Rojo Vázquez,



El/a Vocal: Dr.D. Ignacio Navarrete López-Cózar,



El/a Vocal: Dr.D. José María Alunda Rodríguez,



El Doctorando: D. Jorge Francisco González Pérez,



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
N.º Documento 258244
N.º Copia 683828



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos

**“RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN
LA OSTERTAGIOSIS EXPERIMENTAL CAPRINA”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Jorge Francisco González Pérez

Dirigida por:
Dr. José Manuel Molina Caballero y Dr. Santiago Hernández Rodríguez

Dr. José Manuel Molina Caballero

Dr. Santiago Hernández Rodríguez

D. Jorge Francisco González Pérez

Arucas, enero de 2002

D. JOSÉ MANUEL MOLINA CABALLERO, Profesor Titular del Área de Parasitología, del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y D. SANTIAGO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Catedrático de Parasitología, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que D. Jorge Francisco González Pérez, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado:

“RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN LA OSTERTAGIOSIS EXPERIMENTAL CAPRINA”

el cual consideramos que cumple las normativas vigentes para optar al Grado de Doctor en Veterinaria

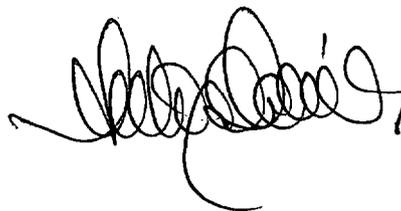
Aruca, a 8 de Enero de dos mil dos

El Director



Dr. José Manuel Molina Caballero

El Co-director



Dr. Santiago Hernández Rodríguez

A mis padres

INDICE

ÍNDICE

	Páginas
1.INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Introducción	5
2.2 Etiología	6
2.2.1 Superfamilia Trichostrongyloidea Cram, 1927	6
2.2.2 Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912	7
2.2.3 Género <i>Ostertagia</i> Ransom, 1907	7
2.2.4 <i>Teladorsagia circumcincta</i> (Stadelmann, 1894)	8
2.3 Biología de los nematodos gastrointestinales	9
2.4 Epidemiología de la ostertagiosis	9
2.5 Patogenia y lesiones	11
2.6 Signos clínicos	14
2.7 Diagnóstico	16
2.8 Tratamiento	17
2.8.1 Antihelmínticos	17
2.8.1.1 Bencimidazoles y probencimidazoles	17
2.8.1.2 Imidazotiazoles	18
2.8.1.3 Lactonas macrocíclicas	18
2.8.1.4 Órgano fosforados	18
2.8.2 Resistencia a los antihelmínticos	18
2.9 Control	19
2.9.1 Quimioprofilaxis	20
2.9.2 Medidas de manejo	21
2.9.2.1 Granjas donde habitualmente sólo se pastorea	21
2.9.2.2 Granjas con pastoreo alternativo	23
2.9.3 Conclusión	24
2.10 Inmunobiología de las trichostrongyloidosis en los rumiantes	25
2.10.1 Introducción	25
2.10.2 Factores que modulan la respuesta inmune	26
2.10.2.1 Inmunidad calostrual	26
2.10.2.2 Edad	27
2.10.2.3 Especies y razas de hospedadores.	28
Inmunidad innata	
2.10.2.4 Estado hormonal	29
2.10.2.5 Estado nutricional	29
2.10.2.6 Efecto de la quimioprofilaxis en la respuesta inmunitaria	30
2.10.2.7 Inmunogenicidad de diferentes aislados de <i>T. circumcincta</i>	30

2.10.2.8 Nichos tisulares de larvas y adultos	32
2.10.3 Modelo de respuesta inmunitaria a nematodos gastrointestinales en roedores. Su extrapolación a los rumiantes	34
2.10.4 Respuesta efectora del tracto gastrointestinal a las tricostrongilidosis digestivas de los rumiantes. Manifestaciones de la resistencia	35
2.10.4.1 manifestación de resistencia frente a parásitos adultos	37
2.10.4.2 Manifestación de resistencia a larvas de nematodos parásitos del tracto gastrointestinal	43
2.10.4.3 Respuesta efectora del abomaso. Particularidades	48
2.10.5 Mecanismos de resistencia a los tricostrongílicos	49
2.10.5.1 Teoría inmunitaria común de la mucosa	51
2.10.5.2 Células efectoras	53
2.10.5.3 Mastocitos y basófilos	54
2.10.5.4 Efecto directo del mucus y de los mediadores de la inflamación sobre los nematodos	58
2.10.5.5 Eosinofilia y resistencia	60
2.10.5.6 Células globulares	67
2.10.5.7 Hiperplasia de mastocitos y generación de leucocitos globulares en la mucosa	69
2.10.5.8 Respuesta linfocitaria durante la tricostrongilidosis	73
2.10.5.9 Respuestas de las citocinas durante la tricostrongilidosis	77
2.10.5.10 Respuesta de los anticuerpos durante la tricostrongilidosis	79
2.10.6 Mecanismos parasitarios de evasión de la respuesta inmune	84
2.10.7 Valoración del grado de inmunidad	88
2.10.7.1 Ganancia de peso	89
2.10.7.2 Pepsinógeno plasmático	89
2.10.7.3 Carga abomasal de vermes	90
2.10.7.4 Recuentos fecales de huevos	90
2.10.7.5 Número de mastocitos en la mucosa	90
2.10.7.6 Eosinofilia como indicador de nematodosis gastrointestinal	91
2.10.8 características de los antígenos parasitarios	93
2.10.9 inmunoprofilaxis	94
2.10.9.1 Vacunación	94
2.10.9.2 Pastoreo mixto como método de control de las tricostrongilidosis	98
2.10.9.3 Reconocimiento del mapa del loci del rasgo económico como método de control	99
3. MATERIAL Y MÉTODOS	101
3.1 Animales	101

3.2 Obtención de L3 de <i>Teladorsagia circumcincta</i>	101
3.3 Diseño experimental	103
3.3.1 Recogida de muestras	104
3.4 Análisis coprológicos	105
3.4.1 Métodos cualitativos	105
3.4.2 Métodos cuantitativos	105
3.5 Análisis hematológicos	106
3.6 Análisis de la respuesta linfoproliferativa	107
3.6.1 Fundamento del test de transformación linfoblástica	107
3.6.2 Materiales	107
3.6.2.1 Reactivos	107
3.6.2.2 Equipo	108
3.6.3 Protocolo de aislamiento de leucocitos mononucleares	108
3.6.4 Protocolo de cultivo	109
3.6.4.1 Preparación de medios, soluciones y suero	109
3.6.4.2 Protocolo de cultivo	109
3.6.5 Lectura y expresión de los resultados	113
3.6.5.1 Protocolo de uso del CellTiter 96® AQUEOUS Non-radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)	114
3.6.5.2 Transformación de los resultados en variables diferencias	115
3.7 Análisis serológicos (IgG). Método ELISA	115
3.7.1 ELISA-IgG anti- <i>Teladorsagia circumcincta</i>	115
3.7.1.1 Material	115
3.7.1.2 Método	118
3.7.1.3 Transformación de los valores de absorbancias en Unidades Relativas (UR)	119
3.7.1.4 Procesamiento de datos. Análisis estadístico	121
3.7.2 ELISA-IgG anti <i>Teladorsagia circumcincta</i> con tratamiento previo del antígeno con periodato sódico	121
3.7.2.1 Tratamiento del antígeno somático de <i>T. circumcincta</i> con periodato sódico	121
3.9 Necropsias	122
3.9.1 Toma de muestras	123
3.9.2 Lavados gástricos	123
3.9.3 Digestión de mucosa gástrica y recogida de vermes inmaduros del tracto alimentario	123
4. RESULTADOS	125
4.1 Recuentos de vermes adultos recogidos en el abomaso	125
4.1 Recuentos de vermes adultos durante la primera fase de la experiencia	125
4.1.2 Vermes recogidos en el abomaso durante la segunda fase de la experiencia	125
4.2 Test de transformación linfoblástica	126
4.1.1 Test de transformación linfoblástica durante la primera fase de la experiencia	126
4.1.1.1 Concanavalina A	128

4.1.1.2	Fitohemaglutinina	129
4.1.1.3	Pokeweed mitogen	130
4.1.1.4	Cultivo de linfocitos con distintas concentraciones de antígeno somático	131
4.1.2	Test de transformación linfoblástica durante la segunda fase del experimento	132
4.1.2.1	Concanavalina A	133
4.1.2.2	Fitohemaglutinina	136
4.1.2.3	Pokeweed mitogen	137
4.1.2.4	Cultivo de linfocitos a distintas concentraciones de antígenos	138
4.2	ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay)	140
4.2.1	ELISA-IgG anti-antígeno somático de <i>T. circumcincta</i>	140
4.2.2	Respuesta serológica específica (IgG) durante la primera fase del experimento	142
4.2.2.1	Resultados utilizando antígeno somático de adultos de <i>T. circumcincta</i>	142
4.2.2.2	Resultados utilizando antígeno somático de adultos de <i>T. circumcincta</i> tratado con periodato sódico (NaIO ₄)	142
4.2.3	Respuesta serológica específica (IgG) durante la segunda fase de la experiencia	144
4.2.3.1	Resultados utilizando antígeno somático de adultos de <i>T. circumcincta</i>	144
4.2.3.2	Resultados utilizando antígeno somático de adultos de <i>T. circumcincta</i> tratado previamente con periodato sódico	145
4.3	Recuentos fecales de huevos	147
4.3.1	Recuentos fecales de huevos durante la primera fase de la experiencia	147
4.3.2	Recuentos fecales de huevos durante la segunda fase de la experiencia	148
4.3.3	Repetibilidad y modelo linear mixto de los recuentos fecales de huevos	149
4.4	Parámetros hemáticos, proteínas séricas totales y fibrinógeno	151
4.4.1	Valor hematocrito	151
4.4.2	Hemoglobina	152
4.4.3	Leucocitos totales	154
4.4.3.1	Recuento diferencial de leucocitos	156
4.4.4	Proteínas plasmáticas totales	168
4.4.5	Fibrinógeno	170
4.5	Recuentos de larvas inmaduras tras la digestión de la mucosa gástrica	171
4.6	Histología de los ganglios linfáticos abomasales	172
5. DISCUSIÓN		175
5.1	Introducción	175
5.2	Nematodos adultos recogidos en el abomaso	178
5.3	Test de transformación linfoblástica	180
5.3.1	Test de transformación linfoblástica durante la primera fase de la experiencia	180
5.3.1.1	Cultivos de linfocitos con mitógenos	180

	inespecíficos	
	5.3.1.2 Cultivos de linfocitos con distintas concentraciones de Ag somático de adultos de <i>T. circumcineta</i>	182
5.3.2	Test de transformación linfoblástica durante la segunda fase del experimento	183
	5.3.2.1 Cultivos de linfocitos con mitógenos inespecíficos	183
	5.3.1.2 Cultivos de linfocitos con distintas concentraciones de Ag somático de adultos de <i>T. circumcineta</i>	185
5.4	ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay)	186
	5.4.1 Respuesta serológica (IgG) durante la primera fase del experimento	187
	5.4.2 Respuesta serológica de la IgG durante la segunda fase de la experiencia	189
5.5	Recuentos fecales de huevos	190
	5.5.1 Recuentos fecales durante la primera fase de la experiencia	190
	5.5.2 Recuentos fecales durante la segunda fase del experimento	191
	5.5.3 Repetibilidad de los recuentos fecales y modelo linear mixto	193
5.6	Parámetros hemáticos, proteínas séricas totales y fibrinógeno	194
	5.6.1 Hematocrito	195
	5.6.2 Hemoglobina	195
	5.6.3 Leucocitos totales	196
	5.6.4 Recuento diferencial de los leucocitos	196
	5.6.4.1 Neutrófilos segmentados	196
	5.6.4.2 Neutrófilos bastonado	197
	5.6.4.3 Linfocitos	197
	5.6.4.4 Monocitos	198
	5.6.4.5 Eosinófilos	198
	5.6.5 Proteínas plasmáticas totales	204
	5.6.6 Fibrinógeno	205
5.7	Recuento de formas inmaduras tras la digestión de los abomasos	205
5.8	Histología de los linfonódulos abomasaes	207
6.	CONCLUSIONES	209
7.	RESUMEN	211
8.	SUMMARY	213
9.	AGRADECIMIENTOS	215
10.	BIBLIOGRAFÍA	217
11.	ANEXO	265

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Sin duda, en la cabaña ganadera de la Comunidad Autónoma de Canarias, la especie caprina juega un papel preponderante y de ahí el interés que suscita desde un punto de vista económico y sanitario. Entre los patógenos que afectan a las cabras en nuestra comunidad, se encuentran los parásitos, y dentro de éstos, destaca por su elevada prevalencia el nematodo abomasal *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*. Este es un pequeño nematodo de apenas 14 mm de longitud considerado como uno de los parásitos más importantes de los pequeños rumiantes, por las pérdidas económicas que ocasiona en todo el mundo. Provocar alteraciones digestivas que repercuten en una inadecuada absorción de nutrientes, y como consecuencia de ello, un escaso aprovechamiento de los recursos.

El desarrollo de medidas de diagnóstico y control adecuadas para la ostertagiosis, redundarían en una reducción de las pérdidas económicas que se asocian a la parasitación por este nematodo. En general, hoy día el diagnóstico se lleva acabo fundamentalmente por medio de análisis coprológicos y el control por medio del uso de antihelmínticos. Aunque se trata de métodos correctos de lucha contra las enfermedades parasitarias, no está exenta de problemas:

- El diagnóstico coprológico sólo nos permite detectar el parásito cuando ya se ha instaurado, además de que en ocasiones se encuentran con falsos negativos.
- El uso de antihelmínticos va acompañado en ocasiones del desarrollo de fenómenos de resistencia, especialmente frecuentes en las cepas de origen caprino.
- Finalmente el uso de antihelmínticos, además de su coste, puede dar lugar a la presencia de residuos en los productos de consumo humano (leche y carne), si no se lleva a cabo un estricto control sobre los periodos de supresión tras su administración.

Esta problemática sirve de acicate para el desarrollo de nuevas líneas de investigación, orientadas a la obtención de métodos diagnósticos fiables y precoces, así como al desarrollo de medidas de control que solucionen satisfactoriamente el problema de las parasitosis en el ganado de abasto. El estudio de la respuesta inmune ofrece un enfoque común a ambas cuestiones, ya que la información obtenida sobre los diferentes antígenos

parasitarios puede ser utilizada bien con fines diagnósticos o en la inducción de respuestas inmunes protectoras.

En el diagnóstico inmunológico de una parasitosis, el principal problema es la existencia de fenómenos de reacción cruzada entre parásitos que ocupan un mismo nicho ecológico. Al analizar la utilidad de antígenos parasitarios en la inducción de respuestas inmunes protectoras, muchas líneas de trabajo parten de la observación de que los rumiantes sometidos a infecciones naturales por nematodos gastrointestinales adquieren resistencia inmune tras el contacto con el parásito. Esto se traduce en una reducción progresiva de la fertilidad de los parásitos adultos alojados en el hospedador, así como el desarrollo de fenómenos de resistencia frente a futuras reinfecciones.

La mayor parte de los estudios desarrollados en estas líneas de investigación se han realizado en bovinos y ovinos, aunque muchos de los hallazgos obtenidos en bovinos y ovinos puedan extrapolarse al ganado caprino, lo cierto es que esto no siempre es posible, pero en cualquier caso esa idea errónea ha hecho que esta especie que, pese a la importancia que tiene en algunas regiones como la Canaria, haya quedado al margen de estas investigaciones. Así mismo, si tenemos en cuenta que las respuestas frente a los parásitos en general y a los nematodos gástricos en particular puede verse afectada por factores de naturaleza nutricional, ambientales, genéticos etc., es necesario considerar independientemente cada especie hospedadora, y su correspondiente entorno, lo que justificaba la realización de este estudio.

En el marco de desarrollo de técnicas que permitan realizar un seguimiento de animales infectados por este tipo de nematodos, hemos tratado de realizar en este primer trabajo un acercamiento a la naturaleza de la asociación parásito-hospedador en nuestro entorno, analizando algunos aspectos de la respuesta inmunitaria celular y humoral en animales sometidos a infecciones con un número de vermes similares a los observados en condiciones naturales, y valorar la respuesta protectora que este tipo de infecciones es capaz de inducir el parásito en esta especie hospedadora.

De este modo, el trabajo realizado se ha encontrado en los siguientes objetivos:

- Constatar el posible papel protector de una infección experimental con cargas parasitarias similares a las detectadas en la población caprina de Gran Canaria.
- Estudiar de qué manera puede afectar la parasitación con *T. circumcincta* la capacidad de proliferación de linfocitos de sangre periférica frente a antígenos somáticos de parásitos adultos y estimulantes inespecíficos de linfocitos T y B en distintos regímenes experimentales, y valorar si la exposición previa a pequeñas cargas parasitarias modifica en algún sentido esta respuesta.
- Analizar los niveles de inmunoglobulina G (IgG) específicas frente al antígeno somático de parásitos adultos tanto en primoinfecciones como en reinoculaciones tras la exposición a pequeñas cargas parasitarias, así como valorar la utilidad del tratamiento previo del antígeno con periodato a la hora de disminuir la reactividad cruzada.
- Evaluar la liberación de huevos en heces en animales primoinfectados y reinoculados, tratar de ver si la infección previa supone una menor liberación de huevos, y por ende, la adquisición de cierto grado de protección, encontrando una correlación entre recuentos fecales con los recuentos finales de nematodos.
- Comprobar posibles variaciones que pudieran desarrollarse en parámetros hemáticos y séricos a lo largo de la infección, tanto en infecciones primarias como reinoculaciones, analizando el posible papel de los eosinófilos como indicadores de infestación.
- Detectar la presencia o ausencia de larvas inmaduras en el abomaso, tanto en animales primoinfectados como otros reinoculados, y valorar histiopatológicamente los ganglios linfáticos abomasales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

Diversos nematodos pueden parasitar el tracto digestivo de los rumiantes. Los principales nematodos gastrointestinales parásitos en rumiantes pertenecen al Orden Strongylida y concretamente a la familia Trichostrongyloidea (Balic y cols., 2000). En el abomaso destacan *Haemonchus* spp., *Ostertagia (Teladorsagia)* spp. o *Trichostrongylus axei*; en intestino delgado, *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp.; mientras que en el intestino grueso *Oesophagostomum* spp. y *Chabertia* spp.

En el pasado, la convivencia de los parásitos con los hospedadores en pastoreo, condujo al establecimiento de un equilibrio entre el parásito y hospedadores. Actualmente, el desarrollo de la ganadería intensiva ha desencadenado la ruptura de este equilibrio, favoreciéndose el desarrollo de los parásitos en los hospedadores y multiplicándose su efecto patógeno en los rumiantes, lo que se traduce en mayores pérdidas económicas derivadas de la acción directa e indirecta de los parásitos. (Hawkins, 1993; Ploeger y cols., 1990; Thomas y cols., 1984; Gross y cols., 1999).

Estudios realizados en USA para evaluar las consecuencias económicas de los parásitos gastrointestinales en la producción de los rumiantes, estiman las pérdidas anuales en 2 billones de dólares. No todas las especies parasitarias del digestivo de los rumiantes son igualmente patógenas. Los géneros que mayores pérdidas productivas provocan son *Ostertagia* spp. y *Haemonchus* spp. Ambas especies tienen en común su localización en el abomaso y la dificultad que tiene el hospedador en desarrollar una respuesta inmunitaria rápida y eficaz frente a ellos (Gasbarre, 1997a; Gasbarre y cols., 2001; Urquhart y col, 1987).

Muchos son los factores que parecen modular las pérdidas derivadas de estos parásitos. Entre ellos podíamos destacar las cargas parasitarias, la edad, sexo y estado nutricional de los hospedadores; las especies y razas parasitados (McClure y Emery, 1994; Vercruysse y Claerebout, 1997), así como factores como el clima, medidas de manejo y de control (Vercruysse y Claerebout, 1997), condicionan también la gravedad de las repercusiones productivas de los parásitos.

Ante estas pérdidas, una de las prácticas más extendidas ha sido el empleo de fármacos para el control o tratamiento de las parasitosis en las explotaciones, si bien se trata de un método no exento de inconvenientes. A parte del gasto que supone el uso de antihelmínticos, la necesidad de servicios veterinarios que encarecen los costes de producción, la aparición de residuos en los animales por el uso de estos fármacos que pueden persistir en los productos animales y llegar al consumidor o el desarrollo de resistencias a antiparasitarios, entre ellos productos tan recientes y eficaces como la ivermectina son algunos de ellos. Todas estas circunstancias explican el desarrollo de nuevas vías de control como es el empleo de vacunas, si bien actualmente estas son ineficaces, tal vez porque actualmente no se conocen completamente los mecanismos inmunológicos involucrados (Balic y cols., 2000).

Aunque se están realizando importantes avances en el desarrollo de estas vacunas, y en el estudio de la respuesta inmune que acontece en las infecciones parasitarias (especialmente sobre diversos inmunomoduladores o citocinas) la mayor parte de ellos se han desarrollado en modelos murinos, (Finkelman y cols., 1997; Brancroft y Grencis, 1998), sin embargo se debe ser cauto a la hora de extrapolar estos resultados a los rumiantes, ya que no se trata ni de los mismos hospedadores ni de los mismos parásitos (Meeusen y Balic, 1999).

2.2 ETIOLOGÍA

2.2.1 Superfamilia Trichostrongyloidea Cram, 1927

La superfamilia Trichostrongyloidea es la mayor de entre los nematodos con bursa (Anderson, 1992). Están divididos en 14 familias y 24 subfamilias (Durette-Desset y Chabaud, 1977; 1981; Durette-Desset, 1983). Se caracterizan por presentar un estoma reducido o rudimentario, estando ausente la corona radiada. Los labios en número de 6-3 o bien ausentes. El cuerpo es delgado, con una bolsa copuladora bien desarrollada, salvo raras excepciones (Soulsby, 1988; Noble y cols., 1989).

Los nematodos trichostrongílidos son frecuentes patógenos de los rumiantes, aunque también pueden localizarse en otros hospedadores como los cerdos, caballos, gatos y aves. Las localizaciones más frecuentes son el abomaso y el intestino delgado, aunque un género, *Dictyocaulus* spp., se desarrolla en las vías respiratorias (Bowman, 1995; Georgi y Georgi, 1990; Anderson, 1992; Urquhart y cols., 1996). Algunos otros géneros se alojan

en los conductos biliares (*Hepatojarakus*), cavidad nasal (*Nasistrongylus*) y glándula mamaria (*Mammanidula*) de sus hospedadores (Anderson, 1992).

El ciclo biológico es directo, generalmente no migratorio y la larva 3 (L3) desarrollada en el medio es la fase infectante y caracterizada por estar envainada al ingresar en el hospedador (Urquhart y cols., 1996).

2.2.2 Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912.

Los nematodos presentes en esta familia son, en su mayoría, de pequeño tamaño, con la cápsula bucal ausente o muy pequeña, sin coronas radiadas y normalmente sin dientes. La bolsa copuladora está bien desarrollada, con amplios lóbulos laterales y un pequeño lóbulo dorsal. Los adultos son parásitos del tracto digestivo del ganado ovino, bovino, caprino, equino y otros vertebrados. Los géneros más importantes son: *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Marshallagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Haemonchus*, *Hyostrongylus*, *Amidostomum*, *Dyctiocaulus*, *Mecistocirrus* y *Graphidium* (Soulsby, 1988; Bowman, 1995).

2.2.3 Género Ostertagia Ransom 1907

Las especies de este género se encuentran en el abomaso, y sólo ocasionalmente en el intestino delgado, de ovejas, cabras, vacas y otros rumiantes (Soulsby, 1988; Anderson, 1992), como los cérvidos holárticos (Anderson, 1992; Durette-Desset, 1983). El nombre del género se debe a Ostertag, quien lo describió por vez primera en Alemania en 1890 (Anderson, 1992).

Por su color se les conoce popularmente como el gusano pardo del estómago. Son vermes delgados, con una cutícula externa, dotada de estrías transversales en su extremo anterior. El resto de la cutícula corporal lleva unas 25-35 estrías longitudinales y ninguna transversal. La bolsa copuladora del macho tiene dos lóbulos laterales y uno dorsal y una membrana bursal accesoria situada en la zona anterior del dorso. Las espículas, de color pardo, relativamente cortas, y su extremo posterior termina en 2 ó 3 procesos. La vulva de la hembra puede ir cubierta con una pequeña solapa anterior (Soulsby, 1988). El extremo distal de la cola de la hembra también puede estar anulada. Los huevos son típicamente estrombiloides (Bowman, 1995; George y Georgi, 1990). Generalmente miden menos de 14 mm de longitud (George y Georgi, 1990).

Atendiendo a criterios exclusivamente morfológicos, *Ostertagia* y *Teladorsagia* son prácticamente indistinguibles, guardándose la denominación *Teladorsagia* para las que afectan a pequeños rumiantes, mientras que *Ostertagia* sería el género parásito de los bovinos (Bowman, 1995; Georgi y Georgi, 1990). La diferenciación entre especies se llevará a cabo a partir de la estructura de las espículas (Urquhart y cols., 1996).

Los adultos sólo son visibles tras una meticulosa inspección o lavados del abomaso, y las larvas se desarrollan en las glándulas gástricas y sólo se pueden ver microscópicamente (Urquhart y cols., 1996). Estas pueden sufrir secuestros larvarios en los estadios tempranos de la cuarta etapa larvaria (Anderson, 1992), fenómeno conocido como hipobiosis.

2.2.4 *Teladorsagia circumcincta* (Stadelmann, 1894)

Se presenta en el abomaso de ovejas y cabras, con una gran adaptación a estos hospedadores (Borgsteede, 1981b), aunque también se han encontrado en el abomaso de ciervos, llamas, muflones, antílopes, etc. (Anderson, 1992). Los machos miden de 7.5 a 8.5 mm de longitud y las hembras de 9.8 a 12.2 mm. Las espículas son finas, de 0.28 a 0.32 mm y cada una termina en un abultamiento grande y en un proceso pequeño y agudo. La vulva está cubierta normalmente por una solapa y se abre en el último quinto del cuerpo. Cerca del extremo de la cola de la hembra hay una banda engrosada con 4 ó 5 estrías transversas (Soulsby, 1988).

Los huevos miden de 80-100 X 40-50 μm . Estos son de forma elíptica regular de polos simétricos no muy anchos. Las paredes laterales son simétricas con cierta forma de barril. La cápsula es delgada, quitinosa, con la superficie lisa, tapizada internamente con una membrana delgada. Al abandonar el hospedador la mórula tiene un gran número de blastómeros que llenan la casi totalidad del huevo (Thiendepont y cols., 1979). Los huevos eclosionan en 18-24 horas y el primer estadio larvario mide 350 μm de longitud (Anderson, 1992). La L3 infectante mide 797-866 μm incluyendo la vaina que la recubre (Dikmans y Andrews, 1933).

Encuadre taxonómico

Orden Nematoda (Rudolphi, 1808)
Superfamilia Trichostrongyloidea (Cram, 1927)
Familia trichostrongylidae (Leiper, 1912)
Género *Ostertagia* (*Teladorsagia*) (Ransom 1907)

Especie *Teladorsagia circumcincta* (Stadelmann, 1894).

2.3 BIOLOGÍA DE LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

El ciclo biológico de *Ostertagia* es directo y muy similar al de otros tricostrongídeos. Los huevos, típicamente de tricostrongídeos salen con las heces y en condiciones óptimas eclosionan y maduran hasta L3 en 2 semanas. En cualquier caso, los huevos de *T. circumcincta* son resistentes a las condiciones adversas, y presentan gran capacidad de adaptación, como demuestra el hecho de su capacidad de eclosionar en intervalos de temperatura que oscilan entre los 4-38 °C (Crofton, 1965; Crofton y Whitlock, 1965), variando únicamente el tiempo que necesita para eclosionar en función de las distintas temperaturas y cepas parasitarias.

Cuando las condiciones de humedad son adecuadas la L3 migra de las heces a la hierba (Urquhart y cols., 1996). La larva de tercer estado es ingerida, desenvaina en el rumen y penetra en las glándulas gástricas de la mucosa del abomaso a los tres o cuatro días de ser ingeridas, originando nódulos blanquecinos en la mucosa. Entre 7 y 10 días después de la infección, las larvas han madurado a L4 (hembras con 7 mm y machos con 5 mm de longitud) y a los 14-42 días aparecen los adultos (Threlkeld, 1934; Sommerville, 1953; 1954; Armour y cols., 1966), a menos que sufran hipobiosis. Por tanto el periodo prepatente dura unas tres semanas (Soulsby, 1988; Urquhart col., 1996). Este fenómeno (hipobiosis), en las que las L4 quedan secuestradas en las glándulas gástricas (Armour y cols., 1966) puede prolongarse durante un periodo de hasta 6 meses, y permite que esta especie, como en otras especies de tricostrongiloides, puedan superar condiciones medioambientales adversas (Georgi y Georgi, 1990; Bowman, 1995). Dunsmore, (1960, 1963), demostró que también una mayor exposición larvaria favorecía el secuestro larvario, y que el empleo de antiparasitarios, que conducen a bajar la carga de nematodos adultos, provoca que una parte de estas larvas en hipobiosis, reanude su desarrollo para restablecer la población de vermes en el abomaso, con lo que la hipobiosis jugaría un papel en el mantenimiento de la población de vermes adultos.

2.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTERTAGIOSIS

En Europa el número de L3 de *T. circumcincta* que están en la vegetación aumenta sensiblemente a mitad de verano y sigue aumentando

progresivamente y es entonces cuando aparece la enfermedad (Urquhart y cols., 1996). Los terneros, corderos y cabritos durante su primer periodo de pastoreo son los más susceptibles al establecimiento de la enfermedad (Kassai, 1999).

Estas larvas derivan principalmente de huevos que proceden de animales adultos que han sufrido un incremento en la eliminación de huevos en los periodos del periparto, en torno a dos semanas antes y unas 6 semanas después de que nazcan los corderos (Urquhart y cols., 1996; Kassai, 1999; Dunsmore, 1965). También contribuyen a incrementar la carga del pasto los vermes que han derivado de L3 que superaron el invierno (Urquhart y cols., 1996). De hecho, la supervivencia de las L3 durante tres meses a -10 °C y por periodos mucho mayores a 4 °C justifican esta capacidad de hibernación (Gibson y Everett, 1972) y explican la posibilidad de que inicien una nueva infección en primavera cuando los animales vuelvan al pasto (Waller y Thomas, 1978).

Es importante hacer notar que estos huevos depositados en la primera mitad de la estación de pastoreo de abril a junio desarrollaran la peligrosa población de L3 de julio a octubre (Urquhart y cols., 1996), favorecida por la sobrepoblación animal y la congregación de los mismos en los puntos de agua de los pastos (Kassai, 1999).

Si la ingesta de las L3 tiene lugar antes de octubre, la mayoría de estas larvas madurarán en tres semanas; si es posterior, lo normal es que frenen su desarrollo y queden en hipobiosis durante varios meses y precipiten la ostertagiosis tipo II cuando maduren.

La inmunidad se adquiere lentamente y generalmente requieren dos estaciones de pastoreo antes de que se adquiriera una resistencia significativa a la infección (Urquhart y cols., 1996).

En áreas subtropicales, por ejemplo en las islas Canarias, la epidemiología de la enfermedad es similar que la descrita para las zonas templadas, excepto porque el ritmo estacional de eventos es diferente. En muchas de estas áreas el parto sucede conjuntamente con un aumento en el pasto, normalmente al final del otoño o invierno. Esto coincide con las condiciones más favorables para el desarrollo de las fases de vida libre de *Ostertagia* spp. y por lo tanto se concentran un mayor número de larvas a lo largo del invierno, originando los problemas clínicos o las pérdidas productivas en la segunda mitad del invierno. El secuestro larvario podría

tener lugar al final del invierno o al principio de la primavera, si bien no se descarta la posibilidad de que en determinadas zonas climáticas (seco-desértico) este fenómeno pudiera tener lugar durante las épocas más secas y calurosas del año (Urquhart col., 1996). Así mismo, la importancia relativa de estas fuentes en cualquier área geográfica podría variar de acuerdo con las condiciones durante el periodo más adverso para la supervivencia larvaria. Si el verano es muy seco y caluroso (como en las islas Canarias), se reduce la longevidad de las L3 excepto en zonas de sombra, que servirán de reservorio de la infección hasta el siguiente invierno como demuestran en Marruecos Ouhelli y cols., 1981 y Pandey y cols., 1990. Con todo, las L3 son más resistentes a la desecación que las L1 y las L2, aunque las larvas son muy sensibles a la exposición directa a la luz solar (Kassai, 1999). Aunque las L3 pueden perdurar en las heces ovinas durante condiciones ambientales adversas, su protección es probablemente menor que en las heces bovinas mucho más voluminosas (Urquhart y cols., 1996). En un estudio desarrollado sobre el efecto de la temperatura en la supervivencia de la L3 de varios géneros de nematodos, considerando un intervalo de temperaturas entre 5-30 °C, resultó que *Ostertagia* spp. fue el género más resistente (Boag y Thomas, 1985). También parece ser más capaz de soportar el frío que otros tricostrongílidos (Furman, 1944; Pandey, 1972; Jasmer y cols., 1987). Lo cierto es que a 4 y 16 °C, 2/3 y a 25 °C, 1/5 de las L3 sobreviven por más de 16 semanas mostrando que, al igual que *O. ostertagi* (Pandey, 1972), *T. circumcincta* puede sobrevivir por largos periodos de tiempo (Pandey y cols., 1993). De hecho, Boag y Thomas, 1985, encontraron tras estudiar la resistencia de las L3 de 12 nematodos diferentes que tan sólo *O. ostertagi* era más resistente que *T. circumcincta* a las temperaturas testadas (5-30 °C).

De modo análogo, las L3 de *T. circumcincta* son más resistentes a la desecación que las L3 de *O. ostertagi* (Pandey, 1976). Similares conclusiones se han obtenido en estudios comparados entre *O. ostertagi* y *T. circumcincta* en Australia (Young, 1983).

2.5 PATOGENIA Y LESIONES

En general, en condiciones naturales coexisten en un mismo hospedador varias especies diferentes de tricostrongílidos, cada uno de ellos con localizaciones y mecanismos de acción patógena diferentes. Se asume que la acción patógena total es, como mínimo, el resultado de la acción conjunta de todos ellos (Cordero de Campillo y cols., 2000), y en esta acción patógena intervienen tanto las larvas como los adultos, si bien las

primeras tiene un mayor protagonismo en el caso que nos ocupa. Así mismo, el curso de la infección variará en función de factores tales como el número de vermes, las especies de tricostrongídeos presentes en el tracto gastrointestinal (no todos son igualmente patogénicos), la edad y nutrición del hospedador etc. (Kassai, 1999).

En el caso concreto de *Ostertagia* spp. se han documentado cambios morfológicos y funcionales subsecuentes a infestaciones experimentales por *O. ostertagi* en terneros (Murray y cols. 1970). Este estudio ha demostrado que el principal efecto patogénico de la infestación por *O. ostertagi* es la reducción de la funcionalidad de las glándulas gástricas, así como la amplia superficie de mucosa que puede verse afectada y es donde tienen lugar los principales cambios funcionales y morfológicos (Soulsby, 1988).

Los cambios fisiopatológicos podrían dividirse en tres fases:

FASE 1: Aproximadamente a los 17 días post-infección. Las lesiones se producen por el desarrollo larvario en las glándulas gástricas, estando restringidos los daños a las glándulas parasitadas, donde las células mucosas, zimogénicas y parietales son reemplazadas por células indiferenciadas columnares de secreción mucosa (Soulsby, 1988; Kassai, 1999; Noble y cols. 1989).

FASE 2: Se asocia a la salida de los adultos de las glándulas gástricas y la aparición de importantes cambios en las glándulas adyacentes, fenómeno que tiene lugar a los 17-35 días post infección. Las glándulas parasitadas, agrandadas, dilatan las glándulas circundantes y estimulan la rápida división de las células epiteliales, sustituyéndose así por células aplanadas indiferenciadas, perdiendo su capacidad funcional fundamentalmente las células parietales. Tiene lugar una importante hiperplasia y un engrosamiento de la mucosa que provoca la desaparición de los complejos de unión celulares (Soulsby, 1988; Kassai, 1999).

Estos cambios morfológicos explican los importantes cambios bioquímicos que tiene lugar al tiempo, y por ende, los signos clínicos de la infección. Se produce un incremento del pH del abomaso porque cesa la producción de ácido clorhídrico por las células parietales (Soulsby, 1988; Kassai, 1999) y porque se modifica el Diferencial del Potencial Transmural (DPT), esto es, el potencial eléctrico a través de la pared gástrica e intestinal, y de la concentración intraluminal de iones. Tanto en infecciones con *T. circumcincta* como con *H. contortus* se ha detectado un

fuerte aumento del diferencial de potencial transmural con variaciones en la concentración de iones a los 30 minutos que siguen a la infección, consecuencia de la mayor presencia de iones de HCO_3 , que también contribuye al aumento del pH gástrico (Cordero del Campillo y cols. 2000).

La caída en la secreción de HCl que provoca una subida del pH gástrico hasta alcanzar el valor de 7, se pensaba que venía determinada exclusivamente por la destrucción de las células parietales de la mucosa del abomaso, pero, la rápida recuperación de los valores normales después del tratamiento antiparasitario, mucho antes de que se alcance la normalidad celular, parece indicar que la causa es otra. Algunos autores sostiene que podría haber una activación de la secreción ácida en los lugares donde el verme no tiene una acción directa, inducido por la acción de la gastrina y la inhibición de la secreción del HCl producido por un factor gástrico de origen desconocido, inducido por la presencia del verme (Cordero del Campillo, 2000).

En cualquiera de los casos, estas condiciones gástricas provocan que el pepsinógeno no se transforme en pepsina, lo que desencadena importantes alteraciones digestivas. Así mismo, como consecuencia de la pérdida de uniones intercelulares produce un filtración de macromoléculas a través de la mucosa del abomaso, llegando el pepsinógeno plasmático a superar las 3 U.I. de tirosina y detectarse proteínas plasmáticas en el contenido abomasal (Soulsby, 1988).

Si bien el parásito induce un aumento en la secreción del pepsinógeno por las células cimógenas, que se vertería directamente a la circulación hemática, el paso del pepsinógeno al plasma puede darse por otras vía, como demuestra el hecho de que ya se vean aumentados sus valores a las 24-48 horas post-infección (Cordero del Campillo, 2000). Por otro lado se produce una pérdida de proteínas del plasma, entre las que destaca la albúmina, lo que desencadena una hipoalbuminemia y un aumento de la tasa catabólica de la albúmina similar a otras parasitosis como fasciolosis o haemoncosis (Dargie, 1975).

Esta pérdida de proteínas provoca cambios en el balance osmótico de la sangre, lo que supone un aumento del líquido, particularmente en las partes más declives del cuerpo. En bovinos el espacio submandibular es el lugar más característico para esta acumulación (Noble y cols., 1989). Como

consecuencia del mayor pH, también se ha detectado un aumento de bacterias en el abomaso (Soulsby, 1988).

Parece ser que también juega un papel en la patofisiología de la enfermedad un componente de hipersensibilidad, y la degranulación eosinofílica durante el desarrollo larvario (Hammerberg, 1986; Schillhorn, 1981; Smith, B. P., 1990)

Macroscópicamente la lesión que se produce es un abultado nódulo circular de 2-3 mm de diámetro con una abertura central en la glándula parasitada. Este nódulo es consecuencia de la intensa división celular y la hiperplasia de la mucosa. Si las infestaciones son masivas, toda la mucosa está hiperplásica con un típico aspecto de "cuero repujado" (Soulsby, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Bowman, 1995).

FASE 3: Se asocia a la pérdida gradual de los parásitos adultos hacia el día 35 post-infección, lográndose progresivamente un regreso a la normalidad de la mucosa gástrica hacia el día 63-70 de infestación (Soulsby, 1988).

Esta es la forma de presentación de la enfermedad conocida como ostertagiosis tipo I, es causada por infecciones a partir de L3 recientes, la mayoría de los vermes presentes son adultos y la respuesta al tratamiento antihelmíntico es buena. En las regiones cálidas es más común en la época de destete y en los meses siguientes y en las regiones templadas más frías, en el ganado joven durante el verano y a principios de otoño.

En la ostertagiosis tipo II se presentan lesiones similares pero más extensas (Soulsby, 1988). Es el resultado de que un número elevado de larvas, que estaban en hipobiosis al principio de la cuarta etapa larvaria, emergen de las glándulas. En las regiones templadas cálidas, las larvas propensas a la inhibición son adquiridas en primavera y la enfermedad puede ocurrir cuando un gran número de larvas reanudan su desarrollo hasta la fase de adulto, a finales del verano u otoño. En las regiones templadas frías, las larvas propensas a la hipobiosis son adquiridas al final del otoño y maduran a finales del invierno o principio de la primavera (Aiello, 2000).

2.6 SIGNOS CLÍNICOS

Al menos en ganado bovino se han observado dos manifestaciones clínicas de la enfermedad.

- (1) Ostertagiosis tipo I
- (2) Ostertagiosis tipo II

La ostertagiosis tipo I aparece en terneros durante su primer verano de pastoreo en climas templados. Ocurre entre julio y octubre y está asociada con la presencia de gran número de parásitos adultos. Se produce edema y necrosis del abomaso, decrecen los niveles de albúmina, anorexia, y hay profusa diarrea acuosa, generalmente de color verde brillante por la falta de desnaturalización de la clorofila del cuajar (Soulsby, 1988; Kassai, 1999), pérdida de peso, deshidratación, aumento del pepsinógeno plasmático, hipoalbuminemia y ocasionalmente edemas periféricos. Los recuentos fecales de huevos son altos (>1000 h.p.g.) (Kassai, 1999). La morbilidad es alta, y la mortalidad es normalmente baja, siempre que se aplique el tratamiento adecuado (Soulsby, 1988). La ostertagiosis tipo II es una entidad clínica clara y se observa en climas templado-fríos a finales de invierno o principio de primavera, tanto en el ganado estabulado como en el que ha pasado el invierno a la intemperie tras su primera estación de pastoreo (Selman y cols., 1976; Kassai, 1999). Se asocia con la salida de gran número de larvas quiescentes de las glándulas gástricas. Ocasionalmente se puede ver esta presentación en animales adultos. Clínicamente se caracteriza por una grave diarrea crónica y emaciación (Martín y cols., 1957; Kassai, 1999), anorexia, deshidratación, incremento del pepsinógeno plasmático, hipoalbuminemia muy marcada y por tanto generalmente provoca edemas periféricos (Kassai, 1999) y con frecuencia conduce a la muerte (Martín y cols., 1957; Kassai, 1999), si bien la morbilidad es baja. En algunos animales pueden observarse más de 200000 parásitos, el 60% de los cuales pueden ser inmaduros. La mucosa del abomaso aparece muy engrosada y edematosa. Al tiempo puede haber necrosis superficial conjuntamente con un exudado inflamatorio. En animales adultos puede aparecer edema en el abomaso. Hay una importante reducción de las proteínas séricas y edema subcutáneo muy evidente por la pérdida de la albúmina sérica (Mulligan y cols., 1963).

En ovinos el signo clínico que aparece con mayor frecuencia es una marcada pérdida de peso. La diarrea es intermitente, y generalmente no tan acuosa como en bovinos (Urquhart y cols., 1996).

En climas tropicales y subtropicales, no suelen darse ciclos biológicos tan marcados, prolongándose la viabilidad de las larvas 3 durante periodos más largos, lo que determina que la ostertagiosis clínica sea poco frecuente. De producirse dichas formas clínicas el tipo I tendría lugar a

finales del invierno (enero-marzo) y la tipo II en otoño, con el comienzo de la estación de lluvias (septiembre-diciembre) (Kassai, 1999).

2.7 DIAGNÓSTICO

Se puede apoyar en los antecedentes de pastoreo y en los signos clínicos que se observan en los animales afectados (Kassai, 1999; Soulsby, 1988). Con todo, los signos clínicos son poco patognomónicos (Kassai, 1999). Los recuentos de huevos en heces pueden ser elevados en la enfermedad tipo I, siendo en ocasiones superior a 1000 huevos por gramo en los casos graves, pero son muy bajos y aún negativos en animales que padecen la enfermedad tipo II (Soulsby, 1988). En cualquier caso los recuentos de huevos fecales no siempre son proporcionales a la carga parasitaria ni a los signos clínicos. De hecho, corderos, cabritos y terneros pueden sufrir de forma fatal la enfermedad coincidiendo con la fase larvaria, siendo en ese momento el recuento de huevos insignificante (Kassai, 1999). En cualquier caso la observación microscópica de los mismos no permite un diagnóstico preciso y debe complementarse de un coprocultivo e identificación de las larvas 3.

Dichas L3 pueden ser contadas en el pasto sirviendo de ayuda en el diagnóstico, particularmente si el cuadro clínico es indefinido, por ejemplo en animales adultos. Niveles de larvas infestantes por encima de 100 por Kg de hierba seca se asocian con una pérdida de crecimiento, y más de 1000 son indicativos de formas clínicas (Soulsby, 1988).

Los altos niveles de pepsinógeno en plasma también pueden ayudar al diagnóstico. En los casos graves los valores pueden exceder las 3 U.I. de tirosina (niveles normales de menos de 1 U. I. en animales jóvenes sin infecciones previas; en animales más viejos los niveles normales pueden alcanzar 1.5-2 U. I. de tirosina / litro). Si bien, no se debe utilizar de forma categórica puesto que incluso los valores de pepsinógeno puede estar aumentados en animales tratados (Michel y cols., 1978b; Kassai, 1999). Cuenta con otros inconvenientes como la necesidad de contar con laboratorios especializados para su realización (Kassai, 1999).

El diagnóstico se confirma a menudo por la respuesta al tratamiento con antihelmínticos bencimidazólicos. La enfermedad tipo I responde rápidamente y en 48 horas se recobra el apetito y se produce una rápida regresión de los cambios en el abomaso. El tipo II responde de manera

menos espectacular siendo necesaria a menudo la repetición del tratamiento (Soulsby, 1988).

El estudio post- mortem permite encontrar lesiones características en las mucosas (Kassai, 1999).

Si bien en este apartado se están llevando a cabo numerosos estudios para el desarrollo de métodos fiables y precisos, y si bien se están alcanzando importantes logros (Gómez-Muñoz, 1996; 2000), lo cierto es que no se trata de métodos que hoy por hoy tengan una aplicación generalizada.

2.8 TRATAMIENTO

Respecto al tratamiento será preciso inicialmente definir el objetivo y escoger el momento idóneo para realizarlo. El control y la profilaxis de las tricostrongilidosis debe contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de manejo que limiten los riesgos de infección. Estas medidas deben ser diseñadas para cada zona de acuerdo con los sistemas de explotación y condiciones climáticas (Cordero del Campillo, 2000).

2.8.1. Antihelmínticos

Los fármacos que se utilizan actualmente pertenecen a los siguientes grupos:

- (1) Bencimidazoles
- (2) Probencimidazoles
- (3) Imidazotiazoles
- (4) Ivermectinas
- (5) Órgano fosforados

2.8.1.1 Bencimidazoles y probencimidazoles

Se administran por vía oral. Se absorben con rapidez, alcanzando en 2-3 horas los niveles plasmáticos más altos. Los más utilizados actualmente son: albendazol, oxibendazol, mebendazol, oxfendazol, fenbendazol, flubendazol y cambendazol.

El netobimin es un probencimidazol muy soluble en agua, por lo que se puede administrar vía oral o subcutánea. Se utiliza en ovinos por vía oral a dosis de 7.5 mg/Kg pv, tiene una eficacia del 98-100% frente a vermes adultos, estadios larvarios y larvas inhibidas de los nematodos gastrointestinales, siendo, además, ovicida y larvicida (Cordero del Campillo, 2000).

2.8.1.2 Imidazotiazoles

El tetramisol y el levamisol son muy eficaces frente a las formas adultas de los nematodos gastrointestinales. Frente a los estadios larvarios su eficacia es menor (menos del 80%). Se recomiendan periodos de supresión de 2 días para el consumo de leche y de una semana para la carne (Cordero del Campillo, 2000).

2.8.1.3 Lactonas macrocíclica

La ivermectina y la doramectina se administran por vía oral o parenteral a dosis muy bajas, con alta eficacia del 95-100% frente adultos y estados larvarios, incluso en hipobiosis. Además son eficaces frente a ectoparásitos. Sin embargo, el periodo de supresión es muy alta. Se mantiene circulando al menos 2 semanas. Para carne, se recomienda esperar 21 días, y no se pueden administrar en ganado lechero (Cordero del Campillo, 2000).

2.8.1.4 Órgano fosforados

Todos tienen buena eficacia frente a los nematodos. Sin embargo, su elevada toxicidad y la aparición de otros fármacos más inocuos y de superior eficacia los ha llevado al desuso (Cordero del Campillo, 2000).

2.8.2 Resistencia a los antihelmínticos

La utilización masiva y reiterada de estos fármacos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes frente a ellos, lo que complica el control de las tricostrongilidosis (Kassai, 1999; Cordero del Campillo, 2000). Está

muy relacionada con el uso de los bencimidazoles y otros más antiguos como fenotiacina o los imidazotiazoles (Cordero del Campillo, 2000).

El elevado potencial biótico de los parásitos y las condiciones climáticas favorables para la supervivencia de los estados larvarios favorecen la aparición de resistencias. También son importantes la administración frecuente, el uso repetido del mismo fármaco o grupos antihelmínticos, y la administración de dosis subterapéuticas (Cordero del Campillo, 2000).

El fenómeno de la resistencia se debe esencialmente a un cambio en la frecuencia de un gen de una población de vermes, producida por una selección inducida por drogas, determinando una reducción de la eficacia por debajo del 95% (Kassai, 1999). La resistencia a los bencimidazoles, por ejemplo, se asocia a una mutación del aminoácido fenilalanina por tirosina en la posición 200 del gen de la β -tubulina isotipo I tanto para *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* (Kwa y cols., 1994) como para *Teladorsagia circumcincta* (Elard y cols., 1996).

2.9 CONTROL

A la hora de plantear el control de las nematodosis gastrointestinales contamos con varias armas. Entre estas se debe destacar medidas de manejo y tratamientos estratégicos, si bien entre las recomendaciones que con mayor frecuencia se encuentra en la bibliografía para el control de las gastroenteritis parasitarias, la mayor parte de ellas se refieren a zonas templadas y en el hemisferio norte. Sin embargo, los mismos principios son aplicables a condiciones locales en otras áreas geográficas (Urquhart y cols., 1996).

Aunque en esencia debe seguir pautas similares a las requeridas para el control de la ostertagiosis bovina, existen algunas pequeñas diferencias en las nematodosis gastrointestinales de los pequeños rumiantes. Se pueden destacar:

- (1) El incremento de huevos en el periodo del periparto es más marcado en ovejas y cabras que en vacas, por lo que es más relevante su papel en la contaminación de los pastos en primavera.

- (2) Las nematodosis gastrointestinales de los pequeños rumiantes suelen ser mixtas con más frecuencia que en bovino. Esto se traduce en diferencias epidemiológicas.
- (3) La mayoría de las veces los pequeños rumiantes pastorean todo el año. Esto implica una tasa de infección de los pastos más continuo y sólo modificada por restricciones climáticas (Urquhart y cols., 1996).

Otro elemento a considerar podría ser la utilización de vacunas, pero a diferencia de lo que ocurre con muchas bacterias y virus, no disponemos de productos comerciales que ayuden al control de las nematodosis gastrointestinales (Kassai, 1999). El desarrollo de estos aspectos de Inmunoprofilaxis se tratará en el apartado 2.10.9.1.

También se están desarrollando algunas medidas de control basadas en la selección de animales. Sin embargo, al igual que la vacunación, aún se trata de estudios experimentales (Kassai, 1999; Georgi y Georgi, 1990). En realidad, este método ha sido el más empleado de forma clásica por los productores desde hace muchos años, basándose únicamente en su observación y la detección de los animales más productivos de su rebaño (Georgi y Georgi, 1990). También se desarrollará este aspecto profusamente en el apartado 2.10.9.3.

2.9.1 Quimioprofilaxis

El tratamiento de los animales es una de las medidas profilácticas más extendida en el control de la ostertagiosis. Se pueden utilizar tanto bencimidazoles, como imidazotiazoles o avermectinas. Siempre que sea posible, se recomendará que los animales recién tratados pastoreen en áreas que hayan sido utilizadas el año anterior, para evitar su inmediata infección (Urquhart y cols., 1996).

El brote ocasional de la ostertagiosis tipo II en ovejas jóvenes en primavera se debe tratar con los mismos antihelmínticos. A diferencia de *O. ostertagi* en terneros, donde las fases secuestradas en los tejidos son susceptibles al levamisol y al thiabendazol (Urquhart y cols., 1996).

2.9.2 Medidas de manejo

Se debe evitar una densidad elevada del rebaño y el agua y la humedad en las zonas de pastoreo que facilitan la supervivencia y la concentración de las larvas (**Kassai, 1999**).

El valorar datos medioambientales como las lluvias, temperaturas, humedades y otros relacionados con la epidemiología de la enfermedad, esto es aspectos tales como los incrementos en la presencia de huevos en las heces en el periodo del parto. Si se dispone de estos datos de la región es posible estimar cuando existen más riesgos de acumulación de larvas e incluso intuir cual será la severidad previsible de la infección en el rebaño (**Kassai, 1999**). Aspectos como el estado fisiológico de los animales, la carga ganadera, duración del pastoreo, la contaminación residual de la hierba, tipos de pradera (regadío, seco), cantidad y tipo de hierbas (gramíneas, leguminosas), juegan un importante papel (**Cordero del Campillo y cols., 2000**). En definitiva, no existe un modelo único de control (**Georgi y Georgi, 1990**).

En Gran Canaria, existen importantes variaciones medioambientales que justifican el adoptar distintos métodos de control en cada área geográfica. Los rebaños caprinos en la isla suelen tener de 200-500 cabras lecheras, y la introducción de nuevos animales es poco frecuente. Típicamente, los rebaños son semi-intensivos, y el pastoreo se restringe a pequeñas áreas del centro y sur de la isla. La alimentación de los animales se suelen suplementar con maíz, salvado de trigo y alfalfa deshidratada. Los tratamientos antiparasitarios, hasta hace unos años, eran esporádicos, y generalmente se empleaba el levamisol. Hoy en día son más frecuentes y se emplean diversos bencimidazoles y avermectinas (**Molina y cols., 1997**).

2.9.2.1 Granjas donde habitualmente sólo se pastorea

Este tipo de granjas pueden buscar un programa sanitario que se va a centrar en la profilaxis antihelmíntica o la alternancia anual de los pastos. El primer método, será el de elección para granjas donde sólo hayan ovejas o cabras, mientras que la otra opción se podrá emplear como método para granjas mixtas (**Urquhart y cols., 1996**).

2.9.2.1.1 Profilaxis por antihelmínticos

Adultas:

La principal fuente de infección de los corderos y cabritos en los pastos son los huevos liberados por los adultos durante el parto, y la profilaxis sólo será eficaz si esto se reduce al mínimo. La administración del antihelmíntico durante el 4º mes de gestación debe eliminar la mayor parte de los nematodos adultos presentes en ese momento, incluyendo a las larvas en hipobiosis, y en estos animales en pastoreo, en las que el estado nutricional suele ser bajo, este tratamiento redundará en una mejor condición corporal fácilmente evidenciable. Sin embargo, durante el final de la gestación y principios de la lactación, estos animales vuelven a infectarse por la ingestión de larvas que han soportado el invierno en el pasto. Por lo que para mejorar la profilaxis, se recomienda un tratamiento posterior a las 4-6 semanas de lactación.

Carneros y adultos jóvenes se pueden tratar en este momento.

Una alternativa sería la incorporación de los antihelmínticos en la comida o bloques energéticos durante todo el periodo del parto. Esto está bien, incluso es mejor que el otro sistema si hay pocos animales y pastorean en una zona pequeña. Sin embargo, si se trata de grandes zonas, se prefiere la primera alternativa terapéutica.

Finalmente, se puede recurrir al empleo de bolos ruminales, ya disponibles para pequeños rumiantes, que permiten una lenta liberación del antihelmíntico durante el periodo del parto (Urquhart y cols., 1996).

Corderos y cabritos:

Se deben tratar al destete, y si es posible, se deben trasladar a pastos seguros en los que no hayan pastoreado adultos al menos el año anterior. Si esto no es posible, se deberán administrar tratamientos repetidos con antihelmínticos, al menos hasta el otoño o hasta la venta de los animales. El número de tratamientos dependerá del tamaño del rebaño y de las condiciones del pastoreo (Urquhart y cols., 1996; Soulsby, 1988). Si este tiene lugar en extensivo, será suficiente con un único tratamiento en septiembre. Si por contra las condiciones del pasto son más intensivas, se recurrirá al menos a 2 tratamientos tras el destete.

Como fármacos para esta quimioprofilaxis, se pueden emplear desde bencimidazoles, levamisol, pro-bencimidazoles y avermectinas / milbemicina.

Estos métodos resultan muy caros y laboriosos, pero en algunas explotaciones ganaderas es el único recurso del que se dispone para controlar las nematodosis (Urquhart y cols., 1996).

2.9.2.1.2 Pastoreo cruzado entre distintos rumiantes

Generalmente se desarrolla este método en ganaderías donde se combinan ovejas y vacas. Este método se basa en la falta de susceptibilidad interespecífica de algunos nematodos gastrointestinales (Urquhart y cols., 1996).

Este método se estudiará con más detalle en el apartado 2.10.9.

2.9.2.2 Granjas con pastoreo alternativo

En estas explotaciones más intensivas, la rotación de cultivos es frecuente, por lo que el heno y el ensilado está más disponible como alimento seguro para cada año, pudiéndolo reservar a los animales más susceptibles del ganado. En estos casos, las medidas de control se establecerán en función a medidas de manejo y quimioprofilaxis (Urquhart y cols., 1996).

2.9.2.2.1 Profilaxis por manejo y antihelmínticos

Se puede alcanzar un óptimo control sólo con un tratamiento antiparasitario anual, que se realizará cuando las ovejas abandonen el pasto (Urquhart y cols., 1996; Cordero del Campillo y cols., 2000; Georgi y Georgi, 1990). Esto finalizará con el pico de huevos del periodo del periparto antes de mover a las ovejas y corderos a pastos seguros. Cuando se realice el destete de los corderos, será conveniente trasladarlos a pastos seguros y sería una medida recomendable de policía sanitaria aprovechar para realizar un tratamiento de ellos con antihelmínticos (Urquhart y cols., 1996).

Otro posible sistema, menos costoso en trabajo y dinero, sería el aprovechar el pasto con rotaciones de cultivo (heno y ensilados), pastoreo de bovinos y al año siguiente de ovejas. Este método es especialmente útil

para corderos y terneros recién destetados (Urquhart y cols., 1996; Cordero del Campillo y cols., 2000; Soulsby, 1988).

Aunque se puede sugerir la no utilización de tratamientos en este sistema, lo cierto es que si no se emplean suelen aparecer casos de nematodosis gastrointestinal clínica en los animales del rebaño. No se debe olvidar que ni siquiera los fármacos más eficaces son capaces de eliminar todos los vermes, y que algunas L3 pueden sobrevivir dos años en los pastos. Por tanto, se recomienda al menos un tratamiento al abandonar un pasto y al ir a introducir los animales en pastos seguros (Urquhart y cols., 1996).

2.9.2.2.2 Profilaxis por el manejo del pasto

Muchos esquemas se han realizado con el objetivo de realizar el control de las nematodosis gastrointestinales únicamente basándose en las rotaciones de los pastos. Uno de ellos se basaba en la rotación en diversos prados a lo largo del año. Pero como quiera que el mismo año retornaba a prados que habían utilizado, este método tiene escaso valor. Otros métodos, como el pastoreo por franjas estrechas de terreno. Para ello se utilizan vallas que van desplazándose cada pocos días, a medida que movemos a los animales a lo largo del terreno. Este método puede ser muy efectivo para prevenir las tricostrongilidosis, pero resulta muy laborioso y las vallas resultan muy caras, por lo que se realiza muy poco en la práctica (Urquhart y cols., 1996; Georgi y Georgi, 1990).

2.9.3 Conclusión

En cualquier caso, es evidente que el propósito de cualquier programa profiláctico debe buscar un equilibrio entre conseguir limitar el desarrollo de la infección y un nivel económico aceptable de gastos (Kassai, 1999).

El empleo cada vez más frecuente de los antiparasitarios, además de que habitualmente se tratan todos los animales del rebaño, lo que incrementa los costes, favorecen el desarrollo de resistencias. Cada vez se tiende más al empleo de los endectodícticos, porque con un único tratamiento estas actuando frente a ecto- y endoparásitos. Sin embargo, no siempre coincide el momento idóneo de administración del fármaco, lo que obliga a duplicar la administración del antiparasitario, lo que favorece el desarrollo de resistencias. El tratamiento de todo el rebaño, así como la

aparición de parásitos resistentes a muchos principios activos suponen importantes pérdidas al sector ganadero. Algunos productores, y muchos consumidores, son reticentes a un empleo masivo de los antiparasitarios, y prefieren producir productos más ecológicos. En general, otras opciones disponibles son la rotación de pastos, pero son complejos, y no siempre se consigue así optimizar el uso de los mismos. Otra posibilidad que se está ensayando es el empleo de agentes nematófagos, con algunos resultados prometedores (Gronvold et al., 1993; Larsen et al., 1997). La detección de animales resistentes o susceptibles en los rebaños se convierte en una alternativa interesante para evitar este abuso de antiparasitarios y para disminuir los costes de producción (Gasbarre et al., 2001).

2.10 INMUNOBIOLOGÍA DE LAS TRICHOSTRONGYLOIDOSIS EN LOS RUMIANTES

2.10.1 Introducción

Los nematodos gastrointestinales provocan en el hospedador una respuesta inmune frente a los diferentes estadios parasitarios. Sin embargo el desarrollo de esta respuesta es lenta, especialmente cuando se trata de *Haemonchus* spp. y *Ostertagia* spp. (Gasbarre, 1997a; Gasbarre y cols., 2001). No se conocen bien los mecanismos por medio de los cuales los bóvidos obtienen una inmunidad protectora (Miller, 1984). Parte de esta resistencia se debe a mecanismos específicos a antígenos, existiendo una compleja interacción de inmunidad celular y humoral (Miller, 1984; Befus, 1986). No está claro el papel de los anticuerpos en la resistencia a los nematodos pero se utilizan frecuentemente para evaluar el contacto con *O. ostertagi* (Kloosterman y cols., 1985; Frankena, 1987; Ploeger y cols., 1990a). La resistencia a los nematodos gastrointestinales requiere también de respuestas inespecíficas (Miller, 1984).

Trabajos histopatológicos de rechazo parasitario, así como ensayos dirigidos a bloquear la respuesta de eliminación parasitaria, han mostrado la importancia de la inmunidad mediada por células en las infecciones parasitarias. Así, la administración de dexametasona a ovinos inmunes revoca el rechazo a L3 de *T. colubriformis* y *H. contortus* (Adams, 1988; Jackson y cols., 1988; Newlands y cols., 1990) y favorece la supervivencia de adultos transferidos quirúrgicamente (Emery y cols., 1992b).

Otro aspecto importante en el estudio de la inmunidad que desarrollan los rumiantes frente a los tricostrongilidos, es la respuesta

innate humoral. Es posible que los diferentes patrones de antígenos superficiales detectados en diferentes nematodos gastrointestinales estimulen diferentes respuestas inmunitarias durante las infecciones. Estos cambios se pueden reflejar en adaptaciones de la superficie del nematodo durante las fases del ciclo en el hospedador y en el exterior. Así, por ejemplo, la maduración de L3 a L4 tiene lugar en diferentes localizaciones en *Ostertagia* y en *Trichostrongylus*, lo que se traduce en diferencias fisiológicas y diferencias estructurales. Además, posiblemente las diferencias antigénicas entre los diferentes nematodos gastrointestinales, también pueden ayudar a evadir la respuesta inmune (Wedrychowicz y cols., 1994).

A medida que disponemos de anticuerpos monoclonales en rumiantes, que permiten caracterizar poblaciones celulares y detectar sus productos, la posibilidad de utilizar antígenos parasitarios recombinantes para diversos ensayos y las mejoras en los métodos de cultivo, diferenciación y clonación *in vitro* de los linfocitos y células no linfoides en rumiantes, permitirán un mayor conocimiento de los fenómenos que desencadenan la respuesta inmunitaria del rumiante frente a las nematodosis gastrointestinales (McClure y Emery, 1994).

2.10.2 Factores que modulan la respuesta inmune

La respuesta inmune parece estar influenciada por un gran número de factores relacionados tanto con el hospedador, el parásito y el medio en el que tiene lugar la asociación parasitaria. Entre dichos factores podríamos destacar las especies y cantidades de parásitos adquiridos así como la edad, sexo, estado hormonal y nutricional y especies de hospedadores (McClure y Emery, 1994; Vercruyse y Claerebout, 1997), también podrían intervenir factores como el clima, medidas de manejo y de control (Vercruyse y Claerebout, 1997). Prácticamente todos estos elementos así como los efectos negativos que pueden tener otras enfermedades están demostrados por diversos autores en pequeños rumiantes (Smith y cols., 1985a; Stear y Murray, 1994; Coop y cols., 1995; Wallace y cols., 1996). Menor es la información recopilada en estos aspectos en bovinos (Michel y cols., 1979; Gasbarre y cols., 1993b).

2.10.2.1 Inmunidad calostrual

En neonatos lactantes, la leche proporciona pasivamente inmunidad materna. Es importante para la protección frente a enfermedades, para



estimular en el neonato su propia inmunidad y para la respuesta a la vacunación del recién nacido. Los isotipos de inmunoglobulinas G (especialmente la G₁), IgA e IgM están presentes en la leche, predominando el isotipo IgG en el calostro (Lascelles y cols., 1986). Sin embargo, con la llegada de reactivos para detectar los niveles de IgE bovina, se ha demostrado una transferencia calostrual efectiva de esta inmunoglobulina en terneros (Thatcher y Gershwin, 1989). La protección del neonato por el calostro puede ser también ayudada por reacciones inducidas por las células linfoides maternas que son absorbidos intercelularmente desde el tracto digestivo del neonato y transportados hasta los ganglios linfáticos mesentéricos (Sheldrake y Husband, 1985). Así, terneros alimentados con calostro completo muestran mayor capacidad bacteriana frente a *Escherichia coli* y títulos de anticuerpos específicos más altos que terneros alimentados con calostro depleccionado en células (Riedel-Caspari y Schmidh, 1987). En terneros, la inmunidad materna puede promover, probablemente vía complejos antígeno / IgG₁, la respuesta inmune local y sistémica a antígenos de la dieta (Porter y cols., 1987). Sin embargo, en otro estudio, la capacidad de vacunar corderos con *T. colubriformis* irradiados no se afectó por la inmunidad calostrual de las ovejas (Dineen y cols., 1978).

2.10.2.2 Edad

La edad es un factor muy importante en el desarrollo de la inmunidad en los rumiantes. Muchos autores han desarrollado trabajos que lo demuestran. Así, por ejemplo, la inmunidad frente a *H. contortus* varía en función de la edad del hospedador (Knight y Rodgers, 1974; Barger, 1988; Gibson y Parfitt, 1972). La inmunidad protectora frente a *Nematodirus* y *Cooperia* se alcanza con un año de edad, sin embargo, frente a *Ostertagia* y *Trichostrongylus* sólo la obtienen los bovinos adultos (Armour, 1989).

Dado que una inmunidad sólida en general tarda al menos 4 a 6 meses en desarrollarse, no es sorprendente que los jóvenes sean altamente susceptibles a las helmintiasis, y sean más difíciles de inmunizar con vacunas a base de L3 irradiadas que ovinos de más edad (Smith y Angus, 1980). En corderos infectados con L3 de *Haemonchus contortus* los linfocitos sanguíneos reactivos a antígeno no se han detectado en animales de menos de 4 meses de edad (Lloyd y Soulsby, 1987), pero sí aparecen en corderos de más de 4 meses al ser infectados. En principio, en todos los ensayos en corderos y animales adultos, la presencia y magnitud de la

respuesta proliferativa de los linfocitos no presagia una inmunidad protectora (Lloyd y Soulsby, 1987; Shubber y cols., 1984; Berezshko y cols., 1987; Riffkin y Yong, 1984), aunque la complejidad de respuestas a extractos antigénicos utilizados requieren la reevaluación con antígenos purificados.

Tal vez exista una resistencia inherente a la edad e independiente de exposiciones previas (Sutherland y cols., 1999). Otros aspectos como la cantidad de huevos liberados en las heces en ovinos parasitados con nematodos gastrointestinales también se ven condicionados por este factor (Douch y Morum, 1993).

2.10.2.3 Especies y razas de hospedadores. Inmunidad innata.

Existen diferencias sustanciales entre individuos y razas en la expresión de inmunidad a los helmintos (Lloyd y Solsby, 1987). En inoculaciones experimentales de *T. circumcincta* en ovinos Scottish Blackface se han detectado diferencias significativas entre ovejas en las respuestas de IgG1 e IgA frente a distintos preparados antigénicos procedentes de fases larvarias de *T. circumcincta* al evaluarlos con sendos test de ELISA, incluso tratándose de animales del mismo sexo, raza y edad, nacidas en la misma granja y sufriendo la misma historia de exposición parasitaria (Sinski y cols., 1995a). Esto puede demostrar la existencia de diferencias genéticas que reflejan la influencia del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la especificidad de la respuesta a anticuerpos (Kennedy, 1989). Estas diferencias también se detectan en los recuentos fecales de huevos (Abbott y cols., 1984).

Gasbarre y cols., 2001, desarrollaron un trabajo muy interesante en este sentido en bovinos parasitados por *O. ostertagi*. Parten de la premisa de que los recuentos fecales de huevos es un rasgo que se conserva de generación en generación (Leighton y cols., 1989), con una heredabilidad de 0.3 (Gasbarre y cols., 1990). Esta heredabilidad es similar a la encontrada en animales procedentes de Australia (Stear y cols., 1984), y un poco mayor que la detectada en Europa (Klooterman y cols., 1992), África (Zinssatag y cols., 2000) y Sudamérica (Suárez y cols., 1995). Los recuentos de huevos en bovinos infectados por *O. ostertagi*, no siguen una distribución “normal”, y un pequeño porcentaje del rebaño es responsable de la mayor parte de la transmisión parasitaria (Gasbarre y cols., 1990). Esta diseminación de huevos por parte de algunos individuos de un rebaño, fue descrita por vez primera por Crofton, 1971a; 1971b. También se ha

descrito en otras poblaciones bovinas (**Genchi y cols., 1989**). La mayoría de los individuos tiene valores de recuentos de huevos en heces bajos, sólo un pequeño porcentaje (15-25%) tiene altos recuentos de huevos fecales (**Anderson y May, 1985; Genchi y cols., 1989**). Este patrón sugiere que un manejo genético de este porcentaje del rebaño podría reducir considerablemente la transmisión parasitaria (**Gasbarre y cols., 2001**).

En relación a la resistencia innata a los nematodos gastrointestinales se desarrolla de la misma forma independientemente de la especie implicada. Así en un trabajo llevado a cabo por **Schmidt y cols., 1998**, no encontraron diferencias en la diversidad de parásitos en diferentes grupos de Aberdeen Angus, concluyendo que el hospedador tenía escasa importancia en la diversidad parasitaria. Esto implica que la resistencia a los diferentes géneros parasitarios es similar y que un individuo resistente a un parásito, lo será a todos los nematodos gastrointestinales. Sin embargo estas conclusiones chocan con las recogidas por **Gasbarre y cols., 2001**, quienes describen correlaciones entre el número de adultos de *Cooperia* spp. y *Ostertagia ostertagi* en el primer mes de pastoreo. Sin embargo, tras 4-5 meses de ocupar los pastos, no había correlación entre estos parásitos en animales individuales. Esta falta de correlación indica que la inmunidad a los dos parásitos no es la misma en cada animal, y que por tanto pueden existir diferentes mecanismos en la resistencia a diferentes especies parasitarias

2.10.2.4 Estado hormonal

Destacar que en determinados estados fisiológicos que van acompañados de cambios hormonales, se produce una mayor susceptibilidad a infecciones por nematodos o bien un incremento en la eliminación de huevos. Dado que esto no va acompañado de cambios en parámetros que examinan la respuesta inmune (producción de linfoblastos, títulos de inmunoglobulinas...) (**Smith y cols., 1983a**) se deduce un efecto directo de estos cambios hormonales. Uno de estos momentos más característico en los rumiantes es la lactación (**O'Sullivan y Donald, 1973**) y el incremento en huevos durante el parto (**O'Sullivan y Donald, 1970; Armour, 1989; Kloosterman y cols., 1991**).

2.10.2.5 Estado nutricional

En el desarrollo de la inmunidad existe un componente nutricional. Tras la infusión de suplementos de proteínas en el abomaso, durante la

inmunización de corderos frente a *H. contortus*, aumentan los niveles de inmunidad adquirida (Smith, 1991) y corderos alimentados con proteína pero no suplementados con energía, alcanzan más rápidamente inmunidad a *H. contortus* (Brown, MD y cols., 1991). El estado nutricional también condiciona la cantidad de huevos que los nematodos pueden liberar con las heces (Coop y Holmes, 1996).

2.10.2.6 Efecto de la quimioprofilaxis en la respuesta inmunitaria

En los bovinos, uno de los principales factores a los que se atribuyen la falta de inmunidad en adultos, es el exceso de medidas de control, tanto por el uso de antihelmínticos como por la rotación de pastos en la primera estación de pastoreo (Ploeger y cols., 1990a). El objetivo del tratamiento es limitar la liberación de huevos al pasto al principio de la estación de pastoreo, con el propósito de limitar el número de larvas al final de la estación. El tratamiento es en ocasiones tan eficaz que consigue plenamente el objetivo. El problema que se deriva de esto, es que el número de larvas es tan pequeño que no estimulan la respuesta inmunitaria (Vercruysse y cols., 1994). De hecho, en diversos trabajos, las vacas tratadas de este modo muestran unos recuentos de huevos mayores y más cantidad de vermes adultos en abomaso después de una exposición, que aquellas vacas que no han sido tratadas previamente (Herber y Probert, 1987; Jacobs y cols., 1987; Vercruysse y cols., 1992). En la mayoría de estos experimentos se expusieron los animales a importantes infecciones experimentales. Si evaluamos la resistencia obtenida por los terneros frente a infecciones naturales, el efecto de los tratamientos previos en el número de huevos y recuento de adultos es más bien poco relevante (Borgsteede y Kloosterman, 1985; Armour y cols., 1988; Jacobs y cols., 1989; Downey y cols., 1993; Fisher y Jacobs, 1995; Taylor y cols., 1995; Kerboeuf y cols., 1996). De todo ello se desprende que el efecto de la quimioprofilaxis sobre la inmunidad adquirida frente a los nematodos gastrointestinales depende entre otras cosas de la eficacia del sistema de control (Armour, 1989), y del espectro de actividad del antihelmíntico (Vercruysse y cols., 1992; Taylor y cols., 1995), considerando que este efecto sólo se encuentra en animales expuestos a altas dosis infectantes (Ploeger y cols., 1990a).

2.10.2.7 Inmunopatogenicidad de diferentes aislados de *T. circumcincta*.

Es posible que la existencia de diferentes genotipos parasitarios seleccionados por resistencia a fármacos tengan diferentes comportamientos

en patogenicidad e inmunogenicidad (Barret y cols., 1998). Estudios previos (Kelly y cols., 1978; Le Jambre y cols., 1982; Mac Lean y cols., 1987; Martín y cols., 1988; Maingi y cols., 1990) sugieren que cambios en las características fisiológicas de los parásitos pueden asociarse a alelos que confieren resistencia a los antihelmínticos. Kelly y cols., 1978, encontraron que a mayores tasas de infectividad, más cambios patológicos, al estudiar el hematocrito, concentración de proteínas plasmáticas y hemoglobina, en ovinos infectados con aislados de *H. contortus* resistentes a bencimidazoles, que cuando se emplearon aislados susceptibles de este nematodo. También encontraron una mayor supervivencia de huevos y formas larvarias en los pastos, así como un mayor número de formas larvarias desenvainadas en el fluido ruminal para el aislado resistente a bencimidazoles. Mac Lean y cols., 1987, demostraron justamente lo contrario al emplear aislados resistentes y susceptibles a bencimidazoles de *Trichostrongylus colubriformis*. En este caso se compararon la tasa de establecimiento, la fecundidad y la patogenicidad. Estudios en pequeños rumiantes sugieren que diferentes poblaciones parasitarias presentan diferencias significativas en la inmunidad (Goyal y Wakelin, 1993). Estas diferencias se encuentran en recuento de vermes, número de mastocitos en mucosa, eosinófilos y anticuerpos.

Sin embargo en otras ocasiones no se llega a constatar este fenómeno. Así Barret y cols., 1998, al realizar un estudio comparando la patogenicidad de la respuesta inmune en ovinos inoculados con tres aislados diferentes de *T. circumcincta*, uno de ellos resistente a bencimidazoles (Moretum Ovine Resistant Isolate-MORI), otro resistente a bencimidazoles e ivermectina (Moretum Caprine Resistant Isolate- MCRI) y otro susceptible a bencimidazoles (Moretum Ovine Susceptible Isolate- MOSI), prácticamente no encontraron diferencias entre estos grupos. Respecto al pepsinógeno plasmático, únicamente encontraron diferencias significativas el día 14 p.i., donde el grupo de ovejas inoculados con MCRI, mostró concentraciones plasmáticas significativamente menores que los otros dos grupos ($p < 0.05$), aunque luego dejaron de observarse diferencias estadísticamente importantes. En los recuentos de huevos en heces, el grupo inoculado con MORI, se encontró un menor número en los días 7 y 14 de hacerse patente la infección ($p < 0.05$), y posteriormente, a partir del día 21 fueron similares. Tras desparasitarlos a todos y reinocularlos del mismo modo, no encontraron diferencias en el número de mastocitos en la mucosa ni en el número de vermes en abomaso. En este caso, los distintos genotipos estudiados no evidenciaron diferencia en las respuestas.

2.10.2.8 Nichos tisulares de larvas y adultos

Todos los parásitos gastrointestinales importantes en rumiantes pertenecen al orden Strongylida, y en su mayoría se clasifican dentro de la familia Trichostrongyloidea (Soulsby, 1982; Mehlhorn y Walldorf, 1988). A pesar de la proximidad filogenética, y de las múltiples similitudes morfológicas, existen importantes diferencias en las fases del ciclo parasitario entre diferentes especies, lo que afecta a la inmunidad e inmunopatología que las distintas especies pueden generar. Estas diferencias son especialmente importantes en los nichos ecológicos dentro de cada hospedador, sobre todo en las larvas, y también se debe considerar los hábitos alimentarios de los adultos. Los diferentes nichos ecológicos condicionan que puedan existir distintas susceptibilidades de los diferentes estadios a los mecanismos de control de los parásitos. Por esto, un mecanismo que resulta eficaz y que provoca resistencia frente a un parásito, no tiene porque ser válido para otra especie parasitaria, ni tan siquiera para otra fase del ciclo del mismo parásito. Por esto es muy importante conocer detalladamente el ciclo biológico del nematodo para comprender que mecanismos inmunes serán probablemente los más relevantes para uno o un grupo de nematodos. En general, suelen existir unas fases larvarias que se desarrollan en los tejidos y los adultos generalmente se encuentran en el lumen gastrointestinal o en el epitelio de la mucosa (Balic y cols., 2000).

La larva infestante de los trichostrongílidos son las L3, y están envainadas. Una vez que es ingerida por el hospedador, se desenvaina en el tracto digestivo, generalmente en situación anterior a la localización final como adulto. Así, por ejemplo, tanto las L3 de *Haemonchus contortus* como de *Trichostrongylus axei*, se desenvainan en el rumen y sus adultos se encuentran en el abomaso. Sin embargo, *T. colubriformis*, su larva se desenvaina en el abomaso y se aloja como adulto en el intestino delgado. Una vez desenvainada la L3 de los trichostrongílidos llega a su nicho ecológico tisular. Allí se desarrolla y muda a L4, lo que normalmente dura de 24-96 horas post-infección. En función de la especie de la que se trate se producirá la muda final a L5 o adulto inmaduro en 8-16 días después de la infección (Balic y cols., 2000).

Cuando existen infecciones combinadas (L3 de *T. colubriformis*, *T. circumcincta*, *H. contortus* y *N. spathiger*) en ovinos inmunizados frente a *Haemonchus contortus*, todos los parásitos pueden ser eliminados; mientras que en ovinos inmunes a *T. colubriformis*, los nematodos abomasales no son rechazados (Gordon, 1968; Dineen y cols., 1977). Esto parece indicar por

tanto que la eliminación del parásito tiene lugar distalmente al lugar donde se van a ubicar, pero no proximalmente, y lo que constataría de un reconocimiento específico del antígeno parasitario y una fase efectora no-específica (Dineen y cols., 1977)

Aunque el desarrollo de L3 hasta adulto es similar en todas las especies, lo cierto es que existen diferencias en los nichos ocupados por las larvas infestantes. Todas las larvas invaden los tejidos, lo que indica que existen factores esenciales en ellos y por ende son imprescindibles para el desarrollo del parásito en el hospedador (Balic y cols., 2000).

Los parásitos han desarrollado una serie de estrategias de evasión de la respuesta inmune para escapar o rechazar la respuesta efectora inmunitaria. Estos mecanismos de los parásitos varían por supuesto en función del nicho en las diferentes especies. Algunas larvas tratan de evadir la respuesta inmune ocupando áreas de difícil acceso para los mecanismos efectores del hospedador parasitado. Por ejemplo, *Teladorsagia circumcincta* y *Ostertagia ostertagi* ocupan las fosas de las glándulas gástricas del abomaso antes de emerger como adultos jóvenes. Otros, como *Haemonchus contortus*, que también habitan los fondos de las glándulas gástricas abomasales, no distienden las glándulas y las L4 se encuentran en la superficie de la mucosa gástrica, lo que sugiere que la motilidad larvaria actúa también como una estrategia de evasión de la respuesta inmune. Otros como *Oesophagostomun* spp. tiene tanto mecanismos de aislamiento como estrategias de motilidad. Las L3 penetran profundamente en la mucosa del intestino delgado y desarrolla una membrana quística antes de emerger al lumen intestinal como L4 y migrar al intestino grueso para continuar su desarrollo como adulto. El género *Trichostrongylus* spp., (por ejemplo *T. colubriformis*), invade el intestino delgado, donde se localiza intraepitelialmente como L3, sin atravesar la capa epitelial. Mientras, los adultos se encuentran fuertemente asociados a la superficie de las capas de moco (Balic y cols., 2000).

La nutrición de los parásitos también es un factor importante. En el caso de *H. contortus*, es el único en emplear una lanceta bucal para aferrarse a la mucosa abomasal con el propósito de alimentarse de la sangre del hospedador. Esto puede justificar algunas de las propiedades inmunomoduladoras atribuidas principalmente a adultos de *H. contortus* (Behnke, 1987).

2.10.3 Modelo de respuesta inmunitaria a nematodos gastrointestinales en roedores. Su extrapolación a los rumiantes

Muchos nematodos gastrointestinales de los roedores realizan migraciones tisulares en su ciclo biológico, cosa que no sucede en las tricostrongilidosis de los rumiantes. Por esto, a la hora de extrapolar los mecanismos que confieren inmunidad a los roedores para los rumiantes se debe ser cauto. Así mismo en los rumiantes, la inmunidad adquirida de forma natural es predominantemente una inmunidad mucosal entérica (McClure y Emery, 1994).

Se han desarrollado ensayos *in vivo* en roedores con anticuerpos monoclonales para definir los requerimientos necesarios para inducir la inmunología parasitaria. Por ejemplo, la eosinofilia inducida por las helmintiasis puede ser revocada específicamente con anticuerpos monoclonales para IL-5 (Korenaga y cols., 1991a; Sher y cols., 1990; Urban y cols., 1991; Coffman y cols., 1989) sin afectar el desarrollo de inmunidad protectora a *Nippostrongylus braziliensis*, *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygyrus*, o *Strongyloides venezuelensis* en ratón (Korenaga y cols., 1991a; Sher y cols., 1990; Urban y cols., 1991). La administración de anticuerpos monoclonales específicos para la IL-2 o IL-5 no tiene efecto sobre la mastocitosis inducida por helmintos en el intestino murino, mientras que los anticuerpos monoclonales contra IL-3 e IL-4 provocan su reducción (Madden y cols., 1991). A pesar de reducir la mastocitosis, *Nippostrongylus* es rechazado normalmente. En contraste, la inmunidad contra una infección experimental con *H. polygyrus*, un nematodo completamente entérico similar a *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, y a otros muchos helmintos de rumiantes, la inoculación de anticuerpos monoclonales contra IL4 reduce entre un 30% (IL-4plus) o un 90% (IL-4R) la inmunidad (Urban y cols., 1991). Anticuerpos monoclonales contra IL-4 (BSF-1) suprime específicamente la respuesta de IgE y afecta la inmunidad protectora frente a *Schistosoma* o *Nippostrongylus* (Sher y cols., 1990; Madden y cols., 1991; Finkelman y cols., 1986) mientras que la administración de anticuerpos monoclonales contra IgE no tiene efectos sobre la inmunidad a *Strongyloides ratti* en ratón (Korenaga y cols., 1991b). Sin embargo, anticuerpos monoclonales contra IFN- γ reduce la protección contra las migraciones de *Schistosoma* (Korenaga y cols., 1991a) y la administración de un suero anti-eosinófilos a cobayas reduce la protección frente *T. colubriformis* (Gleich y cols., 1979). Estos estudios demuestran que los mecanismos efectores para el rechazo del parásito son muy complejos y más difíciles de perturbar con reactivos específicos de lo

que se pensaba, y que la relación parásito-hospedador debe ser considerada para extrapolar los resultados relevantes entre distintos tipos de hospedadores como roedores y rumiantes.

2.10.4 Respuesta efectora del tracto gastrointestinal a las tricostrongilidosis digestivas de los rumiantes. Manifestaciones de la resistencia

No se ha descrito un único mecanismo efector capaz por sí mismo de desarrollar la inmunidad protectora. Lo que sí parece claro es que no todos los nematodos gastrointestinales desarrollan una misma respuesta inmunitaria. En general, tras varios meses de pastoreo la mayoría de los animales del rebaño alcanzan una inmunidad suficiente frente a la mayor parte de los nematodos gastrointestinales. Esta inmunidad se manifiesta porque conduce claramente a una menor capacidad de establecimiento de los parásitos en el animal. Algunos parásitos como *Dictyocaulus viviparus* y *Oesophagostomum radiatum* son capaces de provocar respuestas inmunitarias rápidas y fuertes. Incluso si sólo se exponen previamente los bóvidos al antígeno se consigue una importante reducción en el número de parásitos que logran asentarse (Rubin y Lucker, 1956; Weber y Lucker, 1959; Gasbarre y Canals, 1989). Otros parásitos como *Cooperia* spp. y *Haemonchus placei*, requieren un mayor periodo de exposición antes de que se observe un alto nivel de inmunidad. Pero incluso con estos parásitos, en las vacas, se reduce significativamente la cantidad de larvas que son capaces de asentarse al final de la primera estación de pastoreo (Gasbarre y cols., 2001). La respuesta inmune que desarrollan los bovinos frente a *O. ostertagi* es débil y lenta en aparecer. Son necesarios varios meses de exposición continua para conseguir una disminución del número de vermes (Michel, 1963, 1970; Michel y col, 1973), a pesar de que la disminución en el número de huevos liberados (Michel, 1963; Gasbarre y cols., 2001) y la aparición de cambios en la morfología del parásito (Michel et al, 1972; Gasbarre y cols., 2001) aparecen rápidamente en infecciones primarias. En general, la inmunidad frente a *Ostertagia ostertagi* no suele ser evidente hasta que el animal tiene al menos dos años de edad (Gasbarre y cols., 2001). A pesar de esta falta de mecanismos inmunitarios efectores en los primeros dos años de exposición al nematodo, sí existe una immunoestimulación, que provoca un retraso en el desarrollo del parásito, una inhibición cada vez más evidente en el desarrollo de las larvas y la mayor dificultad que el hospedador opone a la adquisición de nuevos parásitos, en definitiva, como resultado, mayor dificultad para la transmisión al resto del rebaño (Gasbarre y cols., 2001).

Los mecanismos de inmunidad adquirida que confieren a los rumiantes protección frente a los nematodos gastrointestinales, como se comentaba anteriormente, aún hoy no son bien conocidos (**Lloyd y Soulsby, 1987; Rothwell, 1989; Miller, 1984**). **Miller, 1993**, describió dos patrones de expulsión de nematodos. Por una parte, la expulsión espontánea en infecciones primarias, y por otro lado la rápida expulsión de las larvas en hospedadores ya inmunizados. La primera forma de expulsión es infrecuente, y de producirse únicamente afecta a las fases de adulto del parásito. El rechazo a las larvas infectantes en animales expuestos por primera vez, puede suceder en un periodo de horas a semanas, lo que sugiere que operan diferentes niveles o mecanismos de inmunidad (**Balic y cols., 2000**).

Independientemente de la especie parasitaria implicada existen cuatro elementos comunes en la adquisición de inmunidad frente a nematodos:

- (1) Rechazo al ingreso de nuevas L3
- (2) Retraso del desarrollo larvario (L3 o L4, arrestadas o en hipobiosis)
- (3) Disminución de la fecundidad (disminución en el número de huevos liberados por hembras adultas, posiblemente también afecte a los machos)
- (4) Expulsión de vermes adultos.

De dicha manifestación se desarrolla secuencialmente en el tiempo, siendo el grado dependiente de la especie parásita, número de L3 ingeridas, sexo, edad, especie y raza de hospedador (**McClure y Emery, 1994**).

Vercruyse y Claerebout, 1997, tienen un planteamiento similar en lo que concierne al desarrollo de inmunidad frente a tricostrongídeos gastrointestinales bovinos, aunque varía un poco la secuencia de eventos. Para estos autores, primero se produce una disminución de la fecundidad, seguida por una limitación del crecimiento de los vermes. Luego un retraso y secuestro del desarrollo larvario para terminar con la expulsión del adulto y el establecimiento de una resistencia al desarrollo de nuevas infecciones en el hospedador inmune.

Todos estos mecanismos no son siempre fáciles de detectar ni se explican uniformemente, pero en general se puede considerar estos

mecanismos y esta última secuencia como la norma según **Michel y cols., 1973**.

2.10.4.1 Manifestación de resistencia frente a parásitos adultos

La inmunidad frente a estados adultos de nematodos gastrointestinales en rumiantes se manifiesta por la expulsión de la población adulta, cambios en la morfología de los nematodos y la reducción de la fecundidad de las hembras (**Balic y cols., 2000**).

2.10.4.1.1 Expulsión de los nematodos adultos durante la infección

a) Expulsión primaria de nematodos adultos.

Mientras que la expulsión de los nematodos gastrointestinales en infecciones primarias sucede rápidamente en los modelos murinos, la expulsión de los vermes adultos en las infecciones primarias gastrointestinales en los rumiantes es poco frecuente, al igual que en la mayoría de los animales superiores, incluyendo al hombre (**Behnke y cols., 1992**). Como excepción, está el género *Nematodirus* spp., así en ovejas parasitadas con *N. battus* su expulsión es dependiente de la dosis infectante. Ovejas infectadas con 60000 L3, son capaces de eliminar los vermes adultos en 24-28 días post-inoculación. Por el contrario si reciben 20000 L3, los adultos se mantienen al menos hasta 72 días post-inoculación (**Lee y Martín, 1976**). Otros trabajos más recientes (**Winter y cols., 1997**) confirman que la mayoría de los adultos de *N. battus* de una infección primaria con 50000 L3 son rechazados entre los días 18-21. Sin embargo, queda un remanente del 20% de la población original hasta el día 33 p.i. Estos datos parecen indicar que los mecanismos de resistencia no son totalmente efectivos y requieren de un umbral de estimulación para ser completamente activados (**Balic y cols., 2000**).

b) Expulsión de los nematodos adultos como resultado de una infección repetida

La expulsión de nematodos adultos es el resultado de la inmunidad adquirida como consecuencia de exposiciones repetidas, y es común a muchos nematodos gastrointestinales. Se ha detectado en ovinos parasitados con *H. contortus* (**Barger y cols., 1985**), *O. leptospicularis* (**Hertzberg y**

cols., 1995), *T. circumcincta* (Seaton y cols., 1989b), *T. vitrinus* (Seaton y cols., 1989a), *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1990b) y en bovinos continuamente expuestos a L3 de *O. ostertagi* (Michel, 1963).

La pérdida de adultos a veces es dependiente del nivel de L3 ingeridas, como sucede con *H. contortus* y *T. colubriformis* (Barger y cols., 1985; Barnes y Dobson, 1990b). En el caso de *H. contortus* la expulsión sólo sucede si son infectados con dosis semanales de 2400 a 4800 L3, pero no si las dosis son de 600-1200 L3 semanales (Barger y cols., 1985). En el caso de *T. colubriformis* también se retrasa hasta 5 semanas la expulsión de los adultos si las ovejas están infectadas con tan sólo 200 L3 semanales, si lo comparamos con lo que sucede al estar expuestas a 600, 1000 ó 2000 L3 semanales (Barnes y Dobson, 1990b). Estos trabajos muestran que la expulsión está en función de la carga parasitaria, pero no diferencian si la pérdida de nematodos adultos es una consecuencia del desarrollo de mecanismos inmunitarios efectores específicos de adultos. La expulsión de los vermes adultos debido a mecanismos inmunitarios desencadenados por las fases larvarias se ha demostrado en rumiantes. En algunos casos, la respuesta de hipersensibilidad inmediata de las ovejas frente a las larvas, afectan, de forma inespecífica, a la población parasitaria adulta (Miller, 1984; Rothwell, 1989). Además, estos mecanismos de expulsión inespecíficos de los adultos, favorecen la expulsión de otros nematodos que habiten en el mismo ambiente. Sin embargo, existen evidencias que sostienen la idea de que la expulsión de nematodos adultos puede ocurrir como consecuencia del desarrollo de la inmunidad adquirida específica a los adultos, independientemente del desarrollo de resistencias a larvas establecidas. Dos son los aspectos que apoyan esta teoría:

(1) La observación de que la expulsión de los nematodos adultos en los rumiantes se desarrolla con un rango diferente a otras manifestaciones de inmunidad en animales continuamente infectados.

(2) En diversos experimentos, se ha evidenciado el desarrollo de inmunidad frente a nematodos adultos en ausencia de infecciones larvarias (Balic y cols., 2000).

c) Diferentes rangos de expulsión de larvas y adultos

En ovinos infectados continuamente con L3 de *T. vitrinus*, se establece más rápidamente la resistencia al establecimiento y por tanto la expulsión de las L3 que de los adultos (Seaton y cols., 1989a). Igual pasa

con *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1990a) y con *H. contortus* (Barger y cols., 1985)

En contraste, la expulsión de adultos de *O. ostertagi* ocurre antes del establecimiento de resistencia a las larvas, si las vacas están infectándose constantemente (Michel, 1963). En ovejas infectadas continuamente con *T. circumcincta*, la expulsión de los adultos tiene lugar conjuntamente con el desarrollo de inmunidad frente a las L3 (Seaton y cols., 1989b). Estos estudios muestran que la expulsión de los adultos es independiente al desarrollo de resistencia a las L3 establecidas (Balic y cols., 2000).

d) Resistencia generada específicamente frente a nematodos gastrointestinales adultos

Existen evidencias directas del desarrollo de resistencia específica frente a adultos en ausencia de inmunidad larvaria. Emery, y cols., 1992a, transplantaron quirúrgicamente adultos de *T. colubriformis* en ovinos. La ovejas, tras 5 infecciones de 30000 L3 de *T. colubriformis* y después de tratarlas con antihelmínticos, fueron altamente resistentes al parasitismo por adultos de *T. colubriformis* transplantados quirúrgicamente. La resistencia se juzgó al valorar la reducción del número de adultos en animales inmunizados y controles, tras un examen los días 10 y 21 posteriores al trasplante. En comparación a los nematodos del grupo control, en los animales previamente inmunizados no se observaron huevos en las hembras obtenidas el día 21 post-trasplante, además se evidenciaron rupturas y daños en su cutícula. Este experimento confirma que los adultos pueden ser dañados y expulsados como resultado de inmunidad adquirida independientemente de la presencia de estadios larvarios.

En contraste, si las ovejas se inmunizan con 4 infecciones seguidas con 100000 L3, interrumpidas cada 7-10 días con fármacos, entonces son capaces de expulsar 30000 L3 en los primeros días de exposición, pero sólo fueron capaces de expulsar hacia el día 21 el 50% de los adultos implantados quirúrgicamente. Del mismo modo ovinos inmunizados por implantación quirúrgica con 9000 adultos de *T. colubriformis* durante 14 semanas, después de someterse a un tratamiento antihelmíntico y reinfectarse con 30000 L3, se aprecia que las larvas no son rechazadas hasta los 7-10 días p.i. lo que sugiere que la inmunidad generada por los adultos es específica de esta fase. Esta experiencia muestra que efectivamente pueden existir mecanismos inespecíficos frente a nematodos

gastrointestinales, pero que también existen mecanismos específicos de expulsión tras exposiciones prolongadas (Emery y cols., 1992).

2.10.4.1.2. Cambios en la morfología

Es característica la detección de cambios en la morfología de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes, como resultado de la resistencia a los mismos. Es el caso de la disminución de tamaño de los nematodos adultos y la falta de la aleta de la vulva en las hembras adultas. Estos cambios se asocian a una inmunidad adquirida y se ha observado en ovinos infectados con *T. circumcincta* (Smith y cols., 1985b; Seaton y cols., 1989b; Stear y cols., 1995b), con *H. contortus* (Coyne y Smith, 1992) y *T. colubriformis* (Douch, 1988) y en bóvidos parasitados con *O. ostertagi*, tras múltiples infecciones larvianas (Michel, 1969; Michel y cols., 1972; Gasbarre y cols., 2001). Coyne y Smith, 1992, describieron que corderos expuestos a 30000 L3 de *H. contortus*, después de una infección previa con 30000 L3 realizadas tres semanas antes, muestran una menor carga de nematodos en comparación con los controles que no habían estado expuestos previamente, y además, de que los vermes recogidos del grupo inmunizado fueron de menor tamaño. De forma similar, Douch, 1988, mostró una reducción del tamaño de las hembras de *Trichostrongylus* spp. en ovinos alimentados en pastos infectados de nematodos, condicionado por el tiempo de exposición y la resistencia del fenotipo de ovino examinado. Además, las ovejas con menores recuentos fecales de huevos, tenían hembras significativamente más grandes que las hembras de vermes procedentes de ovinos con altos recuentos fecales de huevos. Esto sugiere que el desarrollo de inmunidad a los nematodos gastrointestinales se puede manifestar como una reducción del tamaño de los vermes adultos. Esto está en consonancia con trabajos antiguos como los de Michel, 1969, quien demostró que en vacas expuestas diariamente a 1000, 2000 ó 4000 L3 de *O. ostertagi*, se producía una reducción importante en el tamaño de las hembras y padecían una reducción del tamaño de su aleta vulvar, condicionado por el tiempo de exposición a la infección. Y también con el trabajo desarrollado por Smith y cols., 1984b quienes encuentran correlaciones negativas significativas entre títulos de IgA en ganglios linfáticos abomasales y la longitud de los vermes.

En ovejas infectadas semanalmente con 1000 L3 de *T. circumcincta* se encuentran nematodos adultos significativamente mayores tras 8 semanas p.i., comparado a los nematodos adultos recogidos a las 4 semanas p.i. (Seaton y cols., 1989a). Este dato se interpretó como un cambio en la

población de nematodos adultos con una exposición continua a larvas y este menor tamaño se debe al desarrollo de inmunidad por parte del hospedador. Previamente, el menor tamaño de *T. circumcincta* se había asociado a una respuesta de IgA de ovejas inmunes después de la exposición (Smith y cols., 1985b). Más recientemente, Stear y cols., 1995b demostraron que la longitud de los adultos de *T. circumcincta* en ovejas expuestas previamente, está determinada por la influencia de la densidad de nematodos y por la fuerza de la respuesta de IgA local contra el antígeno excretor-secretor de la 4ª fase larvaria. Mientras la IgA actuó contra la L4 se encontró una variación en la longitud de los adultos (38%), y esto no estaba afectado por la carga parasitaria, lo que indica que la carga parasitaria no condiciona la disminución del tamaño.

En ovinos inmunizados por exposiciones previas con *T. circumcincta* u *O. ostertagi*, se detectan, tras desparasitarlos y exponerlos a una nueva infección experimental con *T. circumcincta*, un menor tamaño de los parásitos hembras alojados en el abomaso, un menor número de huevos en el útero y una menor viabilidad de los huevos, si lo comparamos con otro grupo de ovinos expuestos a la misma carga de L3 de *T. circumcincta* y que no estaban inmunizados. Todo esto se relaciona con un estado inmune del hospedador, sin embargo no se detectan diferencias significativas en el número de huevos liberados en las heces (Sutherland y cols., 1999). Por su parte Seaton y cols., 1989b demostraron que la reducción del tamaño se produce antes que se instaure una inmunidad esterilizante y Stear y cols., 1995a que dicho tamaño guarda en el caso de las hembras una fuerte correlación con el número de huevos presentes en el útero.

2.10.4.1.2. Reducción en la fecundidad

La disminución de la fecundidad de los nematodos hembras adultos se considera consecuencia de infecciones ovinas repetidas de *Trichostrongylus colubriformis* (Gibson y Parfitt, 1973; Barnes y Dobson, 1990a; Bisset y cols., 1996), *Haemonchus contortus* (Dineen y Wagland, 1966) y *T. circumcincta* (Smith y cols., 1985b; Stear y cols., 1995b), en cabras infectadas con *T. colubriformis* (Pomroy y Charleston, 1989a) y en vacas con *O. ostertagi* (Michel, 1963).

En un principio se consideraba la reducción de la fecundidad un mecanismo de regulación de la población de nematodos gastrointestinales (Stear y cols., 1997). Los mecanismos que se esconden detrás de esta disminución de la fecundidad pueden ser resultado de una competición

dependiente de la densidad parasitaria y / o por la inmunidad adquirida. Si se requiere de un umbral de carga para la estimulación de la respuesta inmune del hospedador, la disminución de la fecundidad debería ser efecto de esta inmunidad adquirida que sería densidad-dependiente. Sin embargo, existen algunos datos que contradicen esta teoría. Así **Coyne y cols., 1991**, no encontraron cambios en la fecundidad de los nematodos en corderos de 10-12 semanas que pastaban en pastos contaminados por larvas de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp. y *Oesophagostomun* spp., independientemente de la intensidad o duración de la infección. Además no se detectaron cambios en la fecundidad de los nematodos en corderos inmunizados con 30.000 L3 de *H. contortus* y luego expuestos a 30.000 L3 las semanas 3, 9, 12 ó 20 después de eliminar la población de nematodos inmunizantes (**Coyne y Smith, 1992**). De aquí se concluye que no hay efecto densidad dependiente sobre la fecundidad de los nematodos en las especies examinadas. Sin embargo esto no excluye que puedan haber efectos dependientes de la densidad sobre la fecundidad de otras especies de nematodos gastrointestinales (**Balic y cols., 2000**).

Gibson y Parfitt, 1973, observaron que en corderos de 11-16 semanas de edad infectados con 2.000 L3 de *T. colubriformis* 5 días de la semana y sacrificados a intervalos de 5 semanas, las cargas de nematodos adultos disminuyeron hacia la semana 20 y esto se acompañó de una disminución de la fecundidad. A las 45 semanas del inicio de la infección, la media de la eliminación de huevos por hembra era de 3.6 huevos, comparada con la media de 20.4 huevos en la 5ª semana. También se evidenció la disminución de la fecundidad con corderos de 20 semanas inoculados con 200, 600 ó 2.000 L3 por día, durante 5 días de la semana (**Barnes y Dobson, 1990a**). En este caso, la estimación de la fecundidad en huevos / hembra / día fue dependiente de la tasa de infestación. De modo que las ovejas inoculadas con 200 L3 / día, mostraron una menor fecundidad a la 5ª semana, mientras que las ovejas inoculadas con 600 y 2.000 L3 por día mostraron una menor fecundidad a la 1ª y 3ª semana respectivamente.

Razas ovinas seleccionadas por bajos recuentos de huevos fecales, también muestran una reducción en la fecundidad de *Trichostrongylus* spp. a tenor del número de huevos en el útero de las hembras de los nematodos (**Bisset y cols., 1996**). Este resultado ilustra que la disminución de la fecundidad de *Trichostrongylus* spp. es una manifestación de resistencia adquirida en ovinos y que es dependiente del estado genético del hospedador así como de la cantidad de exposición del hospedador a la infección.

En pastos para la cría de corderos infectados con dosis de 50.000 L3 de *T. circumcincta*, el número de huevos por útero de hembras se mostró directamente correlacionado con el tamaño de las hembras, que a su vez fue dependiente de la densidad de nematodos y de la actividad de IgA frente a productos de excreción secreción de L4 (Stear y cols., 1995b). Como la disminución de tamaño se relaciona con la producción de IgA frente a antígenos de L4, los autores sugieren que el desarrollo restringido es una consecuencia de la inmunidad del hospedador frente a las fases de pre-adultos más que un efecto directo sobre los adultos asentados. Sin embargo, los hallazgos de adultos de *T. colubriformis* implantados quirúrgicamente en ovinos inmunizados, fueron dañados y no mostraron de forma visible huevos (Emery y cols., 1992a), lo que indica que la baja fecundidad puede deberse a mecanismos directos frente a adultos. El menor número de huevos en el útero de las *T. circumcincta* presentes en el abomaso, no se asocia con una menor presencia en heces, pero sí con una menor viabilidad (Sutherland y cols., 1999). Jorgensen y cols., 1998 correlacionaron la menor viabilidad de los huevos del parásito al estado inmunitario del animal. Parece existir una menor viabilidad tras la exposición previa a *O. ostertagi* y a *T. circumcincta*, por lo que puede haber una menor contaminación de los pastos (Sutherland, 1999).

2.10.4.2 Manifestaciones de resistencia a larvas de nematodos parásitas del tracto gastrointestinal

2.10.4.2.1 Secuestro del desarrollo larvario (hipobiosis)

El secuestro de las larvas o hipobiosis en la mucosa del hospedador en la fase de L4, es un fenómeno corriente asociado a un incremento de la resistencia del rumiante y se ha reportado en bovinos parasitados con *O. ostertagi* (Michel, 1963), *Haemonchus placei* (Roberts, 1957) y en ovinos parasitados con *H. contortus* (Barger y cols., 1985), *T. circumcincta* (Seaton y cols., 1989b), *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1993) y *T. vitrinus* (Seaton y cols., 1989a).

Sin embargo, la hipobiosis larvaria también está asociada a cambios estacionales, a la densidad de nematodos y a la cepa de nematodo (Eysker, 1997). Hay pocos estudios recientes que estudien el mecanismo de secuestro larvario en rumiantes inmunes, sin embargo, la presencia de L4 inhibidas de *O. ostertagi* no parece comprometer el desarrollo de inmunidad (Claerebout y cols., 1997b). Stear y cols., 1995b encontraron que la

presencia de L4 de *T. circumcincta* secuestradas en ovejas inmunes estaba asociado a la producción de IgA local contra L4 y de IgG1 en el mucus frente a L3.

Un posible papel en el desarrollo del secuestro es la de suministrar un reservorio para reponer vermes adultos expulsados o viejos. Se ha observado que cuando la población de adultos es eliminada por los tratamientos antihelmínticos no eficaces frente a este tipo de larvas, los estados larvarios secuestrados se desarrollan al estado adulto (**Dunsmore, 1963; Michel, 1963**). **Michel, 1963**, en un estudio sobre inmunidad adquirida a *O. ostertagi* en vacas a las que se les administró dosis diarias orales de 1500 L3, concluyó que el mantenimiento de la carga de nematodos adultos fue resultado del re-emplazamiento desde un "pool" de larvas inhibidas más que por la adquisición de nuevas larvas. Por lo tanto, independientemente de la condición que induce el secuestro durante el desarrollo, este fenómeno parece estar asociado con la protección de los estadios larvarios en desarrollo frente a ambientes hostiles y sirve para el mantenimiento de la población adulta de nematodos (**Balic, 2000**).

Sin embargo, la dosificación semanal continuada de ovejas con L3 de *H. contortus* termina provocando el rechazo de los adultos a las 15 semanas de iniciado el experimento, demostrando que el re-emplazamiento de adultos expulsados desde una reserva del "pool" de larvas en hipobiosis es insuficiente para mantener una población de nematodos adultos en animales fuertemente inmunes (**Barger y cols., 1985**).

Esta situación es discutida por **Michel, 1963**, para el caso de *O. ostertagi*, quien considera que el desarrollo de resistencia al establecimiento de las larvas en bovinos inmunes también reduce la disponibilidad del "pool" de larvas inhibidas capaces de sustituir a los adultos, resultando eventualmente en la desaparición de la población de nematodos en animales inmunizados. En exposiciones naturales de los rumiantes a larvas de nematodos gastrointestinales, variando la inmunidad entre animales, es probable que el desarrollo de las larvas secuestradas dentro de hospedadores inmunes contribuyan significativamente al mantenimiento de la carga de adultos, y consecuentemente a la diseminación de la progenie necesaria para el mantenimiento del parásito en la población. La amplia presentación de este fenómeno en diferentes especies de tricostrongídeos sugiere que se trata de una estrategia de supervivencia afortunada.

2.10.4.2.2. Fallo de las larvas infectivas para establecerse en un hospedador

La principal manifestación de inmunidad adquirida por infecciones con nematodos gastrointestinales en rumiantes es la reducción del número de larvas establecidas en los tejidos y que se desarrollan hasta adultos. Numerosos estudios sobre la resistencia a las larvas infectantes de los nematodos han establecido una serie de claves, que incluyen:

- (1) La resistencia al establecimiento de las larvas se expresa más fuertemente tras múltiples exposiciones larvarias.
- (2) La resistencia al establecimiento es dependiente de la fase evolutiva, tanto en términos de estimulación de la inmunidad del hospedador, como en el desarrollo de mecanismos efectores del hospedador.
- (3) La resistencia generada frente a larvas de una especie de nematodo, es válida en exposiciones homólogas y puede actuar contra otras especies heterólogas presentes en el mismo tejido.
- (4) La existencia de múltiples mecanismos de expulsión que impiden el establecimiento de las larvas (Balic y cols., 2000).

a) Se requieren múltiples exposiciones larvarias para inducir resistencia

Los primeros investigadores establecieron que el fallo de las larvas a la hora de establecer una infección se evidenciaba generalmente después de múltiples infecciones larvarias (Laffau y cols., 1981; Adams, 1983). Trabajos posteriores, utilizando larvas infectantes radiomarcadas con selenio⁷⁵, una técnica que no afecta a la viabilidad del nematodo (Georgi y LeJambre, 1983), concluyeron que las infecciones larvarias múltiples provocan resistencia al establecimiento de *T. vitrinus* (Seaton y cols., 1989a), *T. circumcincta* (Seaton y cols., 1989b) y *H. contortus* (Barger y cols., 1985; Miller, 1983) después de 4 a 8 semanas de exposición repetida. La disminución del establecimiento de *T. colubriformis* sucede entre la 7^a-14^a semanas de exposición diaria dependiendo de la dosis de exposición de 2000 ó 200 L3 respectivamente (Barnes y Dobson, 1990b). El menor establecimiento de las larvas de *O. ostertagi* requiere de periodos más prolongados (21-35 semanas), tras múltiples exposiciones larvarias (Michel,

1973; Claerebout y cols., 1996), aunque la inmunidad ha sido observada tras 5 infecciones inmunizantes abreviadas (Almeria y cols., 1998).

La inmunización con antígenos de L3 de *Trichostrongylus* spp. genera una respuesta inmunitaria que permite el rechazo de las L3 a los 1 ó 2 días de la inoculación (Emery y cols., 1992a), pero resulta menos efectiva frente a adultos. Esta respuesta, se denomina de “rápido rechazo”, y puede precipitarse y prevenir el establecimiento de L3 de *H. contortus* a los 30 minutos de inoculación de las L3 en el abomaso (Jackson y cols., 1988) o bien eliminar las L3 de *T. colubriformis* desenvainadas tras 15 minutos en intestino delgado y a las 4 horas post-inoculación en el píloro en ovinos (McClure y Emery, 1994). En otros protocolos de inmunización, por el contrario, ovinos inmunizados con adultos de *T. colubriformis* eliminan la mayoría de las larvas a las que han sido expuestos durante la segunda semana de infección (Emery, y cols., 1992b). Del mismo modo se ha observado la rápida eliminación de adultos de *H. contortus* tras la ingestión de L3 de *Haemonchus*, a lo que se ha denominado “autocuración” (Steward, 1953; Gordon, 1968).

La valoración de los distintos estados parasitarios para el establecimiento de inmunidad en vacas fue realizada por Gasbarre, 1988, tratando a las vacas sin dar tiempo a que las L3 y las L4 llegaran a ser adultas. Encontró una cantidad significativamente menor de adultos en terneros después de tres inoculaciones con L3 truncadas a los 9 días. Esto sugiere que la mortalidad de las larvas en las glándulas abomasales puede inducir una fuerte respuesta inmunitaria protectora. Sin embargo en otro trabajo similar realizado por Claerebout y cols., 1996, no se desarrolló inmunidad en terneros después de 21 semanas de infecciones truncadas en estado de L3 o L4.

b) Naturaleza específica de la fase del ciclo en el desarrollo de la resistencia

El desarrollo de la resistencia a la llegada de las larvas y el subsiguiente fallo en el establecimiento de la infección, parece ser específica de la fase evolutiva, y el efecto se manifiesta generalmente de forma independiente a otros fenómenos de inmunidad adquirida. Esta afirmación la apoya algunos estudios como los realizados por Barger y cols., 1985, al observar la incapacidad de establecerse de las L3 de *H. contortus*, en ovinos expuestos durante 8 semanas consecutivas a dosis infectantes de 600, 1200, 2400 L3s del parásito, sin embargo este mecanismo defensivo no parece

afectar a los vermes adultos. De forma similar, experimentos en los que la infección es truncada por el uso de antihelmínticos, proporcionan evidencias adicionales para justificar la naturaleza específica (respecto a la fase evolutiva) de la resistencia. Así infecciones interrumpidas de *T. colubriformis* previenen del asentamiento de nuevas larvas, este efecto no se manifiesta frente a vermes adultos transplantados (Emery y cols, 1992a).

Estas mismas peculiaridades de la resistencia a la infección se han observado en bovinos inoculados con *O. ostertagi*, sin embargo el desarrollo de resistencia al asentamiento de L3 del parásito evoluciona de forma más lenta que en el caso anterior (Michel, 1973; Claerebout y cols., 1996), al requerirse 5 infecciones truncadas a los 9 días post-infección con tratamientos antihelmínticos (Almeria y cols., 1998).

c) Expresión de la inmunidad específica de especie e inespecífica.

Ovejas seleccionadas por su alta resistencia a una determinada especie parasitaria gastrointestinal son más resistentes a otras especies de nematodos si las comparamos a otras ovejas de baja resistencia (Woolaston y cols., 1990; Gray y cols., 1992; Sreter y cols., 1994). Esto indica que el genotipo de una oveja determina una resistencia potencial a muchas parasitosis gastrointestinales. Sin embargo, el desarrollo de la inmunidad es específica para cada especie de nematodo. Esta evidencia directa de la naturaleza específica de especie de la respuesta está proporcionada por estudios de exposiciones múltiples. Ovejas inmunizadas con 2 dosis de 20000 L3 irradiadas de *T. colubriformis* fueron incapaces de expulsar larvas de otros nematodos del intestino delgado como *T. vitrinus* o *Nematodirus spathiger*, cuando estas otras especies se inocularon separadamente, sin embargo fue capaz de eliminar las tres larvas cuando se administraron conjuntamente (Dineen y cols., 1977). De forma similar, ovejas inmunizadas con infecciones interrumpidas de *T. colubriformis* fueron capaces de expulsar larvas del intestino, cuando se inocularon solas las L3 de *T. colubriformis* o combinadas con *N. spathiger* o *T. circumcincta*, pero no fueron capaces de expulsar por sí solas a las L3 de *N. spathiger* si se inoculaban estas solas (Emery y cols., 1993). En contraste, en las mismas ovejas, las *T. circumcincta* que se localizaban en el abomaso, no fueron expulsadas, ya sea al administrarlas solas o conjuntamente con *T. colubriformis*. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Barnes y Dobson, 1993, a quienes, ovinos inmunizados durante tres semanas con dosis de 2000 L3 de *T. colubriformis* fueron inmunes al establecimiento de

las larvas de *T. colubriformis* a las 18 semanas, pero no resultaron inmunes a larvas de nematodos abomasales como *H. contortus* o *T. circumcincta*.

Estas observaciones indican que el desarrollo de resistencia para el establecimiento de las larvas en los hospedadores rumiantes es específico de especie, en infecciones inmunizantes mono-específicas. Sin embargo, mientras que el detonante de la expulsión de las fases larvarias es específico de especie, los efectos de la expulsión pueden ser inespecíficos y que por tanto, especies heterólogas que ocupan el mismo órgano, puedan ser expulsadas (Balic y cols., 2000)

2.10.4.3 Respuesta efectora del abomaso. Particularidades

La mayoría de los trabajos sobre la respuesta a antígenos parasitarios por la mucosa se han realizado sobre el intestino (Neutra y cols., 1996). Así mismo la metodología utilizada en el seguimiento de esa respuesta resulta menos sensible para el caso del abomaso (Almeria y cols., 1997a).

Tanto en los ganglios mesentéricos como los ganglios regionales del abomaso muestran a los 3 ó 4 días post infección un marcado incremento en su tamaño. Al cabo de 4 ó 5 semanas post-inoculación, su peso es 20 a 30 veces superior al observado en ganglios de bovinos no parasitados de la misma edad y raza (Gasbarre, 1986; 1994; Canals y cols., 1997). Este aumento del tamaño en los linfonódulos se debe tanto a un incremento del número de linfocitos reactivos al parásito como linfocitos que no reconocen antígenos parasitarios (Gasbarre, 1986). Estudios realizados por Gasbarre, 1994 y Canals y cols., 1997, encuentran un incremento de subpoblaciones linfocitarias B y T (con receptores γ - δ) en detrimento del porcentaje de linfocitos T convencionales (α - β).

Paralelamente, en abomaso también aumenta el número de linfocitos en la mucosa, hasta 8 veces en tan sólo 4 días (Almeria y cols., 1997a). Además, las subpoblaciones linfocitarias siguen la misma evolución que la que acontece en los ganglios. Esto parece indicar que en el abomaso se produce una rápida captura de antígenos, que alcanzan los linfonódulos y a los 4 días los linfocitos ya están combatiendo el parásito desde la mucosa del abomaso (Gasbarre, 1997a).

Existen diferencias funcionales y morfológicas entre el abomaso y el intestino. Muchos cambios estructurales y funcionales se han descrito en intestinos parasitados por diversos tricostrongídeos (Manson-Smith y cols.,

1979; Castro y Harari, 1982; Bell y cols., 1984). La mayoría de los autores asumen que dichos cambios modifican el medio donde vive el parásito, favoreciendo de este modo su expulsión. En los abomasos se han demostrado también algunos cambios morfológicos, como la atrofia en la parasitación por *Ostertagia* (Murray, 1969; Michel y cols., 1972), pero no está claro que estos cambios puedan favorecer el rechazo parasitario (Gasbarre, 1997a), aún cuando diversos autores han demostrado la existencia en la mucosa del abomaso de células inmunitariamente efectoras en parasitaciones por *O. ostertagi* (Baker y cols., 1993a; 1993b).

2.10.5 Mecanismos de resistencia a los tricostrongídeos

En ovinos no inmunizados previamente, se desarrollan inicialmente el 70% de L3 de *T. colubriformis* (Dobson y cols., 1990), siendo más bajo el éxito de implantación para *T. circumcincta* y *H. contortus*. En el caso de *T. colubriformis*, esta tasa inicial de establecimiento puede aumentar en ovinos tratados previamente con corticosteroides, lo que sugiere una pantalla de inmunidad innata. Tras repetidas exposiciones de los ovinos a *T. colubriformis*, *H. contortus* o *T. circumcincta* (1000-2000 L3 por día) durante 5 ó 6 semanas, el porcentaje de establecimiento de las L3 se va reduciendo progresivamente hasta ser menor del 5% durante las siguientes tres semanas (Dobson y cols., 1990). En otros trabajos también se considera que exposiciones repetidas a L3 de *H. contortus*, *Ostertagia* spp. o *Trichostrongylus* spp. confieren una mayor resistencia a la infección (Chiejina y Sewell, 1974; Smith y cols., 1983b; Barger y cols., 1985), tanto por *Ostertagia ostertagi* en bovinos (Holtenius y col, 1983) y *Trichostrongylus colubriformis* en cabras (Cameron, 1984; Pomroy y Charleston, 1989a) si bien otros autores han evidenciado lo contrario con infecciones repetidas de L3 de *H. contortus* (Pomroy y Charleston, 1989b).

La inmunidad específica anti-verme puede ser inducida por “vacunación” L3 irradiadas (Adams, 1978) o por grandes dosis de L3 repetidas e interrumpidas (Emery y cols., 1992a). En estos casos, la inmunidad frente a los parásitos adultos es más reducida comparada con la exposición a infecciones “completas”, y lo mismo sucede al inmunizar ovinos únicamente con adultos (Emery y cols., 1992b). Así, ovinos inmunizados previamente con L3 de *O. ostertagi* o con *T. circumcincta* no evidencian diferencias significativas en el establecimiento de adultos ni en los recuentos de huevos en heces al compararlos con otros animales no inmunizados previamente. Sin embargo, en las ovejas que habían tenido un

contacto previo con el parásito se observó una menor viabilidad de los huevos y un tamaño menor en las hembras adultas, siendo las más pequeñas, las recogidas de los abomasos de aquellos animales que fueron inmunizados con L3 de *T. circumcincta*, luego las procedentes de ovinos inoculados previamente con *O. ostertagi* y las hembras de *Ostertagia* más grandes se obtuvieron de las ovejas expuestas por vez primera. También se encontraron diferencias significativas en el número de huevos presentes en el útero de las hembras, encontrándose un menor número en los parásitos recogidos de los animales previamente expuestos (**Sutherland y cols., 1999**). Estos fenómenos también se han constatado en inoculaciones experimentales con L3s de *T. colubriformis* y *H. contortus* después de prolongar la inoculación de dichas larvas durante 16-20 semanas y 20-24 semanas consecutivas respectivamente (**Dobson y cols., 1990; Barger y cols., 1985**).

A medida que se dispone de anticuerpos monoclonales y otros reactivos, aumentan el número de trabajos que se realizan intentando caracterizar la respuesta inmunitaria que se establecen al desarrollar estos mecanismos de resistencia. Este tipo de estudios cuentan con ciertas dificultades en bovinos por el desarrollo de anafilaxis a inmunoglobulinas murinas (**Howards y cols., 1992**). Si bien no se conocen con exactitud los mecanismos que se ponen en juego al desarrollarse la resistencia de los rumiantes frente a nematodos gastrointestinales, parece claro el papel predominante de la respuesta inmune mediada por células. Algunos ensayos apoyan esta afirmación como los realizados por **Gills y cols., 1992a**, al observar que inoculaciones de anticuerpos monoclonales contra CD4 dan lugar a que el rechazo acelerado a vermes adultos de *H. contortus* se vea afectado.

La importancia de la inmunidad mediada por células en la inmunidad frente a *Haemonchus* y a *Ostertagia* también ha sido constatada por estudios de transferencia celular. Tras transferir linfoblastos y linfocitos procedentes de linfonódulos gástricos de ovinos inmunes a sus gemelos no inmunizados, se provocó la inducción de IgA y la respuesta abomasal de mastocitos, así como protección (**Smith y cols., 1984a; Smith y cols., 1986**). La naturaleza del mecanismo de rechazo transferido / inducido por el donante de linfocitos no se conoce. Lo que sí parece claro es que este tipo de respuesta muestran una gran variabilidad, dependiendo de factores tanto relacionados con el hospedador como con la especie parasita en cuestión (**Hanrahan y cols., 1984; Snider y cols., 1985**).

Sin embargo también ha sido posible transferir la inmunidad frente a *H. contortus* mediante suero hiperinmune de ovejas vacunadas con antígenos adultos del parásito (Smith, 1993).

Por tanto los distintos apartados pueden apuntar que la resistencia a los nematodos gastrointestinales en los rumiantes se puede manifestar de muchas formas. Así mismo la necesidad de sufrir infecciones múltiples para desarrollar la resistencia también parece indicar que para poder conseguir una inmunidad se requiere traspasar un umbral de estimulación. Este estímulo puede ser antigénico, sin embargo, también puede ser de naturaleza física, como daños mecánicos o enzimáticos provocados en los tejidos del hospedador por larvas o adultos. Incluso con similares protocolos de infección, las diferentes especies de nematodos provocan respuestas variables, lo que señala que los umbrales son específicos para cada especie parasitaria, e incluso puede variar con la fase parasitaria. Como ya dijimos, no se conocen completamente los mecanismos responsables de esta resistencia. Sin embargo, algunos cambios en la mucosa y en los tejidos linfoides asociados se observan conjuntamente con el desarrollo de inmunidad en los rumiantes, estos son:

- (1) Hiperplasia de mastocitos en la mucosa
- (2) Aparición de leucocitos globulares.
- (3) Eosinofilia.
- (4) Incremento en la producción de mucus y de la presencia de sustancias inhibitoras en este mucus.
- (5) La producción de anticuerpos específicos (Balic y cols., 2000).

Muchos son los cambios que se presentan localmente como resultado del desarrollo de una respuesta inmunitaria frente a los nematodos gastrointestinales. Entre estos, se incluyen cambios en las poblaciones locales de linfocitos T y B, fibras nerviosas, mastocitos / células globulares, concentraciones en el moco de anticuerpos, e integridad del epitelio y lámina propia.

2.10.5.1 Teoría inmunitaria común de la mucosa

A la mucosa se le atribuye entre otras funciones la expansión de la diversidad de inmunoglobulinas y de la producción de linfocitos B para la totalidad del sistema inmunitario (Reynolds, 1987; Reynaud y cols., 1991). También puede ser importante en el desarrollo extratímico de las células T.

A lo largo de la vida es el principal enclave de expansión periférica de los linfocitos (McClure y cols., 1988) y su respuesta inicial al antígeno puede influir en los posteriores encuentros de éste con el sistema inmune. También se reconoce que su función más relevante durante la enfermedad del tracto gastrointestinal es la protección local (Landsverk y cols., 1991; McClure y Emery, 1993).

La respuesta local que desarrollan los rumiantes a los nematodos gastrointestinales se engloba dentro de una compleja respuesta inmunitaria que se conoce como "teoría inmunitaria común de la mucosa". Esta teoría se basa en la evidencia de la circulación de células en un área restringida de la mucosa (Husband, 1987; Lascelles y cols., 1986; Sheldrake, 1989). En realidad, hoy en día se carece de trabajos que demuestren de forma concluyente la sensibilización local por la exposición de la mucosa a antígenos en rumiantes, y la teoría que se plantea se basa en modelos desarrollados en otras especies. Se postula que los linfocitos que migran a través del intestino normal, alcanzan vía hemática el área interfolicular de las placas de Peyer y la base de los villis y marchan por los vasos linfoides eferentes y probablemente también por los vasos sanguíneos. Los antígenos presentes en el lumen son capturados por células de la mucosa especializadas (células M) dispuestas sobre las placas de Peyer, donde los antígenos serán procesados y presentados por macrófagos subepiteliales o por células dendríticas a las células T. Los antígenos solubles también pueden ser capturados por células epiteliales, macrófagos subepiteliales o por células dendríticas, o penetrar entre las células epiteliales y ser presentadas a células T de la lámina propia o a las células T intra-epiteliales. La resultante activación de las células T induce la diferenciación y estimulación de los linfocitos B, y las células B y T migran a través de los vasos linfáticos aferentes para drenar a los linfonódulos. Aquí, proliferan y se diferencian, para recircular vía vasos eferentes y sanguíneos a la lámina propia a lo largo del tracto gastrointestinal. Una segunda exposición al antígeno induce una respuesta local antígeno-específica de IgA, una producción de citocinas, así como una respuesta inflamatoria y linfoide.

Algunos de los aspectos de esta teoría general se han observado en ovinos y bovinos. La captura de antígenos por células epiteliales M se aprecia en el recto y placas de Peyer del yeyuno (Liebler y cols., 1991; Landsverk, 1987), sin embargo, la clásica manera de presentación de antígenos por las células epiteliales puede no ocurrir porque estas células no expresan la molécula MHC-II (Press y cols., 1991; Gorrell y cols., 1988b; McClure y cols., 1992).

También existen algunos datos sobre la migración de los linfocitos del intestino en los rumiantes. Algunos trabajos detallan el sistema común de la mucosa y el origen y destino de los linfocitos que emigran por el intestino ovino (**Husband, 1985; Reynolds, 1988**). Hay evidencias de que los linfocitos que abandonan el intestino retornan preferentemente a él afectando este fenómeno de manera especial a los linfocitos de memoria, previamente expuestos al antígeno. Sin embargo, las bases de esta migración no aleatoria aún no han sido descifradas. En otras especies, se puede explicar, al menos parcialmente, por la existencia de lugares específicos del endotelio vascular de vasos intestinales y por el tropismo de los linfocitos circulantes por estos receptores. Además, la inflamación que acontece en estas infecciones, y de manera especial cuando se hace crónica, puede incrementar la migración de las células T por adhesión a proteínas matrices extracelulares o modulados por citocinas.

La activación por antígenos puede también modular la expresión de moléculas de superficie, y puede estar también influenciada directa o indirectamente por neuropéptidos locales (**McClure y Emery, 1994**).

Esta migración intestinal de los linfocitos ha sido comprobada por **McClure y cols., 1991** mediante inoculaciones con *Trichostrongylus* spp., al mostrar que el desafío intestinal induce en el sistema inmune inicialmente un rápido incremento en la disponibilidad de células T en el intestino, un rápido secuestro en la lámina propia y la activación de células T de memoria. A continuación se produce un incremento de actividad en el nódulo drenado y la vuelta al intestino de las células de memoria, (7 días después), y posteriormente a la sangre.

2.10.5.2 Células efectoras

Las principales células efectoras típicamente asociadas a las infecciones por nematodos gastrointestinales son los mastocitos y los eosinófilos. Por su gran importancia en alergias humanas, han sido ampliamente estudiados en ratones y en el propio hombre (**Costa y cols., 1997; Kay y cols., 1997; Weller, 1997**).

Se conoce menos el papel de las células epiteliales productoras de mucus (células globulares) como células efectoras en infecciones gastrointestinales, aunque la hiperplasia de células globulares en las parasitaciones por nematodos gastrointestinales está bien documentada, y

parece estar regulada por la respuesta inmune adaptativa (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.3 Mastocitos y Basófilos

Los mastocitos y los basófilos proceden de una misma célula madre hematopoyética y tienen similares productos y mecanismos de activación, incluyendo la reacción con IgE por parte de receptores altamente afines sobre la superficie celular. Las principales diferencias recaen en las citocinas requeridas para su crecimiento y diferenciación así como su localización. Los mastocitos residen y maduran en los tejidos, mientras que los basófilos circulan y maduran en la corriente sanguínea, desde donde pueden ser rápidamente movilizados hacia tejidos inflamados. Los mastocitos han sido más consistentemente estudiados en las parasitaciones por helmintos, y se organizan en una población heterogénea, clasificada como mastocitos del tejido conectivo y mastocitos de la mucosa, basada esta clasificación en la presencia predominante de diferentes proteoglicanos, heparina y condroitin sulfato, en sus gránulos, lo que resulta en diferentes propiedades tintoriales en las secciones histológicas. Mas allá de esta heterogeneidad, dentro de estas poblaciones de mastocitos se han detectado varias proteasas asociadas a los gránulos, cuya expresión varía en función de su localización tisular así como de los compartimentos tisulares (**Scudamore y cols., 1997**). Experimentos con ratones deficientes en mastocitos, demuestran que un precursor común puede aumentar tanto los mastocitos del tejido conectivo como los mastocitos de la mucosa, lo que sugiere que el micro hábitat tisular podría ser crucial en la expresión fenotípica (**Gurish y cols., 1995**). Además, es posible que la propia heterogenicidad detectada en los tejidos sea consecuencia de la expresión diferencial y reversible de las proteasas de los mastocitos durante las diferentes fases de la inflamación (**Friend y cols., 1998**). En la mucosa, los mastocitos pueden residir en la lámina propia o en el epitelio. Los gránulos de los mastocitos intra epiteliales son generalmente mayores que los tisulares, particularmente en los rumiantes en los que se detectan células globulares. Se considera que estos mastocitos intra epiteliales están en su fase final como célula efectora, en una localización idónea para descargar sus productos en el lumen y en el epitelio, donde podrán afectar el micro hábitat de los parásitos con mínimos efectos sobre la arquitectura tisular del hospedador. Los leucocitos globulares también se describen en el lumen del tracto gastrointestinal en ovinos parasitados (**Stankiewicz y cols., 1993**).

Los mastocitos expresan sobre su superficie celular un receptor de la tirosin kinasa, el c-kit, que es un ligando del factor celular de stem (SCF; Factor Estimulador de células madre hematopoyética), producido por un gran número de células, entre las que se encuentra las epiteliales y que es central en el desarrollo y supervivencia de los mastocitos en roedores normales. La expansión de los mastocitos en los animales parasitados es, sin embargo, dependiente de citocinas producidas por células T activadas, en particular la IL-3 (Lantz y cols., 1998). Los mastocitos de los tejidos pueden aumentar su número a través del reclutamiento y maduración de precursores desde la circulación, o, más rápidamente, a través de la migración de mastocitos maduros procedentes de otros tejidos (Wang y cols., 1998a).

Basófilos y mastocitos contienen un gran número de potentes mediadores de actividad biológica, algunos de los cuales están preformados y almacenados en gránulos citoplasmáticos (proteoglicanos, proteasas, histamina) y pueden liberarse en minutos tras la estimulación (mediadores primarios). Los mediadores secundarios son sintetizados *de novo* después de una apropiada estimulación e incluye mediadores lipídicos como la prostaglandina D2 (PGD2), leucotrienos (por ejemplo, LTC4 y LTE4) y factor activador de las plaquetas (PAF) así como una creciente batería de citocinas (IL-1, 3,4,5,6,8,10,13, TNF α , GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo: MIP-1 α , MCP-1, RANTES). Algunas citocinas, incluyendo el TNF α y la IL-4 pueden ser tanto preformadas y almacenadas como liberadas rápidamente así como nuevamente sintetizadas si persiste la activación. El efecto de los mediadores derivados de los mastocitos en los hospedadores incluyen:

- (1) Contracción del músculo liso (histamina, serotonina, prostaglandinas, PAF y leucotrienos).
- (2) Incremento en la permeabilidad vascular (histamina, serotonina, leucotrienos).
- (3) Incremento en la secreción de mucus (histamina, leucotrienos y proteasas).
- (4) Degradación de las membranas basales de los vasos sanguíneos y de las células epiteliales (proteasas).

El conjunto de efectos de estos mediadores es similar al descrito en las respuestas de hipersensibilidad inmediata (Crowe y Perdue, 1992; McKay y Bienenstock, 1994).

Otra consideración importante en cuanto a los mecanismos efectores iniciados por los mastocitos durante el rechazo parasitario, es su fuerte asociación con el sistema nervioso gastrointestinal (**McKay y Bienenstock, 1994**). La degranulación de los mastocitos inducida por los antígenos induce una estimulación de los nervios entéricos y provoca la liberación de acetilcolina. Se ha sugerido que esta interacción entre los mastocitos y las células nerviosas llevan a generar un programa de “alarma” en el tracto gastrointestinal, resultando en un incremento de la secreción de agua y de la fuerza de propulsión gastrointestinal. Creando un mecanismo de “barrido / lavado” desencadenado con el propósito de eliminar el parásito de la luz gastrointestinal y de la superficie epitelial (**McKay y Bienenstock, 1994; McClure y Emery, 1994**). Así, el sistema nervioso estaría integrado en la respuesta inmune adaptativa. La interacción entre los mastocitos y el sistema nervioso se establece en dos vías bien diferenciadas, por una parte varios neuropéptidos pueden causar una degranulación diferencial de los mastocitos y por otro que la administración de factor de crecimiento nervioso (NGF) puede provocar hiperplasia de mastocitos (**Balic y cols., 2000**). Aunque muchos neuropéptidos, hormonas y linfocinas interactúan en la fisiología gastrointestinal y en la inmunidad, la IL-6 es la única linfocina con capacidad para provocar actividad de crecimiento nervioso (**Hoffman y Hinton, 1991**).

La activación inducida por los mastocitos puede ocurrir tras un contacto directo con el patógeno o, más probablemente, después del contacto con moléculas solubles derivadas del patógeno o generadas por el tejido después de una invasión del mismo por el agente morbosos. A parte de la bien conocida activación de los mastocitos dependientes de la IgE que ocurre inmediatamente después de la exposición a un antígeno en animales sensibilizados, la activación de los mastocitos y su degranulación puede también ser detonada directamente por estímulos inespecíficos y, como parte de una respuesta inmune innata, a través de productos de la activación del complemento. Por cualquiera de estos caminos, los mastocitos y los basófilos pueden contribuir al reclutamiento de células en los lugares de inflamación / infección y la generación de respuestas inmunes innatas y adaptativas (**Abraham y Arock, 1998**) así, puede ser la célula efectora responsable de los cambios fisiopatológicos durante las reacciones alérgicas (**Costa y cols., 1997; Meeusen, 1999**), y a la vez conferir protección frente a las infecciones parasitarias (**Miller, 1984; 1996**).

Como quiera que la mayor parte de los aspectos biológicos de los mastocitos han sido elucidados en los modelos de roedores, se debe incidir

en el estudio de la activación de los mastocitos en los rumiantes. Uno de estos aspectos podría ser la identificación de proteasas de mastocitos (Miller, 1996; Scudamore y cols., 1997). En ovinos, una proteasa de mastocitos (últimamente conocida como quimasa, SMCP-1) se identificó en mastocitos localizados en la mayoría de los tejidos excepto la piel, y principalmente en el tracto gastrointestinal y está clonada y completamente caracterizada (McAleese y cols., 1998). Una proteasa similar con alta homología a SMCP-1 se ha identificado hace algunos años en mastocitos caprinos (Macaldowie y cols., 1998). Una triptasa también se ha identificado en mastocitos bovinos (Kuther y cols., 1998). La triptasa de los mastocitos bovinos se ha secuenciado así como el inhibidor de la tripsina pancreática presente en algunos gránulos de los mastocitos bovinos (Pallaoro y cols., 1996).

En cuanto a la hematopóyesis de los mastocitos de los rumiantes parece estar bajo el control de factores y condiciones similares a las descritas en los roedores, como demuestra el hecho de que la IL-3 recombinante y otros SCF (factores de estimulación de colonias) recombinante ovino son importantes en la generación y supervivencia de mastocitos en cultivos de médula ósea ovina (Macaldowie y cols., 1997).

Algunos ensayos han revelado la cronobiología de la activación de estos elementos celulares en rumiantes sensibilizados a nematodos gastrointestinales. Así, en ovejas inmunizadas con *Trichostrongylus* spp. se produce un importante aumento de proteasas - procedentes de los mastocitos - en el contenido duodenal el primer día tras el desafío con L3 de *Trichostrongylus* (McClure y Emery, 1994) y en los ganglios linfáticos gástricos entre 1 a 3 días después de la inoculación de ovinos inmunes con L3 de *H. contortus* (Huntley y cols., 1987).

Datos histológicos también ratifican el desarrollo de mastocitos de la mucosa tras la inducción de la respuesta inmune mediada por células siguiente a la producción de IgG. El aumento en el número de mastocitos / leucocitos globulares (Huntley y cols., 1984) no ocurre en secciones intestinales hasta 5 ó 6 semanas después de una infección primaria con *H. contortus* o *T. colubriformis*, respectivamente (Barker, 1973; Sommerville, 1956) y el número de mastocitos, y la actividad inhibitoria de la migración larvaria presentan una relación inversa con la liberación de huevos desde la 6 a la 8ª semana después de la infección con *T. colubriformis* (McClure y Emery, 1994). Estos resultados sugieren que los mastocitos de la mucosa pueden contribuir a los cambios del medioambiente intestinal que participan

del rechazo de los adultos ya establecidos (Dineen y cols., 1977). El incremento en el número de mastocitos / leucocitos globulares se ha descrito localmente en animales inmunes a *Haemonchus*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus* (McClure y cols., 1992; Smith y cols., 1984b; Snider y cols., 1988; Sommerville, 1956; Douch y cols., 1986; Ritchie y cols., 1966; Klesius, 1988; Miller, 1986; Huntley y cols., 1992a) pudiendo estar modificado este número en función del tiempo post-infección y el grado de inmunidad del hospedador. No sólo incrementan localmente los mastocitos, en ovinos inmunes a *Trichostrongylus*, su número está aumentado en abomaso, yeyuno e íleon distal (McClure y Emery, 1994), y los mastocitos de la mucosa de todas esas localizaciones son movilizados por antígeno larvario para liberar proteasas en cantidades similares (McClure y Emery, 1994).

Las consecuencias de todos estos mecanismos de activación y la liberación de mediadores por parte de las células tendría grandes repercusiones. Son varios los autores que atribuyen a los leucocitos globulares y mastocitos de la mucosa la expulsión inmunitaria de los nematodos gastrointestinales (Huntley y cols., 1982; Miller, 1984; Stear y cols., 1995a; Snider y cols., 1981; Wiggin y Gibbs, 1989) y otros consideran que el número de leucocitos globulares presentes en la mucosa, junto a la concentración local de anticuerpos serían indicativos del grado de resistencia a los nematodos gastrointestinales en las especies rumiantes (Smith y cols., 1984b; Smith y cols., 1985b; Seaton y cols., 1989b; Yong y cols., 1991).

2.10.5.4 Efecto directo del mucus y de los mediadores de la inflamación sobre los nematodos

Es probable que la capa de mucus que se dispone sobre el tejido gastrointestinal juegue un papel determinante en la exclusión de las larvas desde los nichos tisulares normales y en la resistencia a la infección (Lee y Ogilvie, 1981; Miller y cols., 1983). Se considera que las inmunoglobulinas (Ig) y los cambios cuantitativos y cualitativos en la mucosa por sí mismos juegan un papel en el efecto barrido del mucus gastrointestinal frente a los nematodos gastrointestinales (Nawa y cols., 1994). También se ha mostrado que el mucus de las ovejas resistentes, contiene sustancias capaces de paralizar larvas infectantes de nematodos. En este sentido Douch y cols., 1983, mediante bioensayos sobre agar, demostraron que el mucus intestinal de ovejas resistentes a *T. colubriformis* por infecciones repetidas mostraban una significativamente mayor actividad inhibidora de la migración larvaria

en comparación al mucus derivado de ovejas libres de nematodos. Además, ovejas inmunes expuestas a 30000 L3 de *T. colubriformis* muestran incrementos significativos de actividad inhibitora en el mucus intestinal, alcanzando su pico hacia el 8º día tras la exposición mientras que no hay cambios en dicha actividad en el mucus de ovejas que reciben una infección primaria (Jones y cols., 1994).

La actividad inhibitora de la migración larvaria parece actuar inespecíficamente, puesto que el mucus de ovejas resistentes a *T. colubriformis*, exhiben también actividad inhibitora para larvas de *H. contortus*, *N. spathiger* y *T. circumcincta* (Douch y cols., 1983).

Si bien se pensó que el efecto inhibitor producido por el mucus tenía su origen en el contenido de este de histamina y prostaglandinas (E_1 , E_2), lo cierto es que los niveles de histamina encontrados en el mucus de ovejas inmunes a *T. colubriformis* son insuficientes para producir el grado de inhibición observado (Douch y cols., 1983; 1986). Por el contrario la actividad inhibitora de la movilidad larvaria se asoció con la sustancia de anafilaxis (SRS-A), sugiriendo con ello que los leucotrienos, que son los principales constituyentes del SRS-A, podrían ser los componentes activos en los ensayos de actividad inhibitora de la motilidad larvaria (Douch y cols., 1983). Sin embargo, Gray y cols., 1992, no pudieron encontrar correlaciones entre los niveles de leucotrienos y la actividad inhibitora de la actividad larvaria en el mucus de ovejas en pastoreo sobre pastos con contaminación mixta de nematodos. Así mismo, tras purificar leucotrienos a concentraciones de 5×10^{-4} mmol l⁻¹ no tuvieron efecto sobre las larvas en ensayos sobre inhibición de la motilidad larvaria (Daugochies y Ruttkowski, 1998).

Por otro lado, las larvas de nematodos producen leucotrienos (LTB₄) que ejercen una función estimulante sobre el desarrollo y motilidad larvaria (Daugochies, 1996; Daugochies y Ruttkowski, 1998). Difícil reconciliar este papel positivo de los leucotrienos larvarios, con los efectos negativos atribuidos a los leucotrienos del mucus (Douch y cols., 1983). Puede ser que la cantidad de leucotrienos exógenos presentes en el mucus de ovejas inmunes interfieran con los procesos fisiológicos normales en los nematodos, o que los leucotrienos interfieran con otras sustancias presentes en el mucus de ovejas inmunes y que por ello afecten la motilidad larvaria. Sin descartar que es posible que otras sustancias sean responsables de las propiedades paralizantes que sobre las larvas tiene el mucus de ovejas inmunizadas.

Las propiedades directas anti-larvarias del mucus recogido del tracto gastrointestinal de ovejas inmunes se han demostrado recientemente *in vivo*, tras la inoculación de larvas de *T. colubriformis* junto con mucus procedente de animales inmunes, lo que condujo al rechazo larvario (**Harrison y cols., 1999**).

La relación entre la actividad inhibidora del mucus parece claramente relacionada con la presencia de leucocitos globulares. De hecho, dicha actividad se encuentra correlacionada con el número de estas células en el intestino delgado de ovejas en pastoreo en pastos contaminados (**Douch y cols., 1984; 1986; Stankiewicz y cols., 1993**). También tras el cultivo de mastocitos de la mucosa y células globulares procedentes de ovejas inmunizadas a *T. colubriformis*, por exposición previa a larvas de *T. colubriformis* o a preparaciones antigénicas crudas (**Douch y cols., 1996b**), se ha detectado actividad inhibidora de la motilidad larvaria en el estudio de los sobrenadantes. No obstante esto no excluye la posibilidad de que otros tipos celulares, en particular los eosinófilos, puedan ser también fuente potencial de esta actividad (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.5 Eosinofilia y resistencia

2.10.5.5.1 Eosinófilos

A diferencia de los mastocitos y basófilos, los eosinófilos parecen una población homogénea de células. La sangre es abastecida lentamente por la médula ósea de eosinófilos maduros, y desde allí llega a los tejidos donde sobreviven varios días o semanas. Puede haber un elevado número de eosinófilos en los tejidos sin que exista una eosinofilia manifiesta, particularmente en el tracto gastrointestinal. Tras una infección por helmintos, el número de eosinófilos puede aumentar drásticamente (eosinofilia) tanto en sangre como en tejidos. Al contrario que los mastocitos que están uniformemente distribuidos en los tejidos, los eosinófilos pueden tener una migración clara hacia el parásito (**Balic y cols., 1999c**).

Los eosinófilos están presentes en prácticamente todos los vertebrados vivos estudiados, aunque existen algunas diferencias morfológicas y bioquímicas entre especies (**Jones, 1993**). Particularmente, algunos animales, incluyendo algunos felinos y aves, no contienen la peroxidasa de los eosinófilos, y muchas aves, peces y anfibios no contienen

un corazón cristalóide en sus gránulos eosinófilos. La ultraestructura fina y la bioquímica de los eosinófilos de los rumiantes no se han estudiado en detalle, pero los eosinófilos de los rumiantes muestran una fuerte tinción en las secciones tisulares para la peroxidasa endógena (Meeusen y cols., 1989) y los eosinófilos cultivados de médula ósea ovina contiene peroxidasa y arilsulfatasa eosinófilo-específica (Stevenson y Jones, 1992). Estudios ultraestructurales confirman la presencia de un corazón cristalóide en los gránulos de los eosinófilos ovinos, mostrando la misma electrodensidad reversa de los gránulos que la descrita para los eosinófilos humanos y de los roedores después de la activación (Rainbird y cols., 1998).

La pronunciada absorbancia de la eosina por parte de los eosinófilos en tinciones histológicas se debe a las proteínas fuertemente catiónicas presentes en sus gránulos, entre las que están, a parte la peroxidasa de los eosinófilos, proteínas básicas (MBP- major basic protein), proteínas catiónicas eosinófilas (ECP-eosinophil cationic protein) y la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN- eosinophil derived-neurotoxin). Así como las proteínas catiónicas granulares y las hidrolasas lisosomales contenidas en los gránulos. Los eosinófilos contienen gran cantidad de lisofosfolipasa que producen los cristales de Charcot-Leyden (CLCs).

En cuanto su actividad, los eosinófilos activados puede producir metabolitos tóxicos derivados del oxígeno y sintetizar un rango de mediadores de lípidos incluyendo prostaglandinas y leucotrienos (Costa y cols., 1997; Weller, 1997). Recientemente, se ha descubierto la capacidad de los eosinófilos de producir un importante rango de citocinas (IL-1,2,3,4,5,6,8,10,GM-CSF, TNF- α , TGF- β , IFN- γ) y quimiocinas (MIP-1 α , RANTES, eotaxina).

De forma similar a los mastocitos, la respuesta eosinofílica pronunciada observada después de la estimulación por parásitos helmintos está regulada de forma particular. La IL-5 es la citocina T dependiente que resulta clave en el incremento en la población eosinofílica (eosinofilia) tanto en la sangre como en los tejidos después de las infecciones por helmintos. Sin embargo, los niveles basales de eosinófilos están presentes en ratones sin IL-5, probablemente mantenidos por otras citocinas como la IL-3 y GM-CSF (Yoshida y cols., 1996). Estos factores se han de tener en cuenta cuando se evalúa el papel de los eosinófilos en infecciones parasitarias después de que exista una depleción de la IL-5 (Meeusen y Balic, 1999). La alta conservación tanto de la frecuencia (Mertens y cols., 1996) como de la actividad biológica (Stevenson y cols., 1994; 1998) de la IL-5 en roedores,

humanos y especies rumiantes, confirma su único papel de generación de la eosinofilia. Mientras que la liberación sistémica de IL-5 es responsable del aumento en la generación de los eosinófilos de la médula ósea (Wang y cols., 1998b), quimiocinas tipo C-C, en particular eotaxina, están principalmente implicadas en el reclutamiento de los eosinófilos sanguíneos en los tejidos inflamados (Mould y cols., 1997). Linfocitos sanguíneos y mesentéricos de ovinos inmunizados con antígenos de vermes generan sobrenadantes en cultivos celulares en los que abundan factores de diferenciación de eosinófilos (IL-5) y otros factores estimuladores de colonias (entre estos la IL-3) (Haig y cols., 1989), IL-2, y poca cantidad de IFN- γ (McClure y Emery, 1994). En terneros infectados con *Ostertagia ostertagi*, los linfocitos cultivados *in vitro*, producen sobrenadantes que son quimiotácticos para los eosinófilos (Washburn y Klesius, 1984).

La acumulación de eosinófilos en los tejidos es más variable que la de mastocitos (McClure y cols., 1992; Snider y cols., 1988; Douch y cols., 1986; Ritchie y cols., 1966) pero probablemente reflejan mejor la presencia de parásitos (Dineen y Windon, 1980).

La degranulación de los eosinófilos se genera inicialmente por una unión cruzada de receptores de superficie. Los eosinófilos tiene receptores para varios componentes del complemento y varios isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo la IgA y la IgG y receptores de baja afinidad para la IgE. Aunque receptores de alta afinidad para la IgE se han detectado también en eosinófilos humanos, la ausencia de estos receptores en los eosinófilos de los ratones ha puesto en duda el papel uniforme de activación de los eosinófilos IgE dependiente (Kita y Gleich, 1997). De particular importancia en las infecciones gastrointestinales es la evidencia de que los eosinófilos también expresan receptores para el componente secretor de la IgA, y los ligandos de los componentes secretores de la IgA son los más potentes estimuladores de la degranulación eosinofílica (Lamkhioued y cols., 1995). Diversos estudios han demostrado ligandos específicos que producen la degranulación de eosinófilos murinos y humanos sobre la superficie de las larvas de nematodo *in vitro*, mediados por anticuerpos y complemento, provocando la muerte del parásito (Butterworth y Thorne, 1993). Mecanismos similares de destrucción de L3 de *H. contortus in vitro* con eosinófilos ovinos se han demostrado recientemente en presencia de anticuerpos específicos a antígenos superficiales larvarios (Rainbird y cols., 1998).

Mientras los eosinófilos juegan un papel en la remodelación tisular y de la respuesta inmune, su principal función durante las infecciones por nematodos puede recaer en su potencial citotóxico, en particular a través de la liberación de proteínas granulares y por la producción de aniones superóxido. En adición, los leucotrienos sintetizados por los eosinófilos después de su activación pueden actuar de forma similar a las producidas por los mastocitos, mediando vasodilatación, contracciones del músculo liso y secreción de mucus (Balic y cols., 2000).

2.10.5.5.2 Respuesta eosinofílica durante la infección primaria

El incremento en el número de eosinófilos abomasales se detecta en infecciones primarias de *H. contortus* (Charleston, 1965; Salman y Duncan, 1984; 1985; Balic y cols., 1999a). Un gran número de eosinófilos se encuentran en los tejidos abomasales en torno al 5 día post-infección, mientras que su número decrece, pero se mantiene aún significativamente más elevado que en los animales controles, en ovejas que mantienen aún la infección a los 27-36 días desde el inicio de la infección primaria (Balic y cols., 1999a).

La infección primaria de corderos con 50000 L3 de *T. circumcincta* también resulta en un moderado aumento en los eosinófilos en los tejidos abomasales a los 10-21 días post-infección (Stevenson y cols., 1994). En lo que se refiere a los eosinófilos en sangre periférica muestran una respuesta bifásica con un pico moderado hacia el día 7-9 post-infección, disminuyendo hasta el día 14, seguido por un incremento de moderado a importante, hasta el día 21 (Stevenson y cols., 1994).

También en esta ocasión es posible detectar ciertas diferencias en función de factores tales como la especie parásita implicada en cada caso. Así, la eosinofilia tisular es más pronunciada después de una infección primaria con los nematodos, *Nematodirus battus* y *Oesophagostomum columbianum*, ambas larvas caracterizadas por penetrar profundamente dentro de la mucosa. La infección primaria con *N. battus* resulta en un incremento en el número de eosinófilos en el intestino delgado hacia los días 21-23 post-infección, al mismo tiempo que se produce el rechazo de los nematodos adultos, sin embargo los eosinófilos disminuyen su número después, a los mismos niveles que los presentes en animales no infectados, aún cuando todavía esté presente una carga parasitaria de adultos (Winter y cols., 1997). Los niveles de eosinófilos circulantes no incrementan significativamente hasta 25 días post-infección en estos animales y

disminuyen a partir de entonces. También se detecta un moderado incremento en el número de eosinófilos en el intestino delgado transcurridas 40 horas de la infección primaria con L3 de *O. columbianum* y el mayor incremento se obtuvo en el momento de romper los quistes larvarios y emergieran las L4 al lumen intestinal al 5º día post-infección (Shelton y Griffiths, 1967). Tiene lugar entonces un marcado incremento en la infiltración eosinofílica se encuentran granulomas con eosinófilos, rodeando a la cutícula de las L3 y al resto del quiste del nematodo (Sheldon y Griffiths, 1967).

Juntos, estos resultados indican que en general tienen lugar moderadas eosinofalias durante una infección primaria, primero en los tejidos y luego en la sangre periférica y este fenómeno está principalmente asociado con el estado de infección larvario más que de adultos. Esto está de acuerdo con estudios que muestran que extractos solubles de L3 de *H. contortus*, sobre una concentración proteínica similar, son 33 veces más activos para el reclutamiento de eosinófilos que extractos adultos en un modelo desarrollado en glándula mamaria (Adam y Colditz, 1991), aunque esta respuesta eosinofílica moderada parece tener un pequeño impacto sobre el establecimiento de los nematodos en los tejidos durante la infección primaria (Sheldon y Griffiths, 1967; Balic y cols., 1999a). Es probable que los eosinófilos en sistemas naturales parásito / hospedador no están suficientemente activados y / o equipados con anticuerpos específicos durante infecciones primarias para ser efectivos en la muerte de la larva del nematodo (Meeusen y Balic, 1999). Además, algunas larvas están contenidas dentro de estructuras anatómicas que físicamente aíslan al parásito del contacto directo con los eosinófilos (Balic y cols., 2000).

2.10.5.5.3 Eosinófilos e inmunidad adquirida

El incremento en el número de eosinófilos en los tejidos de la mucosa se observa tanto durante las infecciones primarias por nematodos como tras infecciones repetidas, si bien la magnitud de la eosinofilia y el número de eosinófilos en los tejidos es mayor tras varias exposiciones. En ovejas de dos años de edad inoculadas con 10000 L3 de *T. axei* semanales durante 8 semanas mostraron un firme incremento en los niveles de eosinófilos circulantes, iniciando un pico en la mayoría de las ovejas entre 7-14 días desde el inicio de la inoculación (Pfeffer y cols., 1996). Biopsias repetidas del tejido abomasal a través de cánulas revelan incrementos en los niveles de eosinófilos en los tejidos abomasales, comenzando también de 7-14 días desde el comienzo de la experiencia, y alcanzando el pico en la

mayoría de las ovejas el día 53. Todas las ovejas de este experimento mostraron una fuerte caída en los eosinófilos tisulares hacia los valores obtenidos en los controles no inoculados varios días después del pico. Un incremento firme, seguido por una caída importante en los recuentos de eosinófilos periféricos también se detecta tras 6 ó 7 semanas de infección diaria de ovejas previamente inmunizadas con *T. colubriformis* (Kimambo y cols., 1988).

Otros trabajos que ponen de manifiesto el incremento en el número de eosinófilos en los tejidos en las reinfecciones con nematodos gastrointestinales son las llevadas a cabo por Stevenson y cols., 1994, en las que se observan que corderos infectados repetidamente con L3 de *T. circumcincta* durante 7 semanas, desparasitarse y a continuación exponerse a 50000 L3, 10 días después de la exposición, mostraron incrementos en el número de eosinófilos intestinales, el doble de los observados en los corderos que sólo recibieron una infección primaria. Además, mostraron que había una cantidad sustancial de eosinófilos con actividad potencial presentes en los ganglios gástricos, dentro de las 24 horas de la exposición. En contraste, no se detectó actividad potencial de eosinófilos en los linfonódulos gástricos tras la infección primaria. Dicha actividad potencial de eosinófilos se estimó sobre cultivos *in vitro* de eosinófilos de médula ósea ovina (Stevenson y Jones, 1992).

También en corderos inmunizados previamente con 5000 L3 irradiadas de *O. columbianum*, y posteriormente expuestas con 20000 L3 normales (no irradiadas), 4 semanas después presentaron un número mucho mayor de eosinófilos en el intestino delgado si lo comparamos con corderos que no recibieron previamente infecciones inmunizantes (Shelton y Griffiths, 1967). Mientras las larvas enquistadas en esta infección no atraen a los eosinófilos, una vez que la L4 emerge del quiste, los eosinófilos rodean la larva y es posible que sigan el curso de la migración de la larva por acumulación de eosinófilos en los túneles que se forman en el hospedador. Los autores concluyeron en este caso que a pesar de la persecución de la larva por parte de los eosinófilos, la respuesta eosinofílica no es capaz de secuestrar o encapsular la larva.

En rumiantes, además del incremento en número que acontece en las reinfecciones se les atribuye un importante papel en el desarrollo de la inmunidad adquirida frente a los tricostrongídeos por dos aspectos principales:

- (1) Asociación de eosinofilia con un status de resistencia.
- (2) observación histológica de eosinófilos en lugares próximos a la larva del nematodo (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.5.4 Asociación de eosinofilia con un status de resistencia

Cuando corderos merinos se seleccionaron por alta resistencia o por su susceptibilidad a la infección por *T. colubriformis* después de la vacunación con L3 irradiadas, las ovejas de alta resistencia mostraron un gran número de eosinófilos circulantes tanto después de la vacunación como tras la exposición a las 20000 L3 normales (no irradiadas) (**Dawkins y cols., 1989**). De modo análogo, corderos Romney de alta resistencia tuvieron recuentos de eosinófilos periféricos más altos que ovinos susceptibles, cuando pastoreaban sobre pastos contaminados (**Buddle y cols., 1992**). Los niveles incrementados de eosinófilos circulantes se correlacionan también con una disminución en los recuentos de huevos de nematodos fecales en corderos inoculados 2 veces a la semana con 5000 L3 de *T. colubriformis*, y el desarrollo de la inmunidad aumenta tanto como aumenta el número de eosinófilos circulantes que fueron suprimidos por el empleo de dexametasona (**Buddle y cols., 1992**). Estos datos han servido para **Dawkins y cols., 1989** y **Buddle y cols., 1992**, concluyeran que la eosinofilia es una medida de la resistencia del hospedador a los nematodos gastrointestinales, más que un indicador de helmintiasis. Sin embargo, no siempre se detecta esta correlación entre eosinófilos y resistencia (**Woolaston y cols., 1996**).

2.10.5.5.5 Asociación histológica de eosinófilos y fases tisulares larvarias

En las primeras citas de la respuesta eosinofílica en ovinos inmunes tras una infección con *H. contortus*, se detectaron acúmulos de eosinófilos tanto dentro del tejido abomasal como en el lumen del fundus del abomaso (**Steward, 1953; Charleston, 1965; Salma y Duncan, 1985**). Más recientemente se ha demostrado que los eosinófilos llegan al lugar de penetración larvaria en el tejido, en las 24 horas posteriores a la exposición intrabomasal de ovejas inmunes con 1×10^6 L3 de *H. contortus* (**Balic y cols., 1999c**), y si bien se parecían ciertas variaciones individuales de las respuestas, en todas las ovejas inmunizadas y reinfectadas existe este acúmulo de eosinófilos una vez que las larvas alcanzan el nicho tisular. Sin

embargo, si las ovejas ya han rechazado la mayor parte de la carga expuesta antes de que se produzca la penetración tisular; el incremento en el número de eosinófilos tisulares es mucho más discreto e incluso en estos casos la mayoría de las larvas que penetran en las glándulas son rodeadas por eosinófilos.

Gracias a la microscopia electrónica se sabe que en estos casos los eosinófilos están en contacto directo con la superficie de las larvas y en degranulación (**Balic y cols., 1999c**). Así mismo, las larvas rodeadas por estos eosinófilos en degranulación, mostraron daños o muerte, como se pudo determinar ultraestructuralmente. Estas son entre otras algunas de las evidencias histológicas y ultraestructurales de la importancia de los eosinófilos para eliminar las larvas infectantes de *H. contortus* (**Rainbird y cols., 1998; Balic y cols., 1999c**).

La potencial actuación efectora de los eosinófilos viene condicionada por los distintos nichos ecológicos que pueden ocupar las diferentes fases larvianas de las diferentes especies de nematodos que se incluyen en la familia Trichostrongyloidea. Fases larvianas de *Ostertagia* spp. y *Teladorsagia* spp. desarrollados en los fondos de las glándulas gástricas, excluye a los eosinófilos, aunque estas células se pueden localizar inmediatamente adyacentes a estas estructuras atraídas por factores quimiotácticos producidos por las larvas (**Klesius y cols., 1989**). Por su parte, las L3s de *Oesophagostomum* spp. evoluciona a L4 en un quiste rodeado por una membrana, que también excluye a los eosinófilos. Aún más, pocos eosinófilos son atraídos a la vecindad de estos quistes (**Shelton y Griffiths, 1967**). Ambas estrategias, al menos durante la fase inicial de la infección, excluyen el contacto directo entre los eosinófilos y las larvas en desarrollo con lo que los eosinófilos no podrían llevar a cabo la degranulación y eliminación de las larvas, pero probablemente esta incapacidad de acción directa determina otros tipos de respuestas indirectas mediadas por factores eosinofílicos (**Balic y cols., 2000**). Es probable que estas estrategias provoquen, al menos en parte, la respuesta indirecta desarrollada por mediadores eosinofílicos (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.6 Células globulares

Las células globulares son glándulas exocrinas unicelulares productoras de mucus localizadas en el epitelio a lo largo de todo el tracto gastrointestinal especialmente en el intestino grueso. La porción apical de la célula se extiende y está llena de mucinógeno, que es el precursor del

mucus, el cual, a medida que se acumula en la célula, desplaza el núcleo hacia la parte basal de la célula, adquiriendo la característica forma globular. Las células globulares productoras de mucus son también importantes en el tracto respiratorio.

El abomaso (estómago glandular o verdadero) de los rumiantes no contiene células globulares. En vez de esto, el estómago tiene unas células epiteliales columnares muy altas que liberan continuamente moco sobre la superficie, con el propósito de prevenir la digestión de la mucosa por el jugo gástrico. Las células del fundus gástrico también secretan gran cantidad de mucus sobre la superficie abomasal. A parte de su papel en la lubricación y protección de la mucosa, la capa de mucus también proporciona un micro ambiente único para la interacción celular con los distintos componentes moleculares y con los organismos presentes en esta localización (Balic y cols., 2000).

En el caso concreto de las infecciones por nematodos gastrointestinales tiene lugar el aumento en el número de células globulares o células epiteliales productoras de mucus, y generalmente tiene lugar conjuntamente con la hiperplasia de mastocitos tras la infección por nematodos, sin embargo estos dos procesos están regulados de forma independiente en modelos murinos, y cada uno de ellos pueden ser causa de expulsión de diferentes especies de nematodos (Nawa y cols., 1994).

Las infecciones intestinales por nematodos pueden no sólo provocar la hiperplasia de células globulares, si no también inducir diferencias en la glicosilación de la mucina de las células globulares, si bien estos cambios en la composición del mucus se han observado en otras condiciones fisiopatológicas por lo que podría tratarse de un mecanismo específico de expulsión parasitaria (Niew Amerogen y cols., 1998).

Aunque se cree que la hiperplasia de células globulares es dependiente de los linfocitos T, no se tiene del todo claro como tiene lugar esta. Algunos ensayos contribuyen a dar una idea de la complejidad de dicha activación y la intervención de varios factores en su desarrollo. Si bien la depleción de linfocitos T CD4⁺ no parece determinar una reducción del número de células globulares, ni alterar la composición del mucus, si tiene lugar una reducción en la producción de dicho mucus así como la capacidad de eliminar nematodos (Khan y cols., 1995).

Otro mediador de la inmunidad en la actividad de las células globulares y su papel como célula efectora en procesos inmunológicos es la citocina IL-3, que juega un papel crucial en la hiperplasia de células globulares y en la producción del mucus (Wills-Karp y cols., 1998) lo que se correlaciona con la expulsión de *N. braziliensis* (McKenzie y cols., 1998), independientemente de IgE y de los mastocitos. La presencia de receptores en estas células de IL-2 y de las Fc de la IgG (Kobayashi y cols., 1991), contribuyen a pensar que pueden tratarse de elementos que intervienen y / o modulan la respuesta de las células globulares. Del mismo modo la IL-1 producida en macrófagos cultivados parecen mostrarse como mediadores de las respuestas si mantienen una actividad similar a la observada en modelos murinos (Cohan y cols., 1991). Las células globulares también expresan un receptor de cadena alpha de IL-2 (Dahlman-Hoglund y cols., 1996; Kobayashi y cols., 1991).

2.10.5.7 Hiperplasia de mastocitos y generación de leucocitos globulares en la mucosa

La hiperplasia de los mastocitos de la mucosa y la aparición de leucocitos globulares intra-epiteliales en los tejidos de la mucosa son fenómenos bien reconocidos tanto en roedores como en rumiantes en infecciones por nematodos gastrointestinales (Miller, 1984; Rothwell, 1989). Varios estudios realizados en rumiantes han indicado que la hiperplasia de los mastocitos en la mucosa se asocia predominantemente con la presencia de parásitos adultos. Después de infecciones primarias de corderos con *H. contortus*, se observa un incremento del número de mastocitos de la mucosa a los 14-15 días postinfección (Charleston, 1965; Salman y Duncan, 1984). En estudios más recientes, se han detectado pequeños incrementos tanto en el número de mastocitos de la mucosa como de leucocitos globulares en corderos de 5 meses de edad a los 5 días de exposición a 50000 L3 de *H. contortus*, mientras que en corderos con parásitos adultos, tras una infección con 10000 L3 de *H. contortus*, si se detecta un importante aumento en el número de mastocitos de la mucosa (Balic y cols., 1999a). Estos datos coinciden con los hallazgos histológicos encontrados en ovinos infectados con otros nematodos gastrointestinales. Por ejemplo en ovinos de 2 años que reciben 10000 L3 de *T. axei* semanales (Pfeffer y cols., 1996), incrementos significativos en mastocitos de la mucosa (identificados como células IgE⁺) se detectaron 11-14 días después de la primera infección, mientras que corderos con una infección primaria con *N. battus*, evidenciaron este aumento de los mastocitos de la mucosa tras 18 días de infección con 50000 L3 (Winter y cols., 1997).

Aunque el incremento del número de mastocitos de la mucosa en la mucosa de las ovejas se asocia con la presencia de nematodos adultos también en animales que han recibido infecciones múltiples, este número de mastocitos de la mucosa se mantiene muy elevado. Por ejemplo, en ovejas infectadas semanalmente con *T. axei*, durante las primeras 5 semanas de infección se detectó un incremento en el número de mastocitos en la mucosa, manteniéndose a partir de entonces en un número 5 veces mayor al encontrado en ovejas no parasitadas (Pfeffer y cols., 1996). Además, hay un retraso entre la aparición de los mastocitos tisulares y la aparición de los leucocitos globulares intra-epiteliales. De forma similar, los mastocitos de la mucosa estaban presentes tras 4 semanas de infecciones semanales de ovejas con otras 1000 L3 de *T. circumcincta* o *T. vitrimus*, mientras que los leucocitos globulares no se detectaron hasta después de 8 semanas de exposición constante (Seaton y cols., 1989 a, b). El retraso de los leucocitos globulares respecto con la aparición de los mastocitos es consistente con su origen a partir de los propios mastocitos (Huntley y cols., 1984).

Como discutieron Rothwell (1989) y Miller (1996), la observación del número de mastocitos de la mucosa / leucocitos globulares presentes no indica la capacidad funcional de estas células. Una medición directa de la activación / degranulación se proporciona por la detección de mediadores de los mastocitos liberados. Varios estudios han determinado la liberación de proteasas derivadas de los mastocitos ovinos (SMCP) después de la exposición al parásito, mostrando una correlación negativa la cantidad de proteasas presentes en la mucosa abomasal y mucus con el número de vermes que completa el ciclo (Stevenson y cols., 1994). Cantidades elevadas de proteasas de mastocitos se detectaron en la mucosa del abomaso y en el mucus de ovejas hiperinmunes a *H. contortus*, por infecciones repetidas con 10000 L3, y se suprime con el tratamiento con dexametasona (Huntley y cols., 1992a). Cuando estas ovejas hiperinmunizadas se exponen una semana después con 10^5 - 10^6 L3, por inyección directa en el abomaso, la liberación de proteasas de mastocitos se detectó en el suero 2 horas después de la exposición, pero no tras la exposición de ovejas no inmunizadas (Huntley y cols., 1987). Este incremento significativo en la cantidad de proteasas de los mastocitos se detectó también 48 horas después de la exposición, en el mucus de estas ovejas inmunes, pero no en los tejidos del abomaso, lo que sugiere que la liberación depende más de los leucocitos globulares que de los mastocitos de la mucosa (Huntley y cols., 1992a). Este incremento en las proteasas de los mastocitos tras la exposición a las larvas se asocia con una rápida expulsión de las mismas, lo que en este

sistema puede suceder en 4 horas (Miller y cols., 1983). Cuando sólo se administran 10000 larvas, ni se observan la liberación de proteasas de los mastocitos ni una rápida expulsión, lo que sugiere que se precisa un estímulo mínimo para que se produzca la rápida expulsión. Sorprendentemente, cuando las ovejas hiperinmunizadas se expusieron a 1000000 larvas 6 semanas después de la última infección inmunizante, tuvo lugar la rápida expulsión, aunque los niveles de mastocitos de la mucosa y leucocitos globulares habían decrecido drásticamente comparados con los niveles que presentaban a la semana de la inmunización, y tras 48 horas de esta exposición no existían incrementos obvios si lo comparamos con ovejas no inmunizadas. Sin embargo los niveles de mastocitos de la mucosa estaban todavía por encima de los niveles de los controles y pudieron haber disminuido tras la degranulación después de la exposición (Rothwell, 1989). Además, los niveles séricos de proteasas de mastocitos mostraron previamente un pico 2 horas después de la exposición (Huntley y cols., 1987), por lo que es posible que los niveles de las proteasas de los mastocitos detectadas en la mucosa del abomaso y en el mucus las 48 horas post-exposición no reflejen exactamente los niveles que están presentes inmediatamente tras la exposición cuando ocurre la expulsión (Balic y cols., 2000).

La degranulación de los mastocitos de la mucosa / leucocitos globulares, determinada a partir de la liberación de proteasas procedentes de los mastocitos en el suero, también se ha observado en ovejas tras 28 días de infecciones bisemanales con 5000 L3 de *T. colubriformis* y mantiene niveles significativamente elevados sobre todo durante el periodo de infección continua (Douch y cols., 1996a). Además, este efecto puede ser suprimido con el empleo de un inmunosupresor como la dexametasona (Douch y cols., 1996a). Incrementos significativos de las proteasas de los mastocitos se han detectado también en el mucus intestinal de ovinos inmunes 1 día y 5-8 días después de la exposición a L3 de *T. colubriformis*, comparadas con ovejas con similares exposiciones pero no inmunizadas previamente (Jones y cols., 1994), lo que coincide con el tiempo de expulsión de los nematodos en estas ovejas (McClure y cols., 1992).

La liberación de proteasas de los mastocitos también se ha detectado en los ganglios linfáticos gástricos de ovejas hiperinmunizadas dentro de las 24 horas post-exposición con 50000 L3 de *T. circumcincta*, alcanzando el pico a los 2 días tras la inoculación (Huntley y cols., 1987; Stevenson y cols., 1994).

Además de las proteasas procedentes de los mastocitos, otro mediador derivado de los mastocitos se ha encontrado en respuesta a infecciones gastrointestinales en ovinos inmunes. Durante el rechazo a L3 de *T. colubriformis* en ovejas inmunizadas con L3 irradiadas, hubo un incremento en las pérdidas de plasma entérico y secreción de histamina en el duodeno desde el 2º día de la infección, alcanzando el pico el 6º día, lo que se correlaciona con la reducción de la histamina en el tejido duodenal (Steel y cols., 1990). La liberación de histamina, del leucotrieno LTC₄, 6-ketoprostaglandina F_{1α} y tromboxano B₂ en el mucus y contenido intestinal de ovejas inmunes también se ha documentado tras la exposición a *T. colubriformis* (Jones y Emery, 1991; Jones y cols., 1994). Además, cuando corderos de razas seleccionadas por alta o baja respuesta a la vacunación con *T. colubriformis* irradiados, fueron expuestas a 20000 L3 de *T. colubriformis* normales, los animales más inmunes tuvieron valores significativamente más altos de leucotrienos (LT) B₄, C₄ e histamina en el mucus intestinal (Jones y cols., 1990).

Estos resultados indican que, mientras el número de mastocitos / leucocitos globulares está aumentado por infecciones de adultos, la sensibilización y degranulación de estas células puede ocurrir tras la exposición larvaria. Esto se ha demostrado más directamente por la degranulación de aislados de mastocitos de la mucosa / leucocitos globulares por extractos larvarios (Jones y cols., 1992; Bendixsen y cols., 1995). Aislados de mastocitos de la mucosa de ovejas inmunes a *T. colubriformis*, cuando son incubadas con antígeno crudo de L3 *in vitro*, los niveles máximos secretados de histamina y proteasas procedentes de los mastocitos en los sobrenadantes aparecen a los 30 minutos de incubación, mientras que los niveles máximos de secreción de leucotrienos no ocurren hasta las tres horas (Bendixsen y cols., 1995).

Altos niveles de secreción de leucotrienos en ovejas inmunizadas comparadas con otras no inmunizadas también se detectan en preparaciones tisulares del abomaso e intestino delgado y en contenidos del lumen y del mucus de la cavidad intestinal, cuando se exponen a larvas o antígenos larvarios (Douch y cols., 1996b), siendo dicha secreción mucho mayor cuando las células se exponen a larvas o antígenos homólogos.

Estos resultados indican que las ovejas inmunes son capaces de secretar un rango de mediadores de la inflamación derivados de mastocitos en respuesta a la exposición a nematodos gastrointestinales y que estas respuestas están asociadas con la resistencia a estos parásitos. Como señaló

Rothwell (1989), los efectos de los mediadores derivados de mastocitos sobre el hospedador pueden claramente resultar en un ambiente hostil para la supervivencia de los nematodos gastrointestinales debido a los cambios asociados a la inflamación en la mucosa gastrointestinal. Debido al amplio rango de actividades de estos mediadores derivados de los mastocitos, es posible que ellos puedan también actuar sobre la supervivencia de los nematodos (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.8 Respuesta linfocitaria durante la tricostrongilidosis

2.10.5.8.1 Respuesta linfocitaria durante la infección primaria

La infección primaria por nematodos gastrointestinales generan cambios significativos celulares, tanto en los tejidos como en los ganglios linfáticos adyacentes. Sin embargo, marcadas diferencias se observan entre reacciones que tiene lugar durante el desarrollo larvario y la infección por adultos así como entre infecciones producidas por diferentes especies de nematodos (**Balic y cols., 2000**).

Los linfocitos reactivos a antígenos han sido cuantificados en ensayos con extractos solubles parasitarios, generalmente por homogenizados de L3, en animales con más de 6 meses de edad. Entre los 7-35 días post-inoculación se detectan linfocitos en sangre periférica reactivos a antígeno después de una única inoculación experimental de *T. colubriformis*, *H. contortus* o *T. circumcineta* (**Hanrahan y cols., 1984; Zajac y cols., 1990; Emery y cols., 1991; Gill y cols., 1991**) persistiendo más de 72 días (**Kloosterman y cols., 1980**).

Por su parte, en infecciones experimentales con L3 de *Cooperia* spp., *H. contortus*, *O. ostertagi* y *T. colubriformis*, las respuestas linfocitarias se muestran variables en grado, duración y consistencia, si bien suelen acontecer entre los 7 y 14 días de la inoculación (**Adams, 1978**). La situación es más compleja en corderos. Los linfocitos sanguíneos reactivos a antígeno en corderos infectados con *Haemonchus contortus* no se detectan en animales de menos de 4 meses de edad (**Lloyd y Soulsby, 1987**). Si bien tienen lugar estas respuestas linfoproliferativas, en principio, y tanto en animales jóvenes como adultos, la magnitud de la respuesta no presagia un estado de resistencia (**Lloyd y Soulsby, 1987; Shubber y cols., 1984; Berezko y cols., 1987; Riffkin y Yong, 1984**).

Las modificaciones de la actividad linfoproliferativa en el caso de las infecciones primarias, se acompaña de cambios en cuanto al número y tipos de linfocitos presentes en los tejidos. Así, el número de células recuperadas de la lámina propia del abomaso de terneros tras una infección primaria de 200000 L3 de *O. ostertagi* alcanzan altísimos niveles (7 veces el valor de los controles) a los 4 días post-infección y caen al nivel de los controles hacia el día 28 cuando la población de nematodos adultos está presente en el abomaso (Almeria y cols., 1997a). Proporcionalmente, el incremento en el número de células es más patente dentro de las células B y linfocitos $T\gamma\delta$ con respecto a las células $CD4^+$ y $CD8^+$. Al mismo tiempo, los linfonódulos abomasales aumentaron de peso progresivamente, alcanzando su máximo hacia los 28 días de la infección primaria (12 veces el peso de los controles), de nuevo con un incremento proporcionalmente mayor de células B y $T\gamma\delta$ (más del 48% el día 11 y el 23% el día 14 respectivamente). Hubo también un incremento en interleucinas y células que expresan $CD25^+$ tanto en la lámina propia como en los linfonódulos abomasales.

La infección primaria de corderos con *H. contortus* también determina un incremento del nivel de células B y células $T\gamma\delta$, pero en este caso también se ven incrementadas las células T $CD4^+$ en los tejidos abomasales a los tres y cinco días post-infección (Balic y cols., 1999a) y el número total de linfocitos, en particular células B, disminuye en infecciones por adultos (días 27-36 post-infección). El peso de los linfonódulos abomasales se dobla tras 5 días post-infección y se mantiene elevado durante la infección por adultos. Una excepción en la tendencia general es el caso de *O. ostertagi*, que en ensayos similares se aprecia que no hay un incremento de linfocitos $T\gamma\delta$ en los nódulos linfáticos abomasales, a la vez que el número de células B en los ganglios linfáticos disminuyó y evidenció una escasa regulación por antígenos de vermes adultos en ovejas infectadas (Balic y cols., 2000).

Otros casos en los que se aprecia cierto grado de inhibición linfocitaria es en la infección previa con *T. colubriformis*, en los que si bien tiene lugar un aumento de células T en los tejidos intestinales a los 3 días post-inoculación cuando las dosis infectantes son de 20-30000 L3 (Gorrell y cols., 1988b; McClure y cols., 1992), en inoculaciones con 50000 L3 tiene lugar una reducción de linfocitos $CD8^+$ a las 4 semanas post-infección (Gorrell y cols., 1988b).

Estos resultados de cambios linfocitarios durante la infección primaria, a tenor del momento en el que tiene lugar, sugieren que los

principales cambios en los tejidos ocurren durante la fase de infección larvaria, mientras que las infecciones por adultos causan sorprendentemente poca infiltración linfocitaria de los tejidos diana. Las infecciones por adultos, sin embargo, causan una estimulación significativa en los linfonódulos, particularmente en el compartimento de las células B (Almeria y cols., 1997a; Balic y cols., 1999a), lo que confirma y completa los estudios previos de Smith y cols., 1983c, quienes encontraron un aumento en el número de linfoblastos en los linfonódulos gástricos 8 días después de una infección primaria con 50000 L3 de *T. circumcincta* fenómeno que se mantiene mientras están presentes los vermes adultos en el curso de la infección.

2.10.5.8.2 Respuesta linfocitaria durante la exposición de animales inmunizados

Los estudios desarrollados en la década de los ochenta por Smith y cols. sobre la respuesta inmune local de ovejas durante infecciones y reinfecciones con el nematodo gastrointestinal *T. circumcincta* demostraron que la exposición de ovejas inmunes con 50000 L3 resultaba en un incremento en el número de linfocitos en los ganglios linfáticos gástricos, desde las 24 horas, alcanzando un pico 2-5 días después de la exposición, seguido por un incremento de células plasmáticas, y de IgA que alcanzaba el pico el día 6 post-inoculación (Smith y cols., 1985b). Además, Smith y cols., 1986, mostraron que transfiriendo esta respuesta celular a ovejas genéticamente iguales pero libres de nematodos, resultaba en una inmunidad parcial frente a los nematodos gastrointestinales en estas últimas tanto para *T. circumcincta* (Smith y cols., 1986; Smith y cols., 1984a) como para *H. contortus* (Smith y cols., 1984b). Como los animales donantes se muestran inmunes a una nueva exposición, después de la depleción de las células en los linfonódulos gástricos, sugiere que la resistencia en ovejas inmunes también viene determinada por una población celular residente no migradora.

Por el contrario en trabajos sobre infecciones de *H. contortus* en ovinos inmunizados no demuestran grandes cambios en la población linfoide de los tejidos abomasales y linfonódulos cuando no tiene lugar el establecimiento de las larvas en el tejido (Gorrell y cols., 1988a; Balic y cols., 1999b), mientras que sí se producen cambios significativos en ambos compartimentos cuando las larvas invaden los tejidos (Balic y cols., 1999b). En el último caso, se observaron incrementos significativos en las células $T\gamma\delta$, células B y células T CD4 activadas (Balic y cols., 2000).

Tampoco se observan diferencias en la población linfocitaria en el tejido intestinal tras la exposición de ovejas hiperinmunizadas a *T. colubriformis* (Gorrell y cols., 1988b), mientras que sólo una moderada infiltración linfocitaria se observa en el intestino delgado de ovejas inmunizadas con 3 dosis de 30000 L3 (McClure y cols., 1992). Estas ovejas inmunizadas mostraron altos niveles de resistencia a infecciones rechazando la mayoría de los nematodos dentro de las 24 horas del desafío. Por el contrario, cuando el rechazo tiene lugar un poco más tarde (entre los días 3-14 de la exposición) tienen un alto nivel de infiltración linfocitaria en el intestino delgado (principalmente células T), alcanzando un pico 5 días post-exposición (Pfeffer y cols., 1996).

Al analizar conjuntamente las poblaciones linfocitarias en los tejidos con la evolución sistémica de éstos en modelos en los que se utiliza *Trichostrongylus colubriformis*, se aprecia que el desafío con L3 del nematodo inducen primero un rápido incremento en la disponibilidad de células T en el intestino, un rápido secuestro en la lámina propia y la activación de células T de memoria. A continuación se produce un incremento de actividad en el nódulo drenado y con la vuelta al intestino de las células de memoria, (7 días después), y posteriormente a la sangre (McClure y cols., 1991).

En cuanto a la capacidad proliferativa sobre todo en linfocitos de sangre periférica en general los resultados muestran que la respuesta celular a infecciones de ovejas sensibilizadas, son más pronunciadas que en infecciones primarias, lo que se debe esperar de una respuesta inmune anamnésica. Estos cambios se manifiestan especialmente por un aumento en las células $T\gamma\delta$, las células B y células T CD4, mientras que las células CD8 generalmente se mantiene sin cambios o disminuyen en su número. Esto coincide con la falta de un papel funcional observado en los linfocitos CD8 en las infecciones por helmintos en roedores (Finkelman y cols., 1997; Bancroft y Grencis, 1998), y el papel crucial de los linfocitos T CD4 en la inmunidad de los rumiantes a las infecciones por nematodos gastrointestinales establecido por estudios de depleción de CD4 (Gill y cols., 1993b), como demuestra el hecho de que una depleción crónica de células $T\gamma\delta$ (T19+) y células CD8 con anticuerpos monoclonales resultan en un aumento en la protección a la infección por *T. colubriformis* (McClure y cols., 1995).

A pesar de que, **Riffkin y Dobson, 1979**, si atribuyen a esta respuesta una mayor resistencia, otros trabajos demuestran lo contrario. En cualquier caso, independientemente de que tenga o no lugar una mayor capacidad de respuesta de los linfocitos a las reinfecciones, este fenómeno no se encuentra relacionado con una mayor resistencia. Algunos ejemplos apoyan esta afirmación. Así en inoculaciones con L3 de *H. contortus* en animales inmunes, si bien los linfocitos sanguíneos periféricos responden de manera significativa a antígenos larvarios, muy por encima de la reacción observada en animales no inmunes, el rechazo a la reinfección no es más elevada, de hecho en algunos casos el número de vermes que completa el ciclo es superior en animales que mostraron esta mayor receptividad en sus linfocitos (**Gill y cols., 1991**). Este estudio coincide con otros trabajos realizados con otros nematodos gastrointestinales como *Trichostrongylus colubriformis* en los que tampoco se encuentra que esa mayor proliferación linfocitaria se refleje en una respuesta más eficaz, no obteniendo diferencias significativas en los recuentos de adultos en abomaso al final de la experiencia (**Winton y Dineen, 1981**).

De todos modos la consulta de citas bibliográficas que analizan estas capacidades linfocitarias, reflejan que pueden estar sujetos a distintos factores que pueden determinar modificaciones de la tendencia general. Así en el propio caso de *H. contortus* pueden observarse inhibiciones de la capacidad linfoproliferativa a antígenos después de las reinfecciones, manteniéndose la capacidad proliferativa inespecífica a lectinas (fitohemaglutinina) y lipopolisacáridos (**Gill y cols., 1991**), mientras que en otros casos como *O. ostertagi*, *T. axei* se han observado inmunosupresiones generalizadas en las reinfecciones (**Snider y cols., 1986**).

2.10.5.9 Respuestas de las citocinas durante la trichostrongilidosis

La identificación y manipulación de la respuesta de citocinas tiene un gran impacto sobre la comprensión de los mecanismos inmunes implicados en las infecciones por helmintos en modelos murinos. (**Finkelman y cols., 1997**; **Bancroft y Grencis, 1998**). Pocos trabajos han estudiado la respuesta de las citocinas en las infecciones gastrointestinales por nematodos en los ruminantes utilizando principalmente la tecnología RT-PCR para detectar RNAm específico para la expresión de estas citocinas. Como cada vez hay disponible nuevos reactivos (en particular anticuerpos monoclonales), se espera que esta área sufra un importante avance en los próximos años (**Balic y cols., 2000**).

2.10.5.9.1 Respuesta de las citocinas durante la infección primaria

Los análisis de RT-PCR de linfocitos aislados desde la lámina propia del abomaso de terneros con infecciones primarias de *O. ostertagi* indican que hay un incremento en la expresión de IL-4 e INF γ cuando los examinamos a los 10 y 60 días post-inoculación (Almeria y cols., 1997b). Las células de los linfonódulos abomasales de terneros con infecciones primarias mostraron una disminución en la expresión del RNAm de IL-2 y un aumento en la expresión del RNAm de la IL-4, IL-10 e INF γ , después de la infección (Canals y cols., 1997).

Respuestas similares han sido observadas en los ganglios linfáticos abomasales de ovejas infectadas con *H. contortus* (Balic y cols., 1999a).

2.10.5.9.2 Respuesta de las citocinas en animales inmunizados

Los valores de expresión de RNAm para las citocinas se determinaron por RT-PCR en los linfocitos derivados de linfonódulos abomasales de terneras inmunizadas con infecciones abreviadas de *O. ostertagi*, y expuestas posteriormente a L3 del parásito. Estudiando los niveles de expresión de RNAm de las citocinas en este estudio, 10 días post-infección, se detectan valores de expresión de RNAm de IL-4, IL-10, TGF β e INF γ fueron generalmente menores en terneros inmunizados que en terneros no inmunizados (Almeria y cols., 1998). Los autores sugieren que estos bajos niveles de expresión de la IL-4 en animales inmunes comparado con animales no inmunizados, se pueden deber, bien al bajo número de nematodos y por tanto bajo nivel de estimulación del sistema inmune local o bien que la IL-4 no está asociada con mecanismos protectores contra *O. ostertagi*.

Cambios significativos en la expresión de citocinas tras la exposición de ovinos inmunizados con *H. contortus* sólo se detectaron en el grupo de animales que demostraron una respuesta celular significativa en los tejidos abomasales y ganglios linfáticos tras la exposición (Balic y cols., 1999b). En este caso, la expresión del RNAm de INF γ en los tejidos fue mayor los tres días siguientes a la exposición y los niveles detectables de RNAm de IL-4 sólo se encontraron en los tejidos a los 5 días de infección.

Mientras que la evolución de la población linfocitaria de los linfonódulos drenados son generalmente reflejo de los tejidos infectados, especialmente durante las infecciones larvarias (Balic y cols., 1999a), la

expresión de algunas citocinas puede variar ampliamente entre los nódulos linfáticos y los tejidos de animales infectados, en parte debido a la población no linfocitaria tisular que contribuyen al patrón de citocinas tisulares. Además, la expresión de las citocinas puede ser rápidamente regulada tanto al alza como a la baja, y esto es importante para analizar diferentes periodos, especialmente cuando evaluamos la respuesta a la infección larvaria que va desde la L3 hasta la L5 en los primeros 10 días (**Balic y cols., 2000**).

Desde los datos expuestos, parece que mientras que hay un incremento en la expresión del RNAm de la IL-4 en algunos modelos de infecciones gastrointestinales en rumiantes, lo que era de esperar, a partir de estudios de infecciones por nematodos en roedores (**Finkelman y cols., 1997; Bancroft y Grencis, 1998**) esta expresión no siempre se corresponde con protección. Mientras algunos autores sugieren que estos resultados indican que el paradigma de respuesta Th1 / Th2 no se puede aplicar en las infecciones gastrointestinales en rumiantes, todavía disponemos de pocos datos para poder aceptar o rechazar esta idea.

2.10.5.10 Respuesta de los anticuerpos en la tricostrongilidosis

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios que examinan la cinética de la respuesta de los anticuerpos durante las infecciones parasitarias han empleado preparaciones de antígeno crudo de diferentes fases del desarrollo parasitario. Esto dificulta comparar directamente los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios, puesto que la presencia o ausencia de una molécula antigénica específica dentro de la mezcla generalmente no está bien definida y puede variar ampliamente dependiendo, por ejemplo, de los diferentes métodos de extracción empleados. Los resultados obtenidos con mezclas de antígeno crudo son por lo tanto complicados por la naturaleza inespecífica de algunos de los anticuerpos (**De Graaf y cols., 1994**) y respuesta celular (**Torgerson y Lloyd, 1992**) observadas en animales parasitados y / o inmunizados. Además, la aparentemente baja reactividad frente algunos homogenizados parasitarios podría deberse a la dilución del antígeno con proteínas poco relevantes. Por ejemplo, la reacción de las células T es detectable con antígeno de ES (excretor / secretor) pero no con el extracto del homogenizado del verme adulto completo (**Scalling y cols., 1994b**) y estudios de micro-dissección han mostrado que la mayor parte de la reactividad contra el adulto de *H. contortus* se localiza en la región esofágica, donde se origina la mayor parte del excretor / secretor (**Takats y cols., 1995**).

Los antígenos de nematodos están compuestos por productos de excreción-secreción (ES) y antígenos cuticulares y somáticos. Se estudian sobre todo por su papel inmunoprotector, pero también son de interés aquellos que provoquen inmunomodulación o lesiones inmunopatológicas.

Numerosos trabajos relacionan una fuerte respuesta inmunitaria sistémica asociada a la presencia de *Ostertagia ostertagi* en el abomaso en bovinos, al encontrar incrementos séricos de los principales isotipos de Ig reactivos a gran variedad de antígenos parasitarios, tanto tras 3 ó 4 semanas de realizar inoculaciones experimentales (Canals y Gasbarre, 1990; Mansour y cols., 1990) como a los dos meses de exponer ovinos no inmunizados a pastos infectados con trichostrongilos (Gronvold y cols., 1992; Gasbarre y col, 1993a; Nansen y cols., 1993). Vacas repetidamente infectadas con *O. ostertagi* muestran en suero: IgG1, IgG2, IgA, IgM e IgE específicas (Klesius y cols., 1986; Canals y Gasbarre, 1990; Mansour y cols., 1990).

2.10.5.10.1 Captura y presentación de antígenos

La mayor parte de los antígenos que alcanzan el lumen intestinal son capturados por células de la mucosa especializadas denominadas células M que se disponen sobre las placas de Peyer, donde los antígenos serán procesados y presentados por macrófagos subepiteliales o por células dendríticas a las células T. Los antígenos solubles pueden ser también capturados por las células epiteliales, macrófagos subepiteliales o por células dendríticas. También pueden penetrar entre las células epiteliales y ser presentados a las células T de la lámina propia o intra epiteliales. La resultante activación de las células T induce la diferenciación y estimulación de los linfocitos B, y migran a través de los vasos linfáticos aferentes para drenar a los nódulos. Aquí, proliferan y se diferencian, para recircular vía vasos eferentes y sanguíneos a la lámina propia a lo largo del tracto gastrointestinal. Una segunda exposición al antígeno induce una respuesta local antígeno-específica de IgA, una producción de citocinas, inflamación y respuesta linfoide (McClure y Emery, 1994).

En rumiantes se ha demostrado la captura de antígenos por las células epiteliales M en recto y sobre las placas de Peyer en el yeyuno de bovinos y ovinos (Liebler y cols., 1991; Landsverk, 1987), sin embargo puede ser que en rumiantes, no ocurra la clásica manera de presentación de antígenos por las células epiteliales porque estas células no expresan la

molécula MHC-II (Press y cols., 1991; Gorrell y cols., 1988b; McClure y cols., 1992).

2.10.5.10.2 IgG

La presencia de IgG refleja la exposición a nematodos gastrointestinales y los títulos encontrados en vacas lecheras al final de la primera estación de pastoreo están correlacionadas con diferentes niveles de exposición. El incremento experimentado tras dos estaciones de pastoreo, indican la importancia del contacto con el parásito durante el primer año (Ploeger y cols., 1990a).

Como es de esperar, la respuesta serológica frente a los nematodos gastrointestinales son generalmente de gran magnitud y desarrollan un pico muy pronto, tanto tras infecciones primarias como secundarias. La IgG1 alcanza su pico el día 35 post-infección primaria de *O. ostertagi* en el suero de terneros medida con ELISA con tres preparados antigénicos: extracto somático de adultos (AS) larvas L4 / L5 (MS) o con preparaciones de antígeno excretor-secretor recogidas *in vivo* de L4 (Canals y Gasbarre, 1990). Tras un tratamiento y una reinoculación, el pico de respuesta de extractos de larvas (L4 / L5) y antígeno excretor-secretor aceleró, apareciendo a los 14 y 21 días respectivamente tras la segunda infección, mientras que la respuesta al AS fue mucho más lenta en desarrollarse y menos pronunciada (Canals y Gasbarre, 1990; Mansour y cols., 1990). La respuesta sérica a IgG aumenta rápidamente y alcanza mayores niveles tras una infección secundaria con *H. contortus* si comparamos una infección primaria al utilizar antígeno excretor-secretor y somático de adultos y el extracto somático de L3 (Schalling y cols., 1994 a; 1994b; 1995).

En todas los modelos infectivos estudiados, la IgG1 es el isotipo serológico predominante respecto al otro isotipo IgG2 con diferentes extractos parasitarios y fases larvianas (Cross y cols., 1988; Canals y Gasbarre, 1990; Gill y cols., 1993b; Hilderson y cols., 1993a; Schaling y cols., 1995; Hilderson y cols., 1993a). La incubación *in vitro* de *T. colubriformis* en suero de hospedadores con IgG1 disminuye la ovoposición (Bone y Klesius, 1986). Pero en dos ensayos en los que se pretendía transferir inmunidad frente a nematodos gastrointestinales, no tuvieron éxito (Kloosterman y cols., 1980; Adams y cols., 1980).

La respuesta serológica (IgG) en animales inmunizados también muestra diferencias en función del antígeno con el que se induce dicha

inmunización. Así, estas respuestas se desarrollan de forma más temprana en animales inoculados con extractos larvarios que los inmunizados con antígenos de vermes adultos, si bien en este caso las respuestas se muestran más consistentes (**Wedrychowicz y cols., 1994**).

2.10.5.10.3 IgA

La IgA apenas es detectable en suero, de hecho la presencia de IgA en suero podría indicar un rebosamiento de la IgA presente en la luz intestinal tras una importante estimulación antigénica que provoca un importante incremento en su producción y que parte de esta inmunoglobulina se detecte en sangre periférica (**Frankena, 1987**). El bajo nivel sérico de la respuesta a IgA está de acuerdo con su producción local y se ha detectado en el mucus (**Sinski y cols., 1995b**), los tejidos (**Gill y cols., 1993a; Stear y cols., 1995b**) y los ganglios linfáticos (**Smith y cols., 1983c; Bowles y cols., 1995**) de animales infectados.

Su presencia en infecciones por *O. ostertagi* es importante cuando hay vermes adultos y está fuertemente asociada a la salida de adultos de la mucosa abomasal (**Thatcher y cols., 1989**). Otros autores, sin embargo, detectan bajos niveles de IgA específica en el suero de animales infectados y se asocia predominantemente con las fases larvarias más que con los parásitos adultos (**Canals y Gasbarre, 1990; Schalling y cols., 1994a; 1995**). **Stear y cols., 1995a**, por su parte, sugieren que en ovinos infectados por *Teladorsagia circumcincta*, la IgA local inhibe el desarrollo de los vermes.

En ratones, las células Th1, estimulan la producción de IgG2a e IgG2b, mientras que las células Th2 estimulan la producción de IgA, IgG1 e IgE (**Mosmann y cols., 1986; Cher y Mosmann, 1987**). Esto parece indicar que la IgA y la IgG1 no estén correlacionadas negativamente en este modelo, sin embargo en los rumiantes, dado que si se observan correlaciones negativas entre estos isotipos, es posible que la regulación de la IgG1 y la IgA se deba a distintos clones de células Th (**Sinski y cols., 1995a**). Además es posible observar una débil correlación entre la IgA de la mucosa y la IgA plasmática, de 0.48 y 0.63, lo que puede deberse a que a determinados valores umbrales de anticuerpos no sean correctamente detectados por las técnicas empleadas. También puede ser que la transferencia de la IgA de la mucosa al plasma sea menos eficiente a concentraciones bajas de IgA en la mucosa. En cualquier caso, obviamente

la IgA plasmática no es un buen indicador de la IgA presente en la mucosa del abomaso (Sinski y cols., 1995a).

Con respecto a la respuesta serológica secundaria referente a este isotipo. Se aprecia que en animales sensibilizados a antígenos somáticos (L4 y vermes adultos) de *T. circumcincta*, al ser re infectados se aprecia un notable incremento de las inmunoglobulinas IgA específicas a nivel sérico. Al evaluar estas respuestas a nivel local, se constata que esos incrementos también se manifiestan tanto en la mucosa del abomaso como en la bilis, fenómeno que no tiene lugar con otros isotipos, circunstancia que se explica al considerar que los diferentes isotipos están regulados por clones de células T helper específicos (Stevens y cols., 1988).

Así mismo, otros trabajos parecen indicar que la sensibilización con diferentes antígenos parasitarios (L4, L3, productos de excreción secreción...) no modifican estas respuestas locales, considerándose que este fenómeno se asocia a la presencia de epitopos comunes en los distintos antígenos utilizados (Sinski y cols., 1995a) ...

2.10.5.10.4 IgE

No está claro el papel de la IgE en los rumiantes, pero se han encontrado altos niveles de IgE en vacas infectadas con *O. ostertagi* cuando hay larvas secuestradas en la mucosa (Thatcher y cols., 1989), si bien en condiciones naturales, la procedencia y niveles de IgE específicos puede ser diferentes, tal vez debido a las regímenes de infección de cada caso (Baker y Gershwin, 1992; 1993).

Los anticuerpos monoclonales anti-IgE ovina están disponibles desde hace algún tiempo, lo que ha permitido realizar análisis detallados de los niveles de IgE específicos y totales durante infecciones primarias y reinfecciones con distintos nematodos gastrointestinales (Kooyman y cols., 1997; Shaw y cols., 1998). En estos casos se ha observado un incremento de los niveles de IgE específicos y totales con un pico a las 2-3 semanas de la infección (Kooyman y cols., 1997; Shaw y cols., 1998). Esta tendencia general no ha sido corroborada en algunos casos lo que se justifica por la utilización de distintos protocolos en la detección de estas inmunoglobulinas o incluso en los protocolos experimentales utilizados en cada caso, más que a una diferencia genuina inducida por distintas especies parasitarias (Balic y cols., 2000; Huntley y cols., 1998).

2.10.5.10.5 Corolario

En resumen, incrementos sistémicos de IgG1, IgG2 e IgE específicas de nematodos se han detectado en infecciones gastrointestinales primarias de ruminantes, mostrando generalmente una respuesta acelerada y aumentada durante reinfecciones. La respuesta de la IgA está también típicamente asociada a estas infecciones, mucho más importante en las mucosas. Además, los diferentes isotipos de respuestas parecen adaptarse a diferentes fases de la infección por nematodos. En el futuro, el objetivo deberá ser mejorar, definir, purificar antígenos, bien nativos, bien recombinantes, algunos de los cuales incluso ya están caracterizados para definir de forma más precisa estas respuestas (**Balic y cols., 2000**).

2.10.6 Mecanismos parasitarios de evasión de la respuesta inmune

Gracias a estudios realizados en ratones, se sabe que la respuesta inmune puede seguir dos caminos divergentes, que son modulados en función de la mayor o menor presencia de unas moléculas mediadoras conocidas como linfocinas. En ratones, la liberación de estas linfocinas depende de linfocitos T helper (Th). Existen dos grandes subpoblaciones de linfocitos Th en ratones, los Th1 y los Th2, cada uno de los cuales origina dos patrones inmunitarios. Estas dos respuestas se debe a la estimulación de diferentes linfocitos T cooperadores (helper). El resultado es la liberación de diferentes citocinas, cada una de las cuales tiene efectos diferentes en función de la existencia de diferentes receptores específicos para cada una de ellas en la superficie de las células efectoras. Como consecuencia pueden exhibir gran cantidad de efectos que van desde la estimulación hasta la inhibición. El entramado de citocinas pueden tener efecto sobre una misma célula, con un mismo efecto, e incluso con efectos diferentes (**Gasbarre y cols., 2001**).

Las linfocinas dominantes en la respuesta por Th1 son la IL2 y IFN- γ , y generan una respuesta de hipersensibilidad retardada. Es la respuesta predominante en infecciones por parásitos intracelulares. Por su parte, en la respuesta por Th2, las linfocinas predominantes son la IL4, IL5 e IL10 y generan una inmunidad inmediata. Este último tipo de respuesta es la más relevante en infecciones por parásitos extracelulares, particularmente helmintos (**Urban y cols., 1992**), y también es la respuesta predominante en parasitaciones por nematodos gastrointestinales (**Svetic y cols., 1993**).

En bovinos, el perfil de linfocinas de cada clon celular no es tan restrictivo como en los modelos murinos (Brown y cols., 1993; 1994) aunque al analizar en su conjunto la respuesta inmunitaria predomina una de estas respuestas. Al estudiar las linfocinas en la mucosa en rumiantes tras una primera exposición al parásito se encuentran en mayor cantidad RNAm para la IL4, que es el principal indicador de respuesta Th2 (Canals y cols., 1997; Gasbarre y cols., 2001), así como niveles séricos elevados de IgG1, IgE y gran cantidad de mastocitos en la mucosa del abomaso (Gasbarre y cols., 2001). Esto hace pensar en una respuesta inmunitaria similar a la que se produce en ratones (Svetic y cols., 1993). La IL4 se ha demostrado que está directamente implicada en la inmunidad protectora frente a nematodosis gastrointestinales de los ratones (Urban y cols., 1991; 1995), sin embargo, en bovinos infectados con *O. ostertagi* con un nivel elevado de IL4 no se alcanza una inmunidad protectora, a diferencia de lo que ocurre en roedores, donde un incremento en la producción de IL4 determina una reducción de la fecundidad de los vermes (Urban y cols., 1995). Puede ser que en bovinos suceda igual, aunque parece claro que hacen falta otros mecanismos para conseguir la inmunidad protectora (Finkelman y cols., 1997).

En el caso concreto de la ostertagiosis bovina, aunque la respuesta predominante sea la del tipo Th2, lo cierto es que se ponen en juego algunas citocinas que hacen pensar que no se trata de una respuesta Th2 simple (Gasbarre y cols., 2001), y que se ven involucrados distintos mecanismos efectores (Else y Finkelmann, 1998).

Entre las citocinas que se detectan en la ostertagiosis bovina y que no aparecen en parasitaciones por nematodos gastrointestinales en el modelo murino, destaca particularmente el IFN- γ (Canals y cols., 1997; Almeria y cols., 1997a). Este hallazgo resulta particularmente interesante porque tradicionalmente se ha considerado a la IL4 y el IFN- γ que regulaban de forma opuesta la respuesta inmunitaria. De hecho, esta regulación cruzada lleva a que se les considere como los principales factores que dirigen la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2 (Gasbarre y cols., 2001).

Así mismo la población celular efectora que normalmente se encuentra en los tejidos que rodean al parásito es un tanto atípica. Entre los cambios que se detectan en los tejidos adyacentes al parásito destacan la hiperplasia de mastocitos en la mucosa del abomaso, la aparición de leucocitos globulares, la eosinofilia, el incremento en la producción de mucus y la mayor actividad y masa de la musculatura lisa del intestino

(Balic y cols., 2000). Pero si bien *Ostertagia* parece tener una gran capacidad para estimular a gran variedad de poblaciones linfocitarias, pero muy pobre para inducir la estimulación de células efectoras, lo que sugiere que tal vez sea capaz de eludir la respuesta inmune (Gasbarre y cols., 2001). Varios son los mecanismos propuestos para esta evasión, desde la inducción a la generación de células supresoras (Klesius y cols., 1984), la activación policlonal del sistema inmune (Gasbarre, 1986) o bien la elaboración de productos que regulan el crecimiento celular (De Marez y cols., 1997).

Muchos autores coinciden en señalar la capacidad de *Ostertagia* spp. de provocar efectos inmunosupresores no específicos. La mayoría de estos trabajos encuentran reducciones significativas y transitorias en la respuesta *in vitro* a mitógenos de linfocitos procedentes de sangre periférica de bovinos infectados (Klesius y cols., 1984; Cross y cols., 1986; Snider y cols., 1986; Wiggin y Gibbs, 1990), sin embargo esta respuesta no tiene lugar con linfocitos procedentes de los ganglios abomasales (Wiggin y Gibbs, 1990).

Este mismo tipo de respuesta también ha sido observado en linfocitos esplénicos murinos al cultivarse con fracciones proteicas de L4 de este nematodo (Cross y Klesius, 1989). Otro factor que contribuye a reafirmar el papel supresor sobre la respuesta inmunitaria no específicas que adopta *Ostertagia* en el hospedador, es la disminución sérica de IgG circulantes en vacas inmunizadas con un antígeno proteico no relacionado (Mansour y cols., 1991; 1992). Presumiblemente, esta inmunosupresión podría ser una explicación para el lento desarrollo de la inmunidad frente a *O. ostertagi*.

También durante las infecciones por *Ostertagia ostertagi* se ha observado una disminución de la respuesta inmune específica (Gasbarre, 1997a). Poco después de la infección hay gran cantidad de células reactivas a *Ostertagia* en los linfonódulos regionales, pero a medida que la infección perdura, su número disminuye, incluso en bovinos previamente inmunizados (Gasbarre, 1986; 1994). Una posible explicación a esta pérdida de células T reactivas a *Ostertagia* puede ser que el parásito provoca también una estimulación policlonal de especificidad diferente (Gasbarre, 1986). Estudios recientes muestran que las infecciones por *Ostertagia* aumentan el porcentaje de linfocitos B en los tejidos locales (Baker y cols., 1993c; Almeria y cols., 1997a; Canals y cols., 1997). Esta estimulación policlonal de linfocitos B se postula como un potente

inmunosupresor tanto en infecciones por protozoos (Gasbarre y cols., 1980; Sacks y cols., 1980) como por helmintos (Crandall y cols., 1978). Por tanto, aunque aún queda por demostrar concluyentemente que la inmunosupresión es un signo importante y fehaciente en las infecciones por *Ostertagia ostertagi*, parece cierto que en determinados periodos del ciclo parasitario, este efecto tiene lugar. Estudios futuros deberán orientarse en considerar la magnitud y mecanismos de esta inmunosupresión y el impacto que ésta puede tener sobre la salud del rebaño, particularmente en sistemas de explotación intensivos (Gasbarre, 1997a).

Si se asume que las infecciones por *Ostertagia ostertagi* resultan en inmunosupresiones del hospedador, la principal cuestión será determinar si esto afectará la productividad. Esto resulta difícil de evaluar. Dos son los posibles ensayos que se pueden plantear, la evaluación de la eficacia de la vacunación en rebaños parasitados y no parasitados y medir los niveles de infección por otros agentes infecciosos, parasitarios etc.. Obviamente, este último método es difícil de realizar de forma adecuada, en particular si el rebaño es muy grande o aparecen enfermedades graves (Gasbarre, 1997a). Es por esto por lo que los estudios que se realizan actualmente en esta línea se centran en evaluar las vacunaciones. En esa línea, Yang y cols., 1993b, no encontraron diferencias en títulos séricos de Ig después de vacunar contra *Brucella abortus* y rinotraqueítis bovina a vacas infectadas con *O. ostertagi* y *Cooperia* al comparar vacas tratadas con otras sin tratar. Sin embargo, en otro ensayo similar si se observa que tardan más en alcanzar la inmunidad vacunal las vacas, tratadas o no, que están o han estado parasitadas recientemente que un grupo de vacas no parasitadas, aunque tras el retraso, los niveles de Ig son finalmente iguales (Yang y cols., 1993a). Es posible que otros elementos como el stress, malas prácticas de manejo, genética de los animales, cargas parasitarias, etc. puedan potenciar el efecto inmunosupresor (Gasbarre, 1997a).

También en infecciones por *Haemonchus contortus* en ganado caprino se han encontrado una supresión específica de la respuesta linfoproliferativa frente a antígenos parasitarios de linfocitos procedentes de sangre periférica, correlacionándose con la incapacidad de los animales para adquirir resistencia. Esta inespecificidad de la respuesta, se ha explicado mediante la depleción de linfocitos sensible al antígeno parasitario (Adams, 1978), o bien porque exista algún antígeno supresor específico de los linfocitos (Gills y cols., 1991).

2.10.7 Valoración del grado de inmunidad

Hoy resulta imposible medir de una forma tangible el grado de inmunidad adquirida por los rumiantes frente a los nematodos gastrointestinales. Por esto se recurre a estimaciones como puede ser evaluar directamente la resistencia del hospedador por medio de los recuentos de huevos fecales o indirectamente, por medio de la determinación del pepsinógeno sérico o las concentraciones de anticuerpos. Estos parámetros se pueden determinar al final del pastoreo o al principio de la estabulación, y reflejan el nivel de exposición a la infección durante la primera temporada de pastoreo y se pueden emplear como indicadores para predecir si un animal va a adquirir inmunidad (Vercruyse y Claerebout, 1997).

El desarrollo de inmunidad frente a *Ostertagia ostertagi* depende probablemente de la magnitud de la infección y de la duración de la exposición, aunque algunos autores no son de esta opinión (Vercruyse & Claerebout, 1997). Estas discrepancias pueden ser el resultado de que no en todos los estudios realizados se ha procedido siguiendo los mismos diseños experimentales, con lo que las exposiciones al parásito varían mucho en cuanto al nivel y duración a la exposición

Hilderson y cols., 1993b, comprobaron que inoculaciones experimentales de bovinos con distintos niveles de parasitación (4000-50000 L3 / semana) durante 18 semanas, tras ser tratados y expuestos a 150000 L3 no se aprecian diferencias significativas en el número de vermes que completan el ciclo aunque si se encontraron diferencias en la población de parásitos, con un 35% de L4 secuestradas en los terneros infectados previamente con el número más elevado de L3, concluyendo con ello que la inmunidad puede ser responsable del arresto de L4 (desarrollo retrasado) y que en estos protocolos de inoculación largos (18 semanas), la duración o el tiempo que se mantenga el "contacto" entre parásito y hospedador juegue un papel más importante que la propia intensidad de la infección. Conclusiones similares fueron también aportadas previamente por Herlich, 1982 y por Michel, 1970.

Por el contrario, Ploeger y cols, 1995, al simular una infección con dosis crecientes de L3 de *O. ostertagi* durante la primera estación de pastoreo, y someter los animales a un desafío tras un periodo de estabulación (estabulación invernal) no aprecian un aumento de la resistencia, e incluso llegan a observar una correlación negativa entre el número de vermes totales y el grado de exposición, aunque en ningún caso

llegaran a constatar el estatus inmunitario en lo que a la resistencia se refiere, antes del periodo de estabulación.

Como ya indicábamos, diferentes parámetros se pueden estudiar para tratar de evaluar el efecto y/o estatus inmunitario de los parásitos sobre el hospedador, es el caso de la ganancia de peso, el pepsinógeno plasmático, la carga abomasal de vermes y el número de mastocitos en la mucosa (**Barret y cols., 1998**). En cualquier caso, es probable que cada parásito tenga determinados indicadores que nos den una mejor aproximación a la carga parasitaria real. Por ejemplo, parece ser que el mejor indicador de la resistencia frente a *Cooperia* spp., en función del número de vermes capaces de desarrollarse en un desafío es mediante el recuento fecal de huevos. Sin embargo en las infecciones por *O. ostertagi* guardan una mayor correlación con otros parámetros como el pepsinógeno plasmático ($r = 0.7$), la ganancia de peso ($r = -0.5$) y ciertos indicadores de anemia ($r = 0.5$) (**Gasbarre, 1997b**).

En referencia a *T. circumcincta*, la relación entre resistencia y estos parámetros, la información de la que disponemos es la siguiente.

2.10.7.1 Ganancia de peso

Hay resultados dispares en este apartado, pues mientras que **Barret y cols., 1998** no observan diferencias entre ovinos inoculados con dosis repetidas de *T. circumcincta* y no inoculados, en otros casos si se aprecian una ganancia de peso en animales previamente inoculados (**Sykes & Coop, 1977; Jackson & Christie, 1984**).

2.10.7.2 Pepsinógeno plasmático

Este parámetro parece guardar una estrecha relación con el número de vermes que desarrollan su ciclo endógeno, de hecho se aprecian correlaciones positivas entre ambos parámetros, aunque sin significación estadística (**Stear y cols., 1995c**), ya que empieza a mostrarse más elevado a partir de las 2 semanas de la inoculación (**Barret et al., 1998; Sutherland, 1999**) con un pico que suele situarse a las 6 semanas p. i. (**Stear y cols., 1995c**).

Si se trata de animales inmunizados, también comienza a subir los niveles plasmáticos del pepsinógeno la segunda semana, si bien con niveles menores que durante la primera infección (Stear y cols., 1995c).

2.10.7.3 Carga abomasal de vermes

Trabajos recientes que analizan este parámetro en corderos inmunizados con *T. circumcincta*, muestran que la carga abomasal de vermes adultos y formas inmaduras es menor que en animales expuestos por primera vez. El porcentaje de machos y hembras no parece verse modificado en estos casos (Barret y cols., 1998).

2.10.7.4 Recuentos fecales de huevos

En inoculaciones con *T. circumcincta* en ovinos, al realizar un seguimiento de la liberación en heces de huevos del nematodo durante primoinfecciones y tras desparasitar y volver a inocular a los animales, se valora el comportamiento en la liberación de huevos en los animales previamente inmunizados. Así, durante la primoinfección, el pico de huevos tiene lugar a la 7ª semana p.i., al igual que sucedió en la segunda inoculación, aunque la diferencia radicó en la menor cantidad de huevos de vermes liberados en promedio por los animales en esta segunda inoculación. Durante esta segunda inoculación, el periodo de prepatencia varió entre animales, encontrándose mayores periodos de prepatencia en aquellos animales con menores recuentos de huevos. Los autores de esta experiencia, encontraron una importante correlación entre el número de vermes recogido en abomaso y los recuentos fecales de huevos ($r = 0.63$, $p < 0.01$), (en realidad, la variable transformada de logaritmo en base 10 de recuentos fecales de huevos) lo que da idea de su posible utilidad a la hora de valorar la relevancia de la parasitación (Stear y cols., 1995c). Estas altas correlaciones son similares a las detectadas en otros trabajos ($r = 0.88$) (Stear y cols., 1995d). Sin embargo, en exposiciones prolongadas, esta correlación entre el recuento fecal de huevos y el número de vermes presentes en el abomaso va disminuyendo (Michel, 1963; 1970; Michel y cols., 1973; Gasbarre y cols., 2001).

2.10.7.5 Número de mastocitos en la mucosa

También se detectan importantes diferencias en el número de mastocitos de la mucosa del abomaso en animales inmunizados y no inmunizados tras una inoculación experimental con L3 de *T. circumcincta*

($p < 0.001$). Además, este parámetro muestra una buena correlación entre el número de mastocitos en la mucosa y el recuento final de vermes en el abomaso ($r = 0.72$) (Barret y cols., 1998).

2.10.7.6 Eosinofilia como indicador de nematodosis gastrointestinal

La eosinofilia es un hallazgo común en la ostertagiosis, (Dawkins et al, 1989; Buddle et al, 1992; Dobson et al, 1992; Stevenson et al, 1994; Wiggin y Gibbs, 1990) y en general en las tricostrongilidosis (Patterson y cols., 1996; Doligalska y cols., 1999; Rainbird y cols., 1998; Amarante y cols., 1999; Dorchies y cols., 1997). Se le atribuye un papel relevante en la respuesta defensiva del hospedador a la invasión parasitaria, y su efecto protector del hospedador se concentra en la acción directa sobre las fases larvarias que colonizan los tejidos. La eosinofilia tisular es una respuesta inflamatoria que desarrolla la mucosa del abomaso, sin embargo, dicha respuesta es más rápida tras una exposición previa a *T. circumcincta* que cuando el hospedador se expone por vez primera (Stevenson y cols., 1994), e incluso, en exposiciones en animales inmunizados puede ser de mayor magnitud (Stear y cols., 1995c). En bovinos inoculados con L3 de *O. ostertagi* o a extractos larvarios de L3 de dicho parásito sucede lo mismo (Wiggin y Gibbs, 1990; Washburn y Klesius, 1984; Klesius y cols., 1985b; Klesius y cols., 1986). Se considera a los eosinófilos células efectoras en las nematodosis gastrointestinales (Butterworth, 1984) y su actividad está modulada por mecanismos mediados por células específicas (Urban y cols., 1992). En definitiva, esta reacción inflamatoria local es de gran importancia en las reacciones de protección que desarrolla el hospedador frente al parásito, especialmente en las infecciones secundarias (Stevenson y cols., 1994; Moqbel, 1986) y también son importantes en infecciones primarias, aunque no siempre en estas primoinfecciones es el patrón predominante, en ocasiones es la estimulación linfocitaria el factor más importante (Smith, y cols., 1983b). Algo similar sucede con las infecciones primarias de *H. contortus* (Huntley y cols., 1987). Ocasionalmente, en algunas experiencias no se detectan estas eosinoflias, ni siquiera en exposiciones repetidas a L3 de *T. circumcincta* en ovinos, es por esto que algunos autores cuestionan la utilidad de la eosinofilia como fenotipo capaz de orientarnos sobre la respuesta inmunitaria del hospedador (Sutherland y cols., 1999; Yong y cols., 1985).

Para apoyar el importante papel protector que parecen jugar los eosinófilos y mastocitos en las infecciones gastrointestinales, existen trabajos donde detectan actividad potenciadora de eosinófilos y proteasas de

mastocitos ovinos que pueden ser producidos por eosinófilos y mastocitos respectivamente, y los correlacionan respecto al número de vermes que se recogen en abomaso ($r = -0.905$; $p < 0.05$) (Stevenson y cols., 1994). Si se correlaciona el número de eosinófilos durante el pico, con los vermes adultos localizados en el abomaso, baja la fuerza de la correlación negativa, aunque sigue manteniéndose ($r = -0.5$) (Stear y cols., 1995c). No se debe descartar que la acción protectora de estas células se pueda deber a que su presencia favorezca la aparición de diversas interleucinas y que estas traigan otras células y desarrollen otros mecanismos efectores en la zona. En cualquier caso, tanto la respuesta eosinofílica, como especialmente el incremento en los niveles de actividad potenciadora de eosinófilos y proteasas de los mastocitos ovinos, requiere de una exposición previa, puesto que la producción de citocinas Th2, necesaria para desencadenar esta respuesta, sólo se produce en animales inmunizados (Stevenson y cols., 1994). De hecho, la interacción entre los mastocitos y la IgE provoca la liberación de factores quimiotácticos para eosinófilos (Lewis y Austen, 1981).

La eosinofilia (Dawkins y cols., 1989; Buddle y cols., 1992) y la mastocitosis (Douch y cols., 1996c) se han asociado con razas genéticamente resistentes a nematodos gastrointestinales. De hecho, conjuntamente con otros parámetros fácilmente determinables, como recuentos fecales de huevos y los distintos alotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), se han utilizado como marcadores inmunogenéticos en ovinos frente a diversos tricostrongídeos (Hohenhaus y Outteridge, 1995; Douch y cols., 1996; Buddle y cols., 1992).

Por otra parte, la respuesta de hipersensibilidad tipo 1, puede resultar importante desde el punto de vista de la acción patógena del parásito, por los daños que pueden provocar en los tejidos (Wiggin y Gibbs, 1990). Varios autores atribuyen a dicha respuesta inflamatoria local los daños que se provocan en la mucosa y que parecen responsables del incremento sérico del pepsinógeno (Wiggin y Gibbs, 1990; Smith y Gibbs, 1981; Wiggin y Gibbs, 1987). Varios nematodos bovinos, incluyendo *Ostertagia*, también parecen contribuir a que se produzca la presencia de eosinófilos en los tejidos parasitados mediante la liberación de sustancias quimiotácticas para estas células (Washburn y Klesius, 1984; Klesius y cols., 1985a).

2.10.8 Características de los antígenos parasitarios

Un antígeno, en el contexto de una infección, se puede definir como una molécula derivada de un patógeno, que es presentada al sistema inmune del hospedador capaz de inducir una respuesta inmune celular y / o humoral específica de esta molécula. Esta definición deja fuera a cualquier molécula parasitaria que sea accesible al sistema inmune pero que no induzca una respuesta inmunitaria (de modo análogo a las moléculas del hospedador) así como moléculas que no son accesibles al sistema inmune del hospedador, pero que administradas artificialmente pueden provocar una respuesta inmune, y que luego son capaces de actuar sobre estos “antígenos ocultos”. El propósito de la mayoría de los estudios con antígenos es encontrar alguna molécula válida como candidata a ser empleada como vacuna o con fines diagnósticos (Meeusen y Maddox, 1999; Newton y Jun, 1999).

Para acceder a las células presentadoras de antígeno, las moléculas parasitarias necesitan entrar en contacto con los tejidos del hospedador. Esto puede ocurrir cuando las moléculas son excretadas tras la digestión o secretadas por las glándulas secretoras, mayoritariamente localizadas en la faringe (= región esofágica) del parásito. Además, las moléculas superficiales de las fases invasoras de los tejidos están en contacto directo con las células del hospedador, o pueden quedar en los tejidos tras la muda como parte de la misma (Behnke y cols., 1992). Algunas de las moléculas parasitarias internas pueden llegar a ser accesibles e inmunogénicas si sucede la muerte y la degradación del parásito dentro de los tejidos.

Los preparados antigénicos excretor-secretor normalmente se obtienen tras cultivos *in vitro* y a parte de contener moléculas de excreción / secreción, suelen también contener moléculas superficiales, en mayor o menor medida en función del estado del parásito (Behnke y cols., 1992). Si la muerte parasitaria o el daño sucede durante el cultivo, también se pueden encontrar moléculas somáticas en las preparaciones excretor-secretor. Por su parte los antígenos somáticos de vermes adultos, contienen, productos de las glándulas secretoras y del aparato digestivo, por supuesto moléculas superficiales y una multitud de antígenos corporales que habitualmente no son accesibles al hospedador durante infecciones naturales (Balic y cols., 2000).

Las moléculas de superficie de los nematodos gastrointestinales se pueden estudiar por medio del marcaje específico de nematodos intactos con biotina o yodina radioactiva seguida de su extracción con SDS y una tinción

específica del producto marcado. Los perfiles de marcaje con biotina de diferentes estadios larvarios y adultos de *T. circumcincta* y *O. ostertagi* indican que hay cambios considerables proteínicos en las larvas en desarrollo (Keith y cols., 1990). En el caso de *T. circumcincta*, las fases de L1 y L2 son muy similares, mientras que la L3 presenta un perfil polipeptídico diferente. Cambios importantes en la transición de L3 a L4 tienen lugar, lo que se asocia con un cambio de perfiles proteicos aún más profundo. Las diferencias son también similares entre la L3 y la L4 de *O. ostertagi* (Keith y cols., 1990).

2.10.9 Inmunoprofilaxis

2.10.9.1 Vacunación

Cada vez son mayores los esfuerzos por conseguir el control de las parasitosis por medio de vacunas. Entre otras razones, por el propio interés que tienen los consumidores de adquirir productos de origen animal sin residuos químicos ni antibióticos. También se busca con las vacunas solventar problemas de resistencia a fármacos y evitar efectos medioambientales indeseables. Sin embargo pocas son las vacunas que existen hoy en día comerciales para el tratamiento de parasitosis, y dentro de éstas, únicamente se pueden encontrar algunas que involucren a nematodos, (Pengally, 1999). Uno de los principales problemas con el que se encuentran las vacunas frente a parásitos, es la gran eficacia que en general tienen los fármacos. Los modelos matemáticos que se han desarrollado en este sentido en rumiantes, muestran que será más factible con el empleo de vacunas conseguir una reducción en las cargas parásitas en un determinado grupo de animales que en la totalidad de la población, y que probablemente, su gran contribución sea la reducción en las cargas de parásitos en el medio (Barnes y cols., 1995; Frisch, 1999; Pruett, 1999). A la hora de su aplicación práctica, la competencia con los fármacos, por la elevada eficacia de éstos, será por tanto, difícil (Dalton y Mulcahy, 2001).

Trabajos realizados a finales de la década de los 70 y a lo largo de los 80, demostraron la importancia que en la obtención de inmunidad protectora frente a los nematodos gastrointestinales de los rumiantes, podían tener diversas proteínas asociadas a la superficie microvilliar del intestino del nematodo. Concretamente, la contornina, una proteína componente de los filamentos helicoidales, inducía altos niveles de protección contra *H. contortus* (78%) (Munn, 1977; Munn y cols., 1987).

En realidad, los mejores resultados obtenidos con diversos ensayos vacunales se han realizado con *H. contortus*, y generalmente con proteasas (fundamentalmente con glicoproteínas de la membrana microvilliar) procedentes del tracto gastrointestinal de los nematodos (Smith, 1999; Newton y Munn, 1999b). El empleo de estas proteínas es frecuente en parásitos caracterizados por sus hábitos hematófagos y suelen responder bastante bien (Smith SK y cols., 1999; Smith TS y cols., 1997). La vacuna más eficaz en los ensayos realizados hasta el momento es la H11 de *Haemonchus contortus* (Graham y cols., 1993). Se trata de una proteína que participa de la digestión de la sangre por parte del nematodo y que se localiza de forma exclusiva en el intestino del parásito (Smith y cols., 1993; 1997). La unión del anticuerpo con este antígeno (Smith, 1993), provoca una disrupción en la normal capacidad del parásito de ingerir sangre, ya desde la fase de L4, y esta incapacidad se hace extensiva al estadio de adulto. A mayor cantidad de anticuerpos en sangre, mayor es la protección obtenida (Andrews y cols., 1997; Newton y Munn, 1999a; Tavenor y cols., 1992; Smith SK y cols., 1999), además esta proteína proporciona de forma pasiva protección a través del calostro (Andrews y cols., 1995; Newton y Munn, 1999b; Smith WD, 1999) y también se puede lograr traspasando suero inmune (Smith WD, 1993). A esta proteína se la considera un antígeno oculto, y no resulta inmunogénica en infecciones naturales (Newton y Munn, 1999a; Smith, 1999). Con el empleo de este inmunógeno, se ha logrado proporcionar un 90% de protección en corderos durante más de 23 semanas, sin interferir con la inmunidad natural de los animales. Su administración en ovinos durante el último tercio de la gestación reduce el clásico incremento de huevos periparto en un 98%, sin olvidar que la inmunidad calostrual está demostrada. Esta disminución en la producción de huevos tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico (Dalton y Mulcahy, 2001). Las recomendaciones para su empleo consisten en un tratamiento a corderos antes del destete, para protegerlos frente a las L4 y adultos hasta que ellos alcancen la inmunidad natural por exposición a las L3 y también vacunar a las ovejas durante la gestación para prevenir el incremento periparto de huevos y aprovechar el paso de inmunoglobulinas a través del calostro (Newton y Munn, 1999; Smith WD, 1999).

Otros antígenos han sido ensayados con éxito en *H. contortus*. Por ejemplo, la H-gal-GP. Este antígeno es un complejo proteínico que se obtiene por medio de cromatografía de afinidad utilizando N-acetilglicosamida y puede llegar a reducir las cargas de vermes en un 72%, y los recuentos fecales de huevos hasta el 93%. Sin embargo, no se sabe

cual de las distintas fracciones proteicas que constituyen la H-gal-GP es capaz de producir esta protección (Smith NC y cols., 1994; Smith WD y cols., 1994; Smith WD, 1999; Knox y Smith, 2001). Estudios realizados por otros autores parecen demostrar que esta protección se debe principalmente a proteasas tipo cisteína (Knox y cols., 1993; Skuce y cols., 1999a, 1999b). Estas proteínas son también proteasas tipo cisteína y participan en la digestión de la sangre en el intestino del parásito, al igual que la H11 (Rhoads y Fetterer, 1995; 1997; Knox y Smith, 2001). Boisvenue y cols., 1992, también han demostrado la eficacia protectora de otra proteasa tipo cisteína contra *H. contortus*. La naturaleza precisa de estas proteasas puede diferir en distintas áreas geográficas (Cox y cols., 1990b; Pratt y cols., 1990; 1992a; 1992b; Knox y cols., 1993; Karanu y cols., 1997; Rehman y Jasmer, 1998; Skuce y cols., 1999a; 1999b). Esta variación entre aislados puede tener importancia para el desarrollo de vacunas de utilización mundial (Knox y cols., 2001).

Proteasas tipo cisteína (TSBP) han sido aisladas por cromatografía en una cepa de *H. contortus* en cabras de la agrupación caprina canaria. Tras su purificación, se procedió a su ensayo como antígenos inmunoprotectores y como resultado se obtuvo una importante reducción en la liberación de huevos por parte de los animales inmunizados (79-99%) y también una significativa reducción en el número de adultos que se recogieron tras 8 semanas de inoculados respecto a un grupo no inmunizado previamente, que sirvió como testigo (Ruiz y cols., 2001). Otros ensayos en cabras consiguen una reducción del 60% en vermes y del 50% en recuentos fecales de huevos en heces en exposiciones heterólogas (cepas de *H. contortus* de ovino) utilizando una poliproteína del *H. contortus* p100^{GAI}, un complejo de tres proteínas caracterizadas por Jasmer y cols., 1993; 1996. Se han realizado ensayos de inmunización en ovinos con fracciones antigénicas de 53, 39 y 18 kDa (F4, F8 y F 14 respectivamente), procedentes de extractos de hembras adultas de *H. contortus*, obteniéndose una reducción significativa en el número de vermes detectados en el abomaso de los animales inmunizados respecto a un grupo control (>46%), no inmunizado previamente, tras una inoculación oral de 300 L3 / Kg de peso vivo (Gómez-Iglesias, 2001a; 2001 b). Otros antígenos, como un complejo de tres péptidos ligados a Con A, P45, P59 y P53 (complejo P150) caracterizado por Smith TS y cols., 1993 producen también protección parcial en corderos (Knox y Smith, 2001), al igual que sucede con el péptido HcsL3, antígeno obtenido de L3 de *H. contortus* ovinos (Newton y Munn, 1999) y con fracciones de 15-24 kDa del antígeno excretor-secretor de L4 y adultos de *H. contortus*, que es capaz de proteger a ovejas adultas

con un 80% de eficacia. Esta última protección está directamente relacionada con la presencia de IgE sérica (Scabbling y cols., 1997; Kooyman y cols., 2000).

Sin embargo, a pesar del éxito que preside la mayor parte de los experimentos con diferentes glicoproteínas intestinales de *H. contortus*, que sin dudas presentan importantes posibilidades para el futuro control de esta especie, no es menos cierto que no están resultando tan eficaces los intentos de inmunización con otras especies como *Ostertagia* spp. . En esta especie se ha demostrado que moléculas de antígenos superficiales de *T. circumcincta* confieren una protección del 70% frente a nuevas exposiciones empleando el hidróxido de berilio como adyuvante, siendo una respuesta específica de fase (exclusiva de L3) (Wedrychowicz, 1992). Esta respuesta de fase ya fue observada por Keith y cols., 1990, al demostrar que existían una serie de moléculas específicas en la superficie de las distintas fases del ciclo biológico, tratándose de polipéptidos diferentes.

En un estudio reciente, Smith WD y cols., 2001, realizan un ensayo de inmunización cruzada de ovejas con antígenos glicoproteicos de la membrana intestinal de *H. contortus* y de *T. circumcincta*. Al realizar un estudio comparativo entre las glicoproteínas integrales de membrana de los dos parásitos, detectaron bastantes diferencias en los perfiles tras realizar un análisis mediante SDS-page, especialmente la fracción H11, mucho más gruesa y definida para el caso de *H. contortus* (se ha considerado anteriormente su importante papel inmunógeno y protector) mientras que su equivalente en la otra especie estudiada son una serie de pequeñas bandas, entre las que destaca una aminopeptidasa de 124 kDa de peso molecular denominada Oc12 (por la antigua denominación de *Ostertagia circumcincta*), que se encuentra en mucho menor presencia que la proteína H11 en *H. contortus* (McMichael-Philips y cols., 1995). Curiosamente, existe mayor relación en las glicoproteínas de membrana intestinales entre *Ostertagia* spp. y *Haemonchus contortus* que entre *Ostertagia* y *Teladorsagia* spp. (Smith, WD y cols., 2001). A pesar de que *T. circumcincta* no es hematófaga, está demostrado que es capaz de ingerir algunos anticuerpos en ovinos (Murray y Smith, 1994). Como resultado, encontraron una excelente protección en ovinos inmunizados con la proteína H11 en las parasitaciones por *H. contortus*, pero este antígeno fue incapaz de provocar respuestas inmunitarias eficaces al inocular *T. circumcincta* ni *T. axei* a las ovejas. Al utilizar como antígeno preparaciones de glicoproteínas de membrana de *T. circumcincta* no se obtuvieron diferencias ni en el número de adultos ni en los recuentos de huevos al inocular las ovejas con

Teladorsagias. Únicamente se lograron obtener respuestas protectoras, con una reducción en los recuentos fecales de huevos, al inocular a los ovinos inmunizados *H. contortus*, aunque la respuesta protectora fue menor que al emplear las glicoproteínas homólogas (Smith, WD y cols., 2001). Otros estudios coinciden en señalar esta ausencia de protección frente a *T. circumcincta* al utilizar extractos crudos de *H. contortus* (Smith, WD, 1993). Es posible que esta ausencia de protección por parte de estas glicoproteínas se deba a que la cantidad de anticuerpos ingerido por el parásito resulte insuficiente (Smith, WD y cols., 2001). En general, el empleo de proteínas del tipo de H11, y otras como H-gal-GP y TSBP se han ensayado tanto para *Ostertagia ostertagi* como para *Teladorsagia circumcincta*, y aunque el resultado ha sido positivo, en general, lo cierto es que han sido mucho menos consistentes que en el caso de *H. contortus* (Smith y cols., 2000; Knox y cols., 2001).

Algunas galectinas (lectinas integradas en la membrana y capaces de ligar residuos de carbohidratos) se han empleado en ensayos vacunales en corderos con *T. circumcincta* previa clonación parcial y caracterización (Meeusen, 1996; Raleigh y cols., 1996; Newton y cols., 1997; Greenhalgh y cols., 1999), mostrándose capaces de disminuir los recuentos fecales de huevos.

También resultan interesantes ensayos con antígenos purificados de 31 kDa de L3 de *T. circumcincta* en ensayos realizados en ovinos. Los animales inmunizados con este antígeno mostraron reducciones significativas tanto en las cargas parasitarias como en los recuentos fecales de huevos. Se demostró una estimulación inmunogénica mediante el empleo de ELISA y de electroinmunoensayo tras la inmunización. En los animales vacunados se detectaron un mayor número de larvas en la mucosa del abomaso, pero también una mayor infiltración eosinofílica y de linfocitos (McGillivray y cols., 1992), sin embargo, estos trabajos prometedores no han tenido continuidad.

2.10.9.2 Pastoreo mixto como método de control de las tricostrogilidosis

Tanto *Ostertagia ostertagi* como *Teladorsagia circumcincta* son altamente específicas de sus hospedadores y no desarrollan adultos en especies heterólogas (Borsteede, 1981a; Coop y cols., 1985; Sutherland y cols., 1999). Es por esto por lo que se recomienda el pastoreo mixto de vacas y ovejas en programas de control parasitario (Barger y cols., 1996).

Clásicamente se asume que se reduce la contaminación parasitaria a través del consumo de larvas de los pastos por especies heterólogas donde no se van a desarrollar completamente (Barger y Southcott, 1975; Eysker y Jansen, 1982). Con este método se reduce el número de parásitos para cada hospedador (Jordan y cols., 1988). Se ha demostrado que este método de control supone mayor ganancia de peso que la rotación con una sola especie (Jordan y cols., 1988; Barger y Southcott, 1975).

Algunos ensayos tratan de explicar los mecanismos que se ponen en juego en estos casos. Así, en inoculaciones experimentales de L3 de *T. circumcincta* a ovinos tratados con cápsulas de liberación controlada de benzimidazoles que evitan el establecimiento de los adultos, se producen aumentos séricos de IgG anti-L3 de *T. circumcincta*, lo que demuestra que las larvas son capaces, al menos, de provocar una respuesta inmunitaria parcial (Sutherland y cols., 1998). Es posible que la larva de *O. ostertagi* pueda provocar la misma respuesta en ovinos (Sutherland, 1999). Aunque *O. ostertagi* es incapaz de desarrollar en ovino una infección completa (Yakoob y cols., 1983) y por tanto no aparecen huevos en las heces de ovinos infectados, sí se producen incrementos plasmáticos del pepsinógeno, lo que indica la existencia de lesiones histopatológicas tras el desarrollo larvario (Coop y cols., 1985). De hecho se ha demostrado que las L3 de *O. ostertagi* en ovinos llegan a madurar hasta L4 (Herlich, 1974).

Las infecciones mixtas de nematodos son frecuentes en pastoreo. En ovinos de raza merino no inmunizados frente a nematodos gastrointestinales, que infecciones concurrentes con *T. colubriformis* y *T. circumcincta* no comprometen el desarrollo de inmunidad a otros parásitos, pero cuando *T. colubriformis* u *O. circumcincta* están juntas con *H. contortus*, se retrasa el establecimiento de la inmunidad en más del 90% (Honde y Bueno, 1982; Blanchard y Wescott, 1985). Este efecto se puede reproducir si incrementamos el pH del abomaso (Honde y Bueno, 1982).

2.10.9.3 Reconocimiento del mapa del loci del rasgo económico como método de control

Si se logran identificar los genes que regulan la susceptibilidad / resistencia a las infestaciones por *Ostertagia*, o si se asocian a algún carácter hereditario fácilmente identificable se abre una importante puerta para el control de esta nematodosis. En bovino, Gasbarre y cols., 2001, al menos han logrado reconocer un loci que regula la capacidad de los bovinos de liberar un mayor o menor número de huevos cuando están parasitados por

O. ostertagi. Entre las alternativas que nos aporta el conocimiento de estos loci, se encuentra la posibilidad de economizar gastos en fármacos, puesto que se puede recurrir al tratamiento específico de aquel pequeño porcentaje del rebaño (25%) responsable de la mayor diseminación del parásito. De este modo, además de reducir los costes por el empleo de fármacos, se dificulta la aparición de aislados resistentes a los antihelmínticos, puesto que no se trata la totalidad de la población parasitaria. Otra alternativa profiláctica, sería la estimulación de la inmunidad de estos animales más susceptibles por medio del empleo de vacunas o inmunomoduladores. Finalmente, en particular en ganaderías con importantes problemas parasitarios, bien porque se trata de ganaderías ecológicas que restringen el uso de fármacos, o aquellas que por las características de la zona estén fuertemente parasitadas, se puede optar por eliminar los animales susceptibles y contra seleccionarlos para conseguir una cabaña resistente de forma innata o adquirida a la ostertagiosis (Gasbarre y cols., 2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES

En esta experiencia se han utilizado un total de 20 cabritos de la Agrupación Caprina Canaria, que en el momento de su adquisición contaban con una semana de vida. Los animales fueron alojados en instalaciones desinfectadas convenientemente, situadas en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y fueron mantenidos en condiciones libres de nematodos desde su llegada hasta el momento en el que se inició la experiencia.

Una vez finalizado el periodo de lactancia artificial, los cabritos fueron alimentados con piensos comerciales de inicio. Posteriormente se fue incorporando maíz y alfalfa deshidratada progresivamente hasta sustituir completamente el pienso de inicio.

Tras la ubicación de los animales, y antes de iniciar la fase experimental, se les realizó una serie de controles para determinar su estado sanitario desde un punto de vista parasitológico. Así se llevó a cabo un estudio coprológico mediante técnicas de concentración (flotación en solución saturada de cloruro sódico y sedimentación formol-éter) (Colville, J. 1991; Hendrix, 1999), observándose la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. A tenor de estos resultados los animales se trataron con Amprolio (AMPROL 20% MSD-AGVET) durante seis días a una dosis de 1 gr. / 20 kpv.

3.2 OBTENCIÓN DE L3 DE *Teladorsagia circumcincta*

La cepa de *T. circumcincta* utilizada en el desarrollo de esta experiencia fue cedida por la Dra. McKeand del Departamento de Parasitología Veterinaria de la Universidad de Glasgow. Así mismo y durante la segunda fase del estudio también se utilizaron L3 remitidas por el Dr. Alunda de la Facultad de Veterinaria de Madrid. A partir de estas, las L3s necesarias para el desarrollo de la experiencia fueron obtenidas a partir de 2 donantes, cabras adultas de la Agrupación Caprina Canaria libres de nematodos.

Estos animales fueron inoculados por vía intraruminal con 20000 L3. A partir de la inoculación se realizaron controles coprológicos diarios, mediante un método de concentración (flotación en solución saturada de

cloruro sódico) hasta que comenzó la liberación de huevos. En ese momento, se procedió a la recogida de heces, utilizando para ello unos arneses como los que se muestran en las figuras 3.1 y 3.2.



Fig 3.1: Arnés para la recogida de heces

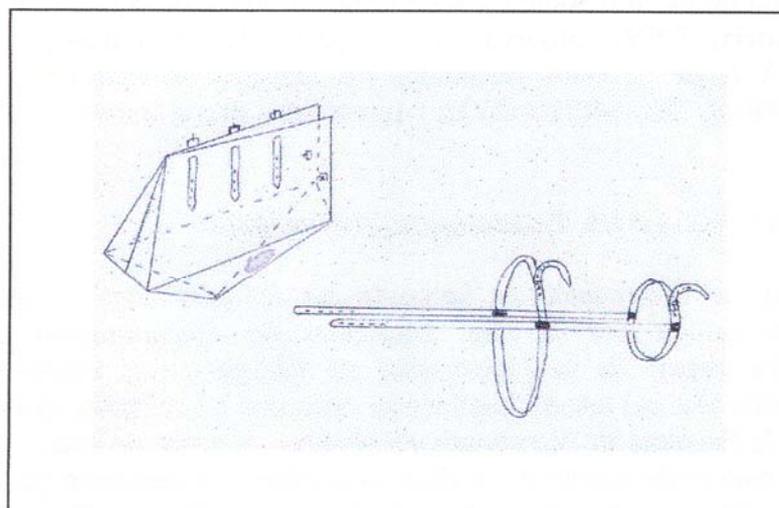


Fig 3.2: Esquema de un arnés

Una vez recogidas las heces, se procedió a disgregarlas y mezclarlas con turba estéril con la ayuda de una espátula, humedeciéndose y evitando que estuvieran acuosas. Las heces se introdujeron en recipientes plásticos

protegidos por una gasa tupida para favorecer su aireación. Estas fueron entonces incubadas a 22° C durante 10 días. A lo largo del período de incubación se procedió durante días alternos a remover el material fecal cultivado para facilitar la aireación de las capas más profundas adicionándoles agua para humedecerlas en caso necesario.

El aislamiento de las L3 obtenidas en el coprocultivo se llevó a cabo mediante el método de Baermann. Las larvas aisladas de este modo fueron absorbidas en papel de filtro, que una vez seco se sometió de nuevo al método de Baermann, obteniéndose con ello una suspensión de L3 en agua, que fue mantenida a 4 ° C hasta su uso. (Fleck y Moody, 1988; MAFF, 1989; Colville, 1991).

La determinación de concentración de larvas se realizó extrayendo cinco alícuotas de 20 µl procediéndose a contar el número de larvas presentes en cada una de ellas. A continuación se midió el volumen de suspensión de L3 y así se obtuvo la concentración de larvas por ml. (MAFF, 1989).

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo se dividió en dos fases. En la primera de ellas se realizó una inoculación con 2.000 L3 de *T. circumcincta* semanales via intraruminal durante 5 semanas consecutivas a 10 cabras (lote A), manteniendo 10 animales sin inocular como testigos (lote B). Los animales de cada lote se mantuvieron aislados entre sí, para evitar la contaminación entre lotes. Con ello se trató a partir de ensayos previos de reproducir infecciones con cargas parasitarias de *T. circumcincta* similares a las observadas en nuestro entorno, (Molina y cols., 1997). Esta fase se prolongó desde la semana 0 de la experiencia hasta la semana 17^a, momento en el que se procede a sacrificar a 5 animales del lote A (lote A1).

La segunda fase del experimento comenzó la semana 17^a y terminó la semana 32^a, con el sacrificio de todos los animales. En la primera semana de esta segunda fase (semana 17^a) los 5 cabritos restantes del lote A (lote A2), así como los del lote B fueron tratados con clorhidrato de levamisol (7.5 mg / k p.v.). En la semana 23^a, los animales del lote A2 (reinfestación) y 5 animales del lote B (lote B1) fueron inoculados intraruminalmente con 20.000 L3 de *T. circumcincta* en una sola dosis. Los 5 animales restantes del lote B (lote B2) quedaron sin inocular, manteniéndose como testigo. El

estudio finalizó con el sacrificio de todos los animales la semana 32ª del estudio.

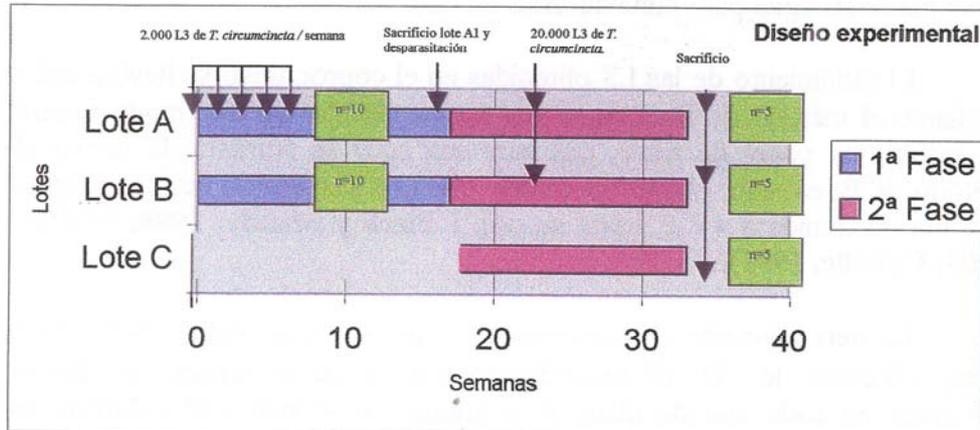


Fig 3.3: Representación esquemática del protocolo experimental. En la primera parte del estudio, las cabras del lote A reciben 5 inoculaciones con 2.000 L3 de *T. circumcincta*. La semana 17ª, se sacrifican 5 animales del lote A (lote A-1), además se desparasitan con clorhidrato de levamisol todos los animales. La semana 23ª, se inoculan con una dosis única de 20.000 L3 de *T. circumcincta* el lote A-2 (n=5), y 5 animales del lote B (B1), quedando otros cinco animales del lote B (B-2) como testigos.

3.3.1 Recogida de muestras

Durante la experiencia se extrajeron de forma seriada y con una frecuencia semanal, muestras de sangre, suero y heces, con el objeto de estudiar diferentes parámetros hemáticos, la capacidad de respuesta “*in vitro*” de los linfocitos frente a mitógenos inespecíficos y antígenos parasitarios así como su respuesta inmune humoral y la presencia y número de huevos de *T. circumcincta* liberados por los animales inoculados.

Las muestras de sangre para hematología fueron obtenidas por punción aséptica yugular y recogidas en tubos colectores con EDTA tripotásico de 5 ml (Venoject). Para los estudios de linfoproliferación, se obtuvieron 7 ml en jeringas que contenían 350 µl de heparina sódica (50 UI / ml de sangre) (Rovi ®). La toma de muestra se realizó desde la semana cero hasta la séptima ininterrumpidamente. También se extrajeron muestras la semana novena y la undécima y desde la vigésimo-cuarta, vigésimo-quinta, vigésimo-séptima, vigésimo-novena y trigésimo-primer. Finalmente también se obtuvo sangre para el test de transformación

linfoblástico la vigésimo-novena semana. Para la obtención del suero, se procedió del mismo modo, recogiendo en este caso las muestras en tubos colectores de 10 ml (Venoject). Posteriormente, y para la separación del suero, se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. Los diferentes sueros, convenientemente identificados, fueron conservados en viales de poliuretano de 1.5 ml y conservados a -40°C hasta su uso. Las muestras de sangre para hematología y de suero se obtuvieron semanalmente, desde la semana 0 del experimento hasta la semana 19^a (ambas inclusive) retomándose las extracciones desde la semana 24^a hasta la 31^a con la misma periodicidad.

Respecto a las muestras fecales, estas se recogieron directamente del recto de los animales, para la realización de estudios coprológicos cualitativos y cuantitativos. Dichas muestras se recogieron con una periodicidad semanal desde el inicio de la experiencia hasta la semana 17^o y posteriormente desde la semana 24^a hasta la 31^a una vez constatada la reducción producida por el antihelmíntico en todos los casos. Para evitar, en la medida de lo posible, fluctuaciones diarias en los recuentos fecales (MAFF, 1989), todas las tomas de muestras se realizaron aproximadamente a la misma hora, procediéndose inmediatamente al procesado.

3.4 ANÁLISIS COPROLÓGICOS

3.4.1 Métodos cualitativos

Sobre las muestras de heces recogidas, se realizaron técnicas de concentración para determinar la liberación de huevos de *T. circumcincta*. Concretamente se realizaron flotaciones con soluciones saturadas de cloruro sódico en todo los animales objeto de estudio (MAAF, 1989; Colville 1991; Sloss y cols, 1994).

3.4.2 Métodos cuantitativos

La concentración de huevos de nematodos en las heces se estimó por el método de McMaster modificado (Paracount-EPGTM). Los recuentos se realizaron por triplicado para cada animal, obteniéndose una media de huevos / animal / gramo de heces (MAAF, 1989; Colville 1991; Sloss y cols., 1994).

3.5 ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

Mediante el empleo de un contador hematológico (Sysmex F-800-TOA instruments), se obtuvo el hemograma de cada uno de los animales estudiados, recogiendo de este modo los valores correspondientes al recuento de eritrocitos y leucocitos totales, concentración de hemoglobina y hematocrito. Los recuentos de eritrocitos se expresaron en 10^6 células / μl , mientras que los recuentos de leucocitos se expresaron en 10^3 células / μl . Por su parte, la hemoglobina se expresó en g/dl y los hematocrito en porcentaje. Este último parámetro se contrastó con los obtenidos utilizando capilares de hematocrito. El contaje celular se realizó por variación de resistencia al pasar la apertura del transductor. Para ello, las muestras eran diluidas mediante un sistema diluidor a una concentración 1:5000 para leucocitos y hemoglobina y a 1:50000 para hematíes y hematocrito. Debido al pequeño tamaño de los eritrocitos en esta especie animal, no fue posible realizar el recuento de plaquetas con el contador hematológico, al solaparse el tamaño celular. La hemoglobina fue determinada por medio de una versión modificada del método Hemiglobincianida ICSH, la luz absorbida fue medida a $540 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ por medio de un filtro de vidrio. El hematocrito fue computado por integración de todas las señales entre dos niveles de discriminación y multiplicado por un factor constante del ratio de dilución.

Los hematocritos se contrastaron con los valores obtenidos tras centrifugar los capilares en una centrífuga para microhematocritos (Hettich Haematokrit). De cada una de las muestras se realizaron frotis sanguíneos que fueron teñidos mediante un método Panóptico Rápido (QCA), con el objeto de elaborar la fórmula leucocitaria o recuento diferencial, para lo que se contaron 200 leucocitos. Posteriormente, y para facilitar su procesado estadístico de los resultados, se transformaron en células / μl , a partir del recuento de leucocitos y dicha fórmula leucocitaria.

La concentración de proteínas plasmáticas se determinó a partir del plasma de los capilares hematocrito. De cada muestra se procesaron dos capilares de modo que uno de ellos se calentó a 56°C durante 5 minutos y el otro se mantuvo a temperatura ambiente. Con la ayuda de un refractómetro se determinó la concentración de proteínas de las muestras tratadas térmicamente y las no tratadas. Ambos parámetros sirvieron para determinar la concentración del fibrinógeno dada la termolabilidad de este producto (Kaneko, 1980) así como el ratio proteínas plasmáticas – fibrinógeno para diferenciar entre una hiperfibrinogenemia provocada por la inflamación a la

asociada a la deshidratación. Éste ratio se calculó del siguiente modo (**Jain, 1993**):

$$PP:F = \frac{[TPP] - [Fib.]}{[Fib.]}$$

3.6 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA

3.6.1 Fundamento del Test de Transformación Linfoblástica

Esta técnica se fundamenta en la capacidad de multiplicación de los linfocitos de animales cuando se cultivan en condiciones óptimas junto a antígenos específicos o mitógenos inespecíficos. El test de transformación linfoblástica es utilizado tanto en inmunología clínica como con fines experimentales para evaluar la función de los linfocitos. Permite detectar la presencia de factores inmunosupresores en el suero, ya sean congénitos o adquiridos por infecciones asociadas (**Barta, 1993, 1983, 1986; Cooperband, 1976; Nelson, 1960**), también deficiencias adquiridas o congénitas de los linfocitos (**Barlough JE y cols., 1991; Lin DS y cols., 1991; Ziegler JB y cols., 1975**) o infecciones víricas de los linfocitos (sobre todo leucemias y linfomas virales) (**Barta, 1981; Oppenheim, 1975**) así como, para evaluar el efecto de terapias inmunomoduladoras (**Brown GB, 1991; Stites DP y cols., 1991**).

3.6.2 Materiales

3.6.2.1 Reactivos

- Penicilina-Streptomicina (Sigma).
- Medio RPMI-1640 (Sigma)
- L-Glutamina 200 (Sigma).
- Ficoll – 400 (Pharmacia Biotech)
- Diatrizoato sódico (Sigma).
- Fosfato potásico (Sigma) (PBS).
- Cloruro sódico (Sigma) (PBS).
- Fosfato disódico (Sigma) (PBS).
- Suero fetal bovino (Biochrom).

- Azul tripán (Sigma).
- Concanavalina A (Sigma).
- Phytohemaglutinina (Sigma).
- Pokeweed Mitogen (Sigma).
- Celltiter 96[®] AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assays (Promega).

3.6.2.2 Equipo

- Placas de cultivo celular (Corning).
- Estufa de CO₂ (Revco Ultima).
- Cámara de flujo laminar (Telstar BV-100).
- Centrífuga (Mixtasel Pselecta y Kubota 5.100).
- Micropipeta (Multipette[®] plus eppendorf).
- Autoclave (Autester-E).
- Hemocitómetros (Cámara de Thoma).
- Microscopio invertido.(Olympus).
- Mechero (Fireboy plus. Integra Bioscience).

3.6.3 Protocolo de aislamiento de leucocitos mononucleares

Por punción venosa yugular se extrajeron 7 ml de sangre que se mezclaron con 7 ml de RPMI (previamente mantenido a 37° C), a los que se había adicionado penicilina (50 U.I. / ml) streptomycin (50 µgr/ ml) y L-Glutamina (1 mM) (**Barta 1993**).

Para la separación de los monucleares se utilizó un gradiente de Ficoll. Para su elaboración, se disolvieron 6.41 gr de Ficoll – 400 en 100 ml de agua destilada así como 10.02 gr de diatrizoato sódico. Con la ayuda de un densímetro, se añadió el diatrizoato sódico preciso para que la densidad final fuera de 1.081 gr/ml. Posteriormente se esterilizó en autoclave.(**Barta, 1993**).

En dos tubos estériles se dispensaron 4 ml de Ficoll, preparado según el protocolo anterior. De la mezcla de sangre y RPMI-1640 procedente de cada animal, se depositaron suavemente 6 ml sobre la solución de Ficoll, en los dos tubos. Sin agitar los tubos, se centrifugaron a 600 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. (**Barta, 1993**).

Tras la centrifugación se obtuvo una banda blanquecina entre el plasma y el medio de separación que contenía a los mononucleares que se

recogieron con pipetas pasteur estériles, depositándose en tubos estériles a los que se adicionó 5 ml de RPMI-1640. (Barta, 1993).



Fig 3.4: Aislamiento de linfocitos en gradiente de Ficoll. Los leucocitos mononucleares se aíslan en la capa blanquecina que se forma entre el plasma y el ficoll.

3.6.4 Protocolo de cultivo

Todo el material que se empleó estaba estéril en el momento de su uso, se trabajó en todo momento en una campana de flujo laminar, a fin de conservar dicha esterilidad.

3.6.4.1 Preparación de medios, soluciones y suero

3.6.4.1.1 Medio RPMI-1640

A un litro de medio de RPMI-1640 se añadió 50.000 U.I. de penicilina, 50 mg de streptomicina y L-Glutamina (1 mM). Se conservó a 4° C y se adicionó el mismo volumen de L-Glutamina cada 3 semanas.

3.6.4.1.2 Suero Fetal Bovino

Se inactivó por calor antes de su uso (56° C durante 30 minutos). Posteriormente se esterilizó por filtración y se conservó a -20° C.

3.6.4.1.3 Preparación y conservación de los mitógenos

La concanavalina A (Con A) es un mitógeno de células T obtenido a partir de la *Canavalina ensiformis*. Esta se resuspendió en PBS estéril a una concentración de 10 mg / ml.

La phitohemaglutinina (PHA) es un mitógeno de células T efectoras procedente de la *Phaseolus limensis*. Se resuspendió en PBS estéril a una concentración de 10 mg / ml.

El Pokeweed mitogen por su parte se reconstituyó con PBS estéril a una concentración de 1 mg / ml. Es un mitógeno procedente de la *Phytolacca americana* y estimula a las células T dependientes de B.

Una vez reconstituidos, los mitógenos se dispensaron en alícuotas y se conservaron a -20° C, evitándose en todo momento las congelaciones y descongelaciones repetidas. (Barta, 1993).

3.6.4.1.4 Preparación del antígeno

Para la obtención del antígeno, se recogieron vermes adultos de *T. circumcincta* procedentes de abomasos de cabras donantes sacrificadas. Los vermes recogidos se lavaron tres veces con PBS 0.01 M en frío, en placas de petri con el propósito de limpiar de restos de mucosa. Una vez lavados, los homogenizados se prepararon con PBS a una concentración de 100 adultos / ml utilizando un homogenizador de vidrio. A continuación se procedió a la sonicación a 80 Hz en hielo, para evitar la degradación antigénica que se produce por el sobrecalentamiento. Este método se repitió varias veces. Se dejó reposar la solución en el hielo durante 1 hora, agitando de vez en cuando el homogenizado. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 30 minutos a 4° C para eliminar los restos no solubles. A continuación se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0.2 µm de diámetro de poro (Maizels, 1991; Ogilyie y col. 1973). Para determinar la concentración proteica de la solución antigénica, se utilizó el método de Bradford mediante un kit comercializado por Bio-rad (Bio-rad protein

assay, Bradford M. Anal. Biochem. 1972). La determinación de la concentración de proteínas por dye-binding (Bradford, 1976; Sedmak & Grossberg, 1977) es preferible a la de Lowry (Lowry, 1951) por la rapidez de la determinación, conveniencia y estabilidad de los reactivos (Maizel y cols., 1991). El ensayo se basa en el cambio de color que sufre el azul brillante de Coomassie cuando se encuentra ligado a proteínas. Pocas sustancias interfieren con esta reacción, excepto algunos detergentes que también ligan al colorante y provocan falsos positivos (Maizel y cols., 1991). La solución así obtenida fue recogida y utilizada como solución de antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* y se almacenó a -40° C hasta su uso.

3.6.4.2 Protocolo de cultivo

3.6.4.2.1 Equilibrado de la placa y adición de mitógenos y antígeno

Previamente a la adición de la suspensión celular se preparó la placa y se equilibró en una estufa de CO_2 a 37° C. Según la figura 3.5, las celdas desde la A1 hasta la A6, ambas inclusive, sirvieron como controles de la técnica para el animal número uno. Del mismo modo se procedió con las celdas C1 a la C6, E1 a la E6 y desde la G1 hasta la G6 para los animales dos, tres y cuatro respectivamente. En estos pocillos de control, se añadieron 50 μl de RPMI-1640 suplementado con un 20% de suero fetal bovino. En los pocillos A7, A8 y A9 (animal uno), C7, C8 y C9 (animal dos), E7, E8 y E9 (animal tres) y G7, G8 y G9 (animal cuatro) se añadió en cada uno de estos pocillos 50 μl de una suspensión de concanavalina A (10 μg /ml) en RPMI-1640 adicionado con un 20% de suero fetal bovino. De modo análogo, en las celdas A10, A11, A12 (animal uno), C10, C11 y C12 (animal dos), E10, E11 y E12 (animal tres) y G10, G11 y G12 (animal cuatro) se dispensaron 50 μl de una suspensión de fitohemaglutinina (12.5 μg /ml) en RPMI-1640 adicionado con un 20% de suero fetal bovino. En los pocillos B1, B2 y B3 (animal uno), D1, D2 y D3 (animal dos), F1, F2 y F3 (animal tres) y H1, H2 y H3 (animal cuatro) se añadió 50 μl de una suspensión de pokeweed mitogen (2.5 μg /ml) en RPMI-1640 adicionado con un 20% de suero fetal bovino. También se ensayó el comportamiento de los leucocitos mononucleares *in vitro* ante tres concentraciones diferentes de antígeno somático de *T. circumcincta*, preparado según el protocolo anterior. Estas tres concentraciones a las que se denominó Ag1 (10 μg /ml), Ag2 (20 μg /ml) y Ag3 (30 μg /ml), se diluyeron en RPMI-1640 adicionado con un 20% de suero fetal bovino. 50 μl de Ag1 se dispensó en las celdas B4, B5 y B6 (animal uno), D4, D5 y D6 (animal dos), F4, F5 y F6 (animal



tres) y H4, H5 y H6 (animal cuatro). Por su parte, 50 μ l de la suspensión correspondiente al Ag2 se añadió a los pocillos B7, B8 y B9 (animal uno), D7, D8 y D9 (animal dos), F7, F8 y F9 (animal tres) y H8, H9 y H10 (animal cuatro). Finalmente se dispensó 50 μ l de la suspensión correspondiente al Ag3 en las celdas B10, B11 y B12 (animal uno), D10, D11 y D12 (animal dos), F10, F11 y F12 (animal tres) y H10, H11 y H12 (animal cuatro).

3.6.4.2.2 Adición de la suspensión de leucocitos mononucleares

Tras la separación de los leucocitos mononucleares, esta suspensión se lavó 250 g durante 20 minutos tres veces con RPMI-1640 para eliminar los restos de Ficoll (**Barta 1993**).

Después de realizar el último lavado, el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo suplementado con un 20% de suero fetal bovino inactivado. A continuación se extrajeron 10 μ l de esta suspensión y se adicionó a una solución que contenía 75 μ l de PBS, 15 μ l de Tripan azul y 50 μ l de suero fetal bovino inactivado. Tras dejar actuar al colorante durante unos minutos, se procedió a realizar un recuento de células viables (no teñidas con el colorante) en una cámara de Thoma. (**Molina 1992** y **Barta 1993**)

De acuerdo con este recuento, se añadió el volumen necesario de RPMI-1640 para ajustar la suspensión a una concentración celular de 1×10^6 leucocitos / ml de medio.

Tras una suave homogenización, alícuotas de esta suspensión (50 μ l) se distribuyeron en 24 pocillos de la placa de cultivo para cada animal investigado según la figura 3.5. De modo que se utilizaron dos filas de la placa de cultivo celular por cada animal estudiado cada semana. Así, el animal número uno ocupó las celdas comprendidas entre la A1 Y la B12, el dos entre C1 Y la D12, el tres entre E1 y la F12 y el cuatro entre la G1 y la H12.

3.6.4.2.3 Incubación

A continuación la placa se incubó durante 72 horas a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Animal
A	C	C	C	C	C	C	ConA	ConA	ConA	PHA	PHA	PHA	Nº 1
B	PWM	PWM	PWM	Ag1	Ag1	Ag1	Ag2	Ag2	Ag2	Ag3	Ag3	Ag3	
C	C	C	C	C	C	C	ConA	ConA	ConA	PHA	PHA	PHA	Nº 2
D	PWM	PWM	PWM	Ag1	Ag1	Ag1	Ag2	Ag2	Ag2	Ag3	Ag3	Ag3	
E	C	C	C	C	C	C	ConA	ConA	ConA	PHA	PHA	PHA	Nº 3
F	PWM	PWM	PWM	Ag1	Ag1	Ag1	Ag2	Ag2	Ag2	Ag3	Ag3	Ag3	
G	C	C	C	C	C	C	ConA	ConA	ConA	PHA	PHA	PHA	Nº 4
H	PWM	PWM	PWM	Ag1	Ag1	Ag1	Ag2	Ag2	Ag2	Ag3	Ag3	Ag3	

Fig 3.5: Distribución de las distintas suspensiones de mitógenos (Con A, PHA y PWM) así como de antígenos (Ag1, Ag2 y Ag3).

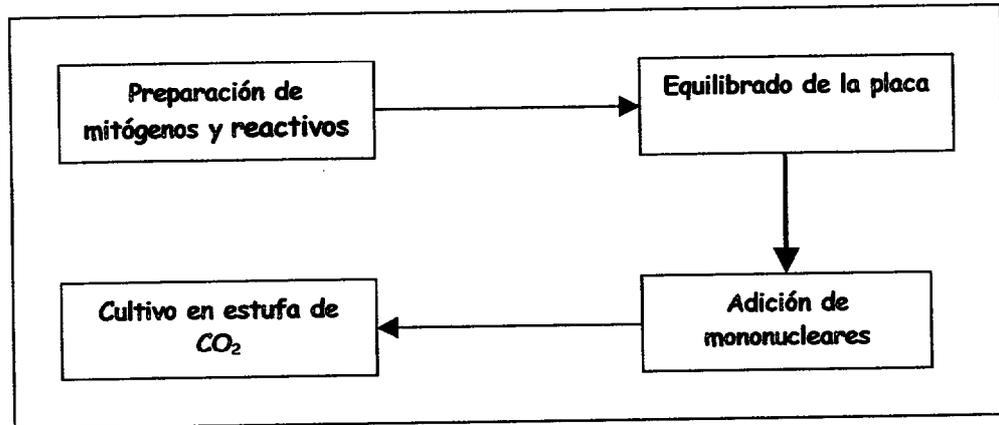


Fig 3.6: Esquema del cultivo celular

3.6.5 Lectura y expresión de los resultados

Tras la incubación en la estufa de CO₂, se procedió a la lectura de la placa para determinar la proliferación de los leucocitos cultivados en cada uno de los pocillos. Para ello se utilizó el método CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Éste método permite determinar el número de células viables en proliferación. En dicho método se utilizan dos soluciones, un compuesto de tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(-3-carboximethoxyphenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, (MTS)) y un reactivo apareador de electrones (phenazine methosulfato; PMS). El MTS al ser bio-reducido por las células viables se transforma en formazán que es soluble en el medio de cultivo (Bartrop y cols., 1991). Así, La absorbancia del formazan a 490 nm es medida directamente de las placas de cultivo celular sin necesidad de procesados adicionales (Cory y cols., 1991; Riss and Moravec, 1992). La conversión del MTS en formazan soluble es efectuado por enzimas dehidrogenasas presentes en células metabólicamente activas y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

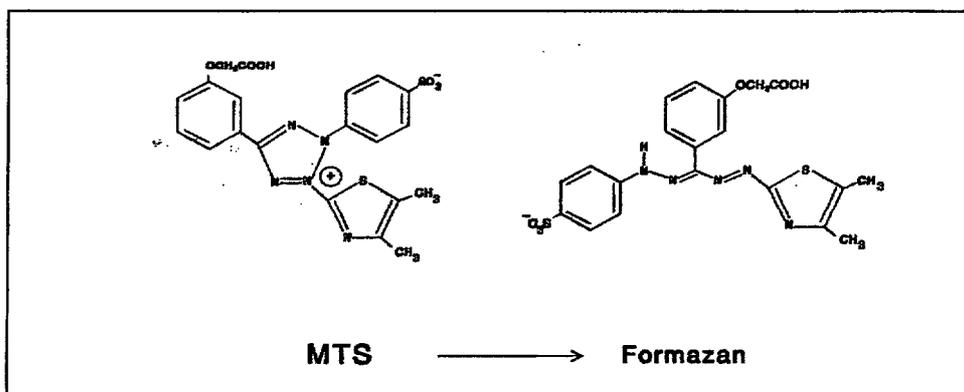


Fig 3.7: Paso del MTS a Formazán

La utilización de CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) conlleva una serie de ventajas como el no requerir el empleo de materiales radioactivos, así como por su rapidez y seguridad. La adición combinada de la solución MTS/ PMS puede sustituir la incorporación de ³H-Timidina, al utilizarse en el mismo paso.

Para su conservación, tanto la solución MTS como la PMS se congelaron a -20° C, protegidos de la luz.

3.6.5.1 Protocolo de uso del CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)

Se descongeló tanto la solución de MTS como la solución de PMS (Promega).

Posteriormente se mezclaron en un vial estéril 2 ml de la solución MTS y 100 μ l de la solución de PMS. Ésta mezcla se realizó inmediatamente antes de usarla y se homogenizó suavemente.

A continuación se añadió 20 μ l de esta mezcla en cada uno de los diferentes pocillos de la placa de cultivo celular. Para este paso se utilizaron micropipetas de repetición electrónicas (Multipette[®] plus Eppendorf). La placa se incubó durante 4 horas en la estufa de CO₂ (5%) y a 37^o C. Durante este período se produce la reducción celular del formazan.

Para la lectura de los valores de absorbancia se utilizó un lector de placas de ELISA. La longitud de onda utilizada fue la de 492 nm (#TB112, Promega Corporation).

3.6.5.2 Transformación de los resultados en variables diferencia

Una vez recogidas las absorbancias se calculó el valor de Δ -absorbancia. Este se estimó por la diferencia existente entre la media de absorbancia obtenida en los pocillos en los que se cultivaron los linfocitos con los distintos estimulantes (Con A, PHA y PWM) así como diversas concentraciones de antígeno (Ag1, Ag2 y Ag3) y el valor promedio de absorbancia obtenido en los pocillos en los que se cultivaron los linfocitos del mismo animal utilizados como testigos en los que no se incorporó ninguno de los inmunoestimulantes estudiados ni antígeno (Gogal y cols., 1997).

3.7 ANÁLISIS SEROLÓGICOS (IgG). MÉTODO ELISA

La respuesta humoral (IgG) de los animales inoculados fue estudiada mediante un método E.L.I.S.A. indirecto con el objetivo de detectar los niveles de IgG específicos frente a antígenos somáticos de vermes adultos.

Con el propósito de resolver la eficacia en la reducción de reacciones inespecíficas que los animales testigos podían presentar con el antígeno somático, se realizaron test E.L.I.S.A. con tratamientos previos del antígeno con periodato sódico. El periodato sódico provoca sobre los antígenos una oxidación que reduce el número de epítomos de naturaleza glucídica que pudieran ser reconocibles.

3.7.1 ELISA-IgG anti-*Teladorsagia circumcincta*

3.7.1.1 Material

3.7.1.1.1 Material inmunológico

Antígeno

El antígeno se obtuvo como quedó referido en el apartado 3.6.4.1.4.

Control positivo

Al no poder contar con un suero de referencia de *T. circumcincta* para la especie caprina y, tratando de eliminar en la medida de lo posible las diferencias o fluctuaciones a lo largo de la experiencia (inter-ensayo), se procedió a obtener un “pool” de sueros que sirviera de control positivo de referencia. Para ello se procedió a realizar un ensayo en condiciones estándar con los sueros de animales inoculados en otra experiencia previa. Aquellos que mostraron una densidad óptica más elevada fueron seleccionados para formar parte de dicho “pool” de referencia.

Este suero de referencia se diluyó en todas las placas a razón de 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200, siendo el diluyente empleado PBS con azida de sodio (Sigma) a una concentración de 0.02% (p / v).

Suero problema

Las muestras de sueros problemas, se diluyeron en PBS con azida de sodio a una concentración de 0.02% (p / v).

Conjugado

En el análisis de los sueros se utilizó como conjugado una anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa (anti-rabbit IgG preoxidase conjugate, IgG fraction of antiserum, Sigma), a una dilución 1/5000 en PBS.

3.7.1.1.2 Reactivos

A) Tampón carbonato

El tampón carbonato, a pH 9.6, se utilizó como diluyente del extracto antigénico para facilitar su adsorción en los pocillos de las microplacas en la antigenación de las placas E.L.I.S.A.

Para 100 ml de tampón:

REACTIVO	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN	
Bicarbonato sódico NaH ₂ CO ₃	71.3	8.4% (p/v)	Sigma
Carbonato sódico NaCO ₃	28.66	10.6% (p/v)	Sigma

B) Solución de lavado y diluyente

Como tampón para realizar los lavados de las placas, se utilizó PBS-Tween 20, aprovechando sus características tensoactivas. El tampón se preparó de la siguiente forma:

Para un litro del mismo:

REACTIVO			
Cloruro sódico	NaCl	7.2 gr	Sigma
Fosfato sódico	Na ₂ HPO ₄	1.48 gr	Sigma
Fosfato potásico	KH ₂ PO ₄	0.43 gr	Sigma
Agua destilada	H ₂ O	1 l	

Añadiéndole Tween 20 a una concentración final del 0.05% (v/v), y ajustando el pH a un valor de 7.2.

C) Agente saturador

Se empleó albúmina bovina (BSA, Sigma) a una concentración del 3% (p/v) en PBS.

D) Sustrato

Como sustrato se utilizó un tampón cítrico-fosfato con un 0.04% (p/v) de hidrocloreto de orto-fenilén diamina (OPD) al que se le añadió en el momento de su uso peróxido de hidrógeno al 30% a una concentración final del 0.1% (v/v). Para preparar 25 ml de sustrato se utilizaron:

REACTIVO		CONCENTRACIÓN		
Ácido cítrico anhidro	C ₅ H ₈ O ₇	6.075 ml	2.1% (p/v)	Panreac
Fosfato sódico	Na ₂ HPO ₄	6.42 ml	2.8% (p/v)	Sigma
PBS-Tween 20		12.5 ml		Sigma
Dihidrocloreto de orto-fenilén diamina (OPD)	C ₆ H ₈ N ₂	10 mgr		Sigma
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	25 µl	30% (v/v)	Panreac

La solución de frenado se preparó a partir de ácido sulfúrico a una concentración 2 M (Panreac Química, S.A.).

3.7.2.2 Método

Tras la descongelación del extracto antigénico, se procedió a la antigenación de la placa. El extracto antigénico se diluyó en tampón carbonato a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, añadiéndose 100 μl de la solución a cada pocillo de las placas de poliestireno (CORNING Dispensable Sterile ELISA Plates, Corning Glass Works). Para facilitar la antigenación se mantuvo a 4° C durante toda la noche.

Lavado de la placa: Tras la antigenación de la placa se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con 200 μl / pocillo de PBS-Tween 20. Cuando ésta no se utilizó inmediatamente, se conservó a -20° C durante un máximo de siete días.

A continuación, la placa fue saturada con una solución de albúmina bovina (BSA, Sigma) al 3% (p/v) en PBS-Tween 20, dispensándose 200 μl por pocillo, incubándose a 37° C durante treinta minutos.

Lavado de la placa: Se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con 200 μl de PBS-Tween 20.

Una vez efectuadas las diluciones seriadas del control positivo, se procedió a la distribución de las mismas (100 μl por pocillo) por duplicado, en los pocillos de las dos primeras filas de la placa según queda reflejada en la figura, reservando dos pocillos como blanco de referencia en la reacción colorimétrica final

Tras realizar las diluciones de los controles negativos y de las muestras problema (1/100), se dispensaron 100 μl de cada uno de ellos, por duplicado. A continuación se cubrieron las placas con una hoja adhesiva y se incubaron durante una hora a 37° C.

Lavado de la placa: Se efectuaron tres lavados de cinco minutos cada uno con 200 μl de PBS-Tween 20.

La adición del conjugado (anti-IgG caprina obtenido en conejo) fue de 100 μl por pocillo, incubándose cuarenta y cinco minutos a 37° C.

Lavado de la placa: Como en el apartado anterior.

Una vez preparada la disolución del sustrato, se añadieron 100 μ l de la misma en cada pocillo. A continuación se procedió a la incubación de la placa durante unos minutos protegidas de la luz en una cámara oscura y a temperatura ambiente.

La reacción se frenó mediante la adición de 50 μ l por pocillo de una solución de ácido sulfúrico 2 M.

Finalmente, se procedió a la medida de las absorbancias o densidades ópticas mediante un lector de placa E.L.I.S.A. La longitud de onda seleccionada fue de 492 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800
B	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200	Blanco	Blanco	*	*	*	*	*	*
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Fig. 3.8: Distribución de los blancos, de las diferentes diluciones del pool de sueros positivo y de sueros problemas (por duplicado).

3.7.2.3 Transformación de los valores de absorbancias en Unidades Relativas (UR)

3.7.2.3.1 Fundamento

Con objeto de eliminar las fluctuaciones que presentan las densidades ópticas de una misma muestra obtenidas en los diferentes ensayos inmunoenzimáticos, se transforman dichos valores de absorbancia en Unidades Relativas (U), a partir del pool de sueros positivos y mediante el empleo de un análisis de regresión (**Box y cols., 1993; Martín Andrés y Luna del Castillo, 1994; Milton, 1994; Gardiner, 1997**)

3.7.2.3.2 Procedimiento

Una vez obtenidas las densidades ópticas (D.O.) de cada uno de los pocillos, se realizó el procesado de los datos de la siguiente forma:

Como todas las muestras se distribuyeron por duplicado en la placa antigenada, se calculó la media aritmética de la D.O. de cada una de ellas.

A dicho valor se le restó la media aritmética del blanco más alto con el objetivo de eliminar la absorbancia debida a reacciones inespecíficas.

Con los valores de D.O. obtenidos a partir de las diferentes diluciones del pool de sueros positivos (1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200), se construyó una *recta patrón* donde se relacionó la absorbancia (eje de abscisas OX), con el logaritmo de las nueve diluciones (eje de ordenadas OY), siendo la *ecuación de la recta*:

$$\text{Log D} = n + m A$$

Donde D es la dilución, n y m los parámetros de ajuste y A la absorbancia.

Dilución	Logaritmo
1/25	-1.4
1/50	-1.7
1/100	-2
1/200	-2.3
1/400	-2.6
1/800	-2.9
1/1600	-3.2
1/3200	-3.5

Tabla: Logaritmo de las diferentes diluciones del suero de referencia.

A n se le da el valor de 0 Unidades relativas (U) y al a absorbancia de la dilución más alta se le da el valor de 100 U.

A continuación se calculó la distancia entre 0 y 100 U y el valor de cada Unidad relativa, con respecto a los logaritmos de las diferentes diluciones.

Para transformar la absorbancia de un suero en Unidades relativas, se despejó el valor de Log D de la ecuación, siendo A dicha absorbancia. Como el valor obtenido viene referido en logaritmo, se calculó la distancia entre 0 U y log D, transformándose a continuación en Unidades con respecto a los logaritmos de las diferentes diluciones.

3.7.2.4 Procesamiento de datos. Análisis estadístico

Con el estudio de contraste de medias entre los controles y el control negativo, establecemos el intervalo donde va a encontrarse el punto de corte, al 95%. En otras palabras, los controles cuya media en unidades (U) sea superior al extremo del intervalo de U de IgG en donde se sitúa el punto de corte (Vizmanos y Asensio, 1976; Canavos, 1988) se consideraron positivos.

Para asignar un valor a dicho punto de corte, se calculó mediante el valor medio de los controles negativos más dos veces la desviación estándar de los mismos.

3.7.2 E.L.I.S.A.-IgG anti *Teladorsagia circumcincta* con tratamiento previo del antígeno con periodato sódico

3.7.2.1 Tratamiento del antígeno somático de *T. circumcincta* con periodato sódico

Los carbohidratos juegan un importante papel como antígenos, muchas veces predominante en los perfiles inmunológicos de microorganismos y parásitos (Ferguson and Homans, 1988), incluso aunque se traten de epítomos que no pueden ser clonados por medio de técnicas de DNA. Existen diversos métodos que nos permiten detectar si un antígeno tiene entre sus determinantes antigénicos carbohidratos. El más simple consiste en estudiar la termoestabilidad de los epítomos, realizando un test de ligazón a anticuerpos tras tratar el antígeno a 100° C durante 5 minutos. Sin embargo, esto puede resultar equívoco, puesto que algunas proteínas son termolábiles. Se prefirió utilizar en nuestro estudio el tratamiento del antígeno con periodato sódico. El periodato provoca la oxidación de los anillos de hexosa, haciéndola lineal, destruyendo con ello cualquier reactividad inmunológica que estos carbohidratos pudieran tener. La oxidación con periodato es una técnica ampliamente utilizada para demostrar la naturaleza de carbohidratos de muchos antígenos, por ejemplo para aquellos reconocidos por anticuerpos monoclonales (Maizels y cols., 1987). En cualquier caso, algunos determinantes glucídicos son resistentes al periodato (por ejemplo la sacarina) (Maizels y cols., 1991). El periodato

también oxida otras moléculas, como la histidina, y por las mínimas condiciones que requiere, es utilizado con mucha frecuencia (**Eyrlar and Jeanloz, 1962; Miller-Podraza and Fishman, 1982**).

3.7.2.1.1 Reactivos necesarios

A) Buffer sodio-acetato

Se añadieron 0.82 gr de acetato sódico (Sigma) a un litro de agua destilada y se ajustó hasta pH 4.5.

B) Borohidrato de sodio 50 mM

A un litro de PBS se le añadieron 1.89 gr de borohidrato de sodio (Sigma).

3.7.2.1.2 Método

Tras la antigenación de la placa de modo análogo a como se describió en el protocolo anterior, se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con 200 µl de PBS-Tween 20. A continuación se dispensaron 150 µl de buffer sodioacetato (pH 4.5) con periodato sódico (NaIO_4) (5mM). Después se incubaron las placas en oscuridad y a temperatura ambiente durante una hora. A continuación se realizaron tres lavados con 200 µl de PBS-Tween 20 de cinco minutos cada uno. Para reducir los productos oxidados se añadieron 150 µl de borohidrato de sodio (50 mM) y se incubó durante treinta minutos a temperatura ambiente (**Thimothy y cols., 1996**). Luego, se realizaron otros tres lavados con 200 µl de PBS-Tween 20 de cinco minutos cada uno. A continuación, la placa fue saturada con una solución de albúmina bovina (BSA, Sigma) al 3% (p/v) en PBS-Tween 20, dispensándose 100 µl por pocillo, incubándose a 37° C durante treinta minutos, retomándose el protocolo habitual del test E.L.I.S.A. desarrollado en el apartado anterior.

3.8 NECROPSIAS

El sacrificio de los animales se realizó mediante inyección en la vena yugular de Tiopental (Tiobarbital 1 g), tras lo cual se les practicó la necropsia reglada y completa, observando macroscópicamente todos los órganos, tejidos y aparatos.

3.8.1 Toma de muestras

Para el estudio estructural se tomaron muestras de ganglios linfáticos abomasales. El tamaño de las muestras fijadas por inmersión en formol fue de 1 cm³. Además se recogieron los abomasos de todos los animales sacrificados para realizar el recuento de los adultos de *Teladorsagia circumcincta* y raspados de mucosa.

3.8.2 Lavados gástricos

Para conocer la carga parasitaria de los animales inoculados, se realizaron lavados de abomaso a todos ellos tras su sacrificio. Para ello, se ligó el duodeno antes de separar el abomaso del resto del aparato digestivo del animal y se depositaron en bolsas debidamente identificadas.

Los cuajares se abrieron sobre una bandeja de plástico, en la que se recogió el contenido. A continuación se lavó intensamente con dos litros de agua destilada la pared del cuajar, raspando cuidadosamente con los dedos la mucosa para separar los vermes adheridos, recogiéndose estos lavados en la misma bandeja donde se vació el contenido. A continuación se agitó intensamente el lavado y se recogieron 400 ml de muestra. Para ello, se utilizaron botes plásticos de 5.5 cm de diámetro y se tomaron las muestras en una probeta graduada, hasta alcanzar un total de 400 ml. Se añadió formaldehído (35-40 % p/v) hasta alcanzar una concentración final de éste al 10%. Para el recuento se emplearon placas de petri marcadas con líneas paralelas separadas entre sí por 1 cm. en las que se depositaban pequeñas cantidades del volumen obtenido tras ser fijada la muestra hasta revisarlos completamente. Se contaron los vermes con una lupa a X16 aumentos. El número de vermes contados en ese volumen de muestra se multiplicó por cinco para obtener el número de vermes presentes en el abomaso (**modificado de MAFF, 1989**).

3.9.3. Digestión de mucosa gástrica y recogida de vermes inmaduros

Se realizó un raspado de la mucosa de todos los cuajares de los animales sacrificados. Para ello se utilizó un porta y se recogió el raspado en botes estériles de orina. Se procedió a su congelación hasta el momento de su procesado.

La mucosa se sometió a una digestión péptica. El líquido de digestión se elaboró añadiendo 8 g de pepsina, 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y 23 ml de solución saturada de sal común a 940 ml de agua destilada. Este volumen fue suficiente para digerir unos 500 gr de tejido. Se dispensó el líquido de digestión en un vaso de precipitado y se añadió el raspado de la mucosa incubándose, en una estufa a 37°C durante 5-6 horas en agitación, hasta completar la digestión de la muestra. Se midió el volumen del líquido resultante de la digestión de la muestra, se agitó vigorosamente y se tomó una alícuota de 10 ml. Con agua destilada se diluyó hasta tener un volumen de 30 ml. Se examinaron estos treinta ml en placas de petri marcadas con líneas paralelas separadas por un centímetro, a 16X. El número de vermes se expresó por gramo de mucosa (**modificado de MAFF, 1989**).

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre la respuesta inmune celular y humoral que *T. circumcincta* desarrolla en cabras inoculadas experimentalmente, tratando además de evaluar el efecto que sobre la inmunorrespuesta tiene una exposición previa a una carga parasitaria baja, similar a las detectadas en Gran Canaria (Molina y cols., 1997).

Dentro del estudio, además de contabilizar los nematodos presentes en el abomaso de los animales en el momento del sacrificio, se ha realizado una valoración de la proliferación de linfocitos sanguíneos *in vitro*, tras cultivarlos en presencia de concanavalina A (con A), fitohemaglutinina (PHA) y pokeweed mitogen (PWM) -tres estimulantes inespecíficos de la linfoproliferación- y también frente a tres concentraciones diferentes de antígeno somático de *T. circumcincta*. Además se ha realizado un estudio del perfil serológico que adopta las IgG específicas a lo largo de la experiencia, así como el recuento de huevos fecales y la evolución de los distintos parámetros hemáticos, con especial atención al número de eosinófilos circulantes. Finalmente, el estudio se completa con la digestión de mucosa del abomaso para la detección de larvas en hipobiosis y con el estudio histopatológico de los ganglios linfáticos abomasales.

4.1 Recuentos de vermes adultos recogidos en abomaso

4.1.1 Recuentos de vermes adultos durante la primera fase de la experiencia

Al finalizar las primeras 17 semanas del experimento se sacrificaron 5 animales pertenecientes al grupo de inoculados semanalmente con 2000 L3 de *T. circumcincta* (lote A1). El promedio de vermes adultos que se recogieron en los abomasos fue de 150 ± 87 vermes / animal, siendo el rango de estos de 60 a 275 vermes / animal.

4.1.2 Vermes recogidos en el abomaso durante la segunda fase de la experiencia

La segunda fase del experimento se inició la semana 17 al desparasitar a todos los animales con clorhidrato de levamisol (7.5 mg / Kg pv sc). Posteriormente, la semana 23^a, se inocularon 10 animales con una dosis única de 20000 L3 de *T. circumcincta* via intrarruminal. Cinco de estos animales, habían sido inoculados en la primera fase del experimento

(lote A2 –reinfestado-), mientras que los otros cinco se habían mantenido anteriormente como testigos (lote B1). Otros cinco animales no se inocularon y sirvieron como controles (lote B2). Todos los animales se sacrificaron la semana 32ª del estudio, y se realizaron lavados abomasales a fin de conocer la carga de vermes adultos. El promedio de vermes encontrado en el lote A2 fue de 1240 ± 634 vermes / animal, mientras que en el lote primoinoculado, lote B1, el promedio fue de 1205 ± 1192 . Los rangos observados fueron 1740-185 y 2580-455 vermes / animal respectivamente.

Durante esta segunda fase de la experiencia, uno de los animales del lote A2, presentó un recuento de vermes muy inferior al resto de los animales de su grupo, con tan sólo 185 adultos. Si descartamos este animal, el promedio de este lote fue de 1504 vermes / animal, y la desviación estándar de tan sólo ± 269 . Lo mismo sucedió en el lote B1. También en este caso un animal presentó un recuento mucho mayor que el resto de los animales de este grupo. Sin este animal, el promedio del lote B1 sería de 517 vermes / animal, y la varianza de ± 88 . Incluso utilizando estos datos, si bien en el lote reinfestado presentó un valor meido más elevado con respecto a lote B1 (infectado sólo en la segunda fase del experimento), no se detectan diferencias significativas consecuentes a la infección previa. Sin embargo, si descartamos estos dos animales que presentan un comportamiento atípico dentro de sus correspondientes grupos, si se encuentra diferencias significativas entre los lotes ($p = 0.009$). En el lote B2, que incluía animales testigos que no habían sido inoculados en ningún momento en la experiencia no se recogieron vermes tras realizar los lavados de abomaso.

4.2 Test de transformación linfoblástica

4.1.1 Test de transformación linfoblástica durante la primera fase de la experiencia

Durante esta primera fase del experimento el test se desarrolló sobre dos lotes de animales, un lote A ($n = 10$), que fue inoculado a razón de 2000 L3 de *T. circumcincta* semanales y el lote B ($n = 10$), no infectado, y que sirvió como testigo durante esta fase de la experiencia. Antes de comenzar el protocolo experimental, se procedió a recoger muestras de sangre de cada uno de los animales, con las que se ensayaron distintas concentraciones de estimulantes inespecíficos, así como de antígeno, a fin de determinar la respuesta linfoproliferativa inicial.

Para los ensayos previos, se utilizaron cuatro cabritos de cinco meses de edad sanos y libres de nematodos gastrointestinales, pertenecientes a la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Respecto a la concanavalina A, se ensayaron 11 diluciones dobles distintas, que oscilaron entre los 0.75 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y 80 $\mu\text{g} / \text{ml}$, por pocillos. Para la fitohemaglutinina se ensayaron un total de 10 diluciones dobles, entre 1.56 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y los 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y el para el pokeweed mitogen, también fueron 10 las diluciones dobles realizadas, que se iniciaron en 0.625 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y los 320 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Para escoger las concentraciones que finalmente se utilizaron en el experimento se emplearon aquellas diluciones que proporcionaron una mayor respuesta linfoproliferativa respecto a los pocillos incubados sin mitógeno que sirvieron como controles.

Cinco fueron las concentraciones de antígeno ensayadas antes de comenzar el experimento. Desde 12.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ hasta 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$. En este caso, se seleccionaron las concentraciones de antígeno cuando no modificaran la respuesta de los linfocitos de los animales no parasitados que se emplearon en la puesta a punto del test de transformación linfoblástica.

Como quedó reflejado en el apartado de material y métodos, cada uno de los ensayos se realizó por triplicado, tanto para los testigos como para las distintas concentraciones de mitógenos y antígeno.

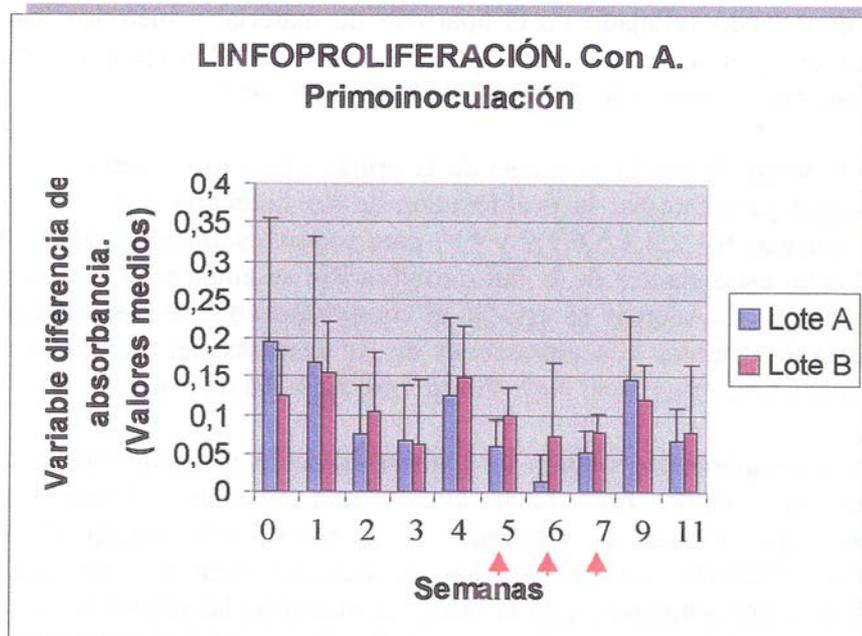
A lo largo de las 17 semanas de la primera fase del experimento se extrajo sangre para estudiar la proliferación de los linfocitos sanguíneos *in vitro*, las semanas 0,1,2,3,4,5,6,7,9 y 11^a, para todos los animales objeto de estudio. Como estimulantes de la linfoproliferación se emplearon la Con A, la PHA y el PWM. Además se estudió el comportamiento de los linfocitos en presencia de distintas concentraciones de Ag somático de adultos de *T. circumcincta* (Ag1: 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$; Ag2: 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$; Ag3: 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Para comparar los valores de linfoestimulación de cada uno de los dos lotes, se calculó para cada animal una variable diferencia de absorbancia, que recoge el resultado de la resta de la media de las absorbancias obtenidas en los pocillos estimulados -bien por mitógenos inespecíficos o por antígenos- con la media de absorbancias obtenidas en los pocillos de control. Una vez obtenidos todas las variables diferencia de absorbancia (Δ absorbancia) de los animales de cada lote, se calcula el valor promedio de dicha variable Δ absorbancia para cada grupo de animales. Los resultados del test de transformación linfoblástica se desglosarán, para una

mejor comprensión, para los distintos mitógenos y concentraciones de antígeno.

4.1.1.1 Concanavalina A

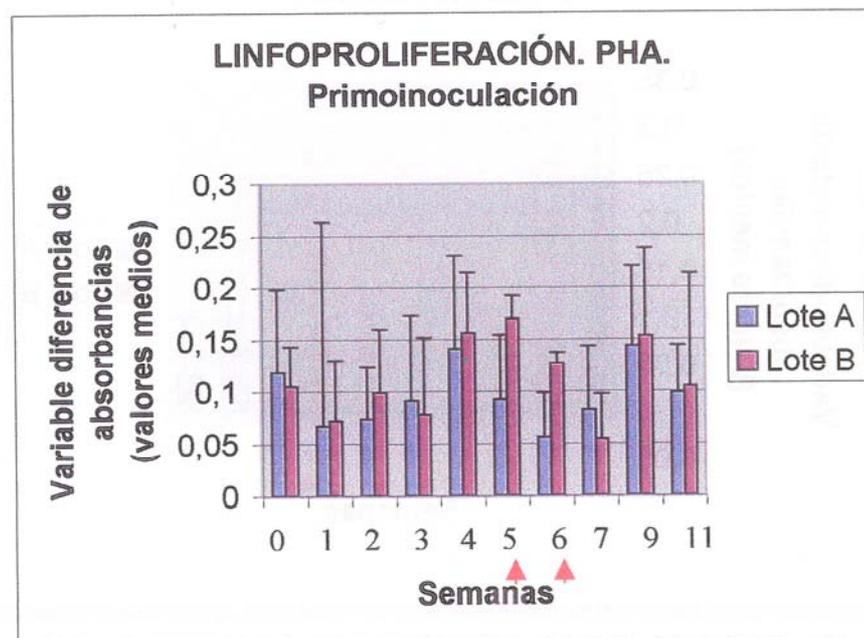
Los resultados obtenidos en los valores de Δ absorbancia para los lotes A y B, muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos en las semanas previas al experimento. Los valores diferencia iniciales son mayores en el lote A y se instauran a partir de la tercera semana, manteniéndose esta tendencia hasta la novena semana. En la 5ª semana estas diferencias son estadísticamente significativas en la linfoproliferación *in vitro* entre el lote A y el lote B ($p = 0.05$). Estas diferencias perduran las semanas 6ª ($p = 0.005$) y 7ª ($p = 0.03$) (gráfica 4.1 ▲). Sin embargo, las semanas 9ª y 11ª dejan de existir diferencias entre los lotes. Las tres semanas en las que detectamos diferencias significativas entre grupos, se observa una menor capacidad de respuesta a la con A *in vitro* de los linfocitos de los animales pertenecientes al lote A, esto es, los animales infectados.



Gráfica 4.1: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcincta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con Con A durante la primera fase del experimento.

4.1.1.2 Fitohemaglutinina

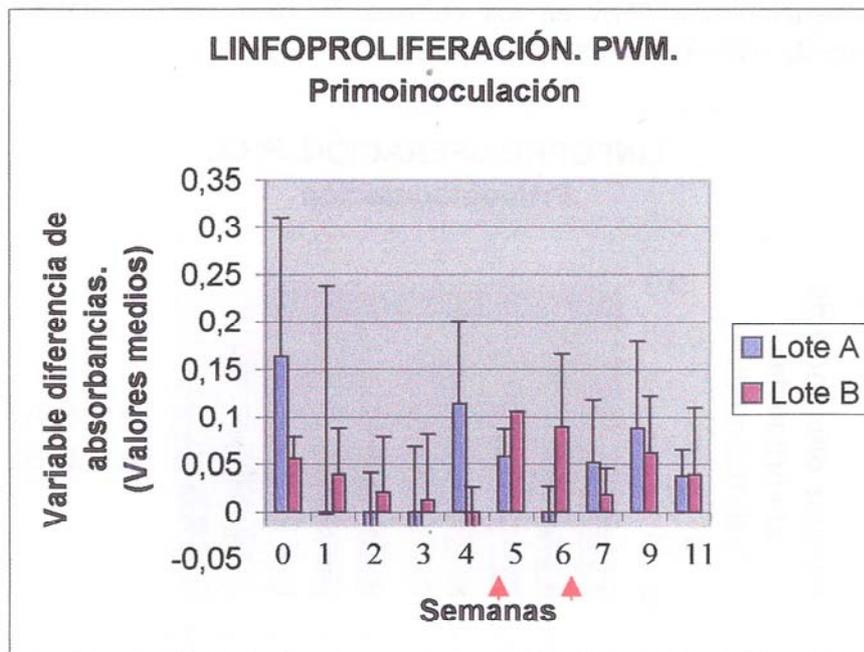
Al estudiar los valores de Δ absorbancia en los linfocitos cultivados en presencia de PHA en los lotes A y B, encontramos una situación similar a la detectada con la con A. También se parte de valores medios más elevados en el lote A, si bien en la siguiente semana después de la primera semana post-inoculación, los valores son mayores en el lote B que en el A. Únicamente encontramos diferencias significativas al estudiar el Δ absorbancia en las semanas 5^a ($p = 0.05$) y 6^a ($p = 0.05$) (gráfica 4.2, ▲), desapareciendo estas diferencias la séptima semana p. i. . Al igual que sucedía con la con A, las semanas en las que se observan diferencias entre lotes, los linfocitos del lote A (inoculado) se muestran con menor respuesta a la estimulación con PHA en los cultivos *in vitro* que los linfocitos procedentes de animales del lote B (testigos).



Gráfica 4.2: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcineta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con PHA durante la primera fase del experimento.

4.1.1.3 Pokeweed mitogen

La respuesta linfocitaria en los cultivos *in vitro* con PWM, los resultados fueron similares a los detectados con la PHA y con con A. También en esta ocasión la capacidad linfoproliferativa en los animales del lote A fue superior antes del experimento. Esta tendencia se invierte a partir de la primera semana, observándose incluso valores de la variables diferencia negativos en el lote A. Los elevadas desviaciones observadas hicieron que sólo se encontraran diferencias significativas en la respuesta linfocitaria en la quinta semana ($p=0.046$) y en la sexta semana ($p = 0.016$) (gráfica 4.3, ▲). No se detectaron diferencias significativas en las restantes semanas de la primoinoculación.

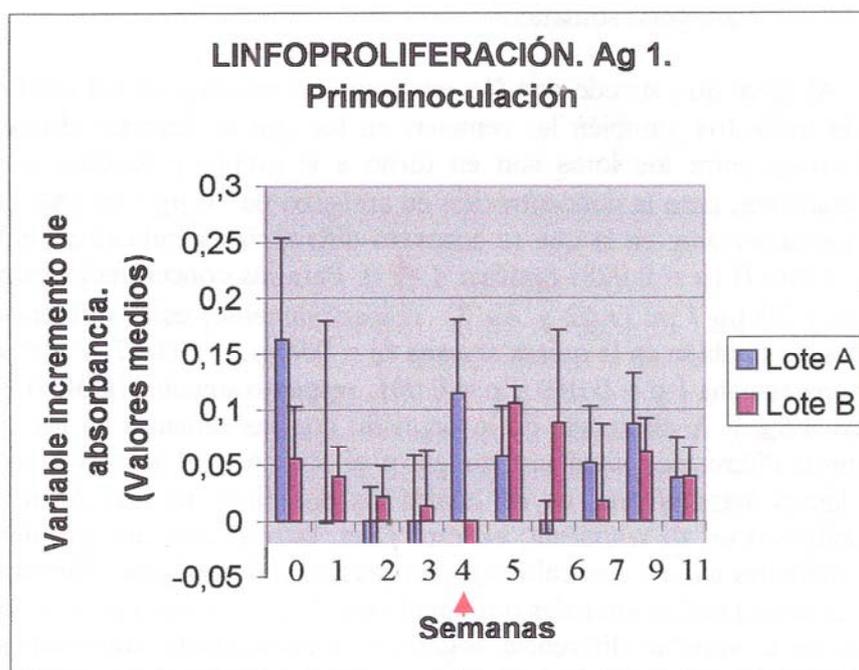


Gráfica 4.3: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcincta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con PWM durante la primera fase del experimento.

4.1.1.4 Cultivo de linfocitos con distintas concentraciones de antígeno somático

Al igual que sucede con los mitógenos ensayados en los cultivos *in vitro* de linfocitos, también las semanas en las que se detectan diferencias significativas entre los lotes son en torno a la quinta y séptima semana. Concretamente, para la concentración de antígeno de 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Ag 1), fue en la quinta semana, en la que se encontró diferencias significativas entre el lote A y lote B ($p = 0.028$) (gráfico 4.4 Δ). Para las concentraciones de 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Ag2 y Ag 3, respectivamente) estas diferencias se encontraron también en la quinta semana ($p = 0.05$ y $p = 0.045$) y además en la séptima semana ($p = 0.049$ y $p = 0.001$, respectivamente) (gráfico 4.5 Δ) (gráfico 4.6 Δ). A diferencia de lo ocurrido con las semanas en las que se detectaron diferencias significativas entre el lote A y el lote B al utilizar estimulantes inespecíficos, en las cuales los linfocitos del lote A sufrieron una inhibición en su respuesta, en este caso, la respuesta linfoproliferativa de los animales inoculados cultivados en presencia de antígeno, fue superior a la encontrada en los animales no inoculados. A de notarse que se producen valores de la variable diferencia negativos, especialmente importantes con las concentraciones más elevadas de antígeno y en el lote testigo, aunque también se nota en el lote inoculado.

Aunque se observaron importantes diferencias entre animales a lo largo del experimento la respuesta de cada animal frente a las distintas concentraciones de antígeno fue muy homogénea. Además, no todos los animales alcanzaron valores de Δ absorbancias positivos, esto es, en ocasiones, los linfocitos en cultivo con concentraciones variables de antígeno somático de adultos de *T. circumcincta*, respondieron peor que los linfocitos de los mismos animales cultivados únicamente con el medio de cultivo. Para una mejor comprensión de esta variabilidad individual, se estudiaron los comportamientos de cada animal inoculado, cada semana respecto al promedio alcanzado por los animales no inoculados (lote B), comparando dicho promedio con los valores semanales obtenidos en la tripleta de pocillos empleados para cada antígeno (ver tabla 4.1).

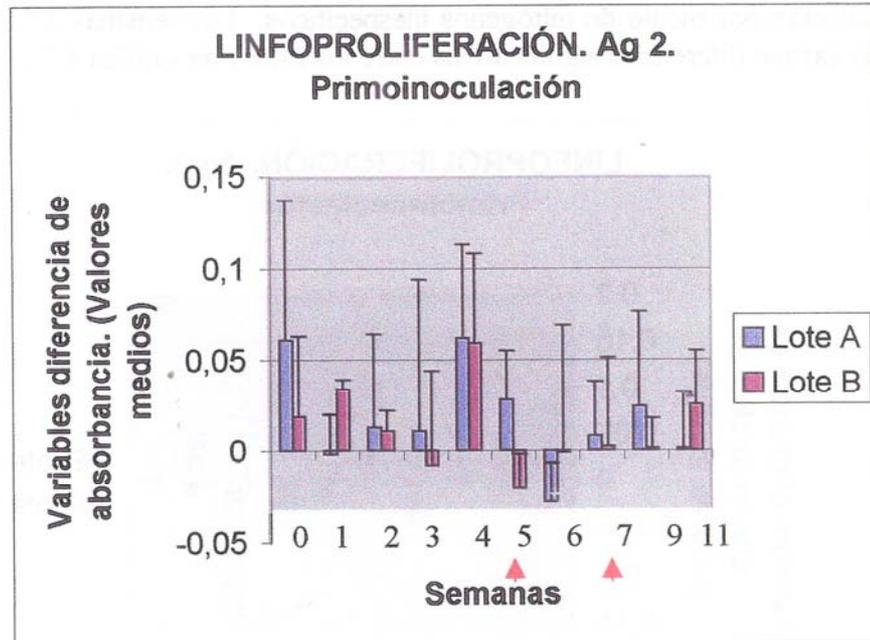


Gráfica 4.4: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcineta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcineta* a una concentración de 10 μ g/ ml (Ag1) a lo largo de la primera fase del experimento.

4.1.2 Test de transformación linfoblástica durante la segunda fase del experimento

La segunda fase de la experiencia, comenzó con la desparasitación de todos los animales con levamisol la semana 17. La semana 23^a se inocularon 10 animales con una dosis única de 20000 L3 de *T. circumcineta* intra-ruminalmente. Cinco de estos animales, eran cabras que habían estado parasitadas en la anterior etapa, y en esta segunda fase se corresponden con el lote A2. Por lo tanto se trata de animales inmunizados. Por su parte, los otros cinco animales inoculados, habían sido testigos del experimento en la anterior etapa, con lo que en este segundo periodo se trata de animales previamente infectados, que se re infectaron. Se corresponden con el lote B1. Finalmente, y como testigos de esta segunda etapa, quedan cinco de los 10 animales que fueron testigos en la anterior fase, y que en esta segunda experiencia son el lote B2, que de nuevo, no estuvieron inoculados. Siguiendo el mismo esquema de descripción de resultados procederemos a

referir independientemente a cada uno de los mitógenos y particularmente consideraremos la respuesta desarrollada frente a diferentes concentraciones de antígeno.

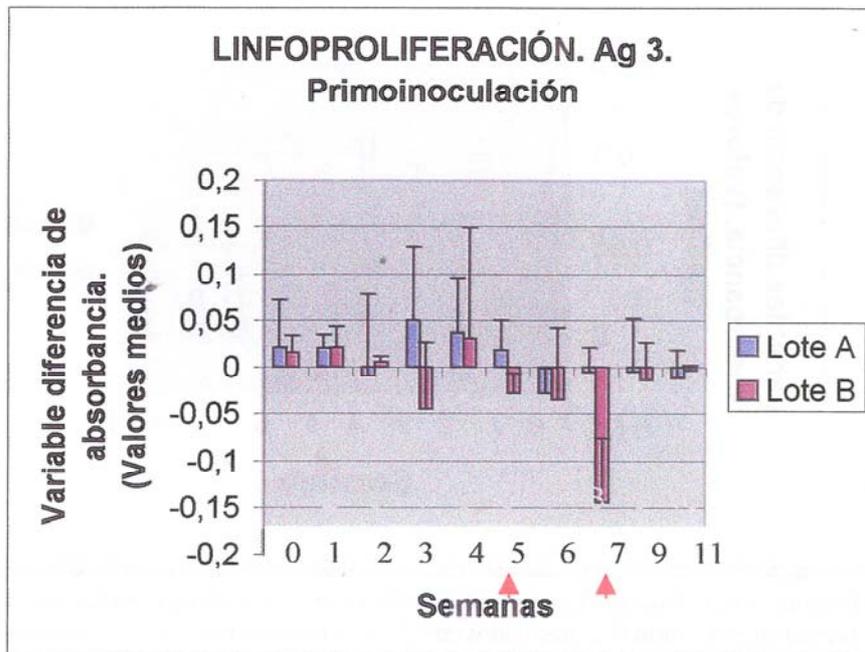


Gráfica 4.5: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcincta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* a una concentración de 20 μ g/ ml (Ag2) durante la primera fase del experimento.

4.1.2.1 Concanavalina A

El estudio de las variables diferencias en la linfoproliferación, muestran que el lote A2 (reinoculados), en la semana 24^a, por tanto una semana después de la reinoculación, mostró una reducción significativa en la proliferación linfocitaria en cultivos *in vitro* en presencia de con A, al compararlos con el lote B2 (testigos) ($p = 0.015$). Además, mostró diferencias cuasi-significativas ($p = 0.08$), respecto al lote B1 (primo inoculados). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre el lote B1 y B2.

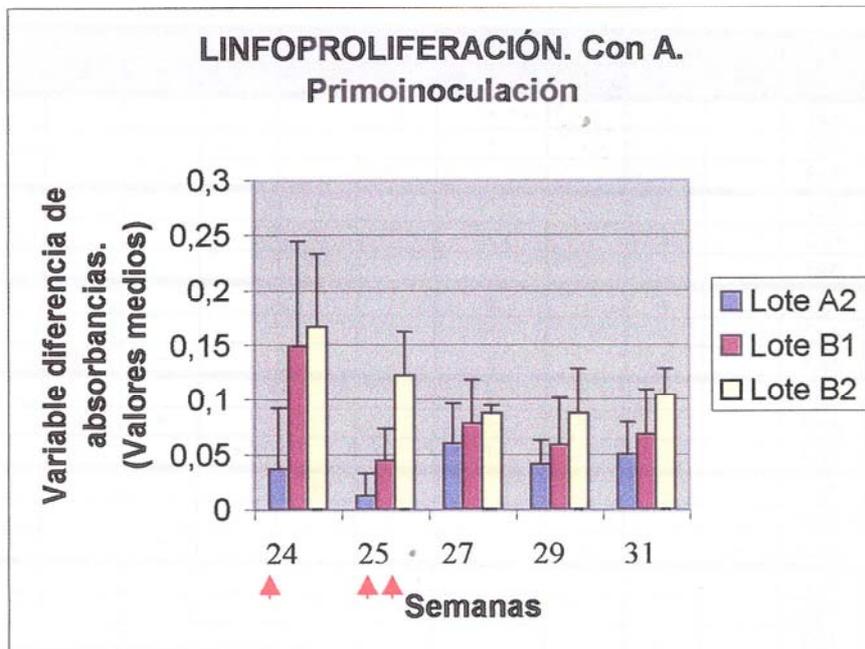
La semana 25^a (2^a semana p.i.), perduran la diferencia entre el lote A2 y el B2 (testigo) ($p = 0.001$) y además, también existen diferencias entre el lote B1 y el B2 ($p = 0.038$). En todos los casos, los animales inoculados muestran unas variables diferencias de menor magnitud que los lotes de animales testigos, evidenciando una pérdida de respuesta linfocitaria a la estimulación por medio de mitógenos inespecíficos. Las semanas 27^a, 29^a y 31^a no existen diferencias significativas entre los lotes (ver [gráfica 4.7](#)).



Gráfica 4.6: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales inoculados con *T. circumcincta* (lote A) y no inoculados (lote B) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* a una concentración de 30 μ g/ml (Ag3)

Animal	Ag	Semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	
18	Ag1		-		+	+						-
	Ag2		-	-	+							-
	Ag3		-									
23	Ag1		+					+				
	Ag2		+					+				
	Ag3			+				+				
35	Ag1		+	-	+							-
	Ag2		+		+							-
	Ag3		+		+							-
44	Ag1		+	+	+						+	+
	Ag2			+	+						+	+
	Ag3				+				+		+	
50	Ag1						+	+				
	Ag2		-	-			+					
	Ag3	-		-						+		+
51	Ag1						+	+				
	Ag2		-					+				
	Ag3							+				+
55	Ag1		-									+
	Ag2		-	-								+
	Ag3		-									+
57	Ag1										+	
	Ag2										+	
	Ag3				-							
66	Ag1		+					+				+
	Ag2							+				
	Ag3							+				
82	Ag1			+	+	+						
	Ag2			+	+							
	Ag3				+							

Tabla 4.2: Se representa el comportamiento de los linfocitos de cada animal en cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de antígenos. Con un signo "+", se representan diferencias significativas entre el animal y el promedio del lote B (no inoculado, testigo) cuando la respuesta linfocitaria fue mayor en los linfocitos cultivados en presencia del antígeno (inmunoestimulación). El signo "-", representa diferencias significativas entre el animal y el promedio del lote B, pero cuando la respuesta linfocitaria en cultivo con el antígeno fue menor que los linfocitos cultivados únicamente con el medio de cultivo (inmunoinhibición).



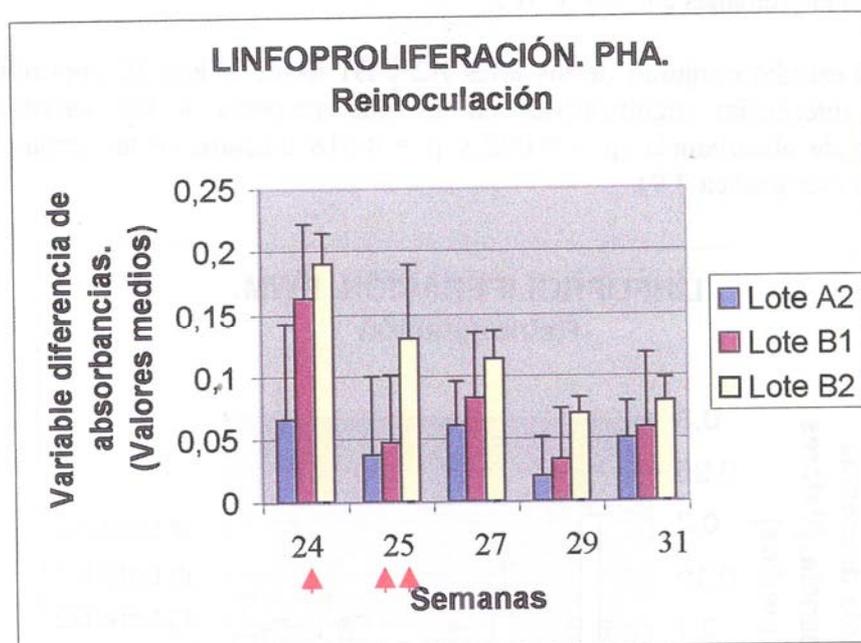
Gráfica 4.7: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcincta* (lote A1) y primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con concanavalina A durante la segunda fase de la experiencia

4.1.2.2 Fitohemaglutinina

Una vez más, tanto en la semana 24^a (1^a semana p.i.) como en la 25^a (2^a semana p.i.), se detectó una reducción en la capacidad de respuesta de los linfocitos procedentes de animales infectados previamente (lote A2) a la estimulación con mitógenos inespecíficos (fitohemaglutinina), al comparar las variables diferencias de absorbancias obtenidas en promedio en los lotes A2 y el lote B2 (testigo) ($p = 0.018$; $p = 0.02$, respectivamente). Estas diferencias significativas desaparecen las semanas 27^a, 29^a y 31^a. No se encontraron diferencias entre el lote A2 y el lote B1, aún a pesar de que en la semana 24^a se observa una mayor respuesta linfocitaria en el lote B1.

El lote B1 (primoinoculados en esta segunda fase), aunque en la semana 25^a (2^a semana p.i.), presenta una menor respuesta de sus linfocitos a la estimulación *in vitro* con PHA que la observada por el lote B2 (testigo), con una significación estadística ($p = 0.05$). Si valoramos las variables diferencia de absorbancias de los lotes A2 y B1 conjuntamente (animales

inoculados en esta segunda etapa), y los comparamos con las encontradas en el lote B2 (testigos), se encuentran diferencias significativas en esta 25ª semana. En las semanas 27ª, 29ª y 31ª no existen diferencias significativas entre el lote B1 y el B2 (ver [gráfica 4.8](#)).



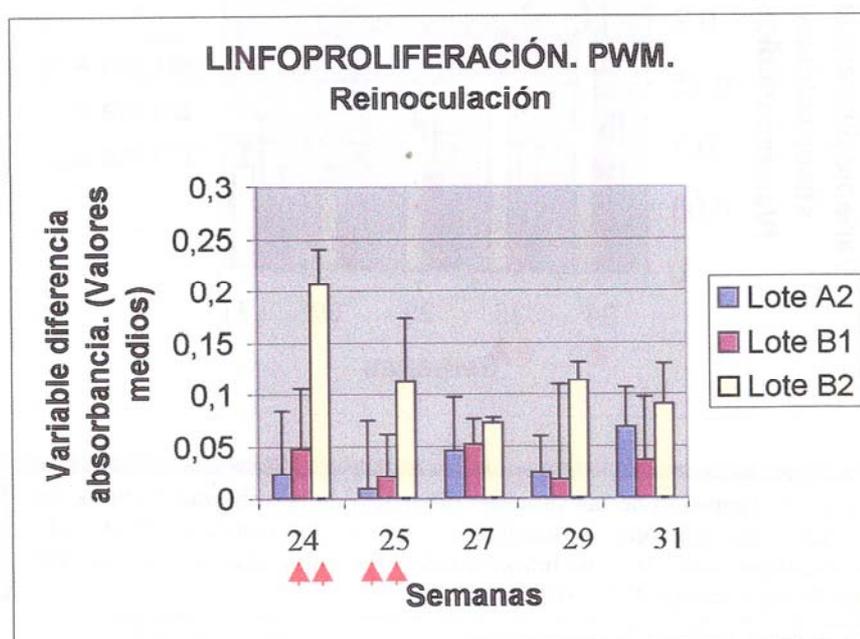
Gráfica 4.8: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcincta* (lote A1), primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con PHA durante la segunda fase de la experiencia.

4.1.2.3 Pokeweed mitogen

También se detectaron disminuciones en la linfoproliferación de los animales pertenecientes al lote A2, al comparar las variables diferencia de absorbancia alcanzadas por los cultivos de linfocitos en presencia de PWM de estos animales con los testigos (lote B2) ($p = 0.001$; $p = 0.048$ y $p = 0.02$, en las semanas 24ª (1ª p. i.), 25ª (2ª p. i.) y 29ª (4ª p.i.), respectivamente) Las semanas 27ª y 31ª no hay diferencias significativas entre estos lotes. No hay diferencias reseñables estadísticamente entre el lote A2 y B1.

Los linfocitos procedentes de animales primoinoculados (lote B1), cultivados con PWM, mostraron una inhibición en su respuesta significativa ($p = 0.005$) al compararlos con los testigos (lote B2) en la semana 24^a. Esta diferencia perduró la semana 25^a ($p = 0.05$), desapareciendo dichas diferencias las semanas 27^a, 29^a y 31^a.

El estudio conjunto de los lotes A2 y B1 frente al lote B2, permitió detectar diferencias significativas en lo que respecta a las variables diferencia de absorbancia ($p = 0.002$ y $p = 0.018$ únicamente las semanas 24^a y 25^a) (ver [gráfica 4.9](#)).

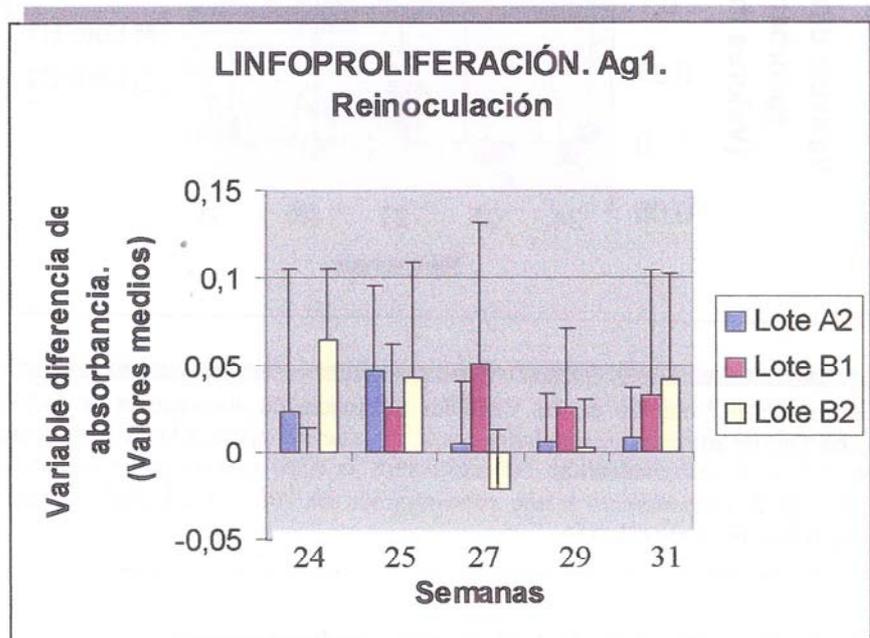


Gráfica 4.9: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcincta* (lote A1), primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con PWM durante la segunda fase de la experiencia.

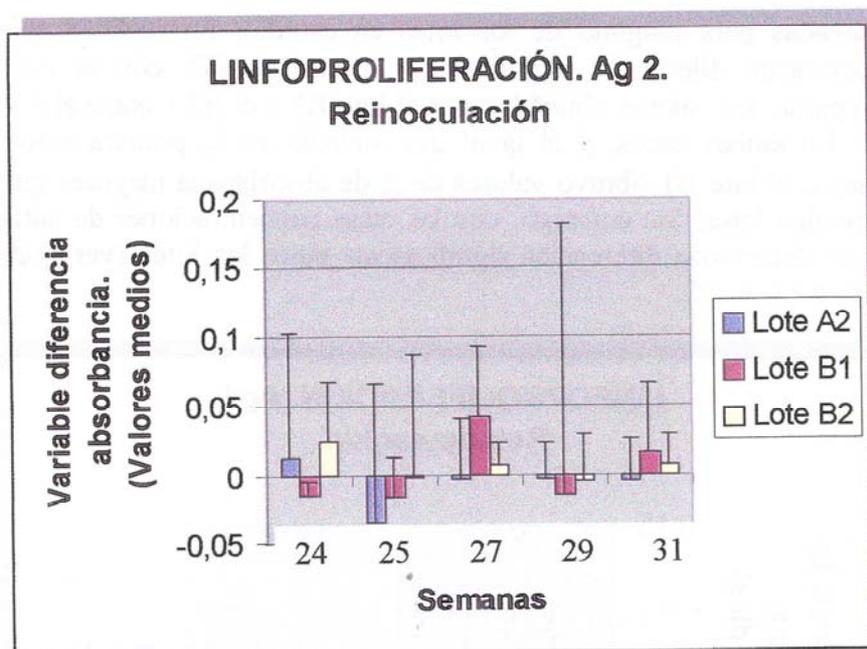
4.1.2.4 Cultivo de linfocitos a distintas concentraciones de antígenos

Durante las cinco semanas en las que se valoró la respuesta linfoide en la segunda fase de la experiencia, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de la variable diferencia de absorbancia en los pocillos que correspondían a las concentraciones de antígeno

ensayadas para ninguno de los lotes en estudio. En realidad sólo se encontraron diferencias significativas la semana 27^a, con el Ag1, al comparar, los valores obtenidos por el lote B1 y el B2 y entre el B1 y el A2. En ambos casos, y al igual que sucedió en la primera etapa del ensayo, el lote B1 obtuvo valores de Δ de absorbancia mayores que los otros dos lotes. Sin embargo, con las otras concentraciones de antígeno no se detectaron diferencias significativas entre los lotes (ver gráficas, 4.10; 4.11; 4.12).



Gráfica 4.10: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcineta* (lote A1), primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcineta* a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$ (Ag1) durante la segunda fase de la experiencia

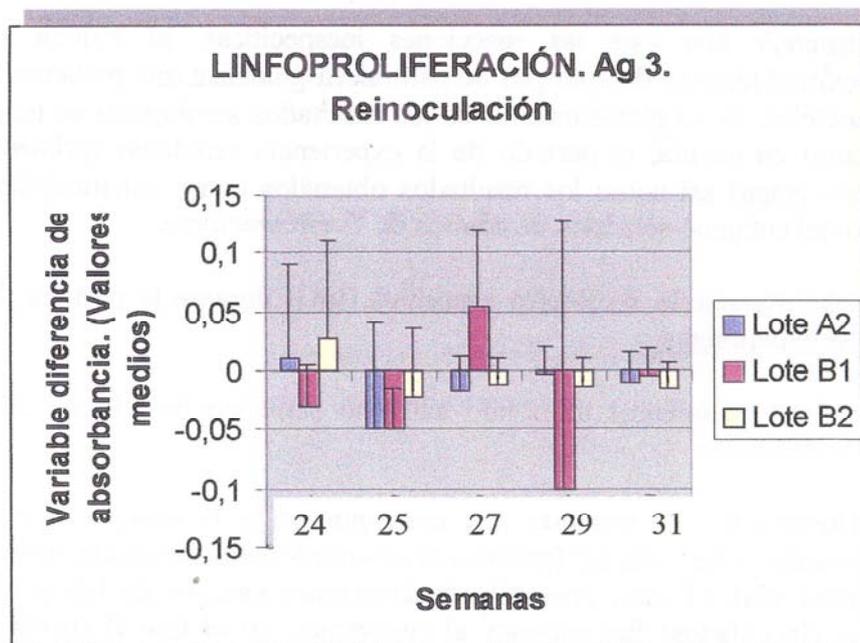


Gráfica 4.11: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcincta* (lote A1), primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* a una concentración de $20\mu\text{g/ml}$ (Ag2) durante la segunda fase de la experiencia.

4.2 E.L.I.S.A. (Enzyme linked immunosorbent assay)

4.2.1 ELISA-IgG anti-antígeno somático de *T. circumcincta*

Para la interpretación de los resultados obtenidos en el test ELISA, se han tomado los resultados recogidos de forma individual en cada animal, y a partir de ellos se han calculado los valores promedio para cada lote en cada etapa de la experiencia. Los valores correspondientes de absorbancias para cada animal, se transformaron en unidades relativas (UR), como quedo reflejado en el apartado de material y métodos. Con esta transformación matemática de los resultados, se pretende eliminar las variaciones que existen entre placas, y se considera también las reacciones inespecíficas, al restar el valor de absorbancia de los blancos al promedio obtenido en el duplicado de cada muestra.



Gráfica 4.12: Promedio de las variables diferencia de absorbancia de linfocitos procedentes de animales reinoculados con *T. circumcineta* (lote A1), primoinoculados (lote B1) y no inoculados (lote B2) cultivados *in vitro* con antígeno somático de adultos de *T. circumcineta* a una concentración de $30\mu\text{g/ml}$ (Ag3) durante la segunda fase de la experiencia.

El procesado estadístico de los resultados se ha realizado a partir de la transformación logarítmica de los valores de las UR obtenidos así como previamente a la comparación de los promedios de los distintos lotes por medio de la correspondiente prueba de t de Student en la que se considero significación estadística con valores $p \leq 0.05$. Esta transformación logarítmica se realizó para disminuir el efecto de las varianzas de los promedios del lote inoculado. La gran variabilidad de respuesta de los animales, hace que teniendo todos ellos valores UR mayores que los controles, no se observe la significación estadística al procesarlos conjuntamente dentro del lote. Esta significación, que por lo demás también se observó si consideramos los valores de absorbancia (D.O.) directamente (Stear et al., 1995c).

Finalmente, se han realizado los test E.L.I.S.A., tanto empleando directamente antígeno somático de adultos de *T. circumcineta*, como tras un tratamiento previo de dicho antígeno con periodato sódico, para tratar

de disminuir con éste las reacciones inespecíficas, al reducir por oxidación el número de epítomos de naturaleza glucídica que pudieran ser reconocibles. En el planteamiento de los resultados serológicos se tendrá por tanto en cuenta, el periodo de la experiencia estudiado (primera y segunda etapa) así como los resultados obtenidos con y sin tratamiento previo del antígeno somático de adultos de *T. circumcincta*.

4.2.2 Respuesta serológica específica (IgG) durante la primera fase del experimento

4.2.2.1 Resultados utilizando antígeno somático de adultos de *T. circumcincta*

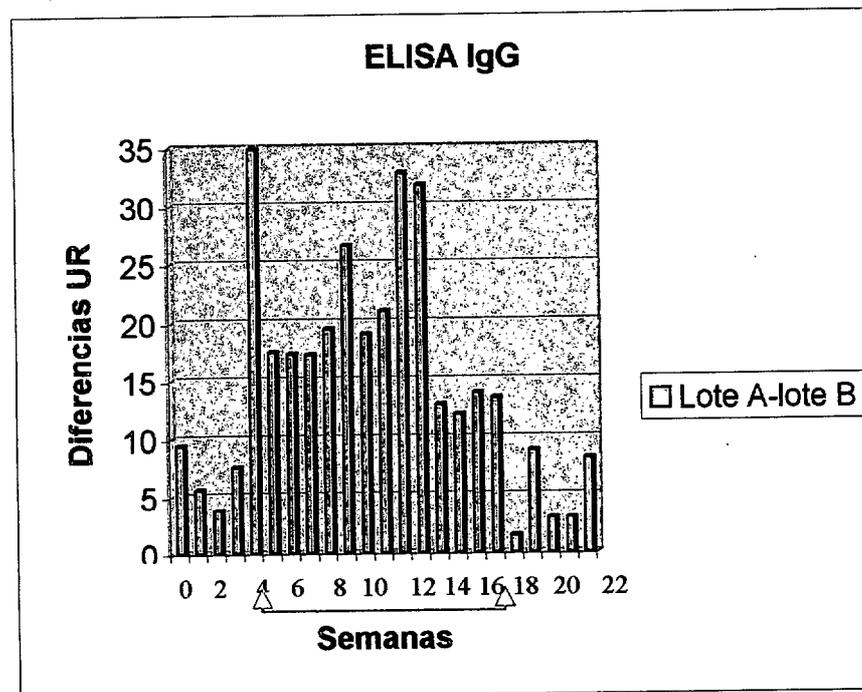
Durante las 17 semanas que corresponden a la primera fase del experimento, y hasta la 22ª (previa a la inoculación de la segunda etapa de la experiencia), el valor promedio de logaritmos base 10 de UR para el lote A (inoculados) fue superior al encontrado en el lote B (testigos). Estas diferencias, alcanzaron significación estadística ($p \leq 0.05$) desde la semana 4ª a la 9ª ininterrumpidamente, y posteriormente las semanas 13ª, 14ª, 15ª y 17ª. En las semanas intermedias, aunque no llegan a resultar significativas estadísticamente, se mantiene la tendencia de mayor UR para el lote A. En estas semanas (10ª, 11ª, 12ª y 16ª) la “p” obtenida al aplicar la prueba T de student oscila entre 0.08 y 0.1, lo que permite hablar de “cuasi-significación”.

En la gráfica 4.13 se ha representado el valor diferencia en UR entre el lote A (inoculado) y el B (testigo) a lo largo de la primera fase del experimento. Aunque no se observó una tendencia clara, la mayor diferencia en los valores promedios de IgG en UR se observaron en las semanas en las que se aprecian por lo general diferencias significativas.

4.2.2.1 Resultados utilizando antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* tratado con periodato sódico (NaIO_4)

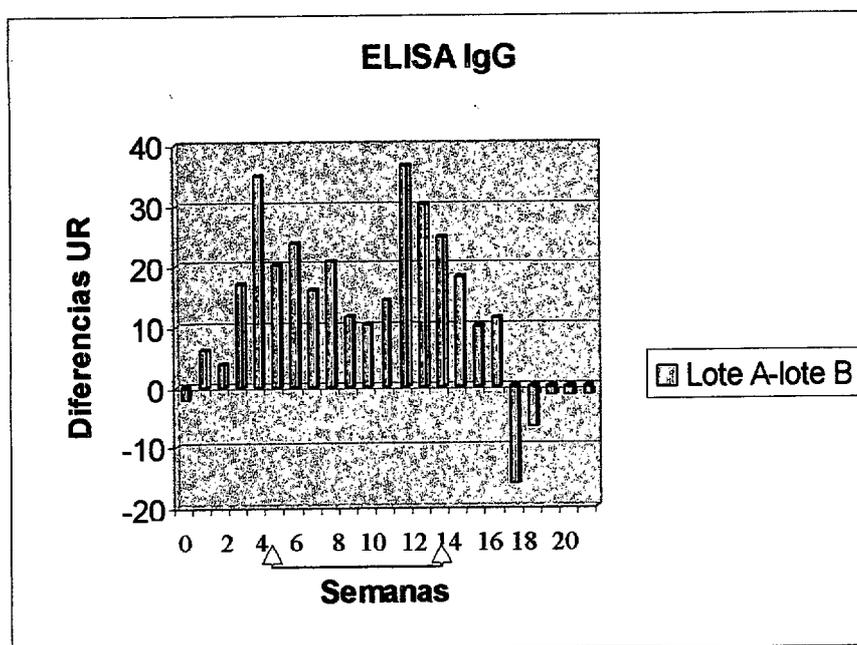
Durante las primeras 17ª semanas del experimento, y con la única excepción de la semana previa, los valores de UR encontrados en promedio en el lote inoculado (A) fueron mayores que los detectados en el lote testigo (B). Esta situación se invierte a partir de la semana 18ª hasta la 22ª, si bien durante estas cinco semanas no existen diferencias significativas entre ambos lotes. Durante el periodo en el que los animales inoculados mostraron niveles más elevados de anticuerpos específicos, estas diferencias

fueron significativas ($p \leq 0.05$) y de forma ininterrumpida entre las semanas 4^a y 14^a, ambas inclusive. Las semanas 15^a ($p = 0.1$) y la 16^a ($p = 0.06$) no se encontraron diferencias significativas, aunque los valores promedio de las UR del lote A (inoculado) fueron mayores que la del lote B (testigo).



Gráfica 4.13: Valores diferencia de UR del lote A y B durante la primera etapa del experimento. Antígeno somático de adulto sin tratamiento previo con NaIO_4 .

Las mayores diferencias en los valores de UR de los promedios de los lotes A y B se detectan en las semanas en las que existen diferencias significativas entre los lotes, como se observa en la gráfica 4.14.



Gráfica 4.14: Valores promedio de la diferencia de UR del lote A y B durante la primera etapa del experimento. Antígeno somático de adulto con tratamiento previo con NaIO_4 .

4.2.3 Respuesta serológica específica (IgG) durante la segunda fase del experimento

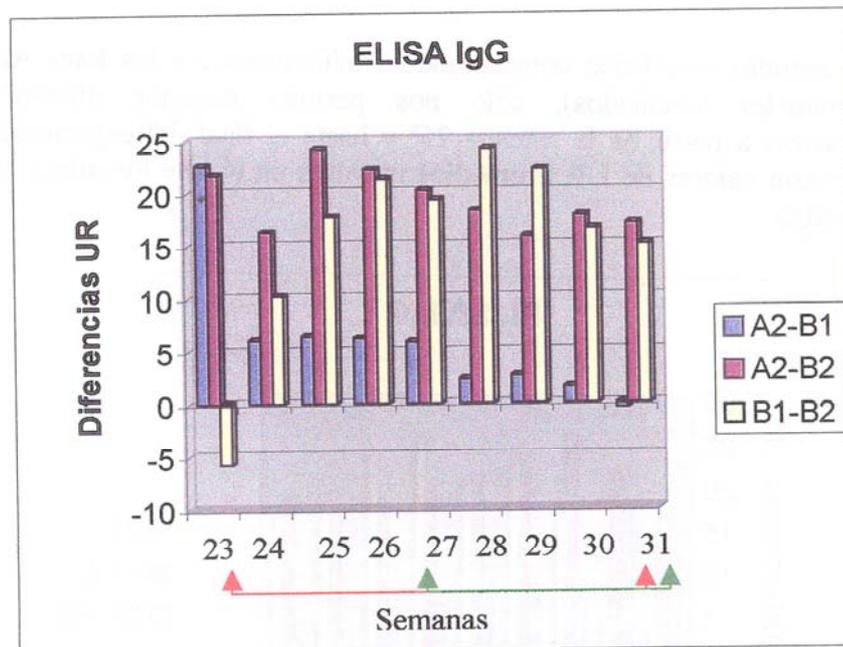
4.2.3.1 Resultados utilizando antígeno somático de adultos de *T. circumcincta*

Al evaluar durante la reinoculación los valores serológicos de IgG específicos anti-*T. circumcincta*, se apreció que el lote A2 (reinoculado) presenta diferencias significativas con el lote B2 (testigo) durante las nueve semanas (desde la semana 23 hasta la 31 del experimento). Respecto al lote B1 (infectados por vez primera), se encuentran diferencias significativas las semanas 23 y 24, pero dejan de apreciarse desde la semana 25^a en adelante. En todos estos casos, el valor del promedio del lote A2 resultó mayor que el detectado en el lote B2.

Por su parte, el lote B1 no llegó a determinar diferencias significativas respecto al lote B2 hasta la semana 27^a. A partir de entonces estas diferencias se mantienen hasta la 31^a. Cada semana su valor era cada

vez mayor y el valor de la diferencia respecto al lote testigo también aumentó semanalmente hasta hacerse estadísticamente relevante.

Finalmente, el estudio conjunto de los lotes A2 y B1 (esto es, todos los animales inoculados) frente al lote B2 (testigos), sólo permiten detectar diferencias significativas a partir de la 25ª semana, siendo mayor la respuesta sérica de IgG específicas detectada en el lote A2+B1 (inoculados) que en los animales testigos (lote B2), y manteniéndose esta situación hasta la semana 31ª.



Gráfica 4.15: Valores promedio de la diferencia de UR de los lotes A2 (reinoculados) y B1 (primoinfectados) y B2 (testigos) durante la segunda etapa de la experiencia. Se ha utilizado antígeno somático de adulto. (Diferencias ▲ entre lote A2 y B2); (diferencias ▲ entre lotes B1 y B2).

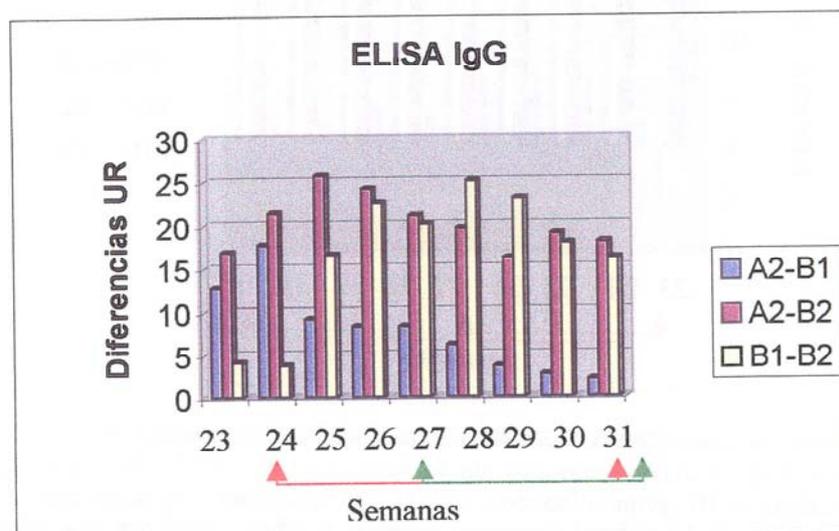
4.2.3.1 Resultados utilizando antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* tratado previamente con periodato sódico

Tras el tratamiento previo con periodato sódico del antígeno somático utilizado en este estudio, no se detectan diferencias significativas entre lotes en la semana 23ª (1ª semana p.i.), pero a partir de

este momento empezaron a detectarse diferencias significativas entre el lote reinoculado (A2), y el primoinfectado (B1) y testigos (B2) durante esta fase del estudio. Estas diferencias siguen patentes con el lote testigo durante todo el estudio, pero dejan de observarse entre los lotes inoculados (A2 y B1), a partir de la segunda semana post-inoculación.

Por su parte, el lote B1 no tiene diferencias significativas con el lote B2 hasta la semana 27^a, y desde entonces hasta la 31^a interrumidamente. Su diferencia con el lote B2 aumenta progresivamente, como recoge la *gráfica 4.16*.

El estudio estadístico considerando conjuntamente a los lotes A2 y B1 (animales inoculados), sólo nos permite detectar diferencias significativas a partir de la semana 25^a y hasta el final del experimento, también con valores de UR promedios mayores en el lote inoculado que en el testigo.



Gráfica 4.16: Valores promedios de la diferencia de UR de los lotes A2 (reinoculados) y B1 (primoinfectados) y B2 (testigos) durante la segunda etapa de la experiencia. Se ha utilizado antígeno somático de adulto tratado previamente con NaIO₄. (Diferencias ▲ entre lote A2 y B2) y (Diferencias ▲ entre lote B1 y B2).

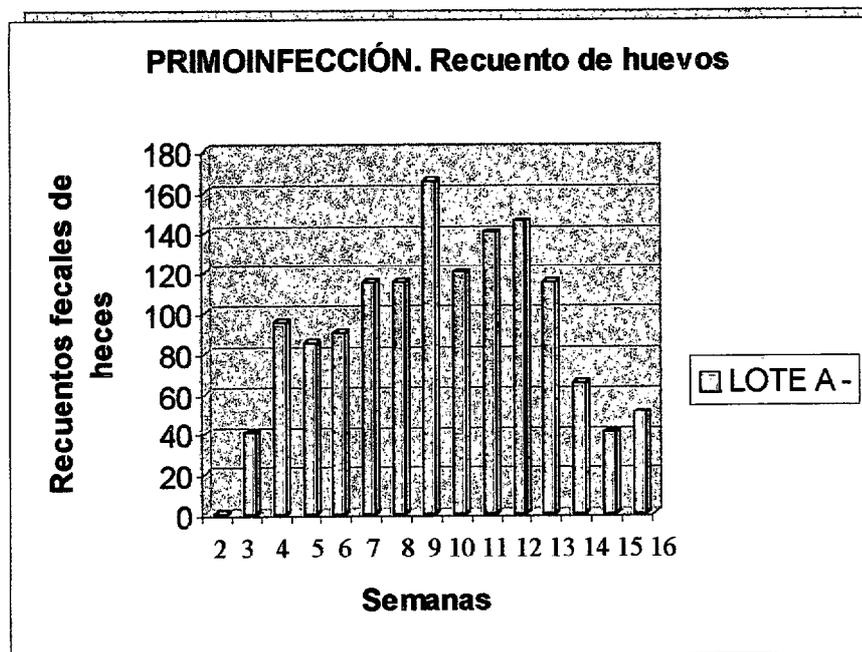
4.3 Recuentos fecales de huevos

Los recuentos fecales de huevos se determinaron por triplicado cada semana desde la semana 0 de la experiencia hasta la 17^a, esto es, a lo largo de la primera fase de la experiencia y desde la semana 23^a hasta la 31^a en la segunda fase del experimento. Para ello los miércoles se recogían muestras de heces del recto de los animales inoculados hacia las 12:00 a.m., y se procedía a la estimación de la concentración de huevos de nematodos en las heces por medio del método de McMaster, tal cual se detalló en el apartado de material y métodos.

4.3.1 Recuentos fecales de huevos durante la primera fase de la experiencia

Durante la primera fase del experimento, únicamente se evidenció la eliminación de huevos de *Teladorsagia circumcincta* en heces de los animales del lote A, al ser el único grupo que estaba inoculado. El periodo prepatente fue de tres semanas para 6 / 10 animales y de 4 semanas para 2 animales, de 5 semanas para otro y el último animal evidenció su parasitación con la presencia de huevos en heces la 7^a semana. Los recuentos fecales de huevos mantuvieron una tendencia a aumentar su número desde la semana tercera hasta la novena, momento en el que alcanzaron su valor máximo. A partir de entonces, este parámetro comenzó a decrecer progresivamente hasta la semana 17^o, (con un pequeño repunte las semanas 12^a y 16^a), en la que se sacrificaron cinco de los animales y se desparasitaron los restantes integrantes de este lote. A continuación se representa gráficamente estos resultados, y se recogen en una tabla anexa los promedios de huevos liberados en las heces en los animales del lote A.

Dado que también se pretendía evaluar la validez del recuento fecal de huevos como estimador del número de vermes adultos que se alojaban en el abomaso de los animales inoculados, se procedió a realizar correlaciones y regresiones lineales entre los valores obtenidos en los recuentos individuales de huevos en heces, y los vermes alojados en el abomaso. Durante esta primera inoculación, la asociación resultó débil. El coeficiente de regresión lineal fue de $R^2=0.56$, con una probabilidad del 0.87.

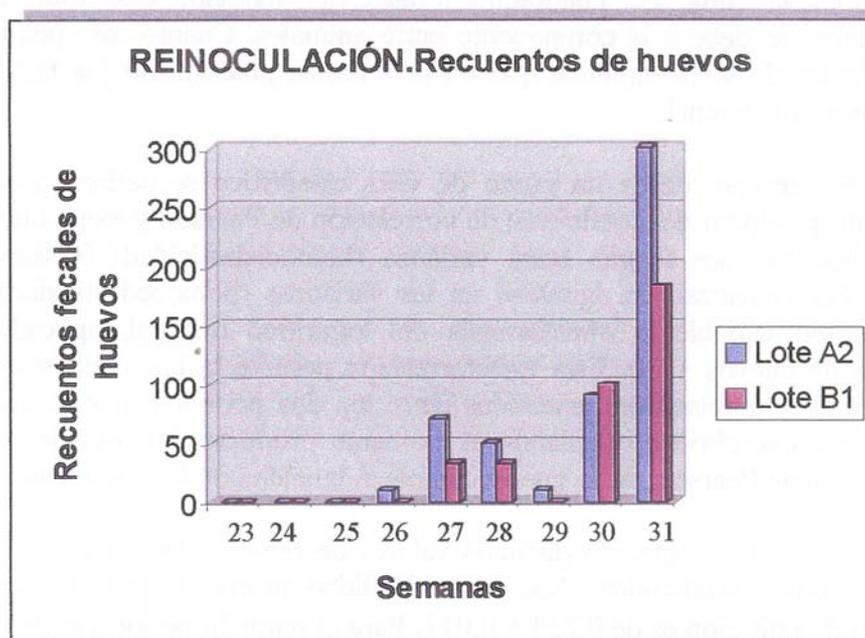


Gráfica 4.13: Representación de los recuentos fecales de huevos del lote A durante la primoinfestación.

4.3.2 Recuentos fecales de huevos durante la segunda fase de la experiencia

La segunda fase del experimento se inició con la inoculación de 20000 L3 de *T. circumcincta* a cinco animales inmunizados en la primera etapa del experimento (lote A2) y otros cinco animales no inmunizados, que pertenecieron en la primera etapa al lote testigo (lote B1). Finalmente, otros cinco animales no fueron inoculados y actuaron como controles de esta segunda inoculación (lote B2). Desde la semana 23^a hasta la 31^a se recogieron muestras de heces semanalmente y por triplicado de todos los animales inoculados, y se estimó la concentración de huevos en las mismas también en este caso mediante el método de McMaster. El periodo de prepatencia para el lote A2 (reinoculado) fue de 3 semanas, mientras que para el lote B1 (primoinfestado) fue de 4 semanas. Si se considera cada animal individualmente dentro del lote A2, dos animales mostraron un periodo de prepatencia de 3 semanas, otros tres de cuatro semanas y un último animal en el que dicho periodo se prolonga hasta la sexta semana. Por su parte, en el lote B1 el periodo de prepatencia oscila entre las 4 semanas y las 7 semanas. A partir de entonces, los recuentos fecales de

huevos van en aumento en el lote A2 hasta el momento del sacrificio la semana 31^a de la experiencia, donde alcanza su valor máximo. Algo similar sucede con el lote B1, aunque en este caso, los recuentos de huevos fecales son algo menores, sin que existan diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.09$).



Gráfica 4.14: Representación de los recuentos fecales de huevos del lote A2 y lote B1 durante la segunda fase del experimento.

Durante esta segunda fase del experimento, los recuentos fecales de huevos mostraron una mayor correlación con el recuento de vermes adultos en el abomaso, observándose un valor de $R^2 = 0.78$ ($p < 0.001$), considerando la semana 9 post-inoculación (31^a del estudio) y el recuento de vermes obtenido tras el sacrificio.

4.3.3. Repetibilidad y modelo lineal mixto de los recuentos fecales de huevos

Falconer, 1989, define la repetibilidad (R) como el cociente entre los componentes de la varianza debida a comportamientos diferentes entre animal (S_E) y la suma de componentes entre animal (S_E) y dentro de cada animal (S_D).

$$R = S_E / S_E + S_D$$

Este cociente, obviamente jamás puede superar el valor de la unidad, por lo que en realidad se trata de una fracción. Cuanto más próximo sea el valor de la R a uno, significa que en la totalidad de la varianza, o lo que es lo mismo, la suma de cuadrados totales del modelo, casi toda esta variabilidad se debe a la componente entre animales. Cuanto más pequeña sea el valor de la R, significa que en la varianza predominan los factores internos a cada animal.

El término, desde un punto de vista estadístico se define como el momento producto del coeficiente de correlación de Pearson y exige que las dos subpoblaciones tengan igual varianza (homocedasticidad) (Canavos, 1993). Para alcanzar esa igualdad en las varianzas (homocedasticidad) se toma como variable la transformada del logaritmo decimal, aplicada al número de huevos + .10. Esta transformación permite la homocedasticidad de las dos subpoblaciones generadas entre los dos periodos, por lo que la repetibilidad se obtiene calculando el momento producto del coeficiente de correlación de Pearson, dado que se cumple la igualdad de las varianzas.

Así, se han obtenido distintos valores de repetibilidad en función de los periodos considerados. Así, la repetibilidad promedio para el primer periodo de infección es de 0.224 ± 0.017 . Para el segundo periodo es de 0.22 ± 0.053 . Ambos datos con un $p < 0.05$. El valor estimado de la repetibilidad entre los dos periodos analizados hasta el máximo de la producción de huevos es de 0.27 con un valor $p < 0.01$ (significativo al 90%). Estos datos nos indican que el componente de la varianza más importante es la varianza dentro de cada animal, esto es, predominan los factores internos de cada animal sobre otros factores. A medida que se reducen los periodos de estudio, aumenta la repetibilidad. Así, si se calcula la repetibilidad para los recuentos de huevos obtenidos en una misma semana, la repetibilidad del primer periodo es de 0.654 ± 0.055 y para el segundo periodo es de 0.531 ± 0.091 , aumentando entonces la importancia de la componente entre grupos. La repetibilidad entre medias globales para los dos periodos de infección es de 0.712.

Esta situación se puede revertir un tanto, si se eliminan los resultados de recuentos de huevos que son algo atípicos al resto de los integrantes de sus grupos. Concretamente, dos animales del lote A2 y uno del lote A durante el primer periodo de la experiencia. En este caso, la repetibilidad es de 0.49 con una significación de 0.04.

Al aplicar el tratamiento de datos del modelo lineal mixto, no se detectaron diferencias significativas ni entre animales ni entre periodos de inoculación.

4.4 Parámetros hemáticos, proteínas séricas totales y fibrinógeno

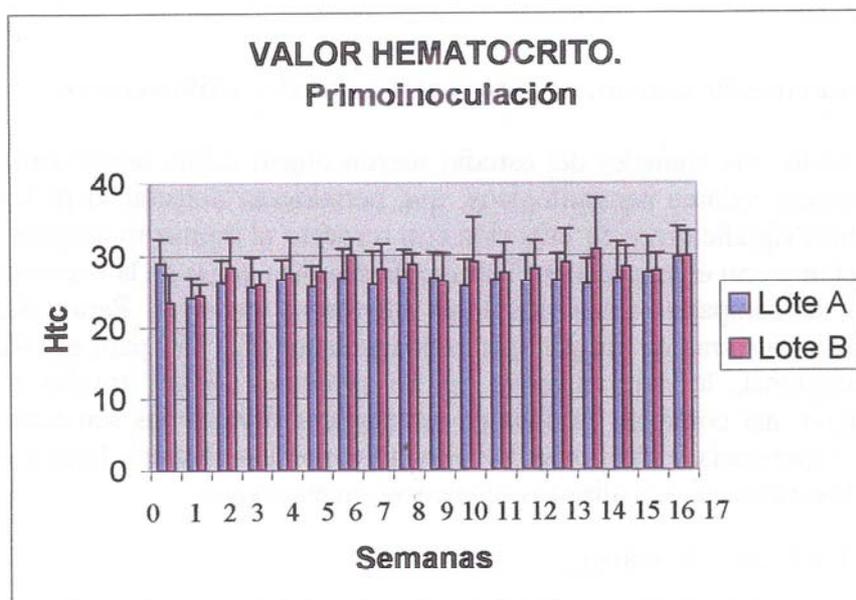
Todos los animales del estudio fueron objeto de un seguimiento de los diferentes valores hematológicos, que permitieran detectar la presencia de cambios significativos de infección con respecto al momento anterior a la inoculación y con el lote testigo. Durante la segunda etapa de la experiencia, también se compararon los dos lotes infectados entre sí. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) para el estudio del hemograma, la determinación de las proteínas séricas totales y del fibrinógeno, así como de la fórmula leucocitaria durante las semanas que duró la experiencia. Los promedios obtenidos por los distintos lotes y cada uno de los parámetros analizados se encuentran en el anexo.

4.4.1 Valor hematocrito

El valor de hematocrito de los lotes A y B durante la primoinfección fueron muy parecidos y de hecho no existieron diferencias significativas entre los dos lotes. Para el lote A, los valores fluctuaron entre el mínimo del 24 % la primera semana postinoculación hasta el valor máximo de 29 % de la semana previa a la inoculación. El valor medio del hematocrito (Htc) para el lote A durante la primoinfección fue de 26.6 ± 1.2 %. El valor de Htc máximo del lote B tuvo lugar la semana 14^a (30.7%) y el mínimo la semana previa a la inoculación (23.4%) al igual que el lote A. La media del valor Htc para el lote B fue de 27.8 ± 1.8 (gráfica 4.15).

Durante la segunda fase del experimento, tampoco se detectaron diferencias significativas entre los distintos lotes estudiados. El valor máximo para el lote A2 (reinoculados) fue de 29.5% la semana 26^a del experimento y el mínimo fue de la 27^a con 25.8%. El promedio del valor Htc para este lote A2 fue de 27.8 ± 1.4 . Por su parte, el lote B1 alcanzó un valor máximo de Htc la semana 26^a (31.7%) y mínimo la semana 27^a (27.7 %) durante esta segunda etapa de la experiencia. El valor promedio del Htc para el lote B1 fue de 28.6 ± 1.3 . No existe tampoco diferencias significativas entre el lote A2 (reinoculados) y el lote B2 (testigos) ni tampoco entre el lote B1 (primoinoculados) y el B2. El valor de hematocrito máximo para el lote B2 fue de 31 ± 7.1 % en la semana 31^a y el mínimo fue

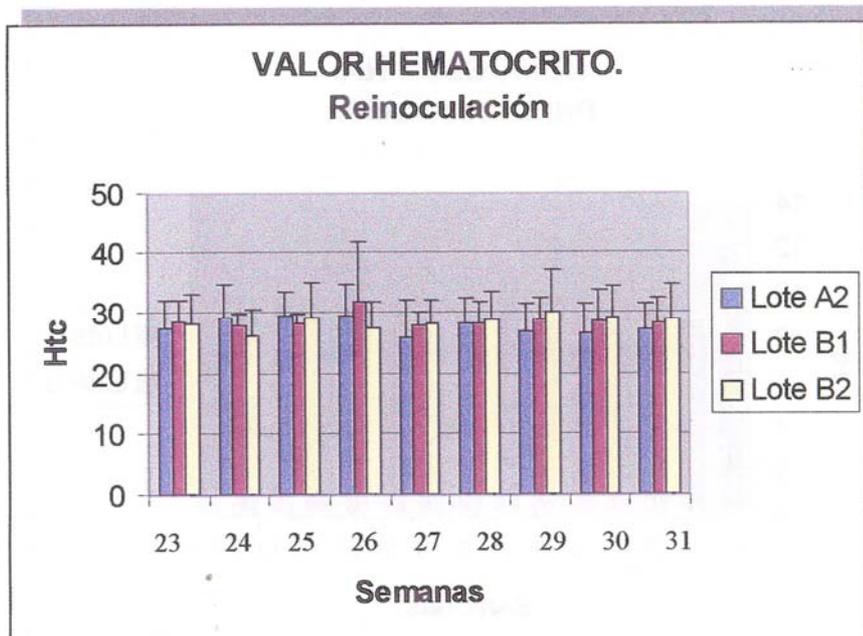
de $26.3 \pm 4 \%$ la semana 24^a durante esta segunda fase de la experiencia (gráfica 4.16).



Gráfica 4.15: Valores de Htc del lote A (inoculado) y lote B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

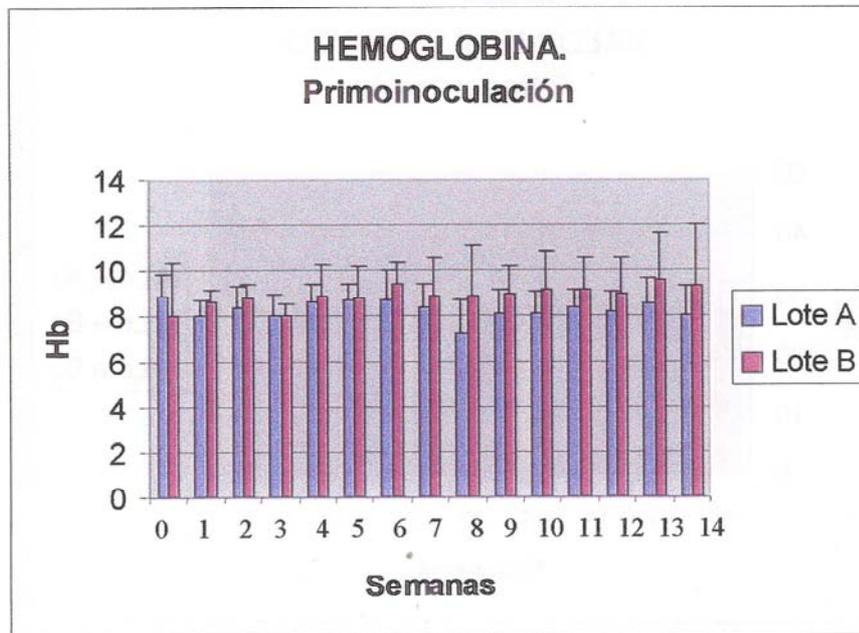
4.4.2 Hemoglobina

El valor de la hemoglobina (Hb) tampoco evidenció diferencias significativas entre los lotes A y B durante la primera fase del experimento y se mantuvo muy homogéneo a lo largo de toda la experiencia. El lote A, alcanzó un valor máximo de 8.9 g / dl la semana 0 de la experiencia y el mínimo (7.2 g / dl) la semana 8^a. El lote A tuvo un valor medio de Hb de 8.3 ± 0.4 g / dl. Por su parte, el lote B alcanzó un valor máximo la semana 13^a (9.6 g / dl) y mínimo las semanas 0 y 3^a (8 g / dl) y en un valor medio de Hb durante esta primera etapa de 8.9 ± 0.4 g / dl (gráfica 4.17).



Gráfica 4.16: Valores de Htc del lote A2 (reinoculado) y lote B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

Durante la segunda fase del experimento no se encontraron tampoco diferencias significativas entre los lotes A2 y B1, ni entre estos y el lote B2. La Hb mantuvo un valor bastante constante a lo largo de las semanas de esta segunda etapa. El lote A2 presentó un valor máximo de 9.3 g / dl la semana 18ª y mínimo de 6.1 g / dl la semana 27ª. El valor medio de la Hb para el lote A2 fue de 8 ± 1 g / dl. Por su parte el lote B1, coincide con el lote A2 en la presentación del valor máximo, semana 18ª (9.5 g / dl) y mínimo, semana 27ª (5.7 g / dl) de Hb. Su valor promedio también fue de 8 ± 1.4 g / dl. El valor medio de Hb para el lote B2 fue de 9.23 ± 0.22 , obteniéndose valores muy homogéneos. Como valor máximo, la semana 28ª con un valor de 9.6 ± 2 g / dl y el mínimo de 9 ± 1.61 g / dl la semana 27ª (gráfica 4.18).



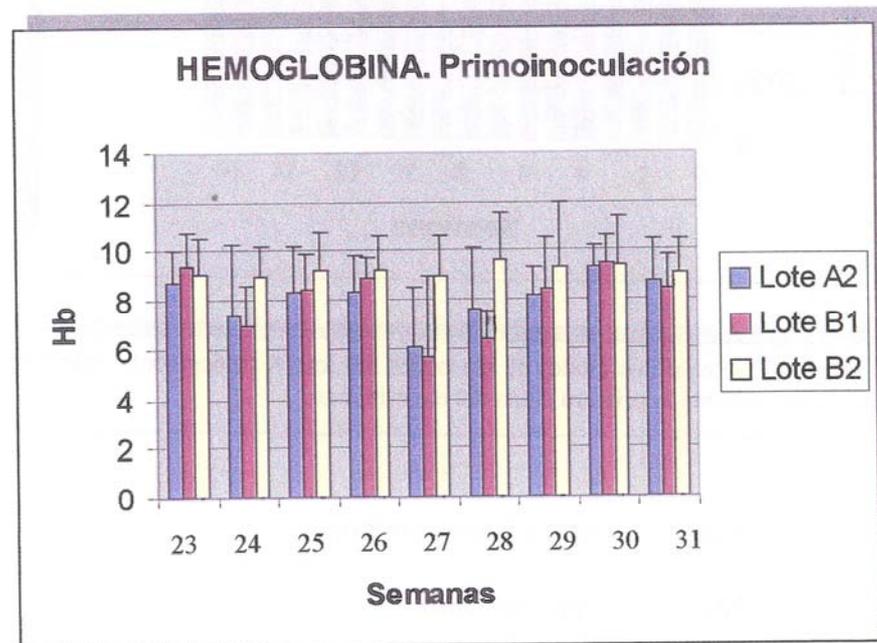
Gráfica 4.17: Valores de Hb del lote A (inoculado) y lote B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3 Leucocitos totales

Durante la primera etapa del experimento no se detectaron diferencias significativas entre el lote A y el lote B en lo que se refiere al número total de leucocitos presentes en sangre periférica. El lote A (inoculado), mostró un valor promedio de 14221 ± 3104 leucocitos / μl . El valor máximo del recuento de leucocitos se presentó la semana 17^a (21405 leucocitos / μl) y el mínimo la semana 3^a (10090 leucocitos / μl). Por su parte, el lote B tuvo en promedio 15724 ± 3580 leucocitos / μl de sangre. Como máximo, se alcanzaron 24023 leucocitos / μl la semana 15^a y mínimo de 10300 leucocitos / μl la cuarta semana p. i. (gráfica 4.19)

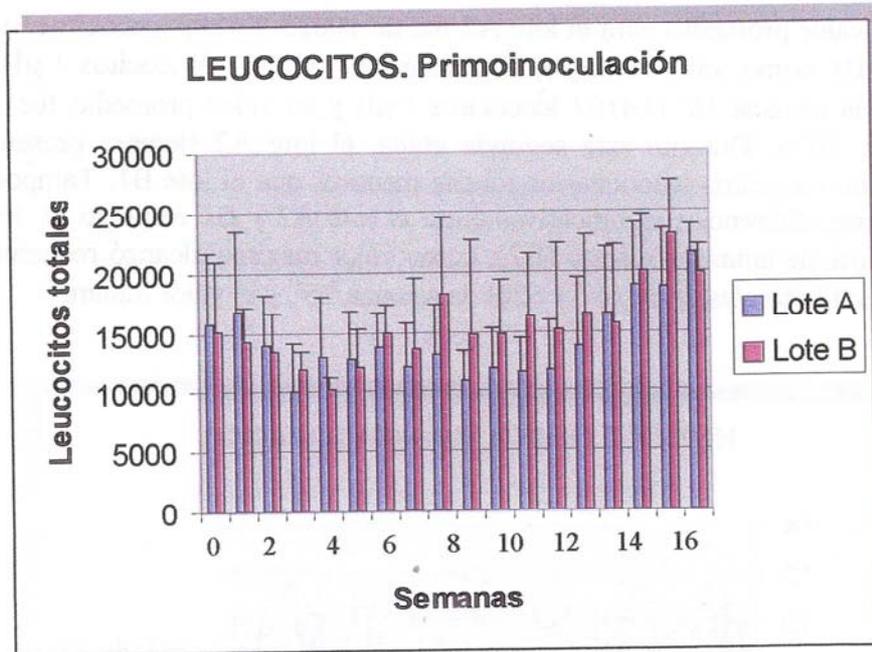
En la segunda etapa se detectaron diferencias significativas entre el lote A2 y el lote B1 las semanas 24^a, 27^a y 29^a ($p = 0.025$; 0.047 y 0.008 respectivamente). En los tres casos, los valores de recuentos leucocitarios del lote B1 fueron sensiblemente superiores a los observados en el lote A2. El lote A2 tuvo como valor máximo el de 12300 leucocitos / μl de sangre (semana 26^a) y como valor mínimo el de 8280 leucocitos / μl (28^a semana

p.i.). El valor promedio para el lote A2 fue de 10825 ± 1289 leucocitos / μl . El lote B1 como valor máximo, la semana 29^a (18867 leucocitos / μl) y mínimo la semana 18^a (14167 leucocitos / μl) y su valor promedio fue de 16462 ± 2076 . Durante esta segunda etapa, el lote A2 siempre presentó valores de recuentos leucocitarios totales menores que el lote B1. Tampoco se detectan diferencias significativas entre el lote A2 y B1 respecto al lote B2. El lote de animales testigo (B2), como valor máximo alcanzó recuentos de leucocitos totales de 16267 ± 5204 la semana 26^a, y el valor mínimo



Gráfica 4.18: Valores de Hb del lote A2 (reinoculado) y lote B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

detectado por el lote B2 durante esta segunda etapa del experimento fue de 14667 ± 7995 en la semana 24^a (gráfica 4.20).

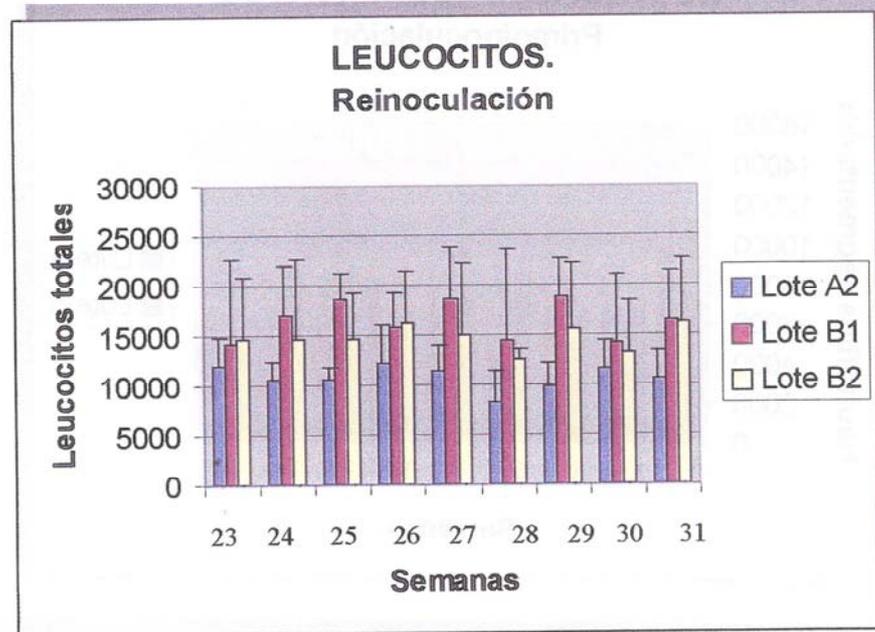


Gráfica 4.19: Recuentos totales de leucocitos del lote A (inoculado) y lote B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3.1 Recuento diferencial de leucocitos

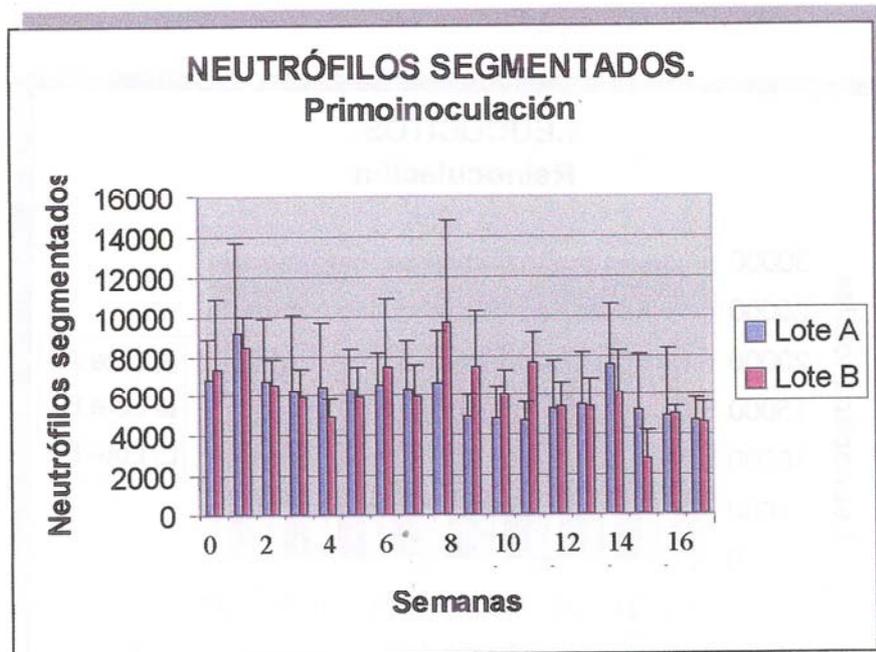
4.4.3.1.1 Neutrófilos segmentados

Únicamente se detectan diferencias significativas entre el lote A (inoculados) y el lote B (testigo) las semanas 9^a y 11^a, con una significación de $p = 0.033$ y $p = 0.001$ respectivamente. En ambos casos, el recuento de neutrófilos segmentados es mayor en el lote no inoculado (B) que en los inoculados (A). En concreto, la semana 9^a, el lote A tuvo 4887 neutrófilos / μl de sangre, mientras, el lote B tenía 7440 neutrófilos segmentados / μl de sangre. De igual modo, la undécima semana, en el lote A se detectaron 4775 neutrófilos / μl de sangre frente a los 7647 neutrófilos / μl de sangre del lote B. En promedio, el lote A tuvo 6065 ± 1170 neutrófilos / μl de sangre, con un valor máximo de 9177 neutrófilos / μl de sangre y mínimo de 4699 en la semana 17^a. El lote B, en promedio tuvo 6264 ± 1572 neutrófilos / μl de sangre, con un valor máximo de 9700 (semana 8^a) y mínimo de 2803 neutrófilos / μl de sangre (gráfica 4.21).



Gráfica 4.20: Recuentos totales de leucocitos del lote A2 (reinoculado) y lote B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

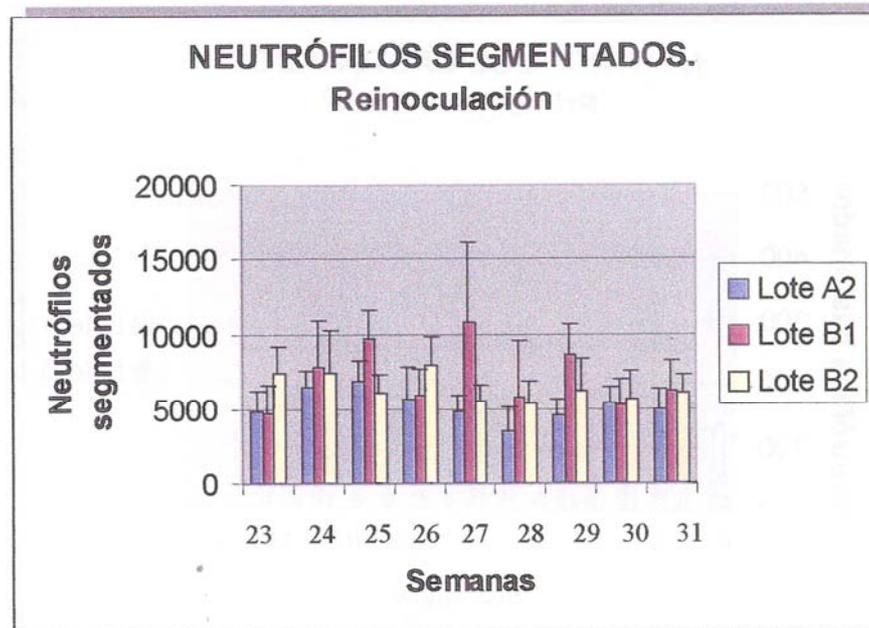
En la segunda fase del experimento se encontraron diferencias significativas en las semanas 27^a (4^a p. i.) y 29^a (6^a p. i.), ($p = 0.05$; $p = 0.01$, respectivamente) entre los lotes A2 y B1. Los animales primoinfectados (B1) presentaron recuentos más elevados que los procedentes de animales infectados previamente (A2). En promedio, el lote A2 tuvo un recuento de neutrófilos segmentados en sangre periférica de 5257 ± 1042 , con una cota máxima de 6806 (semana 25^a) y mínima de 3551 neutrófilos / μl de sangre. El lote B1, en promedio 7309 neutrófilos / μl de sangre, con un máximo de 10789 (semana 27^a) y mínimo de 4733 neutrófilos / μl en la semana 19^a. Se detectaron diferencias significativas entre el lote A2 y el lote B2 en la semana 26^a ($p = 0.05$). El valor promedio de leucocitos en sangre durante la segunda etapa del experimento del lote B2 fue de 6414 ± 1059 . El valor máximo se alcanzó la semana 26^a con 7980 ± 1408 la semana 28^a. Entre el lote B2 y el B1 no se encontraron diferencias significativas, excepción hecha la semana 25^a en la que sí se detectaron ($p = 0.047$) (gráfica 4.22).



Gráfica 4.21: Recuentos de neutrófilos segmentados en sangre periférica en los lotes A (inoculado) y B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

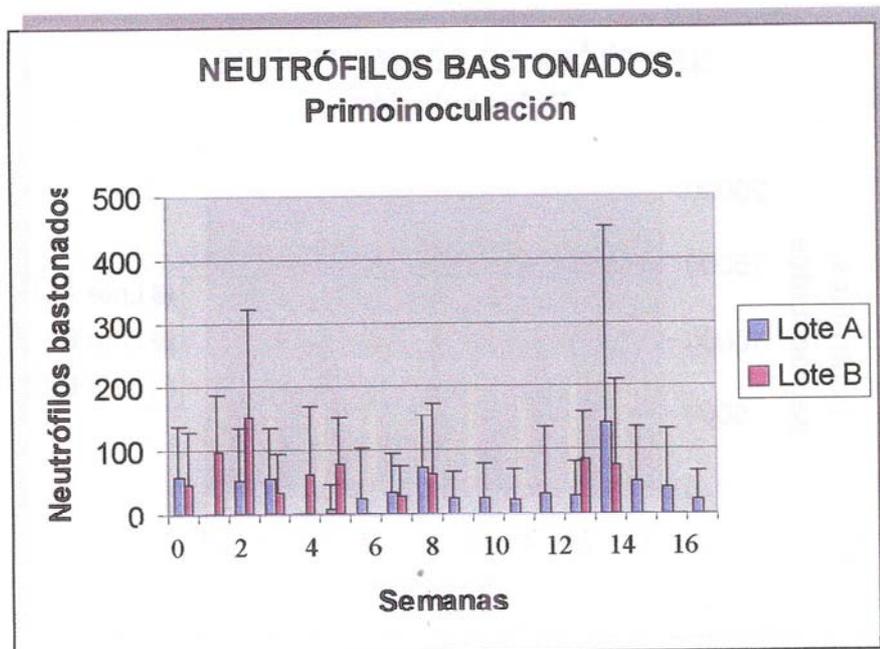
4.4.3.1.2 Neutrófilos bastonados

A lo largo de las primeras 17 semanas del experimento se detectaron diferencias significativas entre los lotes A y B las semanas primera ($p = 0.002$) y quinta ($p = 0.044$). En estas dos semanas, el número de neutrófilos bastonados fue mayor para el lote inoculado (A) que para el lote testigo (B). La cota máxima alcanzada por el lote A fue la semana decimocuarta, con 142 neutrófilos bastonados / μl de sangre. En las semanas 1ª y 4ª, el valor fue de cero. Por su parte, el lote B como máximo se encontraron 151 neutrófilos bastonados / μl de sangre (2ª semana). En las semanas 6ª, 9ª, 10ª, 11ª, 12ª, 15ª, 16ª y 17ª no se detectaron neutrófilos bastonados. Como valor medio, el lote B tuvo 40 ± 45 neutrófilos bastonados / μl de sangre (gráficas 4.23).



Gráfica 4.22: Recuentos de neutrófilos en sangre periférica para los lotes A2 (reinoculado) y B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los lotes A2 (reinoculados) y el B1 (primoinoculados) a lo largo de la segunda etapa del experimento. El lote A2 en promedio tuvo 58 ± 35 neutrófilos bastonados / μl de sangre. El lote B1, 68 ± 70 neutrófilos bastonados / μl de sangre. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los lotes A2 y B1 respecto al lote B2. El promedio del lote B2 fue de 33.5 ± 39.8 bastonados / μl de sangre (gráfica 4.24).



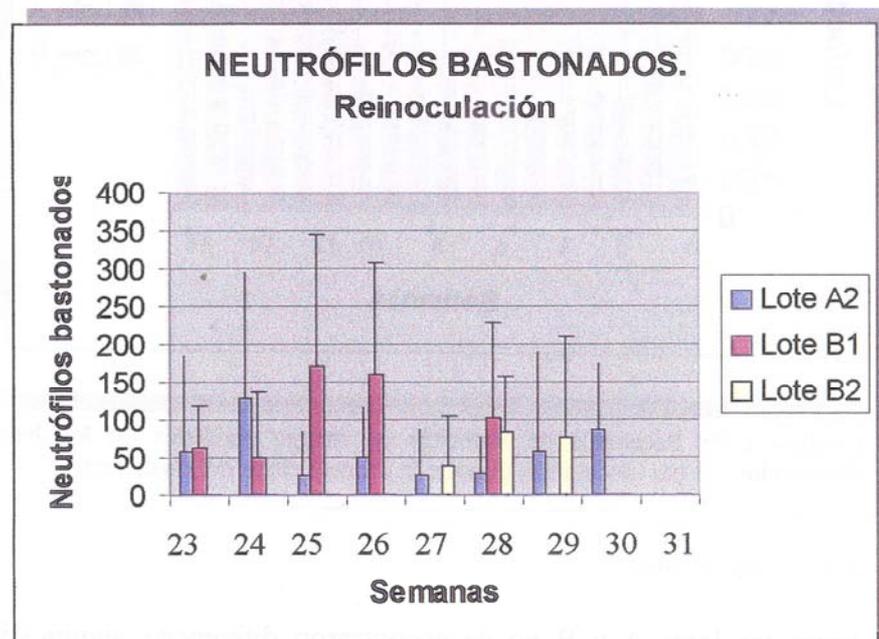
Gráfica 4.23: Recuentos de neutrófilos bastonados en sangre periférica en los lotes A (inoculado) y B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3.1.3 Linfocitos

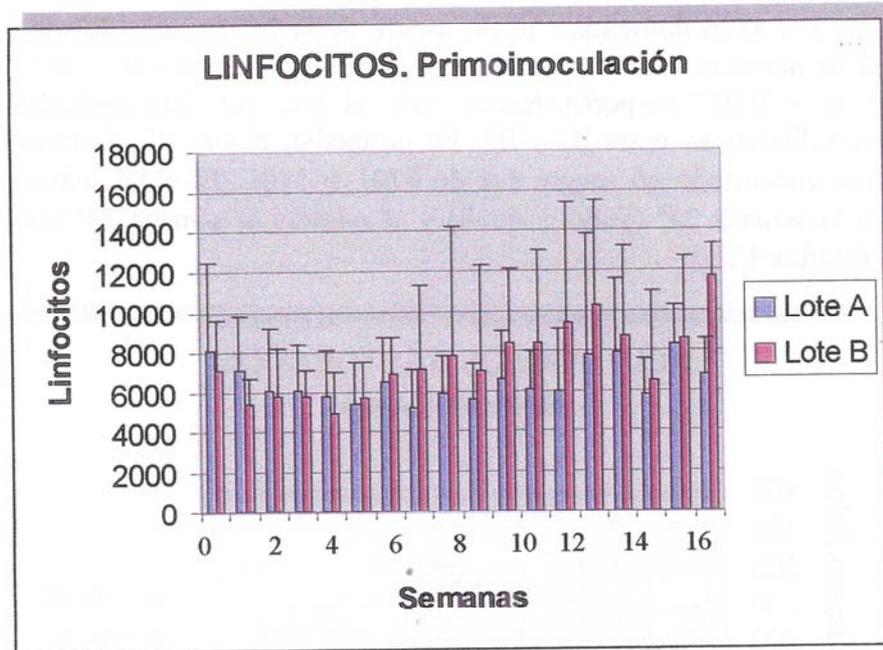
Sólo se detectaron diferencias significativas entre los lotes durante la primera etapa del experimento la semana 17^a ($p = 0.021$), siendo el número de linfocitos en sangre periférica de 6809 por μl de sangre para el lote A y de 11690 por μl de sangre para el lote B. Los valores promedio fueron similares (lote A, 6504 ± 960 ; lote B, 7536 ± 1804 linfocitos / μl de sangre). Los valores de linfocitos en sangre periférica oscilaron entre los 8259 de la semana decimosexta y los 5211 de la semana séptima para el lote A y entre los 11690 de la semana decimoséptima y los 4904 de la cuarta semana (gráfico 4.25).

Durante la siguiente etapa de la experiencia, únicamente se encontraron diferencias significativas entre los lotes en la 29^a semana (6^a semana p. i.) ($p = 0.028$). El lote A2, en promedio, tuvo 4699 ± 1116 linfocitos / μl de sangre, oscilando entre los 6643 de la 19^a semana y los 3198 de la 25^a semana. Por su parte, el lote B1, en promedio presentó 7628 ± 1397 linfocitos / μl de sangre, comprendidos entre los 9198 de la 19^a

semana y los 4776 linfocitos / μl de sangre de la 24^a semana. Respecto al lote B2 se detectaron diferencias significativas las semanas 25^a y 28^a ($p = 0.04$ y $p = 0.027$ respectivamente) con el lote A2. Sin embargo, no existieron diferencias entre B1 y B2. En promedio, el lote B2 el número de linfocitos encontrado en sangre fue de 8701 ± 1101 . El valor máximo se alcanzó la semana 27^a (9366 ± 6038) y el mínimo la semana 24^a (7041 ± 5221) (gráfica 4.26).



Gráfica 4.24: Recuentos de neutrófilos bastonados en sangre periférica para los lotes A2 (reinoculado) y B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.



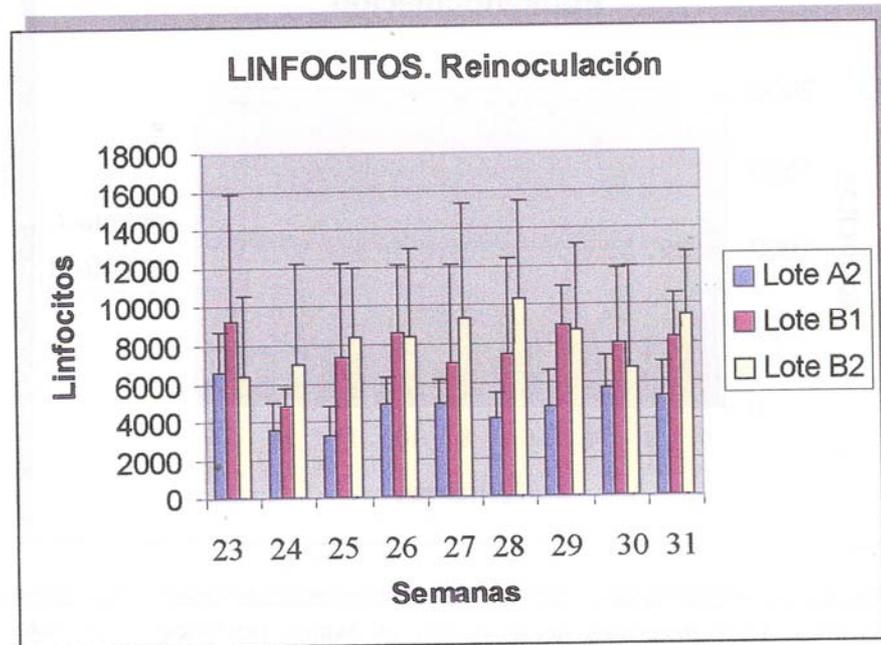
Gráfica 4.25: Recuentos de linfocitos en sangre periférica en los lotes A (inoculado) y B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3.4 Monocitos

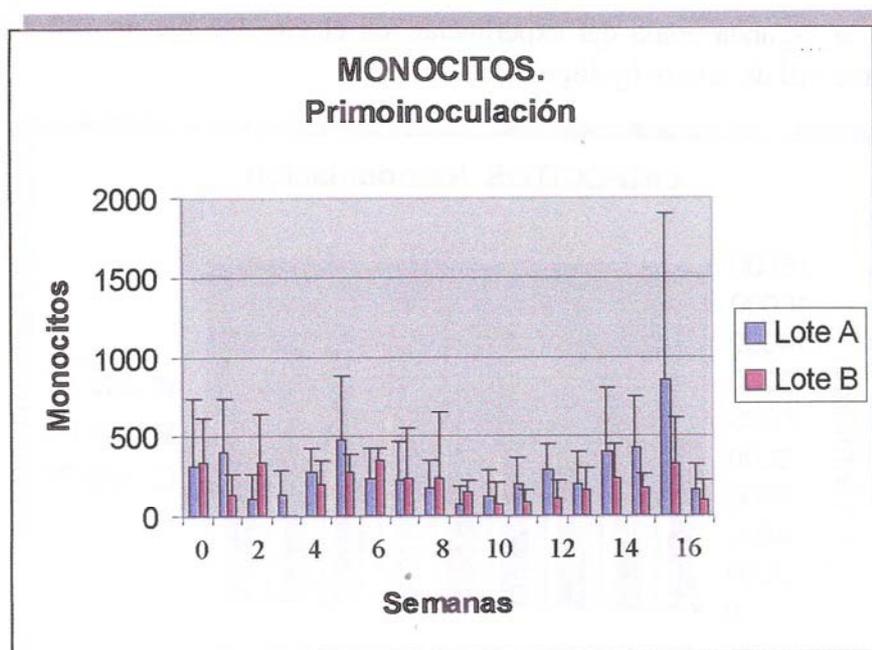
Entre los lotes A y B no se encontraron diferencias significativas durante la primera fase del experimento. Los valores promedio fueron de 283 ± 185 y de 197 ± 103 para los lotes A y B respectivamente. El lote A, como mayor recuento de monocitos, alcanzó 859 de promedio en la semana 16ª y como menor, 77 ± 109 la 9ª semana. El lote B, como máximo tuvo 346 monocitos / μl de sangre en la semana sexta, y en la tercera semana no se encontraron monocitos (gráfica4.27).

Sin embargo, en las semanas 27ª y 28ª si se encontraron diferencias significativas entre los lotes A2 (reinoculados) y el B1 (primoinoculado) ($p = 0.04$; $p = 0.05$, respectivamente). En ambos casos, el número de monocitos por microlitro de sangre fue mayor para los animales que no estaban previamente inmunizados (B). Los promedios fueron de 194 ± 101 para el lote A2 y de 269 ± 139 monocitos / μl de sangre para el lote B1. Durante la reinoculación no se encontraron diferencias entre el lote A2 y el B2 ni tampoco entre el lote B2 y el B1. En promedio, el valor encontrado

durante la segunda etapa del experimento en el lote B2 fue de 162 ± 65 monocitos / μl de sangre (gráfica 4.28).



Gráfica 4.26: Recuentos de linfocitos en sangre periférica para los lotes A2 (reinoculado) y B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

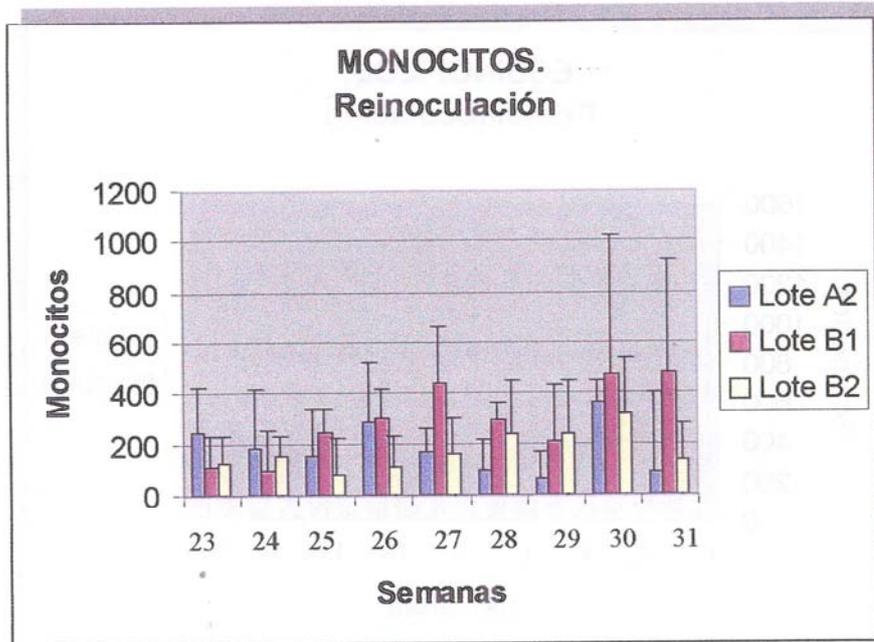


Gráfica 4.27: Recuentos de monocitos en sangre periférica en los lotes A (inoculado) y B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3.5 Eosinófilos

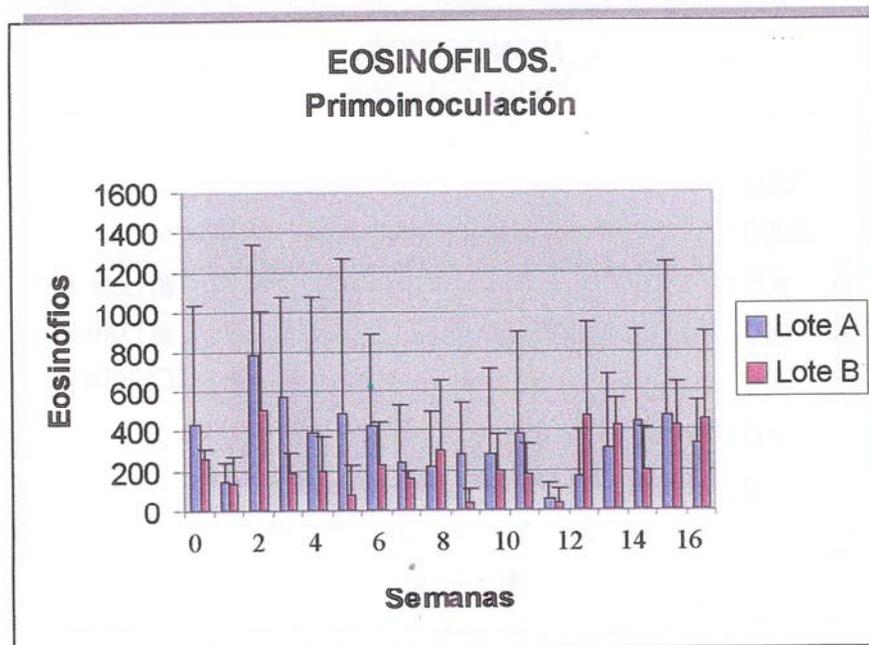
4.4.3.5.1 Eosinófilos durante la primera fase de la experiencia

Durante las primeras 12 semanas, el lote A (inoculado), presentó un valor medio mayor de eosinófilos en sangre periférica que el lote B (testigo). Sin embargo, esta clara tendencia, únicamente alcanza significación estadística la 9ª semana p.i. ($p = 0.05$). La tendencia que siguen los eosinófilos en los animales inoculados es un moderado incremento desde el inicio de la infección hasta la segunda semana, donde alcanza su máximo valor de 785 eosinófilos / μl de sangre, disminuyendo progresivamente a lo largo del resto de esta etapa de la experiencia. El menor valor de eosinófilos en sangre periférica se detecta en el lote A la semana duodécima con 59 eosinófilos / μl de sangre, y su promedio es de 358 ± 170 eosinófilos / μl de sangre. El promedio del lote B fue de 251 ± 148 eosinófilos / μl de sangre (gráfica 4.29).



Gráfica 4.28: Recuentos de monocitos en sangre periférica para los lotes A2 (reinoculado) y B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

Se trató de correlacionar las cargas de nematodos con los recuentos de eosinófilos en sangre periférica obtenida por cada animal inoculado. Para ello se realizaron coeficientes de regresión lineares entre los recuentos de eosinófilos semanales y el número final de vermes en el abomaso de los animales estudiados. Si tomamos el promedio de eosinófilos de las 2ª y 3ª semana (donde alcanzan el pico los distintos animales inoculados del lote A), y los comparamos con los vermes, alcanzamos un valor $R^2 = 0.2$ con una confianza del 89% ($p < 0.11$), siendo esta la mayor correlación detectada entre ambos parámetros.



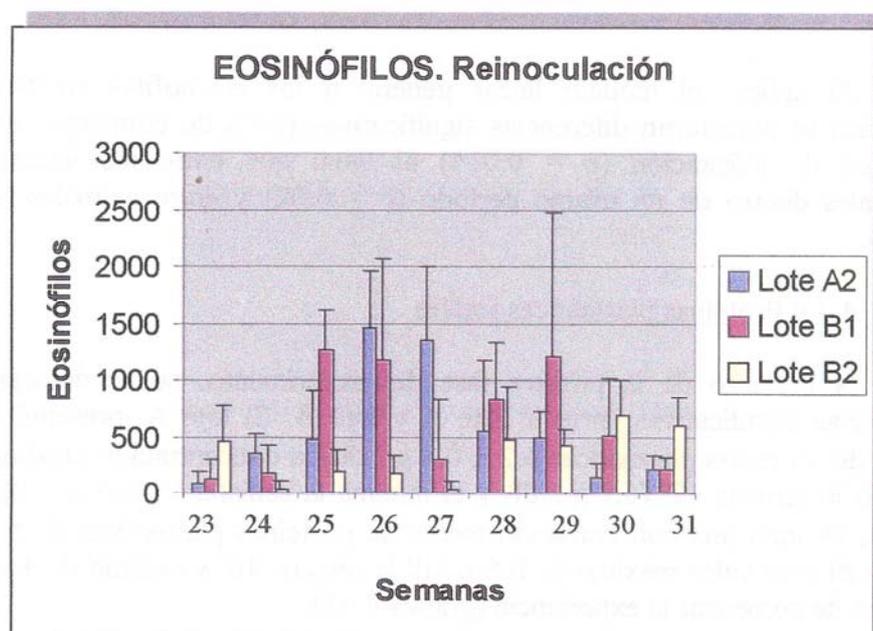
Gráfica 4.29: Recuentos de eosinófilos en sangre periférica en los lotes A (inoculado) y B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.4.3.5.2 Eosinófilos durante la segunda fase del experimento

Sin embargo, durante la reinoculación, donde la carga parasitaria fue más elevada, si se encontraron diferencias entre los animales inoculados y los testigos. El lote A2 (reinoculado), tiene un recuento de eosinófilos en sangre periférica mayor que el lote B2 (testigo), la semana 24^a (primera p. i.) ($p = 0.008$). El lote primoinfectado (B1) durante esta segunda fase de la experiencia, también tiene un mayor número de eosinófilos que el testigo, pero alcanza significación estadística la segunda semana p. i. ($p = 0.018$), con lo que esta segunda semana, los dos lotes inoculados tienen diferencias significativas respecto al lote testigo (el lote A2, también tiene un mayor número de eosinófilos en sangre periférica con una significación de $p = 0.04$). La semana siguiente (semana 26^a del experimento), aunque los dos lotes inoculados tiene mayores recuentos de eosinófilos que el testigo, sólo el lote A2 alcanza significación estadística ($p = 0.005$). En realidad, si descartamos un animal que tiene un recuento anormalmente bajo en el lote B1, también existen diferencias estadísticas ($p = 0.002$). En cualquier caso, la semana siguiente (27^a), ya sólo perdura con respuesta significativa respecto al testigo, el lote previamente infectado ($p = 0.002$), mientras

que el lote B1, sólo tiene diferencias significativas con el propio lote A2 (reinoculado), y ninguna con el lote testigo (B2). A partir de entonces, los recuentos de eosinófilos se homogenizan en los tres grupos y dejan de observarse diferencias que sean de interés desde un punto de vista estadístico.

Si calculamos el coeficiente de regresión lineal entre los recuentos de eosinófilos en sangre periférica y los vermes adultos encontrados en el abomaso, la semana que mejor los correlaciona es la 26ª, con una $R^2 = 0.35$ con una probabilidad del 92%.



Gráfica 4.30: Recuentos de eosinófilos en sangre periférica para los lotes A2 (reinoculado) y B1 (primoinoculados) y lote B2 (testigo) durante la segunda etapa del experimento.

4.4.3.5.3 Repetibilidad y tratamiento estadístico de la varianza por medio del modelo lineal mixto de los eosinófilos

Al igual que se realizó con los recuentos fecales de huevos, se estudió la repetibilidad de los eosinófilos presentes en sangre periférica a lo largo de los periodos de infestación.

La repetibilidad encontrada entre los dos periodos es muy baja, de 0.18. Al igual que sucedía con los recuentos fecales de huevos, predominan los factores internos de cada animal. Por su parte, la repetibilidad entre las medias de los dos periodos es de 0.604.

A medida que se acortan los periodos de estudio, aumenta la repetibilidad, predominando factores externos a cada animal como elementos que explican la varianza. Así, si se trabaja en el primer periodo en un tramo de 7 semanas, la repetibilidad es de 0.277 ± 0.012 . En tramos de dos semanas, es de 0.483 ± 0.021 y en tramos de 2-3 días es de 0.743 ± 0.051 .

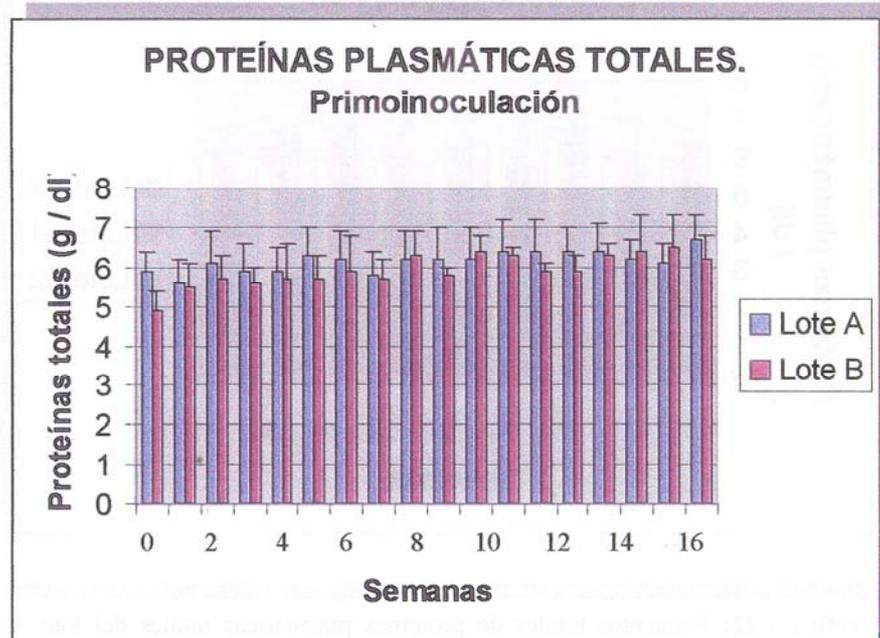
Al aplicar el modelo lineal general a los eosinófilos en sangre periférica se detectaron diferencias significativas (95% de confianza) entre periodos de infestación ($p = 0.014$) al igual que entre los intervalos semanales dentro de un mismo periodo ($p = 0.02$) y entre animales ($p = 0.062$).

4.4.4 Proteínas plasmáticas totales

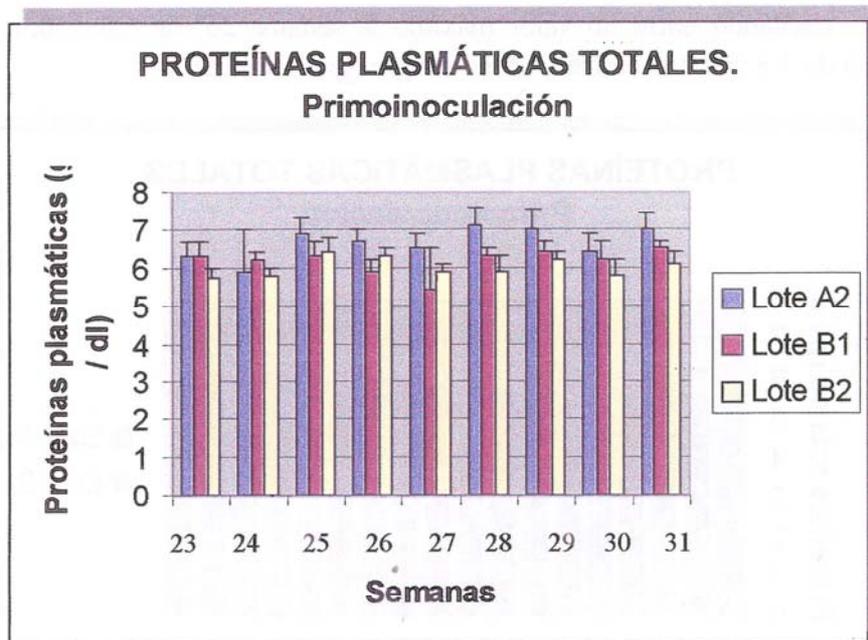
A lo largo de la primera fase del experimento, no se detectaron diferencias significativas entre el lote A y lote B. El lote A, presentó una media de proteínas plasmáticas 6.2 ± 0.3 g / dl. La concentración máxima se detectó la semana 17^a (6.7 g / dl) y la mínima la semana 1^a (5.6 g / dl). El lote B, alcanzó una concentración media de proteínas plasmáticas de 5.9 ± 0.4 g / dl y un valor máximo de 6.5 g / dl la semana 16^a y mínimo de 4.9 g / dl antes de comenzar la experiencia (gráfica 4.31).

La semana 26^a se encontraron diferencias significativas entre los lotes A2 y B1, siendo mayor la concentración de proteínas plasmáticas en el lote A2 (6.7 g / dl) que en el lote B1 (5.9 g / dl). Esta fue la única semana en la que se encontraron diferencias significativas entre estos lotes. El lote A2 alcanzó un valor medio de concentración de proteínas plasmáticas totales de 6.6 ± 0.4 g / dl. Su valor máximo se alcanzó la semana 28^a (7.1 g / dl) y el mínimo la semana 24^a (5.9 g / dl). El lote B1 tuvo una concentración media de 6.1 ± 0.3 , un valor máximo de 6.4 g / dl la semana 29^a y mínimo la semana 27^a (5.4 g / dl). Sólo se encontraron diferencias significativas entre el lote A2 y el B2 ($p = 0.014$) la semana 28^a. No se encontraron diferencias significativas entre el lote B1 y el B2. Los animales del grupo testigo (B2) en promediaron un valor de 6.1 ± 0.3 gr de proteínas plasmáticas / dl de

sangre, oscilando entre un valor máximo la semana 25ª de 6.4 ± 0.4 y un mínimo de 5.8 ± 0.2 proteínas / dl de sangre (gráfica 4.32).



Gráfica 4.31: Recuentos totales de proteínas plasmáticas totales del lote A (inoculado) y lote B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.



Gráfica 4.22: Recuentos totales de proteínas plasmáticas totales del lote A2 (reinoculado) y lote B1 (primo inoculados) durante la segunda etapa del experimento.

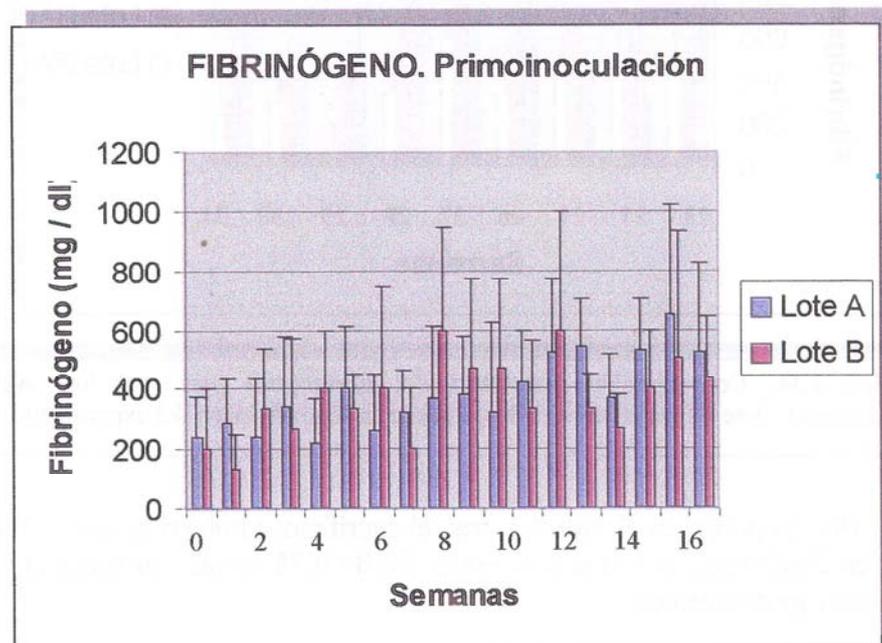
4.4.5 Fibrinógeno

Durante el primer periodo del experimento no se encontraron diferencias significativas en la concentración sanguínea de fibrinógeno entre el lote A y el B. El promedio del lote A fue de 385 ± 123 mg / dl de fibrinógeno en el suero. Su valor máximo se detectó la semana 16^a (650 mg / dl) y el mínimo la semana 4^a (220 mg / dl). Por su parte, el lote B alcanzó un valor promedio de 370 ± 130 mg / dl. Su valor máximo fue de 600 mg / dl, las semanas 8^a y 12^a. Y el mínimo fue de 133 mg / dl la primera semana p. i. (gráfica 4.33).

Durante la segunda fase del experimento, tampoco se detectaron diferencias significativas entre el grupo de animales reinoculados (lote A2) y el lote de animales expuesto por vez primera a la infección (lote B1). El lote A2, alcanzó un valor promedio de 535 ± 156 mg / dl de fibrinógeno. Como valor máximo, la semana 28^a con 760 mg / dl y la semana 24^a tuvo su menor valor con 300 mg / dl. El lote B1, en promedio alcanzó un valor de 567 ± 117 mg / dl. Como máximo fueron

767 mg / dl la semana 27ª y como mínimo 400 mg / dl la 18ª semana (gráfica 4.34).

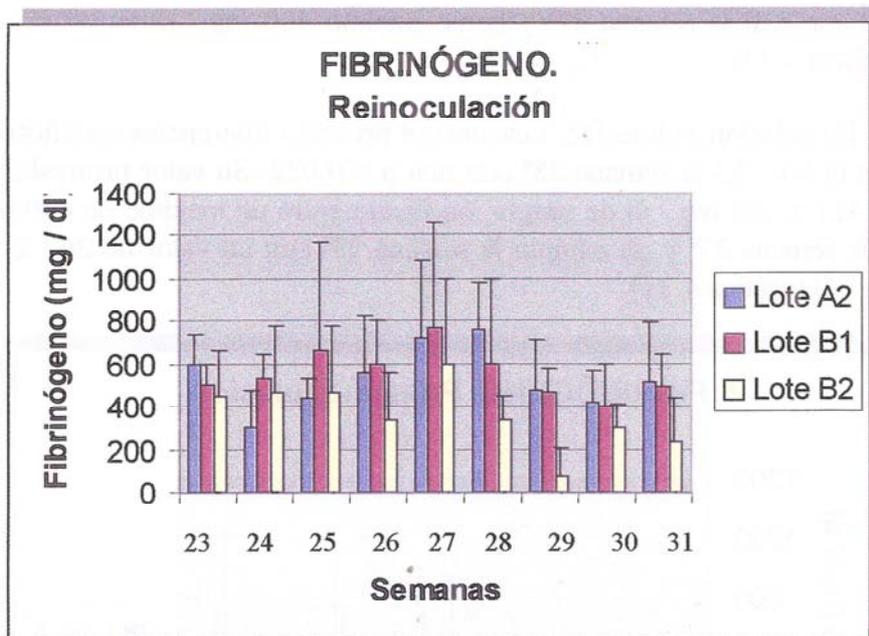
En relación al lote B2, únicamente presentó diferencias significativas con el lote A2 la semana 28ª con una $p = 0.022$. Su valor promedio fue de 411 ± 122 mg / dl de sangre, oscilando entre un máximo de 600 mg / dl la semana 27ª y un mínimo la semana 29ª con un valor de 267 ± 115 mg / dl (gráfica 4.34).



Gráfica 4.33: Concentración plasmática del fibrinógeno para el lote A (inoculado) y lote B (no inoculados) durante la primera etapa del experimento.

4.5 Recuentos de larvas inmaduras tras la digestión de mucosa gástrica

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la digestión de la mucosa de abomaso para detectar formas larvarias inmaduras. De los 5 animales correspondientes al lote A1 (sacrificado a las 17 semanas del experimento) sólo se encontraron larvas en 2 animales, uno de ellos con 0.16 larvas / gr mucosa, y el otro con 0.44 larvas / gr de mucosa.



Gráfica 4.34: Concentración plasmática del fibrinógeno para el lote A2 (reinoculado) y lote B1 (primoinoculados) durante la segunda etapa del experimento.

Por su parte, en el lote A2, tras el sacrificio, también se encontraron larvas en 2 animales, con una concentración de 0.78 larvas / gr mucosa y de 2.8 larvas / gr de mucosa.

Igualmente dos animales del lote B1 mostraron también larvas en la mucosa del abomaso, con una concentración de 0.2 y de 0.67 larvas / gr de mucosa.

4.6 Histología de los ganglios linfáticos abomasaes

La totalidad de los ganglios estudiados en los animales inoculados presentaron un patrón histopatológico similar. Se detectó un aumento de los centros germinales foliculares caracterizados por un incremento en el número de células reticulares con abundante presencia de mitosis, con disminución de áreas B y un aumento de los linfocitos interfoliculares y cordonales. En el seno de los ganglios se detectó una marcada histiocitosis.

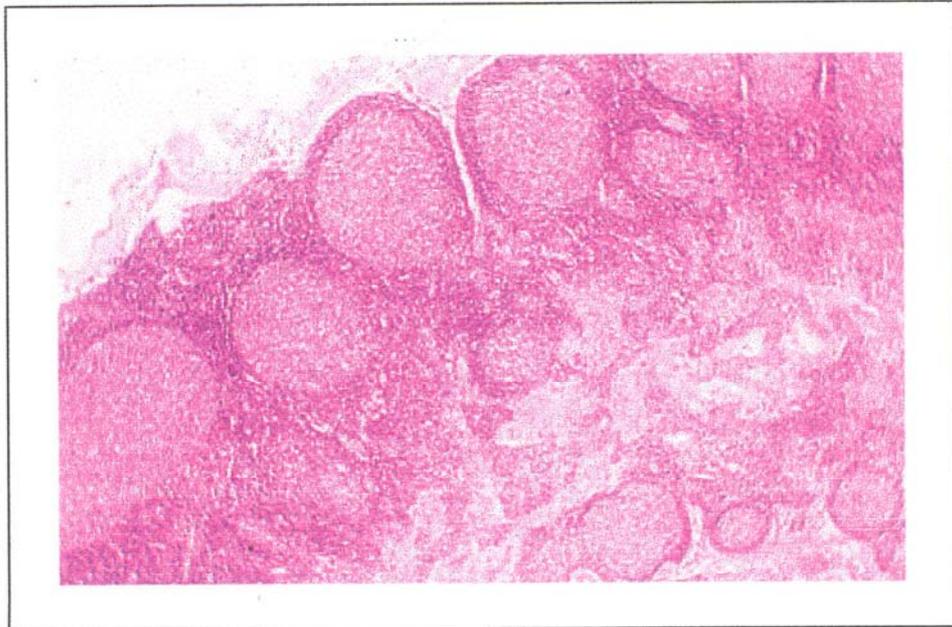


Imagen 4.1: Aumento en los centros germinales foliculares en animales inoculados con *T. circumcineta*

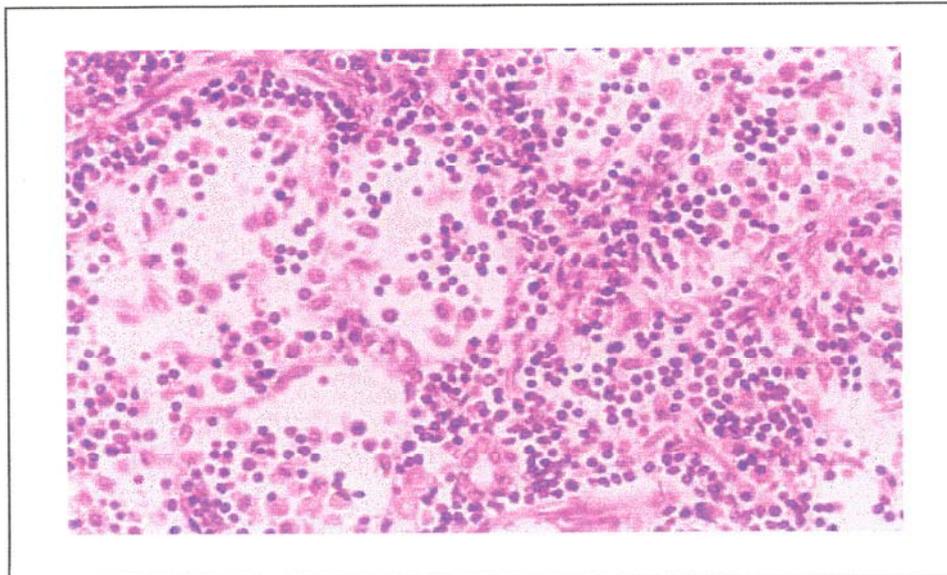


Imagen 4.2: Histiocitos en los senos del ganglio linfático.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

Entre los principales objetivos que se pretenden cubrir con este trabajo experimental, destacan, por una parte el evaluar la respuesta inmune que tiene lugar en ganado caprino de la Agrupación Caprina Canaria expuesto a cargas parasitarias de *Teladorsagia circumcincta* similares a la observadas en la isla de Gran Canaria y por otra el estudiar hasta que punto dichas cargas parasitarias son capaces de desencadenar una inmunidad protectora en los animales expuestos.

Diversos trabajos inciden en la relevancia que tiene en los pequeños rumiantes la parasitación por *T. circumcincta*, y las repercusiones que desde el punto de vista productivo pueden tener en la cabaña ganadera. Este nematodo se aloja en el abomaso de los rumiantes, y para el hospedador resulta difícil desarrollar frente a ellos una inmunidad rápida y eficaz (Gasbarre, 1997a; Gasbarre y cols., 2001), lo que favorece que el parásito pueda desarrollar durante un periodo importante de tiempo su acción patógena, además de que aumenten las posibilidades de transmisión al pasar los huevos con las heces al medio durante más tiempo.

En un estudio previo desarrollado en el Matadero Insular de Gran Canaria se concluyó que *T. circumcincta* era el nematodo más frecuentemente encontrado en los abomasos de las cabras de la isla, con una prevalencia del 65.8% dentro de los animales parasitados. A pesar de existir importantes diferencias climáticas en la isla, y aunque se observaron diferencias en cuanto a prevalencias y cargas parasitarias, lo cierto es que éstas no encontraron significación estadística. En este estudio, se detectó un de 700 vermes / animal, para esta especie, aunque dichos valores oscilaron entre un máximo de 800 vermes / animal en áreas desérticas (fundamentalmente el sur y este de la isla) y menos de 100 vermes / animal encontrados en las zonas más frías (centro de la isla) (Molina y cols., 1997).

El protocolo de inoculación empleado en la primera etapa del experimento, pretendía simular estas parasitaciones, y para ello sirvieron de guía inoculaciones previas realizadas en la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria. De hecho, el promedio el número de vermes recogidos al finalizar la primera etapa de la experiencia fue de 150 ± 87 nematodos / animal, lo que asemeja las cargas

naturales detectadas en la isla especialmente si tenemos en cuenta que transcurrieron doce semanas desde la última inoculación y se considera que la población de estas especies empieza a reducirse a partir de los 30-35 días después de alcanzar el estado adulto.

Considerando que dichas cargas no son muy elevadas, este trabajo pretende reproducirlas para inferir, a partir de los resultados recogidos en este estudio, de que modo pueden repercutir estas infecciones. Hoy día se asume que, aún cuando no se detecta de forma clínica (como sucede habitualmente en Gran Canaria), lo que no implica que dicho parásito no pueda provocar distintas alteraciones y mermas productivas, como una menor ganancia de peso (Hawkins, 1993; Ploeger y cols., 1990b) o bien una menor producción lechera en adultos (Thomas y cols., 1984; Gross y cols., 1999), aspecto de especial importancia en el caso de la ganadería que nos ocupa, puesto que su principal utilidad es la obtención de la leche para la producción de quesos. Sin embargo, esas conclusiones han sido el resultado de trabajos similares realizadas en ovinos, mientras que son escasos o nulos los referidos al ganado caprino, lo que justifica desde nuestro punto de vista, la realización de trabajos como el presente.

En general, la adquisición de inmunidad por parte del hospedador a los tricostrongílidos, se desarrolla lentamente, y se desglosa en diversos mecanismos, que además se suceden secuencialmente en el tiempo. De forma general, inicialmente se desarrolla un rechazo al ingreso de nuevas L3, seguido de un retraso en el desarrollo de éstas en el tejido del hospedador seguido de una progresiva disminución de la fecundidad de las vermes y finalmente su expulsión. Entre otros factores que pueden modificar la rapidez con la que tiene lugar esta secuencia de acontecimientos, destaca las cargas infectantes que reciben los animales (McClure y Emery, 1994). En otras especies de tricostrongílidos, como *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, la expulsión de los vermes adultos por parte de ovinos inmunizados, está condicionada a una exposición parasitaria mínima, de tal modo que si esta no es suficiente, no se desarrolla inmunidad capaz de provocar el rechazo de los vermes alojados en el abomaso en el caso de *H. contortus* (Barnes y cols., 1985) o se retrasa por más de 5 semanas la expulsión de *T. colubriformis* del intestino delgado en animales con inoculaciones larvianas pequeñas (Barnes y Dobson, 1990b).

Así mismo, en estudios en ovinos sobre la respuesta secundaria que desencadena *T. circumcincta* en los ganglios linfáticos regionales, dichas

respuestas tienen lugar en inoculaciones con un número mínimo de 50000 L3, pero no se aprecian cuando se inoculan tan sólo 1000 L3 (Smith y cols., 1984b), de lo que se desprende la importancia que tiene la intensidad de la infección en el desarrollo de inmunidad por parte del hospedador y de ahí el interés en establecer cual es la repercusión que las parasitaciones con pequeñas cargas, (que de forma habitual padecen las cabras de Gran Canaria) pueda tener en el desarrollo de inmunidad frente a la infección.

Gran cantidad de trabajos pretenden también evaluar el efecto de primoinfecciones en los animales, tratando de interpretar hasta que punto dichas infecciones son capaces de proporcionar a los animales cierto grado de protección. A modo de ejemplo, se pueden citar trabajos como los desarrollados por Stear y cols., 1995c; 1995d en los cuales, tras exponer a un grupo de ovejas a infecciones experimentales durante un periodo de 8 semanas, posteriormente, administran un antihelmíntico y tras 4 semanas de recuentos fecales de huevos de cero, inoculan nuevamente, manteniendo los animales infectados hasta su sacrificio 8 semanas después. Otros muchos protocolos experimentales pretenden evaluar la inmunización previa de ovinos con *T. circumcincta* (Stear y cols., 1995b; Sutherland y cols., 1999).

El empleo de fármacos de reconocida eficacia en el tratamiento de nematodosis gastrointestinales es práctica común en este tipo de ensayos, realizándose en ocasiones, incluso antes de que tenga lugar el desarrollo de fases adultas, con el propósito de evaluar la inmunidad que pueden conferir al hospedador las formas larvianas (Emery y cols., 1992; Almeria y cols., 1998; Sutherland y cols., 1998). En cualquier caso se acepta que la exposición repetida del hospedador al nematodo es capaz de proporcionar finalmente inmunidad al hospedador, aunque dicha inmunidad, particularmente en el caso de *Ostertagia* y *Teladorsagia*, sea muy lenta en desarrollarse al menos en ovinos y bovinos, donde se han analizado (Balic y cols., 2000; Smith y cols., 1983b; 1985b; Almeria y cols., 1998; Michel, 1973; Claerebout y cols., 1996; Seaton y cols., 1989a; 1989b; Stear y cols., 1995b; Sutherland y cols., 1999).

A la hora de iniciar la inoculación, la edad de los animales fue de 5 meses. Esta decisión respondió al propósito de contar con animales con capacidad de desarrollar convenientemente la inmunidad. En corderos de menos de 4 meses de edad inoculados con *H. contortus* no se detectan linfocitos reactivos a antígenos, que sí aparecen en corderos de más de 4 meses expuestos al mismo protocolo de inoculación (Lloyd y Soulsby,

1987). Respecto a los animales adultos, de más de dos años de edad, se descartaron porque hay autores que les atribuyen una posible resistencia inherente a la edad e independientemente de sufrir exposiciones previas (Sutherland y cols., 1999).

Como queda recogido en el apartado 2.10.2 de la Revisión Bibliográfica, muchos factores son capaces de modificar la respuesta inmunitaria de los animales parasitados por tricostrongídeos. Por todo ello, se pretendió que los lotes de los animales fueran lo más homogéneo posible. Todos ellos habían nacido la misma semana, y en la misma explotación ganadera. Todos se alimentaron en las mismas condiciones, para evitar en la medida de lo posible que distintos estados nutricionales afectaran al experimento (Coop y Holmes, 1996).

5.2 NEMATODOS ADULTOS RECOGIDOS EN EL ABOMASO

El promedio de vermes adultos recogido en los abomasos de las cinco cabras sacrificadas al finalizar las primeras 17 semanas fue de 150 ± 87 vermes / animal. Durante la segunda fase del experimento se recogieron en promedio 1240 ± 634 vermes en el lote A2 (reinoculados) y 1205 ± 1192 en el lote B1 (primoinoculados en esta segunda fase). Como quedó reflejado en el apartado 4.1.2 de Resultados, uno de los animales del lote A2, presentó un recuento de vermes atípicamente bajo, respecto a los otros integrantes del lote, puesto que únicamente se recogieron 185 vermes adultos en este animal. Si descartamos este individuo, el promedio del lote A2 es de 1504 ± 269 vermes / animal. De modo análogo, en el lote B1 también se detectó un animal con un comportamiento diferenciado del resto de los integrantes del lote. En este caso, el animal descartado presentó un recuento mucho más elevado que el resto de los integrantes de su grupo. Sin este animal, el promedio del lote B1 sería de 517 ± 88 vermes / animal.

Si comparamos los recuentos de vermes del grupo A2 (reinoculado) y el B1 (primoinoculado en la segunda fase del experimento) y por tanto sin contacto previo con el parásito no se encuentra diferencias significativas, aún a pesar de que el promedio del grupo A2 es sensiblemente mayor que el encontrado en el lote B1. Por lo tanto los resultados obtenidos parecen indicar que el protocolo de inoculación seguido durante la primera fase del estudio no es capaz de inducir una respuesta protectora, incluso el promedio de vermes adultos recogidos es ligeramente superior en el grupo de animales primoinfectados, llegando a observarse diferencias significativas al

descartarse un individuo de cada grupo con recuentos discordantes con los restantes integrantes del lote.

Estos resultados coinciden con los observados por otros autores en inoculaciones experimentales de 15000 L3 de *T. circumcincta* en ovinos. **Sutherland y cols., 1999**, no detectan diferencias en el establecimiento de los adultos en ovejas inmunizadas previamente con 5000 L3 semanales durante 8 semanas y otras no expuestas al parásito, aunque si encontraron una menor viabilidad de los huevos, menor fecundidad de las hembras y un menor tamaño en las hembras adultas en las ovejas reinfectadas.

En inoculaciones experimentales con *Ostertagi ostertagi* en bovinos, parece ser cierto que el desarrollo de inmunidad depende de la magnitud de la infección y de la duración de la misma (**Vercruyssen y Claerebout, 1997**). En primo-inoculaciones que oscilaron entre 4000-50000 L3 de *O. ostertagi* durante 17 semanas. Tras desparasitar a todos los animales, y realizar una inoculación de 150000 L3 de *O. ostertagi*, tanto a estos terneros expuestos previamente al parásito como a otro grupo de terneros no inmunizados, tampoco detectan diferencias significativas en el número de vermes entre estos grupos (**Hilderson y cols., 1993b**). Otros trabajos, sin embargo, han mostrado una correlación inversa entre nivel de exposición y recuento de vermes (**Ploeger y cols., 1995**).

También, en inoculaciones realizadas con otras especies de tricostrongídeos, concretamente con 15000 L3 de *H. contortus*, se han detectado recuentos de vermes mayores en animales previamente expuestos a 800 L3 semanales del parásito durante 14 semanas consecutivas que en otros animales no inmunizados previamente, y al igual que en nuestra experiencia, sin diferencias significativas entre lotes (**Gills y cols., 1991**).

En cualquier caso, se distingue una elevada variabilidad en las respuestas individuales, como queda reflejado en los valores de desviación estándar sobre la media, fenómeno que se puede constatar en trabajos similares en ovinos (**Stear y cols., 1995d**). Esta variabilidad en la respuesta, que parece depender de la genética de cada individuo está propiciando estudios encaminados a reconocer los individuos más resistentes y los más susceptibles a nematodos gastrointestinales de los rumiantes, bien para seleccionar a individuos más resistentes, o bien para contra-seleccionar a los más susceptibles (**Gasbarre y cols., 2001; Stear y cols., 1995d**).

En conclusión, en nuestro caso es evidente que la magnitud de la infección y la duración de la misma como factores determinantes en el desarrollo de la infección (Vercruyse y Claerebout, 1997) han resultado insuficientes para provocar una inmunidad capaz de impedir el establecimiento de los vermes adultos en el abomaso, antes bien, al contrario, y a tenor de los resultados obtenidos los animales inoculados previamente son más sensibles a la infección.

5.3 TEST DE TRANSFORMACIÓN LINFOBLÁSTICA

5.3.1 Test de transformación linfoblástica durante la primera fase de la experiencia

Durante la primera fase del experimento se estudió el comportamiento que tenían los linfocitos periféricos de los animales integrantes del lote A (inoculados con 2000 L3 semanales durante 5 semanas consecutivas) y B (lote testigo) en cultivos *in vitro* en presencia de tres estimulantes inespecíficos, concanavalina A (con A), fitohemaglutinina (PHA) y el pokeweed mitogen (PWM) y de tres concentraciones distintas de antígeno somático de adultos de *T. circumcincta*, Ag 1 (10 µg / ml), Ag 2 (20 µg / ml) y Ag 3 (30 µg / ml).

5.3.1.1 Cultivos de linfocitos con mitógenos inespecíficos

El comportamiento que presentaron los linfocitos de los animales inoculados con los tres mitógenos inespecíficos fue similar. En todos los casos, se detectaron una reducción en la respuesta linfocitaria, que resultó significativamente menor, que la linfoproliferación detectada en los animales pertenecientes al lote testigo. Estas reducciones se concentraron entre las semanas 5ª y 7ª post-inoculación, recuperándose a partir de entonces la capacidad de respuesta linfocitaria *in vitro*.

Para el caso de la con A, se detectó esta menor proliferación linfocitaria en cultivos *in vitro* las semanas 5ª ($p = 0.05$), 6ª ($p = 0.005$) y 7ª ($p = 0.03$). De forma similar, la PHA es incapaz de estimular los linfocitos cultivados *in vitro* procedentes de los animales inoculados las semanas 5ª ($p = 0.05$) y 6ª ($p = 0.05$), mientras que el patrón detectado para el PWM es exactamente igual que el encontrado con la PHA, con una reducción en la respuesta linfocitaria *in vitro* en la 5ª semana ($p = 0.046$) y 6ª semana ($p = 0.016$).

Muchos otros autores encuentran en linfocitos sanguíneos procedentes de bovinos inoculados con *O. ostertagi* estas reducciones transitorias pero significativas en la respuesta a mitógenos inespecíficos de dichos linfocitos en cultivos *in vitro* (Klesius y cols., 1984; Cross y cols., 1986; Snider y cols., 1986; Wiggin y Gibbs, 1990). Sin embargo, no parece ocurrir lo mismo cuando se consideran los linfocitos procedentes de linfonódulos abomasales. Wiggin y Gibbs, 1989; 1990, al observar una mayor capacidad de respuesta a la con A en linfocitos bovinos procedentes de ganglios linfáticos abomasales en vacas infectadas con *O. ostertagi*, aunque no atribuyen a esta mayor capacidad de estimulación un efecto protector.

Linfocitos sanguíneos procedentes de ovinos inoculados con otras especies de tricostrongídeos como *H. contortus* (Zajac y cols., 1990), *T. colubriformis* (Emery y cols., 1991) y *Cooperia* spp. (Hanrahan y cols., 1984), a diferencia de lo que sucede en animales infectados con *T. circumcincta*, si que tiene lugar una estimulación de la capacidad proliferativa de los linfocitos en presencia de Con A durante las primeras semanas de la infección.

Parece claro que en esta experiencia, a pesar de que se considera un protocolo experimental que conduce a cargas parasitarias bajas, se ha producido una reducción transitoria en la respuesta de los linfocitos sanguíneos análoga a la descrita en bovinos por varios autores. La mayoría de estos autores atribuyen a *O. ostertagi* la capacidad de provocar efectos inmunosupresores no específicos, reafirmando esta posibilidad al detectarse disminuciones en la respuesta sérica de inmunoglobulinas de estos animales parasitados por *O. Ostertagia* a otros antígenos no relacionados con el parásito (Mannsour y cols., 1991; 1992). Para Cross y Klesius, 1989. La reducción de las capacidades proliferativas de las distintas líneas de linfocitos, podría explicar la lentitud con la que se consigue la inmunidad protectora, a la vez que constituye un aspecto importante a tener en cuenta en caprinos de nuestro entorno parasitados por *T. circumcincta* en cuanto que podrían estar relacionados con un aumento de la susceptibilidad de estos animales a otras infecciones bien sean de naturaleza infecciosa o parasitaria, o incluso ser responsable de inadecuadas respuestas a vacunas (o a estímulos vacunales).

5.3.1.2 Cultivos de linfocitos con distintas concentraciones de Ag somático de adultos de *T. circumcineta*.

El comportamiento que siguieron los linfocitos sanguíneos *in vitro* al cultivarlos con tres concentraciones distintas de antígenos somáticos de vermes adultos de *T. circumcineta* fue similar. En esta ocasión también se encontraron diferencias significativas en los linfocitos pertenecientes a los lotes A y B las semanas 5^a y 7^a, desapareciendo a partir de entonces las diferencias entre los lotes. Sin embargo, en contraposición de lo que sucede para el caso de los estimulantes inespecíficos, en este caso la proliferación linfocitaria en estas semanas en las que se encuentran diferencias significativas, es mayor para el caso de los animales inoculados.

Para el caso del Ag 1, se encontraron diferencias significativas la 5^a semana ($p = 0.028$). El Ag 2, mostró diferencias significativas entre los lotes A y B la semana 5^a ($p = 0.05$) y 7^a ($p = 0.049$), al igual que el Ag 3, que en la 5^a ($p = 0.045$) y 7^a ($p = 0.001$) semana también se detectaron diferencias significativas.

La estimulación en la linfoproliferación de linfocitos sanguíneos procedentes de ovinos inoculados con diversos tricostrongilidos, es un hallazgo frecuente al emplear como antígeno L3 de los diferentes especies de nematodos inoculados, así sucede por ejemplo con *T. colubriformis*, *H. contortus* y *T. circumcineta* (Hanrahan y cols., 1984; Zajac y cols., 1990; Emery y cols., 1991; Gill y cols., 1991), apareciendo entre los 7-35 días post-inoculación y persiste por más de 72 días (Kloosterman y cols., 1980). Sin embargo, muchos autores no atribuyen a esta respuesta linfocitaria una capacidad protectora (Lloyd y Soulsby, 1987; Shubber y cols., 1984; Berezsko y cols., 1987; Rifkin y Yong, 1984).

Los linfocitos sanguíneos procedentes de animales inoculados con *T. colubriformis* no sólo responden a extractos larvarios, si no que también responden a extractos de adultos y antígenos de excreción secreción de vermes adultos. Esta estimulación en la proliferación *in vitro* se inicia a los 7 días de la exposición y perdura hasta los 28 días (McClure y cols., 1992).

En nuestro caso, la respuesta linfocitaria en presencia de antígeno somático de adultos de *T. circumcineta* que se ve estimulada durante unas semanas, indican un reconocimiento por parte de los linfocitos de los animales inoculados al antígeno. Esta respuesta tiene lugar a la quinta semana tal vez porque sea necesaria la presencia de adultos en el abomaso y

el reconocimiento de los antígenos por parte del hospedador. Sin embargo, al igual que sucede en experimentos realizados por otros autores con éste y otros tricostrongilidos, no se puede atribuir a esta respuesta linfocitaria una capacidad protectora, al no encontrar variaciones de importancia en los vermes recogidos en los abomasos al finalizar la experiencia (Lloyd y Soulsby, 1987; Shubber y cols., 1984; Berezsko y cols., 1987; Rifkin y Yong, 1984).

5.3.2 Test de transformación linfoblástica durante la segunda fase del experimento

Al igual que se realizó durante la primera fase del experimento, durante la segunda etapa se procedió a evaluar el comportamiento de los linfocitos sanguíneos a los distintos mitógenos inespecíficos considerados en la primera etapa (Con A, PHA, PWM) y a las distintas concentraciones de antígeno estudiadas (Ag1, Ag 2 y Ag 3). Durante esta fase, se compararon los resultados en la linfoproliferación de los lotes A2 (reinoculado), B1 (primoinoculado en esta segunda fase) y B2 (no inoculado).

5.3.2.1 Cultivos de linfocitos con mitógenos inespecíficos

En general, durante esta segunda fase del experimento, también se aprecia una reducción en la linfoproliferación, si bien fue más precoz en los animales previamente infectados que en los no inmunizados. Así mismo, en ambos casos, las diferencias con el lote testigo aparecieron más precozmente que en la primera etapa.

Si se considera el **lote A2** (reinoculado), se encuentra la reducción en la linfoproliferación en presencia de **Con A** las semanas 24^a (primera de la reinoculación) ($p = 0.015$) y 25^a (2^a p.i. en esta segunda etapa del experimento) ($p = 0.001$). Lo mismo sucede en el caso de la **PHA**, con diferencias en la 24^a ($p = 0.018$) y 25^a ($p = 0.02$) y con el **PWM**, quien fue incapaz de estimular los linfocitos de los animales del lote A2 las semanas 24^a ($p = 0.001$), 25^a ($p = 0.048$) y 29^a ($p = 0.02$). Siempre comparando el lote A2 respecto al lote B2 (testigo).

Para el caso de los animales que integran el **lote B1**, la situación es similar, sólo que se retrasa una semana la reducción en la linfoproliferación de los linfocitos sanguíneos. Concretamente, en el caso de la **Con A**, las diferencias aparecen en la semana 25^a ($p = 0.038$), y desaparecen la semana

27^a. Igual sucede en el caso de la PHA ($p = 0.05$). Sin embargo, para el PWM, aún a pesar de que la capacidad de respuesta de los linfocitos en la semana 25^a es apreciablemente menor que la respuesta que presentan dicha semana los linfocitos sanguíneos procedentes de los animales del lote testigo (B2), no llegan a observarse diferencias significativas.

Probablemente, la mejor manera de comprender el porqué se produce de forma más precoz la inhibición en la respuesta linfocitaria en los animales previamente sensibilizados que en los que se exponen al parásito por vez primera, sea tratando de considerar los motivos por los cuales presumiblemente, se produce esta reducción. Gasbarre, 1997a, encontró también una disminución en la respuesta inmune específica en bovinos inoculados con *O. ostertagi*. Tras la infección se localizan una gran cantidad de linfocitos reactivos a antígenos parasitarios en los linfonódulos regionales. Sin embargo, a medida que la infección perdura, su número disminuye, incluso en bovinos inmunizados (Gasbarre, 1986; 1994). Esta pérdida de células T reactivas a antígenos de *Ostertagia* se puede deber a la propia estimulación que las infecciones que este parásito provoca al incrementar el porcentaje de linfocitos B en determinados tejidos (Baker y cols., 1993c; Almería y cols., 1997 a; Canals y cols., 1997). La estimulación policlonal de linfocitos B se considera un potente inmunosupresor en infecciones por protozoos (Gasbarre y cols., 1980; Sacks y cols., 1980) y también en infecciones por helmintos (Crandall y cols., 1978). Aunque en nuestro trabajo no hemos realizado un estudio que nos permita cuantificar la presencia en los tejidos de los linfocitos B, no es menos cierto que podemos inferir una estimulación en su actividad al haber evaluado los niveles séricos de IgG en los animales a lo largo del experimento. Efectivamente, la respuesta sérica de la IgG para el caso del estudio del antígeno somático de adultos de *T. circumcincta* es más precoz en el caso de los animales del lote A2 que en los pertenecientes al lote B1, como corresponde a una respuesta inmunitaria anamnésica o de recuerdo. De hecho, la respuesta sérica de inmunoglobulinas es tan precoz en el grupo A2, que acontece durante la primera semana p. i., al mismo tiempo que se produce la reducción en la linfoproliferación de los linfocitos en cultivo en presencia de los estimulantes inespecíficos. Aunque estadísticamente no existen diferencias significativas entre el lote B1 y B2 en la semana 25^a (en la que se produce la reducción de la linfoproliferación en los animales del lote B1), lo cierto es que los niveles de IgG aumentan notoriamente, si los comparamos con los que presentaban ese grupo de animales la semana anterior, y con los que presentan los propios animales que corresponden con el lote testigo. Algo similar sucede en el caso de la primera etapa del

experimento. En la semana 4^a, aparecen diferencias significativas entre los animales pertenecientes al lote A y B en lo que se refiere a los niveles séricos de IgG, y sólo una semana después, aparecen la reducción en la capacidad de linfoproliferación de los linfocitos procedentes de sangre periférica de los animales inoculados. Los mitógenos ensayados evalúan fundamentalmente la proliferación de linfocitos T, exceptuando el PWM, que además de estimular la linfoproliferación de los linfocitos T, estimula también a la población de linfocitos B. Tal vez por este motivo, no se encuentran diferencias que sean estadísticamente significativas al emplear el PWM como estimulante linfocitario en el lote B1 respecto al B2 en la semana 25^a del experimento, a diferencia de lo que sucede con los otros dos mitógenos que son estimulantes exclusivos de linfocitos T.

Sin embargo, no hay un acuerdo sobre las razones que provocan esta inmunosupresión. Snider y cols., 1986, consideraron la posibilidad que esta inhibición de la respuesta a PHA por parte de los linfocitos se pueda deber a otros factores como el incremento de histamina que tiene lugar en estas infecciones. En ratones se ha demostrado la capacidad que tiene la histamina de provocar inmunosupresiones en linfocitos murinos al cultivarlos en presencia de PHA (Bonnet y cols., 1984). Lo que si es cierto es que estos fenómenos de inmunosupresión parecen ser generales a muchos nematodos gastrointestinales (Soulsby, 1979).

Otro factor que puede provocar esta supresión de la respuesta inmunitaria del hospedador es, al menos en infecciones por *O. ostertagi* en bovinos, algunas fracciones antigénicas procedentes de larvas de *O. ostertagi*, quienes son capaces de suprimir la respuesta de linfocitos esplénicos murinos cultivados con concaavalina A (Cross y Klesius, 1989). Vercruyse y Claerebout, 1997, atribuyen a este factor un posible papel en el lento desarrollo de la inmunidad por parte de los bóvidos a la infección por *O. ostertagi*.

5.3.1.2 Cultivos de linfocitos con distintas concentraciones de Ag somático de adultos de *T. circumcincta*.

Únicamente se detectaron diferencias significativas la semana 27^a (3^a semana post-inoculación), entre el lote A2 y el lote B2 y entre el B1 y el B2. En los dos casos, la proliferación de los linfocitos sanguíneos procedentes de los animales inoculados fue mayor que la obtenida por los animales del grupo de animales no inoculados.

En parasitaciones por *T. colubriformis*, la respuesta de linfocitos sanguíneos a antígenos somáticos de adultos y L3, así como a antígenos excretor-secretor de adultos, es más precoz en animales previamente infectados (McClure y cols., 1992; Adams y Cripps, 1977). Generalmente, presenta este primer incremento a los dos días de la inoculación y un segundo incremento acontece a los 14 días post-inoculación (McClure y Emery, 1994; McClure y cols., 1991). Además, en este caso existe una correlación negativa entre el índice de estimulación y los recuentos de vermes en abomaso. Tampoco en estos casos parece claro que una respuesta proliferativa precoz suponga una protección a las reinfestaciones por este nematodo (Windon y Dineen, 1981).

Algo similar acontece en inoculaciones con *H. contortus* donde se provoca una respuesta específica precoz, pero que tampoco en este caso supone una inmunoprotección frente a las reinfestaciones (Gill y cols., 1991).

En nuestro estudio, durante la segunda fase del experimento se observó una respuesta la semana 27^a (4^a post-inoculación) de los linfocitos periféricos al Ag1, detectándose una mayor respuesta de los linfocitos procedentes de animales inoculados, sin que la exposición previa a pequeñas cargas parasitarias hayan supuesto ningún cambio en la respuesta linfocitaria de los animales, con lo que al igual que sucedió en la primera fase de la experiencia, se detectó un reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos.

5.4 E.L.I.S.A. (Enzyme linked immunoabsorbent assay)

A lo largo de todas las semanas del experimento se recogieron muestras de sangre con el propósito de estudiar la evolución de la inmunoglobulina G en los distintos lotes. Para la determinación de la IgG específicas, utilizando dos test ELISA, frente a sendos antígenos somáticos de vermes adultos. Dichos antígenos fueron un antígeno crudo, y otro procesado previamente con una reducción con periodato sódico tratando de disminuir el número de epítomos de naturaleza glucídica que pudieran ser reconocibles.

En realidad, los métodos de obtención de los antígenos varían de un laboratorio a otro, y pueden condicionar la presencia o ausencia de determinadas moléculas antigénicas. Por este motivo, los resultados que se recogen al emplear mezclas antigénicas crudas son en ocasiones difíciles de

evaluar, por la propia naturaleza inespecífica de algunos antígenos (De Graaf y cols., 1994). En ocasiones, los animales no expuestos al parásito son capaces de reconocer algunos antígenos presentes en la mezcla antigénica, provocando probablemente esta reacción de inmunidad cruzada a antígenos intestinales (Mansour y cols., 1990). De hecho, se ha demostrado el reconocimiento por parte del suero de ovinos no inmunizados ni expuestos al parásito proteínas de 23-16 kDa y de 12 kDa de extractos antigénicos de L4 de *T. circumcincta* (Wedrychowicz y cols., 1994). Es posible que esta inmunidad cruzada sea la razón por la cual en nuestro estudio se produce un progresivo incremento en los niveles séricos de inmunoglobulinas en los animales testigo, si bien, su aumento es muy inferior al experimentado por los animales infectados, quienes lógicamente, reconocen un mayor número de determinantes antigénicos que los no inoculados. Para tratar de disminuir al máximo estas reacciones de inmunidad cruzada, se realizó el tratamiento previo del antígeno con periodato sódico, consiguiendo así disminuir un tanto la respuesta inespecífica, aunque sin conseguir eliminarla completamente.

5.4.1 Respuesta serológica (IgG) durante la primera fase del experimento.

Los resultados de los valores séricos de la IgG específica al emplear antígeno crudo o tratado previamente con periodato sódico fueron similares. Los niveles de anticuerpos encontrados tras el tratamiento previo con periodato fueron obviamente menores, al eliminar algunos epítomos glucídicos del antígeno. Los niveles de IgG, al antigenar las placas con el antígeno crudo, fueron siempre mayores durante esta fase del experimento en el lote A (inoculado) que los detectados en el lote B. Sin embargo, estas diferencias alcanzaron significación estadística a partir de la 4^a semana post-inoculación.

Probablemente, al disminuir las reacciones inespecíficas, la respuesta sérica que encontramos al emplear antígeno tratado con periodato, define con más precisión las diferencias entre los lotes, al observarse significación estadística desde la semana 4^a-14^a, mostrándose que los valores medios obtenidos en el lote inoculado (lote A) son claramente superiores a los detectados en el lote testigo (lote B). Posteriormente, la respuesta humoral se ve reducida de forma notable, siendo incluso mayor en el grupo testigo, aunque sin significación estadística.

Los niveles séricos de los anticuerpos se emplean comúnmente para evaluar el contacto con diversos nematodos gastrointestinales, pero su papel protector no está, sin embargo, nada claro (Kloosterman y cols., 1985; Frankena, 1987; Ploeger y cols., 1990^a; Sutherland y cols., 1999; Balic y cols., 2000). Numerosos son los trabajos que relacionan un fuerte incremento en los niveles séricos de IgG reactivos a gran variedad de antígenos parasitarios a las tres o cuatro semanas de realizar inoculaciones experimentales de *O. ostertagi* en bovinos (Canals y Gasbarre, 1990; Mansour y cols., 1990). Algo similar sucede al exponer ruminantes no inmunizados a pastos infectados (Gronvold y cols., 1992; Gasbarre y cols., 1993 a; Nansen y cols., 1993; Klesius y cols., 1986; Canals y Gasbarre, 1990; Mansour y cols., 1990). Generalmente la respuesta serológica frente a los nematodos gastrointestinales es de gran magnitud, tanto en primoinfecciones como en exposiciones repetidas al parásito y no sólo afecta al isotipo G. En este caso concreto de primoinfecciones pueden desarrollar un pico en torno a los 35 días post-inoculación (Canals y Gasbarre, 1990) que en nuestro caso se inició a los 28 días p.i..

En nuestra experiencia realizada en cabras, también se detecta con prontitud (4^a semana), un incremento significativo en los niveles séricos de IgG específicas por parte de los animales expuestos, por lo que aún con cargas parasitarias pequeñas, esta respuesta inmunitaria tiene lugar, además en el plazo que generalmente presenta en ovinos y bovinos. Y también, al igual que sucede en estas especies, esta respuesta humoral no supone una protección frente a los vermes, pero podría utilizarse como indicador de la exposición al nematodo, especialmente utilizando antígeno tratado (Kloosterman y cols., 1985; Frankena, 1987; Ploeger y cols., 1990a; Sutherland y cols., 1999; Balic y cols., 2000).

En cualquier caso, a la hora de seleccionar el antígeno parasitario, se debe ser cauto, puesto que están ampliamente referidas en la bibliografía las reacciones cruzadas entre extractos de adultos de tricostrongílidos en ovinos (Cuquerella y cols., 1994; Anderson y cols., 1989; Shamansky y cols., 1989) y también en cepas caprinas (Molina y cols., 1999). Por ello, investigaciones futuras deben orientarse en la detección de alguna fracción antigénica del extracto somático de vermes adultos de *T. circumcincta* que resulte más específico que la mezcla antigénica, de forma similar a como sucede con algunas fracciones de extracto de adultos de *H. contortus*, como la fracción de 26kDa, que sólo es reconocido por sueros procedentes de ovinos parasitados con adultos de *H. contortus* (Gómez-Muñoz, 1996; 2000).

5.4.2 Respuesta serológica de la IgG durante la segunda fase de la experiencia

La respuesta serológica de IgG del lote A2 (reinoculados) fue más precoz que la desarrollada por el lote B1. De hecho, la respuesta desarrollada por los animales inmunizados previamente tuvo lugar la misma semana en la que se realizó la reinoculación, lo que evidencia una rápida respuesta anamnésica o de recuerdo. Además, estas diferencias significativas se mantuvieron desde esta semana 23^a (primera de la reinoculación) y hasta la 31^a (novena semana tras la reinoculación) y se manifestaron independientemente que se emplearan el antígeno tratado con periodato o crudo, con la única excepción de la primera semana (23^a), que no detecta diferencias significativas si se emplean el antígeno tratado con periodato sódico.

Por su parte, el lote B1 (primoinfectado durante la segunda fase), fue incrementando los niveles séricos IgG semanalmente hasta ser significativamente mayores que los correspondientes al lote testigo la semana 27^a (4^a semana p.i.), independientemente que se emplee el antígeno tratado o no con periodato sódico. Por lo tanto, la respuesta sérica de la IgG en el lote B1 es idéntica a la desarrollada por el lote A en la primera etapa de la experiencia, con lo que los diferentes protocolos de inoculación, no han supuesto cambios en la respuesta humoral, al menos en lo que se refiere a los niveles de IgG específicos frente a antígenos somático de adultos de *T. circumcincta*.

Muchos autores destacan la importancia de la exposición previa en el incremento de la respuesta serológica (Ploeger y cols., 1990a). En general, la respuesta sérica de IgG se acelera en bovinos que han estado previamente expuestas al parásito (Canals y Gasbarre, 1990; Balic y cols., 2000). Esto sucede también con otros trichostrongilidos tras infestaciones previas, como por ejemplo con *H. contortus* tanto con antígenos somáticos de adultos, como con extractos larvarios y antígeno excretor-secretor de adultos (Scahling y cols., 1994a; 1994b; 1995; Gómez-Muñoz y cols., 1999). En inoculaciones con L3 de *T. circumcincta*, también se observa una respuesta serológica más precoz en corderos expuestos previamente al parásito que otros no inoculados previamente, al emplear antígeno somático larvario (Sutherland y cols., 1999; Steward, 1955; Emery y cols., 1993).

En definitiva, en nuestro estudio se detecta una respuesta serológica más precoz en los animales previamente expuestos al parásito, sin que esta respuesta tampoco suponga una mayor protección a la cabra frente a la infección parasitaria, lo que coincide plenamente con los hallazgos encontrados por otros autores en otras especies de rumiantes. En este caso, por tanto, incluso las pequeñas cargas parasitarias a las que se vieron expuestas los animales en la primera etapa del experimento, fueron capaces de provocar una respuesta que podría catalogarse como de memoria.

5.5 RECUEENTOS FECALES DE HUEVOS

5.5.1 Recuentos fecales durante la primera fase de la experiencia

Durante la primera fase de la experiencia, únicamente se evaluaron los recuentos fecales de huevos en el lote A (inoculado). El periodo de prepatencia fue de tres semanas para el 60 % de los animales, de 4 semanas para el 20%, mientras que en el resto de los animales se detectó la presencia de éstos en semanas sucesivas, hasta la semana 7ª, en la que todos los animales inoculados liberaron huevos. Desde la tercera semana hasta la novena, la tendencia observada muestra un progresivo incremento en los recuentos fecales, a partir de entonces, una vez alcanzado el pico de huevos la novena semana, el valor promedio decrece paulatinamente, si bien se detectan algunos repuntes en las semanas 12ª y 16ª hasta el sacrificio de la mitad de los animales del lote A la semana 17ª, y el tratamiento del resto con levamisol.

Otros autores, al desarrollar ensayos similares en ovinos, observan un pico en el número de huevos eliminados entorno a las 7 semanas postinoculación, siendo la evolución similar (Stear y cols., 1995c). En cualquier caso, otros trabajos encuentran periodos de prepatencia variables entre animales, y también detectan picos en la eliminación de huevos que oscilan entre las 5 y las 10 semanas post-inoculación (Stear y cols., 1995d; Sutherland, 1999).

En cualquier caso, la variabilidad de respuesta de los animales puede llegar a ser importante y se explica como consecuencia de las capacidades individuales a la hora de generar una respuesta inmune frente al parásito. Como indicábamos en nuestro estudio, al analizar la evolución de los recuentos fecales se aprecian ligeros repuntes, que también han sido observados en animales infectados con este nematodo. Este fenómeno, algunos autores lo atribuyen a L4 que han retrasado su desarrollo a adultos

(Sutherland y cols., 1999). En nuestro caso es difícil establecer si el repunte observado en los recuentos de huevos se debe a la presencia de larvas que hayan retrasado su desarrollo, debido a que de los 10 animales que se estudian en esta primera etapa, únicamente se sacrifican la mitad, conociéndose por tanto la presencia de formas inmaduras presentes en la mucosa gástrica en hipobiosis en la mitad de los animales del lote al finalizar esta primera fase de la experiencia. Lo que si es cierto es que, los dos animales que presentaron larvas inmaduras en los recuentos de larvas en las digestiones abomasales durante este periodo, tienen un incremento en los recuentos fecales de huevos en las semanas en las que se detectaron los incrementos en los recuentos fecales, con lo que parece factible que esta pueda ser la causa de dichos repuntes.

Precisamente, esta variabilidad individual en los recuentos fecales está orientando a líneas de investigación que buscan el control de las nematodosis gastrointestinales mediante la selección de animales con bajos recuentos fecales de heces, y la contra-selección de animales con altos recuentos, tanto en ganado ovino (Stear y cols., 1995d) como en bovino (Gasbarre y cols., 2001).

Dado que en otras especies rumiantes infectados por este nematodo, los recuentos fecales se han utilizado como indicadores de la carga parasitaria (Bryan y Kerr, 1989) se procedió a analizar la correlación de los recuentos fecales y de vermes adultos al final de esta fase, obteniéndose un coeficiente de correlación $R^2 = 0.56$ con una probabilidad del 0.87, que por lo general son algo inferiores a los encontrados por otros autores (Kassai, 1999), lo que tal vez se puede deber al periodo transcurrido desde que se observa los recuentos más elevados (4 semanas post-inoculación) hasta que tiene lugar el sacrificio y recuento de vermes adultos (17ª semana post-inoculación).

5.5.2 Recuentos fecales durante la segunda fase del experimento

Durante esta segunda fase, el periodo de prepatencia de los animales reinoculados fue de 3 semanas (A2), mientras que el grupo de cabras no inmunizadas previamente fue de 4 semanas (B1). En cualquier caso, y al igual que sucedió en la primera inoculación, en los dos lotes de cabritos inoculados de este segundo periodo existieron variaciones en los periodos de prepatencia de cada animal. A partir de entonces, se produce un paulatino incremento en los recuentos de huevos, y el sacrificio, la semana 31ª (8ª p.i.) del experimento coincide con el pico máximo de huevos en los dos lotes.

Aún a pesar de que el lote A2 tiene recuentos de huevos superiores a los detectados en el lote B1, no llegan a observarse diferencias significativas entre ambas ninguna de las semanas de esta segunda etapa de la experiencia.

Sutherland y cols., 1999, aun cuando detecta en ovinos sensibilizados previamente con *T. circumcincta* un menor número de huevos en los úteros de las hembras alojadas en el abomaso de cabras inmunizadas, esto no se traduce en menores recuentos de huevos, aunque sí parece afectar a la viabilidad de los mismos. Otros trabajos experimentales en los que se realizan inoculaciones con *T. circumcincta* se observan periodos de prepatencia en animales previamente infectados que oscilan entre los 20 y 59 días, siendo el periodo de prepatencia mayor, en aquellos animales que tuvieron menores recuentos de huevos. Además, en este estudio encontraron un valor medio en los recuentos fecales de huevos en heces menor en la reinoculación que el detectado en la infección primaria (**Stear y cols., 1995c**).

En nuestro estudio, efectivamente, y al igual que sucede en otras experiencias realizadas en ovinos con *T. circumcincta*, no encontramos diferencias significativas en los recuentos de huevos. Si partimos de la premisa de que los recuentos de huevos se pueden interpretar como indicadores de inmunidad (**Vercruyse y Claerebout, 1997**), es evidente que la exposición de los cabritos a pequeñas cargas parasitarias ha resultado insuficiente para proporcionar a los animales una inmunidad protectora. Incluso, los animales expuestos previamente, tienen un periodo de prepatencia más corto, y aún cuando no existen diferencias significativas con los integrantes del lote B1, lo cierto es que liberan una mayor cantidad de huevos en sus heces. El periodo de prepatencia de los animales del lote A2 fue de 21-42 días, mientras que este rango en el lote primoinoculado (B1) fue de 28-49 días, en ambos casos, valores similares a los referidos por otros autores en inoculaciones similares en ovinos.

En general, los animales con periodos de prepatencia más amplios, fueron también los que tuvieron un menor número de huevos a lo largo del experimento, con la excepción de un animal, que siendo justamente el que presentó los menores recuentos de huevos, fue también el que tuvo el periodo de prepatencia más corto. A diferencia del estudio citado de **Stear y cols., 1995c**, los recuentos de huevos en heces fueron mayores en la segunda etapa del experimento que en la primera. Sin embargo, es difícil establecer conclusiones sobre este dato, porque los protocolos experimentales son diferentes, y esto puede modificar la carga final de nematodos, y por tanto el

número de huevos observados en las heces (Vercruyse y Calerebout, 1997).

En esta segunda fase del experimento, los recuentos fecales de huevos mostraron una mayor correlación con los recuentos de vermes tras realizar los lavados abomasales, siendo $R^2 = 0.78$ ($p < 0.001$), utilizando los valores de huevos correspondientes a la semana 9ª (31ª del estudio).

En inoculaciones con *T. circumcincta* en ovinos se encuentran coeficientes de correlación similares a los encontrados en esta segunda fase de nuestro estudio, oscilando los valores entre $r = 0.63$ ($p < 0.01$) (Stear y cols., 1995c) y $r = 0.88$ (Stear y cols., 1995d). De hecho, los recuentos fecales se mostraron como el mejor indicador de la carga parasitaria en esta infección experimental.

5.5.3 Repetibilidad de los recuentos fecales y modelo lineal mixto

Como ya quedó reflejado en el correspondiente apartado de material y métodos (4.3.3), Falconer, 1989, define la repetibilidad (R) como el cociente entre los componentes de la varianza debida a comportamientos diferentes entre animales (S_E) y la suma de componentes entre animales (S_E) y dentro de cada animal (S_D).

$$R = S_E / S_E + S_D$$

Este cociente, que obviamente no puede superar el valor de la unidad, nos indica cual de los valores de la varianza predominan en cada caso. Cuanto mayor sea el valor de la fracción, cuanto más próximo al valor de "1", el elemento de la fracción que corresponde a S_D será menor, por lo que en la varianza, predominaran los factores que operan entre animales. Por contra, cuanto menor sea la repetibilidad, más importante será en la varianza el papel de los factores internos de cada animal.

La repetibilidad promedio para el primer periodo experimental fue de 0.224 ± 0.017 . Para el segundo periodo es de 0.22 ± 0.053 . Ambos datos con un $p < 0.05$. El valor estimado de la repetibilidad entre los dos periodos infectantes hasta el máximo de la eliminación de huevos es de 0.27 con un $p < 0.01$ (significativo al 90%). Estos datos nos indican que el componente de la varianza más importante es la varianza dentro de cada animal, esto es, predominan los factores internos de cada animal sobre otros factores ambientales. A medida que se reducen los periodos de estudio, aumenta la

repetibilidad. Así, si se calcula la repetibilidad para los recuentos de huevos obtenidos en una misma semana, la repetibilidad del primer periodo es de 0.654 ± 0.055 y para el segundo periodo es de 0.531 ± 0.091 , aumentando entonces la importancia de la componente entre grupos. La repetibilidad entre medias globales para los dos periodos de infección es de 0.712.

Esta situación se ve modificada un tanto, si se eliminan los resultados de recuentos de huevos que son algo atípicos al resto de los integrantes de sus grupos. Concretamente, dos animales del lote A2 y uno del lote A durante el primer periodo de la experiencia. En este caso, la repetibilidad es de 0.49 con una significación de 0.04.

Al estudiar el tratamiento del modelo linear mixto no se encuentran diferencias significativas ni entre animales ni entre periodos de inoculación.

Stear y cols., 1995c, en un estudio similar, en el que tras inocular previamente un grupo de ovejas con *T. circumcincta*, estas son desparasitadas y erinoculadas como en nuestro caso, analizan la repetibilidad de los recuentos fecales. Dichos autores observan como en nuestro estudio que a medida que se reduce los intervalos de muestreo, aumenta también la repetibilidad de las muestras, lo que garantiza la fiabilidad de los métodos de determinación empleados en el procesado de las mismas. También son similares los datos referidos a la repetibilidad entre protocolos experimentales, puesto que estos autores encuentran una repetibilidad de 0.3, y en nuestro estudio se obtiene una repetibilidad entre infecciones de 0.27.

5.6 PARÁMETROS HEMÁTICOS, PROTEÍNAS SÉRICAS TOTALES Y FIBRINÓGENO

A la hora de interpretar los resultados hematológicos obtenidos, es fundamental comparar éstos con los valores de referencia descritos para la especie caprina, si bien, no se deben despreciar las variaciones existentes en las diferentes razas. En este sentido, juega un papel determinante los valores que presentan los controles, animales de la misma edad, procedencia y criados en las mismas condiciones que los animales inoculados, con la única diferencia de no haber estado expuestos al parásito.

A diferencia de lo que sucede con otros tricostrongilidos, como es el caso de *H. contortus*, pocos trabajos recogen valores hematológicos referidos a infestaciones con *T. circumcincta*, y menos aún en ganado

caprino la ostertagiosis. Lo que dificulta la realización de un análisis comparativo de los valores obtenidos en este estudio.

5.6.1 Hematocrito

Los valores detectados en los hematocrito en la primera etapa del experimento fueron del 26.6% para el lote A (inoculado) y del 27.8% para el lote B. No se encontraron diferencias significativas entre los lotes.

Durante la segunda fase de la experiencia, tampoco se detectaron diferencias significativas entre los lotes. El lote A2 presentó un promedio de 27.8%, el del lote B1 fue de 28.6% y el del lote B2 de 28.4%.

Los valores de hematocrito que describe la bibliografía como fisiológicos en la especie caprina oscila entre los 24.3% en cabras de 6-12 meses (Nangia y cols., 1968) y de 27.0 ± 4.6 (Oduye, 1976).

Se puede apreciar por tanto que los animales en nuestro estudio no sufrieron alteraciones en sus niveles de hematocrito a lo largo de todo el estudio.

5.6.2 Hemoglobina

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los lotes A y B durante la primera etapa de la experiencia en lo que se refiere a los valores de hemoglobina. En promedio, el valor de la hemoglobina en el lote A fue de 8.3 g / dl y en el lote B de 8.9 g / dl.

Durante la segunda fase del experimento no se detectaron diferencias significativas entre los lotes. El promedio del lote A2 fue de 8 g / dl, el del lote B1 fue de también de 8 g / dl y el del lote B2 de 9.23 g / dl.

Nangia y cols., 1968, considera 7 g / dl el valor fisiológico de la hemoglobina en la cabra, mientras que para Oduye, 1976, dicho parámetro tendría un valor de 9.1 ± 1.4 g / dl.

Se constata que los resultados obtenidos en los animales en nuestra experiencia se encuentran dentro de los rangos considerados como fisiológicos para la especie caprina.

5.6.3 Leucocitos totales

No se detectaron diferencias significativas entre el lote A y el B a lo largo de la primera fase del estudio. El promedio del lote A fue de 14221 leucocitos / μl , mientras que el lote B obtuvo un valor medio de 15724 leucocitos / μl .

Durante la segunda etapa sí se detectaron diferencias significativas entre los lotes A2 y el B1 las semanas 24^a, 27^a y 29^a, siendo mayores los recuentos leucocitarios del lote B1. No existieron diferencias significativas de ninguno de estos lotes respecto al lote B2. El valor medio del lote A2 fue de 10825 leucocitos / μl de sangre, mientras que los lotes B1 y B2 obtuvieron en promedio 16462 y 14828 leucocitos / μl de sangre respectivamente.

Holman y Dew, 1965, considera como recuento leucocitario fisiológico un valor de $18.18 \pm 3.84 \times 10^3 \mu\text{l}$. Los valores encontrados en la primera etapa del experimento están dentro de los rangos considerados normales. En las tres semanas en las que se detectan diferencias significativas entre los lotes A2 y B1, el lote B1, presentó valores mayores que los del lote A2. Durante estas tres semanas, el lote A2 tuvo valores de 10660 ± 1161 , 11320 ± 3070 y 9880 ± 2842 leucocitos / μl de sangre, mientras que los valores del lote B1 fueron de 17100 ± 4887 , 18333 ± 5311 y 18867 ± 3677 leucocitos / μl de sangre. Por lo tanto, el lote B1 presenta valores de leucocitos dentro de los rangos considerados normales, y el lote A2, parece mostrar un cierto grado de leucopenia, aunque, es importante hacer notar que no evidenció diferencias significativas con el lote control, de animales no inoculados.

5.6.4 Recuento diferencial de los leucocitos

5.6.4.1 Neutrófilos segmentados

Durante la primera etapa del experimento se detectaron diferencias significativas únicamente las semanas 9^a y 11^a. En ambos casos, los valores fueron mayores en el lote no inoculado que en el inoculado. En concreto, en el lote A, fueron de 4887 y de 4775 neutrófilos / μl las semanas 9^a y 11^a respectivamente, mientras el lote B fueron de 7440 y 7647 neutrófilos / μl de sangre.

En la segunda etapa de la experiencia se detectaron diferencias significativas las semanas 27^a y 29^a entre los lotes A2 y B1. Al igual que sucedió en las semanas 27, 29^a en el caso de los leucocitos totales, los valores de neutrófilos segmentados sanguíneos del lote B1 fueron mayores que los detectados en el lote A2. Concretamente, para el lote A2, se detectaron 4873 ± 1567 y 4582 ± 1123 neutrófilos / μl de sangre en las semanas 27^a y 29^a respectivamente. Mientras que en el lote B, 10789 ± 5298 y 8587 ± 2057 neutrófilos / μl de sangre respectivamente. El lote A2 presentó diferencias significativas con el lote B2 únicamente la semana 26^a, donde el lote A2 tuvo en promedio 5571 y el lote B2 7980 neutrófilos segmentados / μl de sangre. Finalmente, entre los lotes B2 y B1, sólo se encontraron diferencias significativas la semana 25^a, donde presentaron respectivamente 9662 ± 1840 y 6001 ± 1231 neutrófilos / μl de sangre.

Los valores considerados como fisiológicos en la especie caprina, van desde 1200 a 7200 neutrófilos / μl de sangre (Jain, 1993b). Según estos valores de referencia, las diferencias existentes entre los lotes en la primera etapa del experimento no parecen relevantes, al estar ambos lotes dentro de los rangos considerados como fisiológicos. Algo similar sucede con las diferencias detectadas entre el lote A2 y el B1 en esta segunda fase del experimento. En este caso, el lote B2, parece mostrar un cierto grado de neutrofilia, respecto a los valores considerados como fisiológicos en la bibliografía, pero sin embargo, no muestra diferencia significativa con los animales testigos. Del mismo modo, las diferencias existentes entre los lotes A2 y B1 respecto al lote B2, tampoco parecen relevantes, al estar los animales dentro de los valores del rango fisiológico.

5.6.4.2 Neutrófilos bastonados

La interpretación de los resultados obtenidos con respecto a los neutrófilos bastonados o en cayado ésta se ve dificultada, al no existir valores fisiológicos de referencia ya que se trata de un tipo celular raro que se suele relacionar con aquellos procesos que estimulan la producción de neutrófilos en la médula ósea, en definitiva, se relaciona con la inflamación aguda.

5.6.4.3 Linfocitos

En la primera etapa del experimento sólo se detectaron diferencias significativas la semana 17^a del experimento, teniendo el lote A 6809 linfocitos / μl de sangre y el lote B 11690 linfocitos / μl de sangre. En

promedio durante esta primera fase, el lote A tuvo 6504 linfocitos / μl de sangre y el lote B 7536 linfocitos / μl de sangre.

De forma similar, sólo se detectaron diferencias significativas entre los lotes A y B la 29ª semana del experimento, siendo el recuento de linfocitos / μl de sangre de 4671 ± 1920 y de 8845 ± 2104 para los lotes A2 y B1 respectivamente. Entre el lote A2 (reinoculado) y el B2 (testigo), las semanas 25ª y 28ª, con valores de linfocitos / μl de 3198 ± 1588 y 4063 ± 1425 para dichas semanas en el lote A2 y de 8418 ± 3636 y 10332 ± 5187 para el lote B2. No existieron diferencias entre el lote B1 y B2.

Se establecen como valores fisiológicos en caprino recuentos de linfocitos / μl de sangre que oscilen entre 2000-9000 (**Jain, 1993b**). Una vez más, si se consideran estos valores como referencia, no existen variaciones importantes en los niveles sanguíneos a lo largo de todo el estudio.

5.6.4.4 Monocitos

No se encontraron diferencias significativas entre los lotes A y B durante la primera fase de la experiencia.

En la segunda etapa, aunque se encontraron diferencias significativas entre los lotes A2 y B1, los valores estuvieron dentro de los rangos considerados fisiológicos por **Jain, 1993b**. Además, no existieron en ningún momento diferencias significativas de ninguno de los lotes inoculados respecto al lote testigo (B2).

5.6.4.5 Eosinófilos

Muchos autores, atribuyen a los eosinófilos un papel relevante en la generación de resistencia frente a las nematodosis gastrointestinales (**Balic y cols., 2000**). De hecho, tanto **Dawkins y cols., 1989**, como **Budle y cols., 1992**, coinciden en señalar a los eosinófilos más que indicadores de helmintiasis, como indicadores de resistencia a las nematodosis gastrointestinales, aunque no siempre se detecta esta correlación (**Woolaston y cols., 1996**).

Diversos autores han demostrado la atracción que muestran los eosinófilos por las fases larvianas de los nematodos gastrointestinales que colonizan los tejidos (**Steward, 1953; Charleston, 1965; Salma y Duncan, 1985; Balic y cols., 1999c**). Una vez allí, estudios de microscopia

electrónica han permitido descubrir el íntimo contacto que se establece entre la larva y los eosinófilos del hospedador e incluso como tiene lugar la degranulación de éstos (**Balic y cols., 1999c; Rainbird y cols., 1998**). Además, la eficacia de dicha degranulación se evidencia en estos estudios al constatar lesiones en las larvas rodeadas de eosinófilos. Esta degranulación busca, de una parte, propiciar su acción citotóxica, fundamentalmente con la liberación de proteínas granulares y de aniones superóxido, quienes directamente actuarán sobre el parásito, y por otro lado, se liberan también leucotrienos, que provocaran vasodilatación, contracción del músculo liso y secreción de mucus (**Balic y cols., 2000**).

Otro aspecto que reafirma esta supuesta actividad de los eosinófilos frente a los nematodos gastrointestinales es la propia capacidad que algunos nematodos han desarrollado para tratar de eludir la acción de estos granulocitos. Así, por ejemplo, el desarrollo larvario en el intestino de *Oesophagostomum* spp. tiene lugar dentro de quistes que protegen al parásito de las sustancias liberadas por los eosinófilos (**Shelton y Griffiths, 1967**). *Haemonchus contortus*, *Ostertagia* spp. y *Teladorsagia circumcincta*, maduran en el hospedador en el fondo de las glándulas gástricas, y así logran eludir la acción protectora que tratan de desarrollar los eosinófilos (**Klesius y cols., 1989; Balic y cols., 2000**).

5.6.4.5.1 Eosinófilos durante la primera fase de la experiencia

Durante las primeras 12 semanas, el lote A (inoculado), promedió un mayor número de eosinófilos en sangre periférica que el lote B (testigo). Sin embargo, esta clara tendencia, únicamente alcanza significación estadística la 9ª semana p.i. ($p = 0.05$). La tendencia que siguen los eosinófilos en los animales inoculados es sufrir un moderado incremento desde el inicio de la infección hasta la segunda semana, donde alcanza su máximo valor de 785 eosinófilos / μ l de sangre, disminuyendo progresivamente a lo largo del resto de esta etapa de la experiencia.

Aunque puede existir una elevada concentración de eosinófilos en los tejidos sin que exista eosinofilia en sangre periférica, lo habitual es que tras una infección por helmintos los eosinófilos en sangre periférica sufran un importante incremento (**Balic y cols., 1999c**). Incluso en infecciones primarias se produce un incremento en el número de eosinófilos presentes en el abomaso de corderos infectados con *H. contortus* (**Charleston, 1965; Salman y Duncan, 1984; 1985; Balic y cols., 1999a**). Su número es muy elevado a los 5 días post-infección, y aunque su número va decreciendo,

sigue siendo mayor que el que presentan ovinos no inoculados tras 27-36 días de iniciado el experimento (Balic y cols., 1999a). En infecciones primarias ovinas con *T. circumcincta* sucede lo mismo a nivel del abomaso. En estas infecciones primarias, se detecta la eosinofilia con un pico moderado hacia el 7-9 día post-inoculación, disminuyendo hacia el 14º día, y sufriendo a continuación un incremento hasta el día 21 (Stevenson y cols., 1994). En definitiva, generalmente se producen moderadas eosinoflias en las infecciones primarias (Balic y cols., 2000; Dawkins y cols., 1989; Buddle y cols., 1992; Dobson y cols., 1992; Stevenson y cols., 1994). Sin embargo, y aún aceptando que esta es la situación más frecuente, diversos autores en ocasiones no han encontrado esta eosinofilia, lo que puede plantear dudas sobre su utilidad como método para evaluar la respuesta inmunitaria del hospedador (Sutherland y cols., 1999; Yong y cols., 1985).

En nuestro estudio, se constata que pequeñas cargas parasitarias, y la inoculación seriada de apenas 2000 L3 semanales de *T. circumcincta* no logran provocar en los animales eosinofilia, lo que difiere de la mayoría de los trabajos citados, tal vez porque el número de larvas infectantes utilizadas fue mucho menor en nuestro caso.

Al tratar de correlacionar las cargas de nematodos con los recuentos de eosinófilos en sangre periférica obtenida por cada animal inoculado, se determinaron los coeficientes de regresión lineares entre los recuentos de eosinófilos semanales y el número final de vermes en abomaso. Si tomamos el promedio de eosinófilos de las 2ª y 3ª semana (donde alcanzan el pico los distintos animales inoculados del lote A), y los comparamos con los vermes, obtenemos una $R^2 = 0.2$ con una confianza del 89% ($p < 0.11$), siendo esta la mayor correlación detectada.

En un estudio desarrollado en ovinos inoculados con *T. circumcincta*, encuentran una interesante correlación negativa entre los recuentos sanguíneos de eosinófilos en la semana de su pico y los adultos recogidos en el abomaso. Esta correlación osciló entre -0.3 y -0.5 (Stear y cols., 1995c).

Es evidente que la correlación existente entre los eosinófilos y los recuentos de adultos en abomaso es muy baja, coincidiendo con otros autores al considerar a los eosinófilos más como una medida de resistencia a la infección que como un indicador de carga parasitaria (Dawkins y cols., 1989; Budle y cols., 1992).

5.6.4.5.2 Eosinófilos en la segunda fase de la experiencia

Durante la segunda fase del experimento, los dos lotes inoculados si experimentaron un incremento significativo en el número de eosinófilos en sangre periférica respecto al lote B2 (testigo). La diferencia entre los dos lotes de animales inoculados radicó en que dicha eosinofilia tuvo lugar una semana antes en el lote A2 que en el lote B1, esto es, la exposición previa si parece proporcionar una respuesta de memoria que se traduce en una respuesta eosinofílica más precoz, dado que la intensidad de la respuesta es similar en ambos lotes, y más duradera en el tiempo. El lote A2, tiene diferencias significativas respecto al lote control desde la primera semana post-inoculación, y conserva esta diferencia hasta la semana 27^a (4 semanas después de la exposición). Por su parte, el lote B1 muestra la eosinofilia la semana 25^a (2^a p. i.), y este lote, aunque sigue teniendo un mayor recuento de eosinófilos en sangre periférica que el lote B2 la semana 26^a, sólo alcanza dicha diferencia validez estadística si se descarta un animal con un recuento anormalmente bajo que aparece en el lote B1.

En general, se considera que exposiciones repetidas a L3 de diferentes tricostrongídeos confieren una mayor resistencia a la enfermedad (Chiejina y Sewell, 1974; Smith y cols., 1983b; Barger y cols., 1985; Dobson y cols., 1990; Holtenius y cols., 1983; Cameron, 1984; Pomroy y Charleston, 1989^a; Shelton y Griffiths, 1967).

Es posible que la respuesta eosinofílica más precoz y duradera en reinfecciones, se deba a una respuesta inmunológica específica. En esta respuesta parece jugar un papel fundamental la IL-5 que es una citocina T dependiente que estimula el incremento de eosinófilos tanto a nivel tisular como en sangre periférica (Meeusen y Balic, 1999). Linfocitos procedentes de sangre periférica y ganglios mesentéricos en ovinos parasitados con *H. contortus*, generan *in vitro*, sobrenadantes ricos en IL-5 e IL-3, por lo que de facto, estimulan la producción de eosinófilos (Haig y cols., 1989). De forma análoga, linfocitos procedentes de terneros infectados con *O. ostertagi* también son capaces de producir sobrenadantes con propiedades quimiotácticas para los eosinófilos (Washburn y Klesius, 1984).

Corderos expuestos a infecciones repetidas con *T. circumcincta* durante 7 semanas, desparasitados posteriormente y reinoculados 4 semanas después, evidencian a los diez días un marcado incremento en el número de eosinófilos alojados en el intestino delgado (Stevenson y cols., 1994). Otros estudios en los que se realizan reinoculaciones en ovinos con *T.*

circumcincta, también se caracterizan por un respuesta eosinofílica más precoz y de mayor magnitud (Stear y cols., 1995c). Aunque habitualmente se encuentra eosinofilia en las inoculaciones experimentales de *T. circumcincta* (Dawkins y cols., Buddle y cols., 1992; Dobson y cols., 1992; Stevenson y cols., 1994), en ocasiones esta no se detecta (Sutherland y cols., 1999; Yong y cols., 1985).

En nuestro estudio, aún a pesar de que se desarrolla una respuesta eosinofílica más duradera y precoz en los animales inmunizados previamente, ésta respuesta no es capaz de provocar una reducción en la carga de nematodos en el abomaso, por lo que, al menos estas cargas parasitarias bajas a las que se expusieron los cabritos, resultan insuficientes para inducir una respuesta efectora eficaz, ni tampoco han supuesto una menor capacidad de establecimiento de las larvas en los animales, antes bien, al contrario. Sin embargo, parece evidente que han sido capaces de desencadenar una respuesta de recuerdo, que presumiblemente originará una reacción de hipersensibilidad a nivel local, en la mucosa del abomaso. Es posible que dicha respuesta tenga un componente específico, esto es, que determinados antígenos estimulen linfocitos T que produzcan la IL-5, que como quedó reflejado en un párrafo anterior, es capaz de inducir la eosinofilia. Este posible mecanismo que pretende justificar esta respuesta anamnésica que desarrollan los animales a la exposición repetida de los eosinófilos, parece contraria a los resultados obtenidos con el test de transformación linfoblástica, al menos por la inmunosupresión que padecen los linfocitos, especialmente los linfocitos T, al cultivarlos en presencia de estimulantes inespecíficos. En cualquier caso, el comportamiento que presentan los linfocitos bovinos procedentes de sangre periférica (que son los que se han incluido en nuestro estudio) y los procedentes de ganglios linfáticos regionales son diametralmente opuestos en infecciones por *O. ostertagi*. Los linfocitos procedentes de sangre periférica ven inhibida su capacidad de respuesta a los mitógenos en cultivos celulares (Klesius y cols., 1984; Cross y cols., 1986; Snider y cols., 1986; Wiggin y Gibbs, 1990), al igual que sucede en nuestra experiencia. Sin embargo, aquellos que proceden de los linfonódulos abomasales sufren un estímulo en su linfoproliferación cuando son estimulados con los mismos mitógenos inespecíficos (Wiggin y Gibbs, 1990). Estudios posteriores se pueden orientar en demostrar que comportamiento presentan los linfocitos presentes en los ganglios linfáticos abomasales caprinos procedentes de animales que sufren infecciones por este nematodo, al realizar el test de transformación linfoblástica en presencia de mitógenos inespecíficos, valorando tanto su respuesta al mitógeno, como los distintos mediadores celulares que liberan,

especialmente estudiando factores como la IL-5, por su importante papel modulador para los eosinófilos.

La semana que mejor correlaciona los eosinófilos en sangre periférica con los recuentos de vermes en abomaso es la 26ª (3ª semana post-inoculación), con una $R^2 = 0.35$ con una probabilidad del 92%. Este valor difiere al encontrado por **Stear y cols., 1995c**, en inoculaciones de *T. circumcincta* en ovinos, quienes encuentran una $r = -0.3$ y -0.5 . Como indicador de cargas parasitarias, se muestra mucho más fiables el recuento de huevos en heces que los recuentos sanguíneos de eosinófilos. Este dato coincide con los referidos por otros autores (**Stear y cols., 1995c**). Además, **Sutherland y cols., 1999**, considerando que la eosinofilia no es un parámetro constante en las infecciones por *T. circumcincta*, consideran más útil su estudio como estimador de la respuesta inmunitaria del hospedador, que no como indicador de cargas parasitarias.

5.6.4.5.3 Repetibilidad y tratamiento estadístico de la varianza por medio del modelo linear mixto

La repetibilidad encontrada entre los dos periodos de infección es muy baja, de 0.18, lo que indica que predominan los factores internos de cada animal. La repetibilidad entre las medias de los dos periodos es de 0.604, muy similar a resultado obtenido en ovejas, en un ensayo similar realizado por **Stear y cols., 1995c**, para quienes la repetibilidad entre medias fue de 0.69.

De forma análoga a lo que sucedía en el caso de los recuentos fecales de huevos, a medida que se acortan los periodos de estudio de la repetibilidad, aumenta el valor de la misma. Como ya se comentó en el correspondiente apartado de los recuentos fecales de huevos, esto implica que los métodos de medición son fiables, y este resultado también es coincidente con lo encontrado por **Stear y cols., 1995c**.

Y también, al igual que sucedió en dicho trabajo de **Stear y cols., 1995c** al aplicar el modelo linear general a los eosinófilos de sangre periférica se encuentran diferencias significativas entre periodos de infección, entre intervalos semanales dentro de un mismo periodo y entre animales.



5.6.5 Proteínas plasmáticas totales

No se encontraron diferencias significativas entre los lotes A y B durante la primera etapa del experimento. El promedio del lote A presentó una concentración plasmática de proteínas de 6.2 g / dl, mientras que el lote B tuvo un valor medio de 5.9 g / dl.

Durante la segunda etapa de la experiencia, sólo se encontraron diferencias significativas entre los lotes A2 y B1 la semana 26^a, siendo mayor el valor de los animales reinoculados (6.7 g / dl) que la del lote de animales primoinoculados (5.9 g / dl). Únicamente se encontraron diferencias significativas respecto al lote control la semana 28^a, y concretamente entre el lote B2 (testigo) y el A2 (reinoculados). La concentración de proteínas plasmáticas encontradas esta semana fue de 7.12 ± 0.5 y 5.9 ± 0.4 para los lotes A2 y B2 respectivamente. No existieron diferencias significativas entre el lote B2 y el B1.

Los valores considerados fisiológicos para las proteínas plasmáticas en cabras se encuentran entre los 6.4-7 g / dl según **Kaneko, 1980** y 6.1-7.4 g / dl según **Boyd, 1984**. A pesar de existir diferencias significativas entre los lotes A2 y B1 en la semana 26^a, ambos grupos presentan concentraciones de proteínas séricas similares a las detectadas en el lote B2 (testigo), por lo que no parece que esta diferencia entre los lotes sea relevante. En cualquier caso, únicamente el lote B1 presenta un valor de proteínas plasmática algo inferior al referido como fisiológico en la literatura. La otra semana en la que se encuentran diferencias de interés estadístico es en la 28^a. En este caso, el lote reinoculado (A2), presenta valores superiores a los encontrados en el lote B2 (testigo), pero dentro de los valores considerados como de referencia.

Aunque la pérdida de albúmina sérica está descrita en la ostertagiosis clínica, desencadenando incluso edemas periféricos en la ostertagiosis tipo I (**Soulsby, 1988; Kassai, 1999**) siendo mucho más frecuente y relevante la pérdida de albúmina en la ostertagiosis tipo II (**Kassai, 1999**), conduciendo a una importante reducción de las proteínas séricas y apareciendo edemas subcutáneos evidentes (**Mulligan y cols., 1963**), en las formas subclínicas, como la que se encuentra habitualmente en Gran Canaria, no conlleva cambios significativos en los niveles séricos de proteínas plasmáticas (**Kassai, 1999**), como también ha sucedido en este estudio.

5.6.6 Fibrinógeno

Durante el primer periodo de estudio, no se observaron diferencias significativas entre los lotes A y B. La concentración de fibrinógeno detectada en el plasma fue de 385 y de 370 mg / dl para los lotes A y B respectivamente.

Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente relevantes entre los lotes en el segundo periodo de estudio, con excepción de la semana 28^a, en la que se encontraron diferencias entre el lote B2 (333 ± 115 mg / dl) y el lote A2 (760 ± 219 mg / dl).

Como valores de referencia se citan 100-400 mg / dl (Duncan y Prasse, 1986). Este dato permite considerar algo elevado el valor del fibrinógeno detectado en el lote A2, lo que parece indicar el desarrollo de una reacción inflamatoria aguda.

5.7 RECuento DE FORMAS INMADURAS TRAS LA DIGESTIÓN DE LOS ABOMASOS

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la digestión de la mucosa gástrica para detectar formas larvianas inmaduras. De los 5 animales correspondientes al lote A1 (sacrificado a las 17 semanas del experimento) sólo se encontraron larvas en 2 animales, uno de ellos con 0.16 larvas / gr mucosa, y el otro con 0.44 larvas / gr de mucosa.

Por su parte, en el lote A2, tras el sacrificio, también se encontraron larvas en 2 animales, con una concentración de 0.78 larvas / gr mucosa y de 2.8 larvas / gr de mucosa respectivamente.

Igualmente dos animales del lote B1 mostraron también larvas en la mucosa del abomaso, con una concentración de 0.2 y de 0.67 larvas / gr de mucosa.

El secuestro larvario es un fenómeno bien conocido, asociado a un incremento de resistencia del rumiante a *O. ostertagi* (Michel, 1963), *Haemonchus placei* (Roberts, 1957) en bóvinos y a *H. contortus* (Barger y cols., 1985), *T. circumcineta* (Seaton y cols., 1989b), *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1993) y *T. vitrinus* (Seaton y cols., 1989a) en ovinos. La hipobiosis también se asocia a cambios estacionales adversos al parásito, a la densidad de nematodos y a la cepa del parásito (Eysker, 1997;

Dunsmore, 1963; Michel, 1963). Michel, 1963, en un estudio realizado con *O. ostertagi*, en el que pretendía establecer un control de la inmunidad adquirida en las vacas, observó que el mantenimiento de las cargas de nematodos se debían en parte al reemplazo de los nematodos adultos rechazados por las larvas que se encontraban en hipobiosis en la mucosa del abomaso. Otros autores están de acuerdo con esta posibilidad (**Balic y cols., 2000**). Sin embargo, si los animales son fuertemente inmunes, esta capacidad de recuperación de la carga de vermes en abomaso se agota, y se termina por eliminar todos los parásitos del hospedador, al menos en infecciones por *H. contortus* en ovinos (**Barger y cols., 1985**) y en parasitaciones por *O. ostertagi* en bóvidos (**Michel, 1963**).

En infecciones experimentales de bovinos con *O. ostertagi*, se han detectado una mayor cantidad de larvas en hipobiosis en animales previamente inmunizados que en otros que se exponen por vez primera al parásito (**Hilderson y cols., 1993b**). Estos autores concluyen que la inmunidad puede ser responsable de este mayor secuestro larvario y que la duración de la infección es más importante que la intensidad de la infección, dado que las inmunizaciones previas las realizaron con exposiciones cuantitativamente diferentes de L3 (grupos inoculados con 4000 L3 y otros con 50000 L3 de *O. ostertagi*). **Herlich, 1982** en un estudio similar, también concluyó que la intensidad de la exposición no era un factor relevante en el desarrollo de inmunidad, al igual que **Michel, 1970**, aunque otros autores obtienen también resultados diferentes (**Ploeger y cols., 1990a**).

Los datos recogidos en los animales de nuestro estudio, no permiten detectar grandes diferencias entre los grupos. La mayoría de los animales, independientemente de los lotes en los que estaban encuadrados, no se encontraron vermes inmaduros tras la digestión del abomaso. Curiosamente, en los tres lotes que han estado parasitados (A1 -primera fase de la experiencia-, A2 y B1) mostraron larvas en el 40% de los animales. En cualquier caso, las cantidades de larvas que aparecieron en el lote A2 fueron algo mayores que las encontradas en el lote B1, todos ellos animales expuestos a un mismo protocolo experimental en la segunda etapa de la experiencia, diferenciándose únicamente en que los integrantes del lote A2 tuvieron una inmunización previa con una pequeña carga parasitaria durante la primera etapa del experimento. Este resultado es similar al observado por **Hilderson y cols., 1993b**, quienes también detectaron un mayor número de formas inmaduras en bovinos previamente inoculados con *O. ostertagi*. Es posible que este mayor recuento de formas inmaduras encontradas en el lote A2, implique un cierto grado de inmunización, aunque no logró traducirse

en un menor número de vermes adultos en el abomaso ni en una reducción en la liberación de huevos; muchos autores atribuyen a este creciente secuestro larvario un incremento de resistencia del hospedador (Michel, 1963; Roberts, 1957; Barger cols., 1985; Seaton y cols., 1989b; Barnes y Dobson, 1993; Seaton y cols., 1989a). En cualquier caso, en nuestro estudio, no existen diferencias significativas en los recuentos de larvas inmaduras encontradas en los abomasos, tal vez debido a que la intensidad de la inoculación inicial no fue capaz de desarrollar esta respuesta protectora de una forma consistente (Ploeger y cols., 1990 a).

5.8 HISTOLOGÍA DE LOS LINFONÓDULOS ABOMASALES

La totalidad de los ganglios estudiados en los animales inoculados presentaron un patrón histopatológico similar. Se detectó un aumento de los centros germinales foliculares caracterizados por un incremento en el número de células reticulares con abundante presencia de mitosis, con disminución de áreas B y un aumento de los linfocitos interfoliculares y cordonales. En el seno de los ganglios se detectó una marcada histiocitosis.

En los linfonódulos abomasales bovinos parasitados por *Ostertagia* muestran un importante aumento de tamaño, que se debe tanto a un incremento del número de linfocitos reactivos al parásito como a otros linfocitos que no reconocen antígenos parasitarios (Gasbarre, 1986). En general se encuentra un incremento en las subpoblaciones linfocitarias T (γ - δ) y B, en detrimento del porcentaje de linfocitos T α - β (Gasbarre, 1994; Canals y cols., 1997; Almeria y cols., 1997a). Los vermes adultos suelen provocar una estimulación de los linfonódulos drenados, particularmente en el compartimento de las células B (Almeria y cols., 1997a; Balic y cols., 1999a). Aunque en nuestro estudio se detecta en los linfonódulos abomasales un aumento en los centros germinales foliculares, lo cierto es que la actividad mitótica detectada en los centros germinales fue notoria, lo que se ajusta a esta estimulación de áreas B citada por otros autores.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1.- La inoculación intrarruminal de 2.000 L₃ de *Teladorsagia circumcincta* de origen ovino durante 5 semanas consecutivas determina en ganado caprino infecciones subclínicas con un periodo prepatente en torno a las 4 semanas y cargas parasitarias bajas similares a las que se observan en condiciones naturales en animales de la isla de G. Canaria.
- 2.- La exposición a cargas parasitarias bajas de *T. circumcincta* en ganado caprino no induce resistencia frente a la reinfección con 20.000 L₃ del nematodo, a tenor de los resultados obtenidos en la evolución de los recuentos de huevos, de formas inmaduras en mucosa gástrica y vermes adultos.
- 3.- Durante la infección experimental baja-moderada de *T. circumcincta* en ganado caprino tienen lugar respuestas proliferativas inespecíficas *in vitro* en linfocitos T (efectores y dependientes de linfocitos B), mientras que esta linfoproliferación no se desarrolla frente a antígenos somáticos de vermes adultos. Tanto la capacidad proliferativa específica como inespecífica se invierte de forma transitoria coincidiendo con la aparición de formas adultas en el abomaso (4-5 semanas post-inoculación).
- 4.- El aumento y reducción transitorias de las respuestas linfoproliferativas específicas e inespecíficas respectivamente que tienen lugar en ganado caprino sometido a infecciones experimentales con *T. circumcincta* se desarrollan de forma más precoz (adelantándose una semana) en animales que han estado previamente infectados con un número bajo del parásitos.
- 5.- La utilización de antígenos somáticos de vermes adultos de *T. circumcincta* tratados con periodato sódico en el desarrollo del test ELISA utilizado en este estudio para el seguimiento los niveles de IgG específicos, determina una reducción de reacciones cruzadas en cabras no infectadas, lo que permite un seguimiento más adecuado del curso de la infección mediante la evolución de la respuesta humoral.
- 6.- Tanto la inoculación seriada con 10.000 L₃ o una sola dosis de 20.000 L₃ de *T. circumcincta* determina una importante respuesta humoral específica del isotipo IgG. Esta reacción que se refleja histológicamente en ganglios linfáticos abomasales, se encuentra plenamente desarrollada a las cuatro semanas de la infección en animales que no han tenido un contacto

previo con el nematodo. La sensibilización de los animales con dosis bajas de *T. circumcincta* inducen una respuesta de memoria que adelanta tres semanas la presencia de anticuerpos específicos.

7.- Los parámetros biopatológicos estudiados no sufren cambios significativos en animales sometidos a infecciones bajas-moderadas de *T. circumcincta*, salvo el recuento de eosinófilos sanguíneos. La eosinofilia sólo se induce mediante la inoculación con 20.000 L3 del nematodo, siendo esta respuesta más precoz y duradera en animales infectados previamente, sin que los niveles de eosinofilia alcanzados supongan una protección frente a la reinfección.

8.- El estudio comparativo entre distintos parámetros como indicadores de la carga parasitaria en infecciones experimentales con *T. circumcincta* en ganado caprino, refleja que los recuentos de huevos son los que muestran una mayor correlación con el número de vermes adultos presentes en el abomaso de los animales infectados. Su repetibilidad aumenta conforme se acortan los periodos de estudio.

RESUMEN

7. RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado una valoración de la respuesta inmune humoral y celular que desarrollan las cabras de la agrupación caprina canaria, al exponerse a parasitaciones de bajas cargas parasitarias del nematodo gastrointestinal *Teladorsagia circumcincta* similares a las que se desarrollan de forma natural en la isla de Gran Canaria, y el posible papel protector que estas inoculaciones puedan tener en los animales al sufrir una reinfestación.

Para la ejecución del estudio, el trabajo se dividió en dos fases bien diferenciadas. Una primera se realizó una primoinoculación con el propósito de reproducir las infestaciones de bajas cargas parasitarias, y una segunda etapa, en la que tras una desparasitación previa, se inocularon los animales con el propósito de evaluar la respuesta a la exposición inicial.

Entre las técnicas empleadas en el seguimiento de la infección en ambas fases se desarrolló un test de transformación linfoblástica, con el que se valora el comportamiento de los linfocitos de sangre periférica frente a diversos mitógenos inespecíficos y antígenos parasitarios, un método de ELISA indirecto, para la detección de los niveles séricos específicos de IgG, así como ecuentos de huevos en heces, de vermes adultos y formas inmaduras en abomaso. Además, se realizaron hemogramas y estudios de proteínas séricas totales y del fibrinógeno.

La exposición previa a estas bajas parasitaciones por *Teladorsagia circumcincta* no parece proteger a los animales de la reinfestación a tenor de los resultados obtenidos en recuentos de huevos en heces, de larvas en mucosa gástrica y de vermes adultos.

Se ha observado que los linfocitos sanguíneos sufren reducciones transitorias en la estimulación a mitógenos inespecíficos *in vitro*, tanto en primoinfestaciones con bajo número de L3 como en reinoculaciones con 20000 L3 del nematodo, siendo esta más precoz en los animales previamente expuestos, pero iguales en magnitud e intensidad.

Se ha detectado una fuerte respuesta humoral (IgG) frente extractos somáticos de adultos de *T. circumcincta*, a partir de la cuarta semana post-inoculación, siendo más precoz en animales previamente sensibilizados. La reducción de epítomos de naturaleza glucídica mediante el tratamiento del

extracto somático con periodato sódico puede reflejar de forma adecuada la exposición de los animales al nematodo.

Los recuentos de eosinófilos en sangre periférica mostraron una evolución variable en función del protocolo de inoculación empleado en cada una de las fases del estudio, alcanzando valores propios de un estado de eosinofilia cuando fueron inoculados con 20.000 L3 de *T. circumcincta*.

Esta respuesta eosinofílica se desarrolló de forma más rápida en animales infectados previamente, siendo por tanto un buen indicador de la exposición a este nematodo, no tanto en cuanto a las cargas parasitarias que se encuentran más correlacionadas con los recuentos de huevos.

SUMMARY

8. SUMMARY

With this essay, we have intended to carry out an assessment about the humoral immune and cellular response which is developed in the goats belonging to the canarian group, when they are exposed to parasites with low parasitic burdens of the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*, similar to the ones developed in Gran Canaria in a natural way. Also, we have studied the possible protector role that these inoculations may have in these animals when suffering a new infestation.

In order to prepare the study, the work was divided into two well-differentiated phases. Firstly, we did an inoculation with the intention of reproducing the infestations with low parasite burdens, which the Canarian goats suffer from. And secondly, after the previous worming, the animals were inoculated in order to assess to what extent the initial exposition supposed any kind of protection against the parasite.

Among the different techniques used to evaluate the immune response, we must highlight the developing of the lymphoblastic transformation test, through which the behaving of the lymphocytes in peripheral blood is assessed, facing the diverse unspecific "mitogens" and parasite antigens. Another test used is the method ELISA, to detect the serological levels of IgG, faecal egg count and immature larvae in the abomasos. Furthermore, we have carried out complete hemograms and studies about total serological proteins as well as about the fibrinogen.

The previous exposure to these low parasite burdens by means of *Teladorsagia circumcincta* has not turned out to be protective for the animals, due to the fact that neither the establishment nor the development of the larvae in the mucous nor the rejection of adult vermes in abomaso has taken place.

The blood lymphocytes have suffered from transitory reductions in the stimulation to unspecific mitogens *in vitro* culturing, both in primoinfestations and in reinoculations, being the latter earlier in the animals previously exposed, but the same in magnitude and intensity.

We have detected indeed, a strong humoral response of the IgG when faced with adult somatic antigen of *T. Circumcincta*, from the fourth to the fourteenth week, which is possible to have diagnostic utility. This

Summary

response is very earlier in animals that have previously suffered from infestations with little parasite burdens.

Eosinophilia has been variable according to the protocol of inoculation used , and it only appears when the parasite burdens were higher. When the animals were reinoculated, the eosinophilic response was earlier and more durable than when animals were not previously inoculated.

All in all, we have verified that the previous exposure of the animals to little parasite burdens of this nematode does not provide protection, at least in infestations lasting seventeen weeks, and that the inoculations of parasites that the Gran Canarian goats usually suffer from cause an immunosuppression in the animals, fact that is believed to have an important pathogen role, difficulting the acquisition of immunity towards other morbid or vaccine agents.

AGRADECIMIENTOS

9. AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que en una u otra medida han contribuido a la realización de este trabajo, y a todas ellas, quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En especial a:

Al Dr. D. José Manuel Molina Caballero, Director de esta Tesis Doctoral, por su sincera amistad y constante dedicación en la ejecución de este trabajo.

Al Dr. D. Santiago Hernández Rodríguez, Co-director de esta tesis doctoral, por su magisterio y apoyo incondicional .

Al Dr. D. Oscar González Díaz, por su inestimable contribución al procesado de datos.

A la **Dra. Dña. Eligia Rodríguez Ponce**, el **Dr. D. Antonio Ruiz Reyes** y a la **Lcda. Dña. Magnolia Conde de Felipe**, por la amistad y espíritu de colaboración que siempre me han mostrado.

A los miembros de las **Unidades de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada**, de **Reproducción y Obstetricia** y de **Patología Animal** de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por su apoyo y ayuda en la realización de esta investigación.

A la **Lcda.. Dña. Anuska González Pérez**, por su contribución desinteresada en algunas traducciones.

A **mis padres**, por el apoyo que me han brindado durante todos estos años.

A la **Dr. Dña. Nereida Robaina González**, por su paciencia, y por el ánimo y cariño que en todo momento me ha dispensado.

A **mis amigos y compañeros**, por el interés y ayuda prestada.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA:

- ABE, T. and NAWA, Y. (1987a):** Localization of mucosal mast cells in W/Wv mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol.* 9: 477-485.
- ABE, T. and NAWA, Y. (1987b):** Reconstitution of mucosal mast cells in W/Wv mice by adoptive transfer of bone marrow-derived cultured mast cells and its effects on the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol.* 9: 31-38.
- ABRAHAM, S.N. and AROCK, M. (1998):** Mast cells and basophils in innate immunity. *Seminars in Immunology.* 10: 373-381.
- ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J. and HOLMES, P. H. (1984):** Studies on the pathophysiology of chronic ovine haemonchosis in Merino and Scottish Blackface lambs. *Parasitology*, 89: 585-596.
- ADAMS, D. B. (1978):** The induction of selective immunological unresponsiveness in cells of blood and lymphoid tissue during primary infection of sheep with the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56: 107-118.
- ADAMS, D. B. (1983):** Investigation with dexamethasone of the processes which moderate immunity against the nematode *Haemonchus contortus*. *Aus. J. Exp. Med. Sci.* 61: 345-353.
- ADAMS, D. B. (1988):** The effect of dexamethasone on a single and superimposed infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 18 (5): 575-579.
- ADAMS, D. B.; MERRITT, C. G. and CRIPPS, A. W. (1980):** Intestinal lymph and the local antibody and immunoglobulin response to infection by *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58 (2): 167-177.
- ADAMS D. B. and COLDITZ, I. G. (1991):** Immunity of *Haemonchus contortus* and cellular response to helminth antigens in the mammary gland of non-lactating sheep. *Int. J. Parasitol.* 21(6): 631-639.
- ADAMS, D. B. and CRIPPS, A. W. (1977):** Cellular changes in the intestinal lymph of sheep infected with the enteric nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55 (5): 509-522.
- AIELLO, S. E. (2000):** *El Manual Merck de Veterinaria*. Merck & CO. INC. New York. USA.
- ALBERS, G. A. A.; GRAY, G. D.; PIPER, L. R.; BARKER, J. S. F.; LeJAMBRE, L. F. and BARGER, I. A. (1987):** The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in Merino sheep. *Int. J. Parasitol.* 17: 1355-1363.
- ALMERIA, S.; CANALS, A.; ZARLENGA, D. S. and GASBARRE, L. C. (1997a):** Isolation and phenotypic characterization of abomasal mucosal lymphocytes in the course
-

- of a primary *Ostertagia ostertagi* infection in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57 (1-2): 87-98.
- ALMERIA, S.; CANALS, A.; ZARLENGA, D. S. and GASBARRE, L. C. (1997b):** Quantification of cytokine gene expresión in lamina propria lymphocytes of cattle following infection with *Ostertagia ostertagi*. *J. Parasitol.* 83: 1051-1055.
- ALMERIA, S.; CANALS, A.; GÓMEZ, M. T.; ZARLENGA, D. S. and GASBARRE, L. C. (1998):** Characterization of protective immune responses in local lymphoid tissues after drug attenuated infections with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 80: 53-64.
- AL SAQUR, I.; ARMOUR, J.; BAIRDEN, K.; DUNN, A. M. and JENNINGS, F. W. (1982):** Field study on the epidemiology and pathogenicity of different isolates of bovine *Ostertagia* spp. *Res. Vet. Sci.* 33: 313-318.
- AMARANTE, A. F.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W. S.; DAVIS, S. K. and BAZER, F. W. (1999):** Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbreed lambs. *Vet. Parasitol.* 80(4): 311-324.
- ANDERSON, D. V.; DIXON, S. C. ; GRAHAM, R. B. (1989):** Ovine monoclonal antibody to *Ostertagia circumcincta*. *Biochem. Soc. Transact.*
- ANDERSON, R. C. (1992):** Orden Strongylida (The Bursate Nematodes). 3.4 Superfamilia Trichostrongyloidea. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmision.* C.A.B. International. Northampton. UK. Pp: 35-191.
- ANDERSON, R. M. and MAY, R. M. (1985):** Herd immunity to helminth infection and implications for parasite control. *Nature.* 315: 493-496.
- ANDREWS S.J.; HOLE N.J.; MUNN E.A.; ROLPH T.P. (1995):** Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. *Int. J. Parasitol.* 25: 839-846.
- ANDREWS, S. J.; ROLPH, T. P. and MUNN, E. A. (1997):** Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Res. Vet. Sci.* 62: 223-227.
- ARMOUR, J. (1989):** The influence of host immunity on the epidemiology of trichostrongyle infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 32: 5-19.
- ARMOUR, J.; JARRETT, W. F. and JENNINGS, F. W. (1966):** Experimental *Ostertagia circumcincta* infection in sheep: development and pathogenesis of single infection. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1267-1278.
- ARMOUR, J.; BAIRDEN, K. and RYAN, W. G. (1988):** Immunity of ivermectin treated cattle to challenge from helminth parasites in the following season. *Vet. Rec.* 122: 223-225.
- BAKER, D. G. and GERSHWIN, L. J. (1992):** Seasonal patterns of total and *Ostertagia*-specific IgE in grazing cattle. *Vet. Parasitol.* 44: 211-212.
-

- BAKER, D. G. and GERSHWIN, L. J. (1993):** Inverse relationship between IgE and worm burdens in cattle infected with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 47: 87-97.
- BAKER, D. G.; GERSHWIN, L. J. and HYDE, D. M. (1993a):** Cellular and chemical mediators of type 1 hypersensitivity in calves infected with *Ostertagia ostertagi*: mast cells and eosinophils. *Int. J. Parasitol.* 23 (3): 327-332.
- BAKER, D. G.; GERSHWIN, L. J.; GIRI, S. N. and LI, C. (1993b):** Cellular and chemical mediators of type 1 hypersensitivity in calves infected with *Ostertagia ostertagi*: histamine, prostaglandin D₂, prostaglandin E₂, and leukotriene C₄. *Int. J. Parasitol.* 23 (3): 333-339.
- BAKER, D. G.; STOTT, J. L. and GERSHWIN, L. J. (1993c):** Abomasal lymphatic subpopulations in cattle infected with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia* spp. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 39 (4): 467-473.
- BALIC, A.; BOWLES, V. M. and MEEUSEN, E. N. T. (1999a):** Cellular and cytokine profiles in abomasal tissues and lymph nodes during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. (submitted).
- BALIC, A.; BOWLES, V. M. and MEEUSEN, E. N. T. (1999b):** Cellular and cytokine responses in the tissue and abomasal lymph nodes during challenge infection of immunised sheep with *Haemonchus contortus*. En preparación.
- BALIC, A.; CUNNINGHAM, C. and MEEUSEN, E. N. T. (1999c):** Eosinophil-dependent and eosinophil-independent responses in the gastrointestinal tract during nematode infections. En preparación.
- BALIC, A.; BOWLES, V. M. and MEEUSEN, E. N. T. (2000):** The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45: 181-241.
- BAMFORD, R. N.; BATTIATA, A. P. and WALDMANN, T. A. (1996):** The role of translational regulation in their expression. *J. Leukocyte. Biol.* 59: 476-480.
- BANCROFT, A. J. and GRENCIS, R.K. (1998):** Th1 and Th2 cells and immunity to intestinal helminths. *Chemical Immunology* 71: 192-208.
- BAO, S.; MCCLURE, S. J.; EMERY, D. L. and HUSBAND, A. J. (1996):** Interleukin-5 mRNA expressed by eosinophils and gamma / delta T cells in parasite-immune sheep. *Eur. J. Immunol.* 26: 552-556.
- BARGER, I. A. (1988):** Resistance in young lambs to *Haemonchus contortus* infection and its loss following antihelmintic treatment. *Int. J. Parasitol.* 18: 1107-1109.
- BARGER, I. A. and SOUTHCOTT, W. H. (1975):** Control of nematode parasites by grazing management-I. Decontamination of cattle pastures by grazing with sheep. *Int. J. Parasitol.* 5: 39-44.

Bibliografía

- BARGER, I. A.; LeJAMBRE, L. F.; GEORGI, J. R. and DAVIES, H. I. (1985):** Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *Int. J. Parasitol.* 15: 529-533.
- BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F. and KNOW, M. R. (1996):** Grazing management for the control of nematode parasites. En: *Sustainable parasite control in small ruminant*. Ed: Le Jambre, L. F. . Bogor, Indonesia.
- BARKER, I. K. (1973):** A study of the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* infection in lambs with observations on the contribution of gastrointestinal plasma loss. *Int. J. Parasitol.* 3 (6): 743-757.
- BARLOUGH, J. E.; ACKLEY, C. D.; GEORGE, J. W.; LEVY, N.; ACEVEDO, R.; MOORE, P. F.; RIDEOUT, B. A.; COOPER, M.D.; PEDERSEN, N. C. (1991):** Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 4: 219-227.
- BARLTROP, J. A.; OWEN, T. C.; CORY, A. H. and CORY, J. G. (1991):** 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfofenyl)tetrazolium, inner SALT (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans a cell-viability indicators. *Bioorg & Med. Chem. Lett.* 1,611.
- BARNES, E. H. and DOBSON, R. J. (1990a):** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: mathematical model of worm fecundity. *Int. J. Parasitol.* 20: 375-380
- BARNES, E. H. and DOBSON, R. J. (1990b):** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: model to predict the worm population over time as a function of infection rate and host age. *Int. J. Parasitol.* 20: 365-373.
- BARNES, E. H. and DOBSON, R. J. (1993):** Persistence of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *Int. J. Parasitol.* 23: 1019-1026.
- BARNES, E. H.; DOBSON, R. J. AND BARGER, I. A. (1995):** Worm control and antihelminthic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11,56-63.
- BARRET, M.; JACKSON, F. and HUNTLEY, J. F. (1998):** Pathogenicity and immunogenicity of different isolates of *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 76: 95-104.
- BARTA, O. and OYEKAN, P. P. (1981):** Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Compar. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 4:209-221.
- BARTA, O (1983):** Serum's lymphocyte immunoregulatory factors (SLIF). *Vet Immunol Immunopathol* 4: pp: 279-306.
-

- BARTA, O (1986):** Immunomodulatory effect of serum on lymphocytes-consequences for the study of immunostimulans in vitro and in vivo. *Compar Immun Microbiol Infect Dis* 9: pp: 193-203.
- BARTA, O. (1993):** Section B: Immunologic techniques evaluating cells and their functions. En: *Veterinary Clinical Immunology Laboratory*. Ed. Barta, O. USA; pp: B1-1-B4-17.
- BEFUS, D. (1986):** Immunity in intestinal helminth infections: present concepts, future directions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 735-741.
- BEHNKE, J. M. (1987):** Evasion of immunity by nematode parasites causing chronic infections. *Advances in Parasitology*. 26: 1-71.
- BEHNKE, J. M. ; BARNARD, C. J. and WAKELIN, D. (1992):** Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International Journal for Parasitology*. 22: 860-907.
- BELL, R. G.; ADAMS, L. S. and OGDEN, R. W. (1984):** Intestinal mucus trapping in the rapid expulsion of *Trichinella spiralis* by rats: induction and expression analyzed by quantitative worm recovery. *Infect. Immunol.* 45: 267-272.
- BENDIXSEN, T.; EMERY, D. L. and JONES, W. O. (1995):** The sensitization of mucosal mast cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 25: 741-748.
- BEREZHKO, V. K.; AKULIN, N. A.; BUZMAKOVA, R. A. and KUROCHKINA, K. G. (1987):** Immunoallergic reactions and a phenomenon of self-cure in experimental haemonchosis (*Haemonchus contortus* of sheep depending on host's age). *Helminthologia*. 24: 119.
- BISSET, S. A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P. G.; JONAS, W. E.; WEST, C. J. and GREEN, R. S. (1996):** Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet. Parasitol.* 61: 249-263.
- BLANCHARD, J. L. and WESCOTT, R. B. (1985):** Enhancement of resistance of lambs to *Haemonchus contortus* by previous infection with *Ostertagia circumcincta*. *Am. J. Vet. Res.* 46 (10): 2136-2140.
- BOAG, B. and THOMAS, R. J. (1985):** The effect of temperature on the survival of infective larvae of nematodes. *J. Parasitol.* 71: 383-384.
- BOISVENUE, R. J.; STIFF, M. I.; TONKINSON, L. V. and COX, G. N. (1991):** Protective studies in sheep immunised with *Ostertagia* cuticular collagen proteins and peptides of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.*, 13: 227-240.
- BOISVENUE, R. J.; STIFF, M. I.; TONKINSON, L. V.; COX, G. N. and HAGEMAN, R. (1992):** Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1263-1265.

- BONE, L. W. and KLESIUS, P. H. (1986):** Effects of host serum on *in vitro* oviposition by *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 10: 27.
- BONNET, M.; LESPINATS, G. and BURTIN, C. (1984):** Histamine and serotonin suppression of lymphocyte responses to phytohemagglutinin and allogenic cells. *Cell. Immunol.* 83: 280-291.
- BORGSTEEDE, F. H. M. (1981):** Experimental studies on the host specificity of *Ostertagia* spp. In cattle and sheep. *Parasitol.* 82: 185-187.
- BORGSTEEDE, F. H. M. (1981a):** The infectivity of some nematode parasites of reindeer (*Rangifer tarandus L.*) and elk (*Alces alces L.*) for cattle and sheep. *Zeitsch. Parasitol.* 67: 211-215.
- BORGSTEEDE, F. H. M. (1981b):** Experimental cross-infections with gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *Z. Parasitenk.* 65: 1-10.
- BORGSTEEDE, F. H. M. and KLOOSTERMAN, A. (1985):** Effects on the use of a morantel sustained release bolus in first and second year grazing cattle. *Vet. Parasitol.* 18: 39-49.
- BOTTJER, K. P.; KLESIUS, P. H. and BONE, L. W. (1985):** Effects of host serum on feeding by *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). *Parasite Immunol.* 7 (1): 1-9
- BOWLES, V. M.; BRANDON, M. R. and MEEUSEN, E. (1995):** Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunol.* 84: 669-674.
- BOWMAN, D. D. (1995):** *Georgis' Parasitology For Veterinarians*. 6th edition. Editado: Dwight D. Bowman. W. B. Saunders Company. Philadelphia. USA.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. y HUNTER, J. S. (1993):** Modelado sencillo a base de mínimos cuadrados (Análisis de regresión). En: *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcciones de modelos*. Editado por John Wiley & Sons. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España; pp: 465-519.
- BOYD, J. W. (1984):** The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals. *Veterinary Clinical Pathology.* 13(2).
- BRADFORD, M. M. (1976):** A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- BROWN, G.B.; BOLIN, S.R.; FRANK, D. E.; ROTH, J. A. (1991):** Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus, and the influence of recombinant cytokines. *Am J Vet Res* 52: 381-387.
-

- BROWN, M. D.; POPPI, D. P. and SYKES, A. K. (1991):** The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. *Aust. J. Agric. Res.* 42: 253.
- BROWN, W. C.; WOODS, V. M.; DOBBELAERE, A. E. and LOGAN, K. S. (1993):** Heterogeneity of cytokine profiles of *Babesia bovis*-specific bovine CD4⁺ T cell clones activated *in vitro*. *Infect. Immunol.* 61: 3273-3281.
- BROWN, W. C.; DAVIS, W. C.; WOODS, V. M.; DOBBELAERE, A. E. and RICE-FITCHT, A. C. (1994):** CD4⁺ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific adult worm antigen express both unrestricted and Th2 Cytokine profiles. *Infect. Immunol.* 62: 818-827.
- BRYAN, R. P. and KERR, J. D. (1989):** The relationships between the natural worm burden of steers and the faecal egg count differentiated to species. *Vet. Parasitol.* 30: 327-334.
- BUDDLE, B. M.; JOWETT, G.; GREEN, R. S.; DOUCH, P. G. C. and RISDON, P. L. (1992):** Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22: 955-960.
- BUTTERWORTH, AE (1984):** Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol.* 23: 143-235.
- BUTTERWORTH, A. E. and THORNE, J. I. (1993):** Eosinophils and parasitic diseases. En: *Immunopharmacology of Eosinophils*. Editores: H. Smith y R. M. Cook. Academic Press. London. Pp: 119-150.
- CAMERON, D. C. (1984):** A comparison of the effects of nematode parasitism on sheep and Angora gotas. *Msc Thesis*. University of New England. Armidale. N.S.W. Australia.
- CANALS, A. and GASBARRE, L. C. (1990):** *Ostertagia ostertagi*: isolation and partial characterization of somatic and metabolic antigens. *Int. J. Parasitol.* 20: 1047-1054.
- CANALS, A.; ZARLENGA, D. S.; ALMERIA, S. and GASBARRE, L. C. (1997):** Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58(1): 63-75.
- CANAVOS, G.C. (1988):** Prueba de hipótesis estadísticas. En: *Probabilidad y estadística: Aplicaciones y métodos*. Editado por G. C. Canavos. McGraw-Hill. Méjico; pp: 303-353.
- CAPRON, A. and DESSAINT, J. P. (1988):** Vaccination against parasitic disease: some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 139: 109-114.
- CASTRO, G. A. and HARARI, Y. (1982):** Intestinal epithelial membrane changes in rats immune to *Trichinella spiralis*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 6: 191-202.
- CHARLESTON, W.A. G. (1965):** Pathogenesis of experimental haemonchosis in sheep with special reference to the development of resistance. *J. Comp. Pathol.* 75: 55-67.

- CHARLEY-POULAIN, J.; LUFFAU, G. and PERY, P. (1984):** Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 14: 129.
- CHER, D. J. and MOSMANN, T. R. (1987):** Two types of murine helper T cell clone II. Delayed type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 138: 3688-3694.
- CHIEJINA, S. N. and SEWELL, M. M. H. (1974):** Worm burdens, acquire resistance and live weight gain in lambs during prolonged daily infections with *Trichostrongylus colubriformis* (Giles, 1892) Loos. 1905. *Parasitology*,. 69: 315-327.
- CLAEREBOUT, E. and VERCRUYSE, J. (2000):** The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitol.* 120, s25-s42.
- CLAEREBOUT, E.; HILDERSON, H.; MEEUS, P.; De MARER, T.; BELINKE, J.; HUNTLEY, J. and VERCRUYSE, J. (1996):** The effect of truncated infections with *Ostertagia ostertagi* on the development of acquired resistance in calves. *Vet. Parasitol.* 66: 225-239.
- CLAEREBOUT, E.; HILDERSON, H.; SHAW, D. J. and VERCRUYSE, J. (1997a):** The presence of an early L₄ population in relation to the acquired resistance of calves naturally infected with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 66: 225-239.
- CLAEREBOUT, E.; HILDERSON, H.; SHAW, D. J. and VERCRUYSE, J. (1997b):** The presence of an early L₄ population in relation to acquired resistance of calves naturally infected with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 68: 337-346.
- COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W. P.; HUDAK, S.; JACKSON, J. and RENNICK, D. (1989):** Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* 245 (4915): 308-310.
- COHAN, V. L.; SCOTT, A. L.; DINARELLO, C. A. And PRENDERGAST, R. A. (1991):** Interleukin-1 is a mucus secretagogue. *Cell. Immunol.* 136: 425-434.
- COLVILLE, J. (1991):** Common Laboratory Procedures for Diagnosing Parasitism. En: *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. Ed. Paul W. Pratt. American Veterinary Publications, Inc. California. USA; pp: 7-50.
- COOP, R. L.; SMITH, W. D.; ANGUS, K. W.; GRAHAM, R. B.; WRIGHT, S. E. and JACKSON, F. (1985):** Effect of *Ostertagia ostertagi* on lamb performance and cross resistance to *O. circumcincta*. *Res. Vet. Sci.* 39: 200-206.
- COOP, R. L.; HUNTLEY, W. D. and SMITH, W. D. (1995):** Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res. Vet. Sci.* 1995: 24-29.
- COOP, R. L. and HOLMES, P. H. (1996):** Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26: 951-962.
-

- COOPERBAND, S.C.; BADGER A. M.; MANNICK, J. A. (1976): Non-hormonal serum suppressive factors. En: *Mitogens in Immunobiology*. Editado por Oppenheim J.J., Rosenstreich D.L. Academic Press, New York. USA. pp: 555-572
- CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO, F. A.; MARTÍNEZ, A. R.; SÁNCHEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, S.; NAVARRETE, I.; DíEZ, P.; QUIROZ, H. and CARVALHO M. (2000): Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongiloidosis y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.
- CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A. and CORY, J. G. (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assay in culture. *Cancer Commum*; 3:207-212.
- COSTA, J.J.; WELLER, P. F. and GALLI, S. J. (1997): The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Am. Med. Assoc.* 278: 1815-1822.
- COX, G. N.; SHAMANSKY, L. M. and BOISVENUE, R. J. (1989): Identification and preliminary characterisation of cuticular surface proteins of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* , 36: 233-242.
- COX, G. N.; SHAMANSKY, L. M. and BOISVENUE, R. J. (1990): *Haemonchus contortus*: A simple procedure for purifying proteins from third- and fourth-stage larvae. *Exp. Parasitol.* , 70: 227-235.
- COX, G. N.; PRATT, D.; HAGEMAN, R. and BOISVENUE, R. J. (1990): Molecular cloning and sequencing of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 25-34.
- COYNE, M. J. and SMITH, G. (1992): The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naïve and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *Int. J. Parasitol.* 22: 315-325.
- COYNE, M. J. ; SMITH, G. and JOHNSTONE, C. (1991): A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. *Int. J. Parasitol.* 21: 847-853.
- CRANDALL, R. B.; CRANDALL, C.A. and JONES, J. F. (1978): Analysis of immunosuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. *Clin. Exp. Immunol.* 33: 30-37.
- CROFTON, H. D. (1965): Ecology and biological plasticity of sheep nematodes. I. The effects of temperature on the hatching of soma parasites of sheep. *Cornell Veterinarian.* 55: 242-250.
- CROFTON, H. D. (1971a): A quantitative approach to parasitism. *Parasitology.* 62: 179-193.

Bibliografía

- CROFTON, H. D. (1971a):** A model of host-parasite relationships. *Parasitology*. 63: 343-364.
- CROFTON, H. D. and WHITLOCK, J. H. (1965):** Ecology and biological plasticity of sheep nematodes. III. Studies on *Ostertagia circumcincta* (Stadelmann, 1894). *Cornell Veterinarian*. 55: 259-262.
- CROSS, D. A. and KLESZIUS, P. H. (1989):** Soluble extracts from larval *Ostertagia ostertagi* modulating immune function. *Int. J. Parasitol.* 19: 57-61.
- CROSS, D. A.; KLESZIUS, P. H. and HAYNES, T. B. (1986):** Lymphocyte blastogenic responses of calves experimentally infected with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 22: 49-55.
- CROSS, D. A.; KLESZIUS, P. H. and WILLIAMS, J. C. (1988):** Preliminary report: Immunodiagnosis of pre-type II Ostertagiasis. *Vet. Parasitol.* 27: 151-158.
- CROWE, S. E. and PERDUE, M. H. (1992):** Gastrointestinal tract hypersensitivity: Basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology*. 103: 1075-1095.
- CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, CARRERA, L.; De La Fuente, C.; ALUNDA, J. M. (1994):** Cross antigenicity among ovine Trichostrongyloidea. Preliminary report. *Vet. Parasitol.* 53: 243-251.
- CUMMINS, L. J.; THOMPSON, R. L.; YONG, W. K.; RIFFKIN, G. G.; GODDARD, M. E.; CALLINAN, A. P. L. and SAUNDERS, M. J. (1991):** Genetics of *Ostertagia ostertagi* selection lines. En: *Breeding for Disease Resistance in Sheep*. Editado por: G. D. Gray y R. R. Woolaston. Wool Research and Development Corporation. Parkville, Victoria, Australia, pp: 11-18.
- DAHLMAN-HOUGLUND, A.; AHLSTEDT, S.; HANSON, L. A.; DAHLGREN, U. and TELEMO, E. (1996):** Different expression of IL-2 receptor alpha-chain on a lamina propria T cell population and goblet cells in rats orally tolerized or sensitized to ovalbumin (OA) after colonization with OA-producing *Escherichia coli*. *Clin. Exp. Immunol.* 106: 534-540.
- DALTON, J. P. and MULCAHY, G. (2001):** Parasite vaccines- a reality?. *Vet. Parasitol.* 98: 149-167.
- DARGIE, J. D. (1975):** Application of radioisotopic techniques to the study of red cells and plasma protein metabolism in helminth diseases of sheep. *Symp. Br. Soc. Parasit.* 13: 1-26.
- DAUGSCHIES, A. (1996):** Investigation into the production and function of leukotrienes during histotropic development of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitol. Res.* 82: 416-422.
- DAUGSCHIES, A. and RUTTKOWSKI, B. (1998):** Modulation of migration of *Oesophagostomum dentatum* larvae by inhibitors and products of eicosanoid metabolism. *Int. J. Parasitol.* 28: 355-362.
-

- DAWKINS, H. J. S. ; WINDON, R. G. and EAGLESON, G. K. (1989): Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 19: 199-205.
- DE GRAAF, D. C.; BERGEN, P.; HILDERSON, H.; CLAEREBOU, E. and VERCRUYSE, J. (1994): Identification and isolation of 19.7 kDa *Ostertagia ostertagi* specific antigen and evaluation of its potential for immunodiagnosis. *Int. J. Parasitol.* 24: 681-688.
- DeMAREZ, T.; COX, E. ; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSE, J. and GODDEERIS, B. (1997): Induction and suppression of lymphocyte proliferation by antigen extracts of *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57: 69-77.
- DIKMANS, G. and ANDREWS, J. S. (1933): A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. *Transactions of the American Microscopical Society.* 52: 1-25.
- DINEEN, J. K. and WAGLAND, B. M. (1966): The dynamics of the host-parasite relationship. IV. The response of sheep to graded and to repeated infection. *Parasitology.* 56: 639-650.
- DINEEN, J. K.; GREGG, P.; WINDON, R. G.; DONALD, A. and KELLY, J. D. (1977): The role of immunologically specific and non-specific components of resistance in cross protection to intestinal nematodes. *Int. J. Parasitol.* 7: 211-215.
- DINEEN, J. K.; GREGG, P. and LASCELLES, A. K. (1978): The response of lambs to vaccination at weaning with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae; segregation into "responders" and "non-responder". *Int. J. Parasitol.* 8: 59-63.
- DINEEN, J. K. and WINDON, R. J. (1980): The effect of sire selection on the response of lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int. J. Parasitol.* 10: 189-196.
- DOBSON, R. J.; WALLER, P. J. and DONALD, A. D. (1990): Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of infection rate on the establishment of infective larvae and parasites fecundity. *Int. J. Parasitol.* 20: 347-352.
- DOBSON, R. J.; BARNES, E. H. and WINDON, R. G. (1992): Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* in single and concurrent infections. *Int. J. Parasitol.* 22: 997-1004.
- DODDS, W. J. (1980): Hemostasis and coagulation. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed: Kaneko J. J. Academic Press, INC. Orlando. Florida. USA; pp: 696.
- DOLIGALSKA, M.; MOSKA, B. and STEAR, M. J. (1999): Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and faecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20; 70 (3-4): 299-308.

Bibliografía

- DORCHIES, P.; BERGEAUD, J. P.; VAN KHANH, N. and MORAND, S. (1997):** Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils?. *Parasitol. Res.* 83(7): 727-730.
- DOUCH, P. G. (1988):** The response of young Romney lambs to immunization with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int. J. Parasitol.* 18: 1035-1038.
- DOUCH, P. G. C. and MORUM, P. E. (1993):** The effect of age on the response of Romney sheep to gastrointestinal nematodes during grazing. *Int. J. Parasitol.* 23: 651-655.
- DOUCH, P. G. C.; HARRISON, G. B. L.; BUCHANAN, L. L. and GREER, K. S. (1983):** *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int. J. Parasitol.* 13 (2): 207-212.
- DOUCH, P. G.; HARRISON, G. B.; BUCHANAN, L. L. and BRUNSDON, R. V. (1984):** Relationship of histamine in tissues and antiparasitic substances in gastrointestinal mucus to the development of resistance to *trichostrongyle* infections in young sheep. *Vet. Parasitol.* 16: 273-288.
- DOUCH, P. G. C.; HARRISON, G. B. L. ; ELLIOT, D. C.; BUCHANAN, L. L. and GREER, K. S. (1986):** Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasitic activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. *Vet., Parasitol.* 20 (4): 315-331.
- DOUCH, P. G.; HARRISON, G. B.; ELLIOTT, D. C.; BUCHANAN, L. L. and GREER, K. S. (1996a):** Serum mast cell proteinase responses of sheep challenged with *Trichostrongylus colubriformis* and the effect of dexamethasone treatment. *Int. J. Parasitol.* 26: 91-95.
- DOUCH, P. G.; MORUM, P. E. and RABEL, B. (1996b):** Secretion of anti-parasite substances and leucotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. *Int. J. Parasitol.* 26: 205-211.
- DOUCH, P. G.; GREEN, R. S.; MORRIS, C. A.; McEEWAN, J. C. and WINDON, R. G. (1996c):** Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int. J. Parasitol.* 26(8-9): 899-911.
- DOWNEY, N. E.; HARRINGTON, D. and ABBOTT, E. M. (1993):** Effect of first-season treatment of calves with fenbendazole slow-release bolus on second-year immunity to infection by lung and gastrointestinal nematodes. *Irish J. Agri. Food Res.* 32: 147-159.
- DUNCAN, J. R. and PRASSE, K. W. (1986):** *Veterinary laboratory Medicine.* 2^a ed. Iowa State University Press.
- DUNSMORE, J. D. (1961):** Effect of whole body irradiation and cortisone on the development of *Ostertagia* spp. in sheep. *Nature.* 192: 139-140.
- DUNSMORE, J. D. (1963):** Effect of removal of an adult population of *Ostertagia* from sheep on concurrently existing arrested larvae. *Aust. Vet. J.* 39: 459-463.
-

-
- DUNSMORE, J. D. (1965):** *Ostertagia* spp. in lambs and pregnant ewes. *Journal of Helminthology*. 39: 159-184.
- DURETTE-DESSET, M. C. (1983):** No. 10. Keys to genera of the superfamily Trichostrongyloidea. En: *CIH Keys to Nematode Parasites of Vertebrates*. Editores: Anderson, R. C. and Chabaud, A. G. CAB International, Wallingford, UK, pp: 1-68.
- DURETTE-DESSET, M. C. and CHABAUD, A. G. (1977):** Essai de classification des nématodes Trichostrongyloidea. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 52: 539-558.
- DURETTE-DESSET, M. C. and CHABAUD, A. G. (1981):** Nouvel essai de classification de nématode Trichostrongyloidea. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 56: 297-312.
- ELARD, L.; COMES, A. M. and HUMBERT, J. F. (1996):** Sequences of β -tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79: 249-253.
- ELSE, K. J. and FINKELMAN, F. D. (1998):** Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitology*. 28: 1145-1158.
- EMERY, D. L.; BENDIXSEN, T. and McCLURE, S. J. (1991):** The use of electroblotted antigen of *Trichostrongylus colubriformis* to induce proliferative responses in sensitized lymphocytes from sheep. *Int. J. Parasitol.* 21 (2): 179-185.
- EMERY, D. L.; McCLURE, S. J.; WAGLAND, B. M. and JONES, W. O. (1992a):** Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: immunization with normal and truncated infections. *Int. J. Parasitol.* 22 (2): 215-220.
- EMERY, D. L.; McCLURE, S. J.; WAGLAND, B. M. and JONES, W. O. (1992b):** Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: immunization with adult parasites. *Int. J. Parasitol.* 22 (2): 221-225.
- EMERY, D. L.; WAGLAND, B. M. and McCLURE, S. J. (1993):** Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 23: 841-846.
- EYLAR, E. H. and JEANLOZ, R. W. (1962):** Periodate oxidation of the α_1 acid glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 237:1021-1025.
- EYSKER, M. (1997):** Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. *Vet. Parasitol.* 72: 265-272; discusión: 272-283.
- EYSKER, M. and JANSEN, J. (1982):** Population built-up of gastrointestinal nematode infections in ewes and lambs on pasture grazed by calves in the previous year. *Res. Vet. Sci.* 32: 203-205.
-

- EYSKER, M. and PLOEGER, H. W. (2000):** Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitol.* 120: s109-s119.
- FALCONER, D. S. (1989):** Variance. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Scientific & Technica. Essex CM20 2JE. UK.
- FERGUSON, M. J. and HOMANS, S. W. (1988):** Parasite glycoconjugates: towards the exploitation of their structure. *Parasite Immunol.* 10:465-479.
- FERRICK, D.A.; SCHRENZEL, M. D.; MULVANIA, T.; HSIEH, B.; FERLIN, W. G. and LEPPER, H. (1995):** Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells *in vivo*. *Nature.* 373: 255-257.
- FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; SNAPPER, C. M.; OHARA, J. and PAUL, W. F. (1986):** Suppression of *in vivo* polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B cell stimulatory factor 1 (IL-4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (124): 9675-9678.
- FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, S. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B. GAUSE, W. C. and URBAN, J. F. Jr. (1997):** Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 505-533.
- FISHER, M. A. and JACOBS, D. E. (1995):** Influence of chemoprophylaxis on protective immunity to nematodes in cattle: a two-year study comparing four control strategies. *Vet. Rec.* 137: 581-585.
- FLECK, SL; MOODY, AH (1988):** Faecal parasites. En: *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*. Ed. Wright. Cambridge. Reino Unido; pp: 8-52.
- FRANKENA, K. (1987):** The interactions between *Cooperia* spp and *Ostertagia* spp (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle. *PhD thesis*, Agriculture University Wageningen, The Netherlands. P: 101.
- FRIEND, D. S.; GHILDYAL, N.; GURISH, M. F. ; HUNT, J.; HU, X.; AUSTEN, K. F. and STEVENS, R. L. (1998):** Reversible expression of tryptases and chymases in the jejunal mast cells of mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 160: 5537-5545.
- FRISCH, J. E. (1999):** Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* 29: 57-71.
- FURMAN, D. P. (1944):** Effects of environment upon the free-living stages of *Ostertagia circumcincta* (Stadelmann) Trichostrongylidae: 1.Laboratory experiments. *Am. J. Vet. Res.* 5: 79-86.
- GARATE, T.; CABRERA, Z.; COPEMAN, D. B.; HARNETT, W.; McLAREN, D. J.; PATTERSON, M. and PARKHOUSE, R. M. E. (1991):** Surface antigens of male worms and microfilariae of *Onchocerca gibsoni*. *Int. J. Parasitol.* 21: 37-45
-

-
- GARDINER, W. P. (1997):** Regresión modeling methods in the Biosciences. En: *Statistics for the Biosciences. Data analysis minitab software*. Editado por Prentice Hall Europe. Gran Bretaña; pp: 245-261.
- GASBARRE, L. C. (1986):** Limiting dilution analices for the quantification of cellular immune responses in bovine ostertagiasis. *Vet. Parasitol.* 20: 133-147.
- GASBARRE, L. C. (1988):** Induction of protective immunity in calves against *Ostertagia ostertagi* by strategic administration of an antihelminthic. *Proceedings 33rd Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Parasitol.* 42.
- GASBARRE, L. C. (1994):** *Ostertagia ostertagi*: changes in lymphoid populations in the local lymphoid tissues after primary or secondary infection. *Vet. Parasitol.* 55: 105-114.
- GASBARRE, L. C. (1997a):** Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Vet. Parasitol.* 72: 327-343.
- GASBARRE, L. C. (1997b):** Do fecal egg counts accurately reflect worm numbers in cattle?. *Vet. Proc.* 11: 900-903.
- GASBARRE, L. C. and CANALS, A. (1989):** Induction of protective immunity in calves immunized with adult *Oesophagostomum radiatum* somatic antigens. *Vet. Parasitol.* 34: 223-238.
- GASBARRE, L. C.; FINERTY, J. F. and LOUIS, J. A. (1980):** Non-specific immune responses in CBA/N mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Parasite Immunol.* 3: 273-280.
- GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A. and DAVIES, C. J. (1990):** Genetic control of immunity to gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet. Parasitol.* 37: 257-272.
- GASBARRE, L. C.; NANSEN, P.; MONRAD, J.; GRONVELD, J.; STEFFAN, P. and HENRIKSEN, S. A. (1993a):** Serum anti-trichostrongyle antibody responses of first and second grazing calves. *Res. Vet. Sci.* 54: 340-344.
- GASBARRE, L. C. ; LEIGHTON, E. A. and DAVIES, C. J. (1993b):** Influence of host genetics upon antibody responses against gastrointestinal nematode infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 46: 81-91.
- GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A. and BRYANT, D. (1995):** Genetically controlled resistance to gastrointestinal nematode infections in cattle. *Proc. Beef Improv. Fed.* 212-217.
- GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A. and SONSTEGARD, T. (2001):** Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 98: 51-64.
- GENCHI, C.; MADONNA, M. and TRALDI, G. (1989):** Epidemiology of *Ostertagia ostertagi* in dairy cow from different breeding system. *Parasitologia.* 31: 123-132.
-

GEORGI, J. R. and LeJAMBRE, L. F. (1983): Radiolabelling of infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematode: *Trichostrongyloidea*) with ⁷⁵Se methionine and their performance as tracers in sheep. *J. Parasitol.* 68: 875-882.

GEORGI, J. R. and GEORGI, M. E. (1990): Helminths. Nematodes. *Parasitology for Veterinarians*. W. B. Saunders Company. Philadelphia. USA. Pp: 138-210

GIBSON, T. E. and EVERETT, G. (1972): The ecology of the free-living stages of *Ostertagia circumcincta*. *Parasitology*. 64: 451-460.

GIBSON, T. E. and PARFITT, J. W. (1972): The effect of age on the development by sheep resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. *Res. Vet. Sci.* 13: 529-535.

GIBSON, T. E. and PARFITT, J. W. (1973): The development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* by lambs under conditions of continuous infection. *Res. Vet. Sci.* 15: 220-223.

GILL, H. S.; GRAY, G. D.; WATSON, D. L. and HUSBAND, A. J. (1993a): Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Par. Immunol.* 15: 61-67.

GILL, H. S.; WATSON, D. L. and BRANDON, M. R. (1993b): Monoclonal antibody to CD4⁺ cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunol.* 78: 43-49.

GILLS, H. S.; POMROY, W. E.; CJARLESTON, W. A. G. and MORIARTY, K. M. (1991): Caprine haemonchosis: Lymphocyte responses to parasitic antigen and mitogens. *Small Ruminant Research*. 4: 101-108.

GILL, H. S.; WATSON, D. L. and BRANDON, M. R. (1992a): Monoclonal antibody to CD4⁺T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology*. 78 (1): 43-49.

GILLS, H. S.; HUSBAND, A. J. and WATSON, D. L. (1992b): Localisation of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31 (1-2): 179-187.

GLEICH, G. J.; OLSON, G. M. and HERLICH, H. (1979): The effect of antiserum to eosinophils on susceptibility and acquired immunity of the guinea pig to *Trichostrongylus colubriformis*. *Immunology*. 37 (4): 873-880.

GOGAL, R. M. Jr.; ANSAR AHMED, S. and LARSEN, C. T. (1997): Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, non-radioactive assay (Lympho-Pro). *Avian Diseases*; 41(3):714-725.

GÓMEZ-IGLESIAS, L. A.; ANGULO-CUBILLÁN, F.; ALUNDA, J. M. and CUQUERELLA-AYENSA, M. (2001 a): Respuesta humoral y celular (linfoproliferación) de corderos inmunizados frente a *Haemonchus contortus* con fracciones solubles del helminto. *Acta Parasitologica Portuguesa*. 8 (2). Fp-268

- GÓMEZ-IGLESIAS, L. A. ; DE LA FUENTE-LÓPEZ, C.; ALUNDA, J. M. and CUQUERELLA-AYENSA, M. (2001b): Aislamiento y purificación de antígenos solubles de adultos de *Haemonchus contortus* de potencial interés diagnóstico e inmunoproláctico. *Acta Parasitologica Portuguesa*. 8 (2). Fp-269.
- GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M. and ALUNDA, J. M. (1996): Identification and Partial Purification of a 26 Kilodalton Antigen of Adult *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 26(3): 311-318.
- GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-IGLESIAS, L. A.; MÉNDEZ, S.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; De La FUENTE, C. and ALUNDA, J. M. (1999): Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet. Parasitol.* 81: 281-293.
- GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; DOMÍNGUEZ, I. A.; GÓMEZ-IGLESIAS, L. A.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MÉNDEZ, S.; De La FUENTE, C.; ALUNDA, J. M. and CUQUERELLA (2000): Serodiagnosis of haemonchosis with a somatic antigen (Hc26) in several breeds of sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 354-360.
- GORDON, H. McL. (1968): The self-cure reactions. *Vet. Med. Rev.* 1968.
- GORREL, M. D.; MILLER, H. R. P. and BRANDON, M. R. (1988a): Lymphocyte phenotypes in the abomasal mucosa of sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 10: 661-674.
- GORREL, M. D.; WILLIS, G.; BRANDON, M. R. and LASCELLES, A. K. (1988b): Lymphocyte phenotypes in the intestinal mucosa of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Clin. Exp. Immunol.* 72: 274.
- GOYAL, P. K. and WAKELIN, D. (1993): Influence of variation in host strain and parasite isolate on inflammatory and antibody responses to *Trichinella spiralis* in mice. *Parasitology* 106: 371-378
- GRAHAM, M.; SMITH, T. S. ; MUNN, E. A. and NEWTON, S. E. (1993): Recombinant DNA molecules encoding aminopeptidase enzymes and their use in the preparation of vaccines against helminth infections. *Patent Application No. WO 93/23542*.
- GRAY, G. D.; BARGER, I. A.; LeJAMBRE, L. F. And DOUCH, P. G. (1992): Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 22: 417-425.
- GREENHALGH, C. J.; BECKHAM, S. A. and NEWTON, S. E. (1999): Galectins from sheep gastrointestinal nematodes are highly conserved. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98: 285-289.
- GRENCIS, R. K.; ELSE, K. J.; HUNTLEY, J. F. and NISHIKAWA, S. I. (1993): The in vivo role of stem cell factor (c-kit ligand) on mastocytosis and host-protective immunity to the intestinal nematode *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite Immunol.* 15 (1): 55-59.

- GRONVOLD, J.; NANSEN, P. and GASBARRE, L. C. (1992):** Development of immunity to *Ostertagia ostertagi* (*Trichostrongylidae*: Nematoda) in pastured young cattle. *Acta Vet. Scand.* 33: 305-316.
- GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S. A. and NANSEN, P. (1993):** Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. *J. Helminthol.* 67: 31-36.
- GROSS, S. J.; RYAN, W. G. and PLOEGER H. W. (1999):** Anthelmintic treatment of dairy cows and its effects on milk production. *Vet. Rec.* 144: 581-587.
- GURIS, M. F. ; PEAR, W. S.; STEVENS, R.L.; SCOTT, M. L.; SOKOL, K.; GHILDYAL, N.; WEBSTER, M. J.; HU, X.; AUSTEN, K. F.; BALTIMORE, D. and FRIEND, D. S. (1995):** Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor. *Immunity.* 3: 175-186.
- HAIG, D. M.; WINDON, R. G.; BLACKIE, W.; BROWN, D. and SMITH, W. D. (1989):** Parasite-specific T cell responses of sheep following live infection with the gastric nematode *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 11 (5): 463-477.
- HAMMERBERG, B. (1986):** pathophysiology of nematodiasis in cattle. *Vet. Clin. North Am.* 2(2): 225-224.
- HANRAHAN, L. A.; BENZ, G. W. And SCHULTZ, R. D. (1984):** Experimentally induced *Cooperia oncophora* infection in calves: lymphocyte blastogenic and delayed hypersensitivity responses. *Am. J. Vet. Res.* 45 (5): 855-862.
- HARP, J. A.; RUNNELS, P. L. and PESCH, B. A. (1988):** Lymphocyte recirculation in cattle: patterns of localisation by mammary and mesenteric lymph node lymphocytes. *Vet. Immun. Immunopathol.* 20: 31-39.
- HARRINSON, G. B. L.; PULFORD, H. D.; GATEHOUSE, T. K.; SHAW, R. J.; PFEFFER, A. and SHOEMARKER, C. B. (1999):** Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reaction during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *Int. J. Parasitol.* 29: 459-468.
- HAWKINS, J. A. (1993):** Economic benefits of parasite control in cattle. *Vet. Parasitol.* 46: 159-173.
- HENDRIX, C.M. (1999):** Pruebas de laboratorio más comunes para el diagnóstico del parasitismo. En "*Diagnóstico parasitológico veterinario*". Ed. C.M. Hendrix. Harcourt Brace. Madrid. España; pp: 255-263.
- HERBERT, I. V. and PROBERT, A. J. (1987):** Use of an oxfendazole pulse release bolus in calves exposed to natural subclinical infection with gastrointestinal nematodes. *Vet. Rec.* 121: 536-540.
- HERLICH, H. (1974):** Infection dynamics of the cattle parasite, *Ostertagia ostertagi*, in sheep. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 41: 52-54.
-

-
- HERLICH, H. (1982):** *Ostertagia ostertagi* in calves: clinical parasitism and resistance. *Am. J. Vet. Res.* 43: 882-883.
- HERTZBERG, H.; KOHLER, L.; DEPLAZES, P.; HACKI, W. H. and ECKERT, J. (1995):** Pathophysiological studies of sheep during the build-up of immunity against *Ostertagia leptospicularis* and after challenge infection. *Research in Veterinary Science.* 58: 14-19.
- HILDERSON, H.; de GRAAF, D.; VERCRUYSE, J. and BERGHEN, P. (1993a):** Characterisation of *Ostertagia ostertagi* antigens by the different bovine immunoglobulin isotypes. *Res. Vet. Sci.* 55: 203-208.
- HILDERSON, H.; VERCRUYSE, J.; de GRAAF, D. C.; BASTIAENSEN, P.; FRANSEN, J. and BERGHEN, P. (1993b):** The presence of an early L₄ larvae population in relation to the immune response of calves against *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 47: 255-266.
- HILDERSON, H.; BERGHEN, P.; de GRAAF, D.; CLAEREBOU, E. and VERCRUYSE, J. (1995):** Immunization of calves with *Ostertagia ostertagi* fourth stage larval antigens failed to protect calves from infection. *Int. J. Parasitol.* 25: 757-760.
- HOFFMAN, F. M. and HINTON, D. R. (1991):** Cytokine interactions in the central nervous system. *Regional Immunol.* 3: 268.
- HOHENHAUS, M. A. and OUTERIDGE, P.M. (1995):** The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br. Vet. J.* 151(2): 119-140.
- HOLMAN, H. H. and DEW, S. M. (1965):** The blood picture of the goat. IV. Changes in coagulation times, platelet counts and leucocyte numbers associated with age. *Res. Vet. Sci.* 6: 510-521.
- HOLTENIUS, P.; UGJLA, A. and OLSSON, G. (1983):** Epidemiological studies on *Ostertagia ostertagi* infections in cattle during their 1st, 2nd and 3rd summer on pasture. *Nord. Vet. Med.* 233-238.
- HONDE, C. and BUENO, L. (1982):** *Haemonchus contortus*: egg laying influenced by abomasal pH in lambs. *Exp. Parasitol.* 54 (3): 371-378.
- HOSKING, B. C.; WATSON, T. G. and LEATHWICK, D. M. (1996):** Multigeneric resistance to oxfendazole by nematodes in cattle. *Vet. Rec.* 138: 67-68.
- HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C.; SOPP, P. and BROWNLIE, J. (1992):** Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T cells subpopulations analysed by specific depletion *in vivo* with monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32 (3-4): 303-314.
-

HUNTLEY, J. F.; WALLACE, G. R. and MILLER, H. R. P. (1982): Quantitative recovery of isolated mucosal mast cells and globule leukocytes from parasitised sheep. *Res. Vet. Sci.* 33 (9): 8-63.

HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. and MILLER, H. R. P. (1984): The isolation and characterisation of globule leukocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasited sheep. *Parasite Immunol.* 6 (4): 371-390.

HUNTLEY, J. F.; GIBSON, S.; BROWN, D.; SMITH, W. D.; JACKSON, F. and MILLER, H. R. P. (1987): Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* 9 (5): 603-614.

HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. F. J.; JACKSON, R. and MILLER, H. R. P. (1992a): The influence of challenge dose, duration of immunity or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus* infected sheep. *Parasite Immunol.* 14 (4): 429-440.

HUNTLEY, J. F.; HAIG, D. M.; IRVINE, D. M.; INGLIS, L.; Mac DONALD, A.; RANCE, A. and MOQBEL, R. (1992b): Characterisation of ovine mast cells derived from *in vitro* culture of haemopoietic tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32 (1-2): 47-64.

HUNTLEY, J. F.; SCHALLING, H. D. F. H.; KOOYMAN, F. N. J.; MacKELLAR, A.; JACKSON, F. and SMITH, W. D. (1998): IgE antibody during infection with the ovine abomasal nematode, *Teladorsagia circumcincta*: primary and secondary responses in serum and gastric lymph of sheep. *Parasite Immunol.* 20: 565-571.

HUSBAND, A. J. (1985): Mucosal immune interactions in intestine, respiratory tract and mammary gland. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 1: 25-57.

HUSBAND, A. J. (1987): Perspectives in mucosal immunity: a ruminant model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17: 357-365.

HUTCHINSON, L.E.; STEVENS, M. G. and OLSEN, S. C.; (1994): Cloning bovine cytokine cDNA fragments and measuring bovine cytokine mRNA using the reverse transcription-polymerase chain reactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 13-29.

JACKSON, F. and CHRISTIE, M. G. (1984): Further observations on faecal egg output in lambs dosed continuously with *Ostertagia circumcincta*. *Res. Vet. Sci.* 36: 375-377.

JACKSON, F.; MILLER, H. R. P.; NEWLANDS, G. F. J.; WRIGHT, S. E. and HAY, L. A. (1988): Immune exclusion of *Haemonchus contortus* larvae in sheep: dose dependency, steroid sensitivity and persistence of the response. *Res. Vet. Sci.* 44 (3): 320-323.

JACOBS, D. E.; PITT, S. R.; FOSTER, J. and FOX, M. T. (1987): Interactions between chemoprophylaxis and immunity to bovine parasitic gastroenteritis and bronchitis: pilot studies using an oxfendazole pulse release bolus. *Res. Vet. Sci.* 43: 273-275.

JACOBS, D. E.; FOSTER, J. GOWLING, G.; PILKINGTON, J. G.; FOX, M. T. and RYAN, W. G. (1989): Comparative study of early-season prophylaxis using ivermectin

- with lungworm vaccination in the control of parasitic bronchitis and gastroenteritis in cattle. *Vet. Parasitol.* 34: 45-56.
- JAIN, N.C. (1993a):** The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. En "*Essentials of Veterinary Hematology*". Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. USA; pp: 349-380.
- JAIN, N. C. (1993b):** Examination the blood and bone marrow. En *Essentials of Veterinary Haematology*. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. USA; pp: 7
- JASMER, D. P.; WESTCOTT, R. B. and CRANE, J. W. (1987):** Survival of third-stage larvae of Washington isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* exposed to cold temperatures. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 54: 48-52.
- JASMER, D. P.; PERRYMAN, L. P.; CONDER, G. A.; CROW, S. and McGUIRE, T. C. (1993):** Protective immunity to *Haemonchus contortus* induced by immunoaffinity isolated antigens that share a phylogenetically conserved carbohydrate gut surface epitope. *J. Immunol.* 151: 5450-5460.
- JASMER, D. P.; PERRYMAN, L. P. and McGUIRE, T. C. (1996):** *Haemonchus contortus* GA1 antigens: related phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein and released from the nematode during infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93: 8642-8647.
- JONES, D. A. C.; RILEY, J.; KERBY, N. W. and KNOX, D. P. (1991):** Isolation and preliminary characterisation of a 48-kilodalton metalloproteinase from the excretory/secretory components of the frontal glands of *Porocephalus penntastomids*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46: 61-72.
- JONES, D.G. (1993):** The eosinophil. *J. Comp. Pathol.* 108: 317-335.
- JONES, W. O. and EMERY, D. L. (1991):** Demonstration of a range of inflammatory mediators released in trichostrongylosis of sheep. *Int. J. Parasitol.* 21 (3): 361-363.
- JONES, W. O.; WINDON, R. G.; STEEL, J. W. And OUTERIDGE, P. M. (1990):** Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 20: 1075-1079.
- JONES, W. O.; HUNTLEY, J. F. and EMERY, D. L. (1992):** Isolation and degranulation of mucosal mast cells from the small intestine of parasited sheep. *Int. J. Parasitol.* 22 (4): 519-521.
- JONES, W. O.; EMERY, D. L.; McCLURE, S. J. and WAGLAND, B. M. (1994):** Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 24: 519-525.

JORDAN, H. E.; PHILIPS, W. A.; MORRISON, R. D.; DOYLE, J. J. and MCKENZIE, K. (1988): A 3-year study of continuous mixed grazing of cattle and sheep: parasitism of offspring. *Int. J. Parasitol.* 18: 779-784.

JORGENSEN, L. T.; LEATHWICK, D. M.; CHARLESTON, W. A. G.; GODFREY, P. L.; VLASSOFF, A. and SUTHERLAND, I. A. (1998): Variation between hosts in the development success of the free-living stages of trichostrongyle infections of sheep. *Int. J. Parasitol.* 28: 1352.

KARANU, F. N.; MCGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C.; BESSER, T. E. and JASMER, D. P. (1997): CD4⁺T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19: 435-445.

KASSAY, T. (1999): Phylum Nematelminthes-roundworms. *Veterinary Helminthology*. Butterworth-Heinemann. Oxford. UK.

KANEKO, J. J. (1980): Apendix VI. Normal concentrations of blood constituents in domestic animals. *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*. Ed: Kaneko, J. J. pp: 794.

KATONA, I. M.; URBAN, J. F. And FINKELMAN, F. D. (1988): The role of L₃ T₄⁺ and Lyt-2⁺T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* 140 (9): 3206-3211.

KAY, A. B. ; BARATA, L.; MENG, Q.; DURHAM, S. R. and YING, S. (1997): Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *Int. Archv. All. Immunol.* 113: 196-199.

KEITH, K. A.; DUNCAN, M. C.; MURRAY, M.; BAIRDEN, K. and TAIT, A. (1990): Stage-specific cuticular proteins of *Ostertagia circumcincta* and *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.* 20: 1037-1045.

KELLY, J. D.; WHITLOCK, H. V. ; THOMPSON, H. G.; HALL, C. A.; MARTÍN, I. C. A. and LE JAMBRE, L. F. (1978): Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole antihelminthics. *Res. Vet. Sci.* 25: 376-385.

KENNEDY, M. W. (1989): Genetic control of the immune repertoire in nematode infections. *Parasitol. Today.* 5: 316-324.

KERBOEUF, D.; HOSTE, H.; HUBERT, J. and Le STANG J. P. (1996): Response of cattle treated with fenbendazole slow release bolus to challenge from nematodes the following season. *Vet. Parasitol.* 62: 107-118.

KHAN, W. I.; ABE, T.; ISHIKAWA, N. And YOSHIMURA, K. (1995): Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti-CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. *Parasite Immunology.* 17: 485-491.

-
- KIMAMBO, A. E. and Mac RAE, J. C. (1988):** Measurement in vitro of a larval migration inhibitory factor in gastrointestinal mucus of sheep made resistant to the roundworm, *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 28 (3): 213-222.
- KIMAMBO, A. E.; MacRAE, J. C. and DEWEY, P. L. (1988):** The effect of daily challenge with *Trichostrongylus colubriformis* larvae on the nutrition and performance of immunologically resistant sheep. *Vet. Parasitol.* 28: 205-212.
- KITA, H. And GLEICH, G. J. (1997):** Eosinophils and IgE receptors: a continuing controversy [editorial; comment]. *Blood.* 89: 3497-3501.
- KLESIUS, P. H. (1988):** Immunity to *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 27 (1-2): 159-167.
- KLESIUS, P. H. ; WASHBURN, S. M.; CIORDIA, H.; HAYNES, T. B. and SNIDER, T. G. (1984):** Lymphocyte reactivity to *Ostertagia ostertagi* antigen in tipe I ostertagiasis. *Am. J. Vet. Res.* 45 (2): 230-233.
- KLESIUS, PH; SNIDER, TG; HORTON, LW; CROWDER, CH (1985a):** Visualization of eosinophil chemotactic factor in abomasal tissue of cattle by immunoperoxidase staining during *Ostertagia ostertagi* infections. *Vet. Parasitol.* 31: 49-56.3
- KLESIUS, PH; HAYNES, TB; CROSS, DA (1985b):** Chemotactic factors for eosinophils in soluble extracts of L3 stages of *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.* 15: 517-522.
- KLESIUS, P. H.; HAYNES, T. B.; CROSS, D. A. and CIORDIA, H. (1986):** *Ostertagia ostertagi*: excretoty secretory chemotactic substance from infective larvae as cause of eosinophil locomotion. *Exp. Parasitol.* 61 (1): 120-125.
- KLESIUS, P. H.; SNIDER, T. G.; HORTON, L. W. and CROWDER, C. H. (1989):** Visualisation of eosinophil chemotactic factor in abomasal tissue of cattle by immunoperoxidase staining during *Ostertagia ostertagi* infection. *Vet. Parasitol.* 31 (1): 49-56.
- KLOOSTERMAN, A.; BENEDICTUS, J. and AGHINA, H. (1980):** Colostral transfer of anti-nematode antibodies in cattle and its significance for protection. *Vet. Parasitol.* 7: 133.
- KLOOSTERMAN, A.; BORGSTEEDE, F. H. M. and EYSKER, M. (1985):** The effect of experimental *Ostertagia ostertagi* infection in stabled milking cows on egg output, serum pepsinogen levels, antibody titres and milk production. *Vet. Parasitol.* 17 (4): 299-308.
- KLOOSTERMAN, A.; PLOEGER, H. W. and FRANKENA, K. (1991):** Age resistance in calves to *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. *Vet. Parasitol.* 39 (1-2): 101-113.
-

Bibliografía

- KLOOSTERMAN, A.; PARMENTIER, H. K. and PLOEGER, H. W. (1992):** Breeding cattle and sheep for resistance to gastrointestinal nematodes. *Parasitol. Today*. 8: 330-335.
- KNIGHT, R. A. and RODGERS, D. (1974):** Age resistance of lambs to single inoculation with *Haemonchus contortus*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 41: 116.
- KNOX, D. P. and SMITH, W. D. (2001):** Vaccination against gastrointestinal nematodes using gut-expressed antigens. *Vet. Parasitol.* 100(1-2): 32-32.
- KNOX, D. P.; REDMOND, D. L. and JONES, D. G. (1993):** Characterisation of proteases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology*. 106: 395-404.
- KNOX, D. P.; REDMOND, D. L.; SKUCE, P. J. and NEWLANDS, G. F. J. (2001):** The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 101 (3-4): 311-335.
- KOBAYASHI, K.; HAMADA, Y.; BLASER, M. J. and BROWN, W. R. (1991):** The molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium. *J. Immunol.* 146: 68-74.
- KONNO, A.; HASHIMOTO, Y.; KON, Y.; OKADA, K. and DAVIS, W. C. (1995):** Expression of $\gamma\delta$ T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 105-112.
- KOOYMAN, F. N.; VAN KOOTEN, P. J.; HUNTLEY, J. F.; MacKELLAR, A.; CORNILISSEN, A. W. and SCHALLING, H. D. (1997):** Production of a molecular antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitol.* 114: 395-406.
- KOOYMAN, F. N.; SCHALLING, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A.; HUNTLEY, J. F.; CORNELISSEN, A. W. and VERDELDE, L. (2000):** Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. *Parasite Immunol.* 22: 13-20.
- KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, K. and TADA, I. (1991a):** The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Immunology*. 72 (4): 502-507.
- KORENAGA, M.; WATANABLE, N. and TADA, I. (1991b):** Effects of anti-IgE monoclonal antibody on a primary infection of *Strongyloides ratti* in mice. *Parasitol. Res.* 77 (4): 362-363.
- KUTHER, K.; AUDIGE, L.; KUBE, P. And WELLE, M. (1998):** Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. *Cell and Tissue Research*. 293: 111-119.
-

-
- KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G. and ROOS, M. H. (1994):** Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with conserved mutation at amino acid 200 β -tubulin isotype I. *Molec. Biochem. Parasitol.* 63: 299-303.
- LAFFAU, G.; PERY, P. and PETIT, A. (1981):** Self-cure and immunity following infection and reinfection in ovine haemonchosis. *Vet. Parasitol.* 9: 57-67.
- LAMKHIQUED, B.; GOUNNI, A. S.; GRUART, V.; PIERCE, A.; CAPRON, A. And CAPRON, M. (1995):** Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur. J. Immunol.* 25: 117-125.
- LAMMAS, D. A.; MITCHELL, L. A. and WAKELIN, D. (1987):** Adoptative transfer of enhanced eosinophilia and resistance to infection in mice by an in vitro generated T cell line specific for *Mesocestoides corti* larval antigen. *Parasite Immunol.* 9 (5): 591-601.
- LANDSVERK, T. (1987):** The follicle-associated epithelium of the ileal Peyer's patch in ruminants is distinguished by its shedding of 50 nm particles. *Immunol. Cell. Biol.* 65: 251.
- LANDSVERK, T.; HALLERAKER, M.; ALEKSANDERSEN, M.; McCLURE, S.; HEIN, W. and NICANDER, L. (1991):** The intestinal habitat for organised lymphoid tissues in ruminants. Comparative aspects of structure, function and development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28;1.
- LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRNOFF, G. and GALLI, S. J. (1998):** Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and immunity to parasites. *Nature.* 392: 90-93.
- LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J. and HENRIKSEN, S. A. (1997):** Biological control of gastro-intestinal nematodes –facts, future or fiction?. *Vet. Parasitol.* 72: 479-492.
- LASCELLES, A. K.; BEH, K. J.; MUKKUR, T. K. and WATSON, D. L. (1986):** The mucosal immune system with particular reference to ruminant animals. En: *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Ed: Morrison, W. I. Cambridge Press, Cambridge. Reino Unido.
- LEE, D. L. and MARTÍN, J. (1976):** Changes in *Nematodirus battus* associated with the development of immunity to this nematode in lambs. En: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*. Ed: H. van den Bossche. Amsterdam: Elsevier North Holland. Pp: 311-318.
- LEE, G. B. and OGILVIE, B. M. (1981):** The mucus layer in intestinal nematode infections. En: *The Mucosal Immune System in Health and Disease*. Editores: P. L. Ogra y J. Bienenstock. Columbus: Ross Laboratories. Pp: 175-183.
- LEIGHTON, E. A.; MURRELL, K. D. and GASBARRE, L. C. (1989):** Evidence for genetic control of nematode egg-shedding rates in calves. *J. Parasitol.* 75: 498-504.
-

Bibliografía

- LE JAMBRE, L. F. ; MARTÍN, P. J. and JARRETT, R. G. (1982):** Comparison of changes in resistance of *Haemonchus contortus* eggs following withdrawal of thiabendazole selection. *Res. Vet. Sci.* 32: 39-43.
- LEWIS RA; AUSTEN KF (1981):** Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature.*293: 103-108.
- LIEBLER, E. M.; PAAR, M. And POHLENZ, J. F. (1991):** M cells in the rectum of calves. *Res. Vet. Sci.* 51: 107.
- LIN, D.S.; BOWMAN, D. D. (1991):** Cellular responses of cats with primary toxoplasmosis. *J. Paras* 77:272-279.
- LLOYD, S. and SOLSBY, E. J. L. (1987):** Immunobiology of gastro-intestinal nematodes of ruminants. En: *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*. Vol I, CRC Press. Boca Raton. FL. USA. 1-41.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. H.; FARR, A. L. AND RANDALL, R. J. (1951):** Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-268
- LUSTIGMAN, S.; HUIMA, T.; BROTMAN, B.; MILLER, K. and PRICE, A. (1990):** *Onchocerca volvulus*: Biochemical and morphological characteristics of the surface of third- and fourth-stage larvae. *Exp. Parasitol.*, 71: 489-495.
- McLAREN, D. J.; ORTEGA-PIERRES, G. and PARKHOUSE, R. M. E. (1987):** *Trichinella spiralis*: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitology*, 94: 101-114.
- MACALDOWIE, C. N.; HUNTLEY, J. F.; MACKELLAR, A.; McINNES, C. And 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60: 97-110.
- MACALDOWIE, C. N.; MACKELLAR, A. And HUNTLEY, J. F. (1998):** The isolation and purification of a dual specific mast cell-derived protease from parasitised caprine jejunal tissue. *Res. Vet. Sci.* 64: 17-24.
- MACLEAN, J. M.; LEWIS, D. and HOLMES, P. H. (1987):** The pathogenesis of benzimidazole-resistant and benzimidazole-susceptible strains of *Trichostrongylus colubriformis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Helminthol.* 61: 179-189.
- MADDEN, K. B.; URBAN, J. F.; ZILTENER, H. J.; SCHRODER, J. W. ; FINKELMAN, F. D. and KATONA, I. M. (1991):** Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-involved mastocytosis. *J. Immunol.* 147 (4): 1387-1391.
- MAFF (1989):** Helminthology. London: Her Majesty's Stationery Office. Reino Unido; pp: 1-68.
-

- MAINGI, N.; SCOTT, M. E. and PRICHARD, R. K. (1990):** Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology*, 100: 327-335.
- MAIZELS, R. M. and SELKIRK, M. E. (1988):** Biology and immunochemistry of nematode antigens. En: *The Biology of Parasitism*. Editores: P. T. England and A. Sher. Alan R. Liss, pp: 285-308.
- MAIZELS, R. M.; BLAXTER, M. L.; ROBERTSON, B. D. AND SELKIRK, M.E. (1991):** Parasite Antigens, Parasite Genes. En: *A Laboratory Manual for Molecular Parasitology*. Cambridge University Press. New York, USA. pp: 1-6
- MAIZELS, R. M.; KENNEDY, M. W.; MEGHJI, M.; ROBERTSON, B. D. and SMITH, H. V. (1987):** Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* 139:207-214.
- MANSON-SMITH, D. F.; BRUCE, R. G. and PARROTT, D. M. V. (1979):** Villous atrophy and expulsion of intestinal *Trichinella spiralis* are mediated by T cells. *Cell. Immunol.* 47: 285-292.
- MANSOUR, M. M.; DIXON, J. B.; CLARKSON, M. J.; CARTER, S. D.; ROWAN, T. G. and HAMMET, N. C. (1990):** Bovine immune recognition of *Ostertagia ostertagi* larval antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24: 361-371.
- MANSOUR, M. M.; ROWAN, T. G.; DIXON, J. B. and CARTER, S. D. (1991):** Immune modulation by *Ostertagia ostertagi* and the effects of diet. *Vet. Parasitol.* 39 (3-4): 321-332.
- MANSOUR, M. M.; DIXON, J. B.; ROWAN, T. G. and CARTER, S. D. (1992):** Modulation of calf immune responses by *Ostertagia ostertagi*: the effect of diet during trickle infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33 (3): 261-269.
- MARTÍN ANDRÉS, A. Y LUNA del CASTILLO, J. de D. (1994):** Regresión lineal. En: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Editado por Martín Andrés, A. Y Luna del Castillo, J. de D. Cuarta edición. Ediciones Norma S.A. Madrid, España; pp: 451-466.
- MARTÍN, P. J.; ANDERSON, N.; BROWN, T. H. and MILLER, D. W. (1988):** Changes in resistance of *Ostertagia* spp. To thiabendazole following natural selection or treatment with levamisole. *Int. J. Parasitol.* 18: 333-340.
- MARTÍN, W. B.; THOMAS, B. A. C. and URQUHART, G. M. (1957):** Chronic diarrhoea in housed cattle due to atypical parasitic gastritis. *Vet. Rec.* 69: 736-739.
- McALESSE, S. M. ; PEMBERTON, A. D.; McGRATH, M. E.; HUNTLEY, J. F. And MILLER, H. R. P. (1998):** Sheep mast-cell proteinases-1 and -3: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling of the enzymes and further studies on substrate specificity. *Biochemical Journal.* 333: 801-809.

Bibliografía

- McCLURE, S. J.; DUDLER, L.; THORPE, D. and HEIN, W. R. (1988):** Analysis of cell division among subpopulations of lymphoid cells in sheep. II. Peripheral lymphocytes. *Immunology*, 65; 401.
- McCLURE, S. J. and EMERY, D. L. (1993):** Recent advances in veterinary immunology, particularly mucosal immunity. En: *Veterinary Vaccines*. Ed: Peters, A. R. Butterworth, Oxford, Reino Unido.
- McCLURE, S. J. and EMERY, D. L. (1994):** Cell-mediated responses against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. En: *Cell-mediated immunity in ruminants*. Ed: Goddeeris, B. M. L. and Morrison, W. I. Florida. USA.
- McCLURE, S. J.; WAGLAND, B. M. and EMERY, D. L. (1991):** Effects of Freund's adjuvants on local, draining and circulating lymphocyte populations in sheep. *Immunol. Cell. Biol.* 69 (Pt 6): 361-367.
- McCLURE, S. J.; EMERY, D. L.; WAGLAND, B. M. and JONES, W. O. (1992):** A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int. J. Parasitol.* 22 (2): 227-234.
- McCLURE, S. J.; EMERY, D. L. and HUSBAND, A. J. :** Effects of adjuvant and route of administration on the intestinal immune response of sheep to ovalbumin. *Immunology*.
- McCLURE, S. J.; DAVEY, R. J.; LLOYD, J. B. and EMERY, D. L. (1995):** Depletion of IFN-gamma, CD8+ or TCR gamma delta+ cells *in vivo* during primary infection with an enteric parasite (*Trichostrongylus colubriformis*) enhances protective immunity. *Immunol. Cell. Biology.* 73: 552-555.
- McGILLIVERY, D. J.; YONG, W. K.; ADLER, B. and RIFFKIN, G. G. (1992):** A purified stage-specific 31 kDa antigen as a potential protective antigen against *Ostertagia circumcincta* infection in lambs. *Vaccine* 10(9): 607-613.
- McKAY, D. M. and BIENENSTOCK, J. (1994):** The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. Today.* 15: 533-538.
- McKENZIE, G.J.; BANCROFT, A.; GRENCIS, R. K. and McKENZIE, N. J. (1998):** A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Current Biology.* 8: 339-342.
- McMICHAEL-PHILIPS D; MUNN EA and GRAHAM M (1995):** Helminth Parasite Antigen With Aminopeptidase-Like Activity. *International patent Application.* WO 95/12671.
- MEEUSEN, E. N. T. (1996):** Rational design of nematode vaccines: natural antigens. *Int. J. Parasitol.* 26: 813-818.
- MEEUSEN, E. N. T. (1999):** Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet. Parasitol.* 84: 259-273.
-

-
- MEEUSEN, E. N. T. and BALIC, A. (1999):** Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. *Parasitology Today (en prensa)*.
- MEEUSEN, E. N. T. and MADDOX, J. F. (1999):** Progress and expectations for helminth vaccines. *Adv. Vet. Med.* 41: 241-256.
- MEEUSEN, E.; GORRELL, M. D.; RICHARD, M. D. And BRANDON, M. R. (1989):** Lymphocyte subpopulations of sheep in protective immunity to *Taenia hydatigena*. *Parasite Immunol.* 11: 169-181.
- MEEUSEN, E.; FOX, A.; BRANDON, M. R. and LEE, C. S. (1993):** Activation of uterine intraepithelial $\gamma\delta$ T cell receptor positive lymphocytes during pregnancy. *European Journal of Immunology.* 23: 1112-1117.
- MEHLHORN, H. and WALLDORF V. (1988):** Life cycles: En: *Parasitology in Focus: Facts and Trends*. Editores: H. Mehlhorn. Berlin. Springer-Verlag
- MERTENS, B.; GOBRIGHT, E. and SEOW, H. F. (1996):** The nucleotide sequence of bovine interleukin-5-encoding cDNA. *Gene.* 176: 273-274.
- MICHEL, J. F. (1963):** The phenomena of host resistance and the course of infection of *Ostertagia ostertagi* in calves. *Parasitology.* 53: 63-84.
- MICHEL, J. F. (1969):** Some observations on the worm burdens of calves infected daily with *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology.* 59: 575-595
- MICHEL, J. F. (1970):** The regulation of populations of *Ostertagia ostertagi* in calves. *Parasitology.* 61: 435-447.
- MICHEL, J. F. (1973):** Acquired resistance to *Ostertagia* infection. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 66: 778.
- MICHEL, J. F.; LANCASTER, M. B. and HONG, C. (1972):** Host induced effects on the vulval flap of *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.* 2: 305-317.
- MICHEL, J. F.; LANCASTER, M. B. and HONG, C. (1973):** *Ostertagia ostertagi*: protective immunity in calves. *Exp. Parasitol.* 33: 170-186.
- MICHEL, J. F.; LANCASTER, M. B. and HONG, C. (1973):** The effect of age, acquired resistance, pregnancy and lactation on some reactions of cattle to infection with *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology.* 79: 157-168.
- MICHEL, J. F.; LANCASTER, M. B.; HONG, C. and BERRETT, S. (1978b):** Plasma pepsinogen levels in some experimental infections of *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Rec.* 103: 370-373.
- MILLER, H. R. P. (1984):** The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6: 167-259.
-

Bibliografía

- MILLER, H. R. P. (1986):** Mucosal mast cells, basophils, immediate hypersensitivity reactions and protection against gastrointestinal nematodes. En: *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Morrison, W. I. Ed: Cambridge University Press. United Kingdom.
- MILLER, H. R. P. (1993):** Immunopathology of gastrointestinal nematode infestation and expulsion. *Current Opinion in Gastroenterology*. 9: 986-993.
- MILLER, H. R. P. (1996):** Mucosal mast cells and allergic response against nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54: 331-336.
- MILLER, H. R.; JACKSON, F.; NEULANDS, G. And APPLEYARD, W. T. (1983):** Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 35: 357-363.
- MILLER-PODRAZA, H. And FISHMAN, P. H. (1982):** Translocation of newly synthesized gangliosides to the cell surface. *Biochemistry*. 21:3265-3270.
- MILTON, J. S. (1994):** Regresión y correlación. En: *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. Editado por McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España; pp: 339-352.
- MOLINA, JM. (1992):** Aportaciones al diagnóstico inmunológico de la paratuberculosis caprina. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral.
- MOLINA, JM; GUTIÉRREZ, AC; RODRÍGUEZ-PONCE, E; VIERA, JA Y HERNÁNDEZ S. (1997):** Abomasal nematodes in goats from the subtropical island of Gran Canary (Spain). *Vet. Res.* 28; pp: 259-270.
- MOLINA, J. M.; RUIZ, A.; RODRÍGUEZ-PONCE, E.; GUTIÉRREZ, A. C.; GONZÁLEZ, J. F. and HERNÁNDEZ, S. (1999):** Cross-reactive antigens of *Haemonchus contortus* adult worm in *Teladorsagia circumcincta* infected goats. *Vet. Res.* 30: 393-399.
- MULLIGAN, W.; DALTON, R. G. and ANDERSON, N. (1963):** Ostertagiasis in cattle. *Vet. Rec.* 75: 1014.
- MONROY, F. G.; EAST, I. J.; DOBSON, C. and ADAMS, J. H. (1989):** Immunity in mice vaccinated with a molecular weight 60000 glycoprotein secreted by adult *Nematospiroides dubius*. *Int. J. Parasitol.* 19: 71-76.
- MOQBEL, R (1986):** Helminth-induced intestinal inflammation. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 719-727.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A. and COFFMAN, R. L. (1986):** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
-

- MOULD, A. W.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G. And FOSTER, P. S. (1997):** Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J. Clin. Invest.* 99: 1064-1071.
- MUNN, E. A. (1977):** A helical, polymeric extracellular protein associated with the luminal surface of *Haemonchus contortus* intestinal cells. *Tiss. Cells.* 9: 23-34.
- MUNN, E. A.; GRAHAM, M. and COADWELL, W. J. (1987):** Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* 94: 385-397.
- MURRAY J and SMITH WD (1994):** Ingestion of host immunoglobulin by three non-blood-feeding nematode parasites of ruminants. *Res. Vet. Sci.* 57: 387-389.
- MURRAY, M. (1969):** Structural changes in bovine ostertagiasis associated with increased permeability of the bowel wall to macromolecules. *Gastroenterology.* 56: 763-772.
- MURRAY, M.; JENNINGS, F. W. and ARMOUR, J. (1970):** Bovine ostertagiasis: structure function and mode of differentiation of the bovine gastric mucosa and kinetics of the worm loss. *Res. Vet. Sci.* 2: 417-427.
- NANGIA, O. P.; AGARWAL, V. K. and SINGH, A. (1968):** Studies on blood cellular constituents of female Beetal goats from birth to over five years of age. *Indian J. Anim. Sci.* 38: 616-625.
- NANSEN, P.; STEFFAN, P. E.; CHRISTENSEN, C. M.; GASBARRE, L. C.; MONRAD, J.; GRONVOLD, J. and HENRIKSEN, S. A. (1993):** The effect of experimental trichostrongyle infections of housed young calves on the subsequent course of natural infection on pasture. *Int. J. Parasitol.* 23(5): 627-638.
- NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; ABE, T.; KHAN, A.; BING-SHI, ITOH, H.; IDE, H. and UCHIYAMA, F. (1994):** Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite Immunol.* 16: 333-338.
- NELSON, D. S. y GATTI, R. A. (1960):** Humoral factors influencing lymphocyte transformation. *Progr Allergy* 21: 261-341.
- NEUTRA, M. R.; PRINGAULT, E. and KRAEHENBUHL, J. P. (1996):** Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275-300.
- NEWLANDS, G. F. J.; MILLER, H. R. P. and JACKSON, F. (1990):** Immune exclusion of *Haemonchus contortus* larvae in the sheep: effects on gastric mucin of immunization, larval challenge and treatment with dexamethasone. *J. Comp. Pathol.* 102 (4): 433-442.
- NEWTON, S. E. and MUNN, E. A. (1999a):** Progress in the development of vaccines against gastrointestinal parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today.* 15: 116-122.

NEWTON SE; MUNN EA (1999b): The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15: 116-122.

NEWTON, S. E.; MONTI, J. R.; GREENHALGH, C. J.; ASHMAN, K. and MEEUSEN, E. N. T. (1997): cDNA cloning of galectins from the third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86: 143-153.

NIEW AMERONGEN, A. V.; BOLSCHER, J. G.; BLOMENA, E. and VEERMAN, E. C. (1998): Sulfomucins in the human body. *Biological Chemistry.* 379: 1-18.

NOBLE, E. R.; NOBLE, G. A.; SCHAD, G. A. and MacINNES, A. J. (1989): Section V: Phylum Nematoda. 15. Class Secernentea (= Phasmodia), Orders Tylenchida, Rhabditida, Strongylida. Parasitology. *The Biology of Animal Parasites.* Lea & Febiger. Philadelphia. USA.

ODUYE, O. O. (1976): Haematological values of nigerian goats and sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 8: 131-136.

OPPENHEIM, J. J.; DOUGHERTY, S.; CHAN, S. C.; BAKER, J. (1975): Utilization of lymphocyte transformation to assess clinical disorders. En: *Laboratory Diagnosis of Immunological Disorders.* Editado por: Vyas, G. N. Grune and Stratton, New York. USA. pp: 87-109.

O'SULLIVAN, B. M. and DONALD, A. D. (1970): A field study of nematode parasite populations in the lactating ewe. *Parasitology.* 61: 301-315.

O'SULLIVAN, B. M. and DONALD, A. D. (1973): Responses to infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in ewes of different reproductive status. *Int. J. Parasitol.* 3 (4): 521-530.

OUHELLI, H.; BENZAOUIA, T.; PANDEY, V. S. and DAKKAK, A. (1981): Etude épidémiologique de certaines parasitoses du mouton au Maroc atlantique par utilisation de la méthode des "animaux traceurs". *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.* 34: 319-324.

PALLAORO, M.; GAMBACURTA, A.; FIORUCCI, L.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. and ASCOLI, F. (1996): cDNA cloning and primary structure of trypsin from bovine mast cells and evidence for the expression of bovine pancreatic trypsin inhibitor mRNA in the same cells. *Eur. J. Biochem.* 237: 100-105.

PANDEY, V. S. (1972): Effects of temperature on survival of the free-living stages of *Ostertagia ostertagi*. *J. Parasitol.* 58: 1042-1046.

PANDEY, V. S. (1976): Effect of desiccation on survival of the infective larvae of *Ostertagia ostertagi*. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 24: 315-320.

PANDEY, V. S.; OUHELLI, H.; DAKKAK, A. and CABARET, J. (1990): Epidemiology of gastrointestinal helminths of sheep in the Rabat area of Morocco. *Ann. Rech. Vét.* 21: 259-266.

- PANDEY, V. S.; CHAER, A. and DAKKAK, A. (1993): Effect of temperature and relative humidity on survival of eggs and infective larvae of *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 49: 219-227.
- PARKHOUSE, R. M. E. and ORTEGA-PIERRES, G. (1984): Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 88: 620-630.
- PATTERSON, D. M.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J. F.; STEVENSON, L. M.; JONES, D. G.; JACKSON, E.; RUSSEL, A. J. (1996): Studies on caprine responsiveness to nematodiasis: segregation of male goats into responders and non-responders. *Int. J. Parasitol.* 26(2): 187-94.
- PENGALLY, C. (1999): Antiparasitics: products and markers. *Animal Pharm. Reports*. PJB publications, London. UK.
- PERDUE, M.; MASSON, S.; WILLIAMS, K.; KOSECKA-JANISZEWSK, U. and CROWE, S. (1990): The mucosal mast cell response and resultant functional abnormalities in the intestine. En *Mucosal Immunology*. Ed: Cripps, A. W. Newey & Beath, Newcastle. Reino Unido. 14.
- PERNTHANER, A.; CABAJ, W.; STANKIEWICZ, M.; DAVIES, J. and MAASS, D. (1997a): Cytokine mRNA expression and IFN-gamma production of immunised nematode resistant and susceptible lambs against natural poly-generic challenge. *Acta Parasitologica*. 42: 180-186.
- PERNTHANER, A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P. G. C. and MAASS, D. R. (1997b): Cytokine mRNA expression and IFN-gamma production in nematode resistant and susceptible line lambs artificially infected with gastro-intestinal nematodes. *Acta Parasitologica*. 42: 55-61.
- PFEFFER, A.; DOUCH, P. G.; SHAW, R. J.; GATEHOUSE, T. K. ; RABEL, B.; GREEN, R. S. ; SHIRER, C. L.; JONAS, W. E. and BISSET, S. (1996): Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. *Int. J. Parasitol.* 26: 765-773.
- PLOEGER, H. W.; KLOOSTERMAN, A.; BORGSTEEDE, F. H. M. and EYSKER, M. (1990a): Effect of naturally occurring nematode infections in the first and second grazing season on the growth performance of second-year cattle. *Vet. Parasitol.* 36: 57-70.
- PLOEGER, H. W.; KLOOSTERMAN, A. and BORGSTEEDE, F. H. M. (1990b): Effect of antihelminthic treatment of second-year cattle on growth performance during winter housing and first lactation yield. *Vet. Parasitol.* 36: 311-323.
- PLOEGER, H. W.; KLOOSTERMAN, A. and RIETVELD, F. W. (1995): Acquired immunity against *Cooperia* spp. and *Ostertagia* spp. In calves: effect of level of exposure and timing of the midsummer increase. *Vet. Parasitol.* 58: 61-74.
- POMROY, W. E. and CHARLESTON, W. A. G. (1989a): Development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Vet. Parasitol.* 33: 283-288.

POMROY, W. E. and CHARLESTON, W. A. G. (1989b): Failure of young goats to acquire resistance to *Haemonchus contortus*. *N. Z. Vet. J.* 37: 23-26.

PORTER, P.; POWELL, J. R. and BARRATT, M. E. J. (1987): Inter-relationships between mucosal and systemic immunity determining the balance between damage and defence in the bovine gut in response to environmental antigens. En: *Recent Advances in Mucosal Immunology*. Ed: McGhee, J. R.; Mestecky, J.; Ogra, P.L. and Bienenstock, J. Plenum Press. Part B, 901. New York. USA

PRATT, D.; COX, G. N.; MILHAUSEN, M. J. and BOISVENUE, R. J. (1990): A development regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 181-192.

PRATT, D.; ARMES, L. G.; HAGEMEN, R.; REYNOLDS, V.; BOISVENUE, R. and COX, G. N. (1992a): Cloning and sequence comparison of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 209-218.

PRATT, D.; BOISVENUE, R. J. and COX, G. N. (1992b): Isolation of putative cysteine protease genes of *Ostertagia ostertagi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 39-48.

PRESS, C.; McCLURE, S. J. and LANDSVERK, T. (1991): Computer assisted morphometric analysis of absorptive and follicle associated epithelia of Peyer's patches in sheep fetuses and lambs indicates the presence of distinct T and B cell compartments. *Immunol.* 72: 368.

PRESSON, B. L.; GRAY, G. D. and BURGESS, S. K. (1988): The effect of immunosuppression with dexamethasone on *Haemonchus contortus* infections in genetically resistant Merino sheep. *Parasite Immunol.* 10 (6): 675-680.

PRITCHARD, D. I.; LEGGETT, K. V. ; ROGAN, M. T.; McKEAN, P. G. and BROWN, A. (1991): *Necator americanus* secretory acetylcholinesterase and its purification from excretory-secretory products by affinity chromatography. *Parasite Immunol.*, 13: 187-199.

PRUD'HOMME, G. J.; KONO, D. H. and THEOFILOPOULOS, N. (1995): Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 β , interleukin-10, interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. *Molec. Immunol.* 32: 495-503.

PRUETT, J. H. (1999): Immunological control of arthropod ectoparasites- a review. *Int. J. Parasitol.* 29: 25-32

RAINBIRD, M. A.; MACMILLAN, D. and MEEUSEN, E. N. T. (1998): Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and IL-5. *Parasite Immunol.* 20: 93-103.

RALEIGH, J. M. and MEEUSEN, E. N. T. (1996): Developmentally regulated expression of a *Haemonchus contortus* surface antigen. *Int. J. Parasitol.* 26: 673-675.

- RALEIGH, J. M.; BRANDON, M. R. and MEEUSEN, E. (1996):** Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*. *Par. Immunol.* 18: 125-132.
- REHMAN, A. and JASMER, D. P. (1998):** A tissue specific approach for analysis of membrane and secreted proteins from *Haemonchus contortus* gut and its application to diverse nematode species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97: 55-68.
- REID, J. F. S.; ARMOUR, J.; JENNINGS, F. W.; KIRKPATRICK, K. S. and URQUHART, G. M. (1967):** The fasciolosis ostertagiasis complex in young cattle: A guide to diagnosis and therapy. *Vet. Rec.* 80: 371-374.
- REYNAUD, C. A.; MACKAY, C. R.; MÜLLER, R. G. and WEILL, J. C. (1991):** Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ; the sheep ileal Peyer's patch. *Cell*, 64; 995.
- REYNOLDS, J. D. (1987):** Peyer's patches and the early development of B lymphocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 135, 43.
- REYNOLDS, J. D. (1988):** Lymphocyte traffic associated with the gut: a review of *in vitro* studies in sheep. En: *Migration and Homing of Lymphoid Cells*. Ed: Husband, A. J. CRC Press, Boca Raton.
- RHOADS, M. L. and FETTERER, R. H. (1995):** Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like proteases by *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 81: 505-512.
- RHOADS, M. L. and FETTERER, R. H. (1997):** Extracellular matrix: a tool for defining extracorporeal digestion of parasite proteases. *Parasitology Today.* 13: 119-122.
- RIEDEL-CASPARI, G. and SCHIMDT, F. W. (1987):** Additional protection of neonatal calves against infection by colostral cells?. *Immunobiology*, 4 (Suppl.) 83.
- RIFFKIN, G. G. and DOBSON, C. (1979):** Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infections. *Vet. Parasitol.* 5: 365-378.
- RIFFKIN, G. G. and YONG, W. K. (1984):** Recognition of sheep with have innate resistance to Trichostrongylid nematode parasites. En: *Immunogenetic Approaches to the Control of endoparasites, with particular reference to Parasites of Sheep*. Eds: Dineen, J. K. and Outteridge. CSIRO & AWC. Melbourne. Australia.
- RISS, T. L. and MORAVEC, R. A. (1992):** Comparison of MTT, XTT and novel tetrazolium compound for MTS for *in vitro* proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)*; 3:184a.
- RITCHIE, J. D. S.; ANDERSON, N.; ARMOUR, J.; JARRETT, W. F. H.; JENNINGS, F. W. and URQUHART, G. M. (1966):** Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: parasitology and pathogenesis of a single infections. *Am. J. Vet. Res.* 27 (118): 659-667.

Bibliografía

ROBERTS, F. H. S. (1957): Reactions of calves to infestation with the stomach worm *Haemonchus placei*. *Aust. J. Agric. Res.* 8: 740-767.

ROTHWELL, T. L. W. (1989): immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int. J. Parasitol.* 19 (2): 139-168.

ROTHWELL, T. L. W.; PRICHARD, R. K. and LOVE, R. J. (1974): Studies on the role of histamine and 5-hydroxytryptamine in immunity against the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. I. *In vivo* and *in vitro* effects of the amines. *Int. Arch. Allergy.* 46 (1): 1-13.

ROY, E. A.; HOSTE, H.; FULLER, P.; TATARCZUCH, L. and BEVERIDGE, I. (1996): Development of morphological changes and ileal glucagon gene expression in the small intestine of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *J. Comp. Pathol.* 115: 441-453.

RUBIN, R. and LUCKER, J. T. (1956): Acquired resistance to *Dyctiocaulus viviparus*, the lungworm of cattle. *Cornell Vet.* 46: 88-96.

RUIZ, A.; MOLINA, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ-PONCE, E. and CONDE, M. M. (2001): Ensayo de inmunoprotección en cabars frente a *Haemonchus contortus* mediante el empleo de proteinasas tipo cisteína aisladas de homogenizados de vermes adultos. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 8(2): 364.

SACKS, D. L.; SELKIRK, M.; OGILVIE, B. M. and ASKONAS, B. A. (1980): Intrinsic immunosuppressive activity of different trypanosome strains with parasitic virulence. *Nature.* 283: 476-478.

SALMA, S. K. and DUNCAN, J. L. (1984): The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 16: 43-54.

SALMA, S. K. and DUNCAN, J. L. (1985): Studies on the abomasal pathology of immunized and non-immunized sheep infected with *Haemonchus contortus*. *J. Helminth.* 59: 351-359.

SAUMA, S. Y. ; TANAKA, T. M. and STRAND, M. (1991): Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46: 73-80.

SCHALLING, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A.; BERNADINA, W. E. And HENDRIKX, W.M. (1994a): Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 57: 63-68.

SCHALLING, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A. and HENDRIKX, W.M. (1994b): Immune responses of Texel sheep to excretory / secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 108: 351-357.

-
- SCHALLING, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A. and HENDRIKX, W. M. (1995): Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet. Parasitol.* 56: 149-162.
- SCAHLING, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A. and CORNELISSEN, A. W. (1997): Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol.* 19: 447-453.
- SCHILLHORN, T. W. (1981): Ostertagiasis in cattle: pathophysiological and epidemiological considerations. *Compend. Cont. Ed. Prac. Vet.* 3: S175-S181.
- SCHMIDT, E. E.; SUÁREZ, V. H. and CABARET, J. (1998): Nematode genera diversity in cattle: similarity of between-sire progenies. *Vet. Res.* 29: 139-148.
- SCHULZE-KOOPS, H.; LIPSKY, P. E.; KAVANAUGH, A. F. and DAVIS, L. S. (1995): Elevated Th1- or Th10-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 155: 5029-5037.
- SCUDAMORE, C. L.; McMILLAN, L.; THORNTON, E. M.; WRIGHT, S. H.; NEWLANDS, G. F. J. and MILLER, H. R. P. (1997): Mast cell heterogeneity in the gastrointestinal tract. *Am. J. Pathol.* 150: 1661-1672.
- SEATON, D. S.; JACKSON, F.; SMITH, W. D. and ANGUS, K. W. (1989a): Development of immunity to incoming radiolabelled larvae continuously infected with *Trichostrongylus vitrinus*. *Research in Veterinary Science.* 46: 22-26.
- SEATON, D. S.; JACKSON, F.; SMITH, W. D. and ANGUS, K. W. (1989b): Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with *Ostertagia circumcincta*. *Res. Vet. Sci.* 46: 241-246.
- SEDMAK, J. J. AND GROSSBERG, S. E. (1977): A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal Biochem* 79:544-552.
- SELKIRK, M. E.; DENHAM, D. A.; PARTONO, F.; SUTANTO, I. and MAIZELS, R. M. (1986): Molecular characterisation of antigens of lymphatic filarial parasites. *Parasitology*, 91: S15-S38.
- SELMAN, I. E.; REID, J. F. S. and ARMOUR, J. (1976): Type II ostertagiasis in adult cattle. *Vet. Rec.* 99: 141-143.
- SHAMANSKY, L. M. ; PRATT, D.; BOISVENUE, J.; COX, G. N. (1989): Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 73-86.
- SHAW, R. J.; GATEHOUSE, T. K. and McNEILL, M. M. (1998): Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 28: 293-302.
-

- SHELDRAKE, R. F. (1989):** Mucosal immunology: concepts and applications. En: *Post Graduate Committee of Veterinary Science Proceedings* 118, (clinical immunology). University of Sidney, Sydney. 259.
- SHELDRAKE, R. F. and HUSBAND, A. J. (1985):** Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs. *Res. Vet. Sci.* 39 (1):10-15.
- SHER, A.; COFFMAN, R. L.; HIENY, S. and CHEEVER, A. W. (1990):** Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.* 145 (11): 3911-3916.
- SHELTON, G. C. and GRIFFITHS, H. J. (1967):** *Oesophagostomum colombianum*: Experimental infection in lambs; effects of different types of exposure on the intestinal lesions. *Pathologica Veterinaria.* 4: 413-434.
- SHUBBER, A. H.; LLOYD, S. and SOULSBY, E. J. L. (1984):** Immunological unresponsiveness of lambs to infection with *Haemonchus contortus*. Effect of infection in the ewe on the subsequent responsiveness of lambs. *Z. ParasitenKde.* 70 (2): 219-228.
- SILBERSTEIN, D. S. and DESPOMMIER, D. D. (1984):** Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. Immunol.*, 132: 898-904.
- SINSKI, E.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; EISLER, P. H.; HOLMES, P. H.; McKELLAR, Q. A.; MURRAY, M. and STEAR, M. J. (1995a):** Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 58: 61-74.
- SINSKI, E.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; EISLER, M. C.; HOLMES, P. H.; McKELLAR, Q. A.; MURRAY, M. and STEAR, M. J. (1995b):** Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 59: 107-118.
- SKUCE, P. J.; STEWART, E. M.; SMITH, W. D. and KNOX, D. P. (1999a):** Cloning and characterisation of glutamate dehydrogenase (GDH) from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* 118: 297-304.
- SKUCE, P. J.; REDMON, D. L.; LIDDELL, S.; STEWART, E. M.; NEWLANDS, G. F. J.; SMITH, W. D. and KNOX, D. P. (1999b):** Molecular cloning and characterisation of gut-derived cysteine proteases associated with a host-protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 119: 396-405.
- SLOSS, M.W.; KEMP, R.L.; ZAJAC, A.M. (1994):** Veterinary Clinical Parasitology. Editado por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L.. *American Association of Veterinary Parasitologists.* Iowa. USA.
- SMITH, B. P. (1990):** Parasite Control Programs. En: *Large Animal Internal Medicine.* Editado por: Robert W. Reinhardt. Mosby. Missouri. USA.
- SMITH, N. C.; WALLACH, M.; PETRACCA, M.; BRAUN, R. and ERCKERT, J. (1994):** Maternal transfer of antibodies induced by infections with *Eimeria maxima*
-

partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. *Parasitology*. 109: 551-557.

SMITH, S.K.; PETTIT, D.; NEWLANDS, G.F.; REDMON, D. L.; SKUCE, P. J.; KNOX, D. P. and SMITH, W. D. (1999): Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvilliar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 21: 187-199.

SMITH, T. S.; MUNN, E. A.; GRAHAM, M.; TAVERNOR, A. and GREENWOOD, C. A. (1993): Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 23: 271-277.

SMITH, T. S.; GRAHAM, M.; MUNN, E. A.; NEWTON, S. E.; KNOX, D. P.; COADWELL, W. J.; McMICHAEL-PHILLIPS, D.; SMITH, H.; SMITH, W. D. and OLIVER, J. J. (1997): Cloning and characterisation of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1338: 295-306.

SMITH, W. D. (1991): *Morechum Annual Report*.

SMITH, W. D. (1993): Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. *Res. Vet. Sci.* 54 (1): 94-101.

SMITH, W. D. (1999): Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int. J. Parasitol.* 29: 17-24.

SMITH, W.D. and ANGUS, K. W. (1980): *Haemonchus contortus*: attempts to immunize lambs with irradiated larvae. *Res. Vet. Sci.* 29 (1): 45-50.

SMITH SB; GIBBS HC (1981): Effects of naturally acquired mixed helminth parasitism in yearling dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1065-1072.

SMITH, W. D.; JACKSON, F. and WILLIAMS, J. (1983a): Studies on the local immune response of the lactating ewe infected with *Ostertagia circumcincta*. *J. Comp. Pathol.* 93 (2): 295-305.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E. and WILLIAMS, J. (1983b): Local immunity and *Ostertagia circumcincta*: changes in the gastric lymph of immune sheep after challenge infection. *J. Comp. Pathol.* 93 (3): 479-488.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E. and WILLIAMS, J. (1983c): Local immunity and *Ostertagia circumcincta*: changes in the gastric lymph of sheep after primary infections. *J. Comp. Pathol.* 93: 471-478.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E.; WILLIAMS, J.; WILLADSEN, S. M. and FEHILLY, C. B. (1984a): Resistance to *Haemonchus contortus* transferred between genetically histocompatible sheep by immune lymphocytes. *Res. Vet. Sci.* 37 (2): 199-204.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E.; WILLIAMS, J. and MILLER, H. R. P. (1984b): Manifestations of resistance to ovine ostertagiasis associated with immunological responses in the gastric lymph. *J. Comp. Pathol.* 94 (4): 591-601.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E. and WILLIAMS, J. (1985a): Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune response of 4,5 and 10 month-old lambs. *J. Comp. Pathol.* 95: 235-245.

SMITH W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E. and WILLIAMS, J. (1985b): Ovine ostertagiasis: a natural host parasite interaction for studying protective local immune responses in the gut. En: B. Morris and M. Myyasaka (editores). *Immunology of the Sheep*. Roche, Balse, pp: 483-502.

SMITH, W. D.; JACKSON, F.; JACKSON, E. ; GRAHAM, R.; WILLIAMS, J.; WILLADSEN, S. M. and FEHILLY, C. B. (1986): Transfer of immunity to *Ostertagia circumcincta* and IgA memory between identical sheep by lymphocytes collected from gastric lymph. *Res Vet. Sci.* 41(3): 300-306.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K. and MURRAY, J. M. (1994): Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16: 231-241.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K. and PETTIT, D. (2000): Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasite Immunol.* 22: 239-247.

SMITH, W. D.; PETTIT, D. and SMITH, S. K. (2001): Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 23: 203-211.

SNIDER, T. G.; WILLIAMS, J. C.; SHEEHAN, D. S. and FUSELIER, S. H. (1981): Plasma pepsinogen, inhibited larval development, and abomasal lesions in experimental infections of calves with *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 8: 176-183.

SNIDER, T. G.; KLESIUS, P. H. And HAYNES, T. B. (1985): Dermal responses to *Ostertagia ostertagi* in *O. ostertagi* and *Cooperia punctata*-inoculated calves. *Am. J. Vet. Res.* 46 (4): 887-890.

SNIDER, T. G.; WILLIAMS, J. C.; KARNS, P. A.; ROMAIRE, T. L.; TRAMMEL, H. E. and KEARNEY, M. T. (1986): Immunosuppression of lymphocyte blastogenesis in cattle infected with *Ostertagia ostertagi* and/or *Trichostrongylus axei*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11 (3): 251-264.

SNIDER, T. G.; WILLIAMS, J. C.; KNOX, J. W.; MARBURY, K. S.; CROWDER, C. H. and WILLIS, E. R. (1988): Sequential histopathological changes of Type 1, pre-Type II and Type III Ostertagiasis in cattle. *Vet. Parasitol.* 27 (1-2): 169-179.

SOMMERVILLE, R. I. (1953): Development of *Ostertagia circumcincta* in the abomasal mucosa of sheep. *Nature.* 171: 482-483.

-
- SOMMERVILLE, R. I. (1954):** The histotropic phase of the nematode parasite *Ostertagia circumcincta*. *Australian Journal of Agriculture Research*. 5: 130-140.
- SOMMERVILLE, R. I. (1956):** The histology of the ovine abomasum and the relation of the globule leucocyte to nematode infestations. *Aust. Vet. J.* 32: 237.
- SOULSBY, E. J. L. (1979):** The immune system and helminth infection in domestic species. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 23: 71-102.
- SOULSBY, E. J. L. (1982):** *Helminth, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. 7ª edición. London: Bailliere Tindall.
- SOULSBY, E. J. L. (1988):** *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*. 7ª edición. Interamericana, México, D. F.. México.
- SRETER, T.; KASSAI, T. and TAKACS, E. (1994):** The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24: 871-876.
- STAFFORD, K. and COLES, G. C. (1999):** Nematode control practices and antihelminthic resistance in dairy calves in the south west of England. *Vet. Rec.* 144: 659-661.
- STANKIEWICZ, M.; JONALS, W.; DOUCH, P.; RABEL, B.; BISSET, S. and CABAJ, W. (1993):** Globule leucocyte in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J. Parasitol.* 79: 940-945.
- STEAR, M. J. and MURRAY, M. (1994):** Genetic resistance to parasitic disease: particular of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 54: 154-176.
- STEAR, M. J.; NICHOLAS, F. W.; BROWN, S. C.; TIERNEY, T. and RUDDER, R. (1984):** The relationships between the bovine major histocompatibility system and faecal worm egg counts. En: *Immunogenetic Approaches to the Control of Endoparasites*. Ed: Dineen, J. K. & Outteridge. CSIRO Division Animal Health, Melbourne. Australia, pp: 126-133
- STEAR, M. J.; BALDOCK, F. C.; BROWN, S. C.; GERSHWIN, L. J.; HETZEL, D. J. S. ; MILLER, J. E.; NICHOLAS, F. W.; RUDDER, T. H. and TIERNEY, T. J. (1990a):** The genetic control of nematode infections in ruminants. En: *4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Editado por: W. G. Hill, R. Thompson y J. A. Woolliams. Edimburgo. XVI, pp: 449-452.
- STEAR, M. J.; HETZEL, D. J. S.; BROWN, S. C.; GERSHWIN, L. J.; MACKINNON, M. J. and NICHOLAS, F. W. (1990b):** The relationships among ecto and endoparasites levels, class 1 antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Vet. Parasitol.*, 34: 303-321.
- STEAR, M. J.; BISHOP, S. C.; DOLIGALSKA, M.; DUNCAN, J. L.; HOLMES, P. H.; IRVINE, J.; McCRRIRIE, L.; McKELLAR, Q. A.; SINSKI, E. and MURRAY, M.**
-

Bibliografía

(1995a): Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 17: 643-652.

STEAR, M. J. ; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L. and MURRAY, M. (1995b): A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. *Vet. Parasitol.* 60: 69-81.

STEAR, M. J.; BISHOP, S. C.; DUNCAN, J. L.; McKELLAR Q. A. and MURRAY, M. (1995c): The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophils counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.*, 25(3): 375-380.

STEAR, M. J.; BAIRDEN, K.; BISHOP, S. C.; DUNCAN, J. L.; KARIMI, S. K.; McKELLAR, Q. A. and MURRAY, M. (1995d): Different patterns of faecal egg output following infection of Scottish Blackface lambs with *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.*, 59: 29-38.

STEAR, M. J. ; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; HOLMES, P. H.; McKELLAR, Q. A.; PARK, M.; STRAIN, S.; MURRAY, M.; BISHOP, S. C. and GETTINBY, G. (1997): How host control worms [letter]. *Nature.* 389: 27.

STEEL, J. W.; JONES, W. O. and WAGLAND, B. M. (1990): The response of immune sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis*: enteric plasma loss and secretion of biogenic amines. *Int. J. Parasitol.* 20: 1067-1073.

STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNÁNDEZ-BOTRÁN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R. and VITETTA, E. S. (1988): Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 334: 255-258.

STEVENSON, L. M. and JONES, D. G. (1992): Use of enzyme microassay to detect eosinophil potentiating activity in sheep. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 5: 325-330.

STEVENSON, L. M.; HUNTLEY, J. F.; SMITH, W. D. and JONES, D. G. (1994): Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections in lambs. *FEMS-Imm. Med. Micro.* 8: 167-173.

STEVENSON, L. M.; McINNES, C. J.; HAIG, D. M. and JONES, D. G. (1998): Eosinophil-specific biological activity of recombinant ovine interleukin-5. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66: 359-365.

STEWART, D. F. (1953): Studies on the resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. And on the immunological reactions of sheep exposed to infection. V. The nature of the self-cure phenomenon. *Aus. Agric. Res.* 4: 1000-1017.

STEWART, D. F. (1955): "Self cure" in nematode infestations of sheep. *Nature* 176: 1273.

- STITES, D. P.; TERR, A. I. (1991):** Basic and Clinical Immunology. Editado por: Stites, D. P. & Terr, A. I. Seventh edition. Appleton & Lange, Norwalk, USA.
- SUÁREZ, V. H.; LORENZO, R. M.; BABINEC, F. J. and SCHMIDT, E. E. (1995):** Variabilidad genética en el conteo de huevos de nematodos gastrointestinales en ternero Aberdeen Angus. *Revista de Medicina Veterinaria*. 76: 142-146.
- SUTHERLAND, L. A.; LEATHWICK, D. M.; GREEN, R. S.; MILLER, C. M. and BROWN, A. E. (1998):** The effect of continuous drug exposure on the immune response of lambs challenged with drug-susceptible or resistant nematode larvae. *Vet. Res. Comm.* 22: 305-314.
- SUTHERLAND, I. A.; BROWN, A. E.; GREEN, R. S.; MILLER, C. M. and LEATHWICK, D. M. (1999):** The immune response of sheep to larval challenge with *Ostertagia circumcincta* and *O. ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 84: 125-135.
- SVETIC, A.; MADDEN, K. B.; ZHOU, X. D.; LU, P.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D.; URBAN, J. F. Jr. and GAUSE, W. C. (1993):** A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J. Immunol.* 150: 3434-3441.
- SYKES, A. R. and COOP, R. L. (1977):** Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 88: 671-677.
- TAKATS, C.; SCAHLLING, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W. and HENDRIKX, W. M. L. (1995):** Immune responses of sheep to microdissected parts of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 25: 857-860.
- TAVENOR A.S.; SMITH T.S.; LANGFORD C.F.; GRAHAM M.; MUNN E.A. (1992):** Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 14: 671-675.
- TAYLOR, J. B.; VIDAL, A.; TORPIER, G.; MEYER, D. J.; ROITSCH, C.; BALLOUL, J. M.; SOUTHAN, C.; SOUNDERMEYER, P.; PEMBLE, S.; LECOCQ, J. P.; CAPRON, A. and KETTERER, B. (1988):** The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.*, 7: 465-472.
- TAYLOR, S. M.; MALLON, T. R.; KENNY, J. and EDGAR, H. (1995):** A comparison of early and mid-grazing season suppressive antihelminthic treatments for first year grazing calves and their effects on natural and experimental infection during the second year. *Vet. Parasitol.* 56: 75-90.
- #TB112, PROMEGA CORPORATION:** CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin.
- TERRY, R. AND HUDSON, K. (1982):** Immunosuppression in parasitic infections. *Fortschr. Zool. Suppl.* 12 (27): 125-139.

- THATCHER, E. F. and GERSHWIN, L. J. (1989):** Colostral transfer of bovine immunoglobulin E and dynamics of serum IgE in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20: 325-334.
- THATCHER, E. F.; GERSHWIN, L. J. and BAKER, N. F. (1989):** Levels of serum IgE in response to gastrointestinal nematodes in cattle. *Vet. Parasitol.* 32: 153.
- THIENPONT, D.; ROCHETTE, F. and VANPARIJS, O. F. J. (1979):** Huevos de lombrices bovinos y ovinos. *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico.* Janssen Research Foundation
- THIMOTHY, V. B.; DONALD, P. K.; DUBEY, J. P.; GAY, J. M.; MATHISON, B. A. and McELWAIN, T. F. (1996):** Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (6): 1423-1428.
- THOMAS, G. W.; BARTON, N. J.; MCGOWAN, A. A.; MICKAN, F. J. and JAMES, R. E. (1984):** Effect of whole herd antihelminthic treatment on milk production of dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 36: 266-269.
- THRELKELD, W. L. (1934):** The life history of *Ostertagia circumcincta*. *Technical Bulletin No. 5, Virginia Polytechnic Institute, Virginia Agriculture Experimental Station, Blacksburg, Virginia, USA.* 24 pp.
- TORGERSON, P. R. and LLOYD, S. (1992):** Lymphocyte reactivity to antigens of *Haemonchus contortus* in antigen-inoculated and *H. contortus*-naive lambs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1699-1704.
- URBAN, J. F. Jr.; KATONA, I. M.; PAUL, W. E. and FINKELMAN, F. D. (1991):** Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (13): 5513-5517.
- URBAN, J. F. Jr.; MADDEN, K. B.; SVETIC, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P. P.; GAUSE, W. C.; KATONA, I. M. and FINKELMAN, F. D. (1992):** The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127: 205-220.
- URBAN, J. F. Jr.; MALISZEWSKI, C. R.; MADDEN, K. B.; KATONA, I. M. and FINKELMAN, F. D. (1995):** IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *J. Immunol.* 154: 4675-4684.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. and JENNINGS, F. W. (1987):** Veterinary Parasitology, *Longman Scientific and Technical, Avon.*
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. and JENNINGS, F. W. (1996):** Veterinary Parasitology, *Longman Scientific and Technical, Avon.*

- VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; HILDERSON, H. and BERGHEN, P. (1992):** Efficacy of the morantel sustained release trilaminar bolus against gastrointestinal nematodes and its influence on immunity in calves. *Vet. Parasitol.* 44: 97-106.
- VERCRUYSSSE, J.; HILDERSON, H. And CLAEREBOU, E. (1994):** Effect of chemoprophylaxis on immunity to gastrointestinal nematodes in cattle. *Parasitol. Today.* 11: 129-132.
- VERCRUYSSSE, J. and CLAEREBOU, E. (1997):** Immunity development against *Ostertagia ostertagi* and other gastrointestinal nematodes in cattle. *Vet. Parasitol.* 72: 309-326.
- VERMUNT, J. J. ; WEST, D. M. and POMROY, W. E. (1995):** Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zeland. *Vet. Rec.* 137: 43-45.
- VIZMANOS, J.R. y ASENSIO, R. (1976):** Contraste de hipótesis. En: *Curso y ejercicios de bioestadística*. Editado por J.R. Vizmanos y R. Asensio. Centro de promoción reprográfica. Madrid. España; pp: 211-229.
- WAGLAND, B. M.; JONES, W. O.; HRIBAR, L.; BENDIXEN, T. and EMERY, D. L. (1992):** A new simplifies assay for larval migration inhibition. *Int. J. Parasitol.* 22(8): 1183-1185.
- WALLACE, D. S.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L. et al (1996):** Influence of soyabean meal supplementation on the resistance of Scottish blackface lambs to haemonchosis. *Res. Vet. Sci.* 60: 138-143.
- WALLER, P.J. (1977):** Antihelminthic resistance. *Vet. Parasitol.* 72: 391-412.
- WALLER, P. J. and THOMAS, R. J. (1978):** Nematode parasitism in sheep in north-east England: the epidemiology of *Ostertagia* species. *Int. J. Parasitol.* 8: 275-283.
- WANG, H. W.; TEDLA, N.; LLOYD, A.R.; WAKEFIELD, D. and McNEIL, P. H. (1998a):** Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J.Cli. Investigations.* 102: 1617-1626.
- WANG, J.; PALMER, K.; LOTVALL, J.; MILAN, S.; LEI, X. F.; MATTHAEI, K. I.; GAULDIE, J.; INMAN, M. D.; JORDANA, M. and KING, Z. (1998b):** Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. *J. Cli. Invest.* 102: 1132-1141.
- WASHBURN, S. M. and KLESZIUS, P. H. (1984):** Leukokinesis in bovine ostertagiasis: stimulation of leukocyte migration by *Ostertagia*. *Am. J. Vet. Res.* 45 (6): 1095-1098.
- WEBER, T. B. and LUCKER, J. T. (1959):** Immunity against the cattle lungworm: Resistance resulting from initial infection with small numbers of larvae. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 26: 132-137.

WEDRYCHOWICZ, H. (1986): Studies on the antigens of *Ostertagia circumcincta*. III Somatic and metabolic antigens of adult nematodes. *Acta Parasitol. Pol.* 30: 317-326.

WEDRYCHOWICZ, H.; TAIT, A.; BAIRDEN, K. and HOLMES, P. H. (1992): Immune response of sheep to surface antigens of infective larvae of *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol.*, 19: 249-266.

WEDRYCHOWICZ, H.; HOLMES, P. H.; BAIRDEN, K. and TAIT, A. (1994): Surface and excretory/secretory antigens of fourth-stage larvae and adult *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 53: 117-132.

WELLER, P. F. (1997): Human eosinophils. *J. All. Cli. Immunol.* 100: 283-287.

WIGGIN CJ; GIBBS HC (1987): Pathogenesis of simulated natural infections with *Ostertagi ostertagi* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 48: 274-280.

WIGGIN, C. J. and GIBBS, H. C. (1990): Adverse immune reactions and the pathogenesis of *Ostertagia ostertagi* infections in calves. *Am. J. Vet. Res.* 51 (5): 825-832.

WINDON, R. G. and DINEEN, J. K. (1981): The effect of selection of both sire and dam on the response of F₁ generation lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int. J. Parasitol.* 11: 11-18.

WINTER, M. D. ; WRIGHT, C. and LEE, D. L. (1997): The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitology.* 114: 189-193.

WIGGIN, C. J. and GIBBS, H. C. (1989): Studies of immunomodulatory effects of low-level infection with *Ostertagia ostertagi* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1764-1770.

WIGGIN, C. J. and GIBBS, H. C. (1990): Adverse immune reactions and the pathogenesis of *Ostertagia ostertagi* infection in calves. *Am. J. Vet. Res.* 51: 825-832.

WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B.; NEBEN, T.; KARP, C. and DONALDSON, D. (1998): Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 282: 2258-2261.

WOOLASTON, R. R.; BARGER, I. A. and PIPER, L. R. (1990): Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 20: 1051-1058.

WOOLASTON, R. R.; MANUELI, P.; EADY, S. J.; BARGER, I. A.; LEJAMBRE, L. F.; BANKS, D. J. and WINDON, R. G. (1996): The value of circulating eosinophil count as a selection criteria for resistance of sheep to trichostrongyle parasites. *Int. J. Parasitol.* 26: 123-126.

YAKOUB, A.; HOLMES, P. H. and ARMOUR, J. (1983): Pathophysiology of gastrointestinal trichostrongyles in sheep: plasma losses and changes in plasma pepsinogen levels associated with parasite challenge of immune animals. *Res. Vet. Sci.* 34: 305-309.

- YANG, C.; GIBBS, H. C. and XIAO, L. (1993a): Immunologic changes in *Ostertagia ostertagi*-infected calves treated strategically with an antihelmintic. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1074-1083.
- YANG, C.; GIBBS, H. C.; XIAO, L. and WALLACE, C. R. (1993b): Prevention of pathophysiologic and immunomodulatory effects of gastrointestinal nematodiasis in calves by use of strategic antihelmintic treatments. *Am. J. Vet. Res.* 54: 2048-2055.
- YONG, W. K.; EDWARDS, L. D. and HUCKER, D. A. (1985): Peripheral blood white cells responses during concurrent copper deficiency and gastro-intestinal nematodiasis in sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 63: 273-281.
- YONG, W. K.; SAUNDERS, M. J.; MORTON, R. E.; HERMON, M.; MCGILLVERY, D. J.; HOOPER, I. J.; MORGAN, P.; RIFFKIN, G. G.; CUMMINS, L. J. and THOMPSON, R. M. (1991): Immunology of ostertagia resistance. En: G. D. Gray and R. R. Woolaston, *Breeding for Disease Resistance in Sheep*. Australian Wool Corporation, Melbourne.
- YOSHIDA, T.; IKUTA, K.; SUGAYA, H.; MAKI, T.; TAKAGI, M.; KANAZAWA, H.; SUNAGA, S.; KINASHI, T.; YISHIMURA, K.; MIYAZAKI, S.; TAKAKI, S. and TAKATSU, K. (1996): Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angylostrongylus cantonensis* in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity.* 4: 483-494.
- YOUNG, R. R. (1983): Populations of free-living stages of *Ostertagia ostertagi* and *O. circumcincta* in a winter rainfall region. *Aust. J. Agric. Res.* 34: 569-581.
- ZAJAC, A. M.; KRAKOWKA, S.; HERD, R. P. and McCLURE, K. E. (1990): Experimentally *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 36 (3-4): 221-235.
- ZIEGLER, J. B.; HANSEN, P.; PENNY, R. (1975): Intrinsic lymphocyte defect in Hodgkin's disease: analysis of the phytohemagglutinin dose response. *Clin Immunol Immunopathol* 3: 451-461.
- ZINSSATAG, J.; ANKERS, P.h.; NIJE, M.; SMITH, T.; PANDEY, V. S. ; PFISTER, K. and TANNER, M. (2000): Heritability of gastrointestinal nematode faecal egg counts in West Africa village N'Dama cattle and its relation to age. *Vet. Parasitol.* 89: 71-78.

ANEXO

11.- ANEXO

Tabla I

Valores promedio de recuentos fecales de huevos de los animales del lote A durante la primera fase del experimento.

SEMANAS	RECUENTOS FECALES
1	0 ± 0
2	0 ± 0
3	40 ± 39
4	95 ± 104
5	85 ± 67
6	90 ± 61
7	115 ± 58
8	115 ± 111
9	165 ± 160
10	120 ± 79
11	140 ± 102
12	145 ± 96
13	115 ± 85
14	65 ± 34
15	40 ± 46
16	50 ± 71

Tabla II

Valores promedio de recuentos fecales de huevos de los animales del lote A2 y el B1 durante la segunda fase del experimento.

SEMANAS	LOTE A2	LOTE B1
24	0 ± 0	0 ± 0
25	0 ± 0	0 ± 0
26	10 ± 22	0 ± 0
27	70 ± 84	33 ± 58
28	50 ± 112	33 ± 58
29	10 ± 22	0 ± 0
30	90 ± 109	100 ± 61
31	300 ± 245	183 ± 92

Tabla III

Promedio de las variables diferencia de absorbancia obtenidos en el test de transformación linfoblástica por los animales del lote A y B durante la primera fase del experimento.

Semanas	Lotes	Diferencia de absorbancia					
		Con A	PHA	PWM	Ag1	Ag2	Ag3
0	A	0.2 ± 0.16	0.118±0.08	0.163±0.0147	0.61±0.091	0.033±0.076	0.021±0.051
	B	0.09±0.06	0.063±0.038	0.055±0.023	0.019±0.048	0.025±0.044	0.015±0.019
1	A	0.17±0.162	0.067±0.196	-0.002±0.24	-0.002±0.2	0.022±0.022	0.02±0.015
	B	0.154±0.066	0.072±0.058	0.039±0.048	0.034±0.027	0.008±0.005	0.021±0.022
2	A	0.075±0.062	0.071±0.049	-0.021±0.06	0.013±0.051	-0.006±0.05	-0.01±0.09
	B	0.103±0.079	0.099±0.061	0.021±0.057	0.011±0.028	0.004±0.011	0.005±0.006
3	A	0.068±0.069	0.092±0.082	-0.028±0.1	0.046±0.086	0.044±0.083	0.05±0.079
	B	0.063±0.083	0.078±0.074	-0.032±0.07	-0.008±0.05	-0.036±0.05	-0.045±0.07
4	A	0.125±0.102	0.141±0.09	0.114±0.086	0.062±0.067	0.038±0.051	0.037±0.059
	B	0.148±0.067	0.156±0.058	0.12±0.058	0.059±0.006	0.03±0.049	0.03±0.119
5	A	0.058±0.033	0.092±0.062	0.055±0.029	0.028±0.046	0.01±0.027	0.018±0.032
	B	0.1±0.034	0.17±0.022	0.105±0.001	-0.021±0.01	-0.028±0.02	-0.028±0.02
6	A	0.012±0.037	0.056±0.042	-0.011±0.04	-0.028±0.03	-0.026±0.02	-0.03±0.03
	B	0.072±0.098	0.127±0.01	0.088±0.078	-0.001±0.08	-0.042±0.07	-0.035±0.08
7	A	0.051±0.03	0.082±0.061	0.051±0.067	0.021±0.052	0.008±0.03	-0.006±0.03
	B	0.096±0.023	0.054±0.043	0.018±0.027	0.002±0.069	-0.046±0.05	-0.145±0.07
9	A	0.146±0.083	0.143±0.078	0.087±0.092	0.038±0.045	0.013±0.052	-0.005±0.06
	B	0.119±0.047	0.063±0.085	0.061±0.061	0.001±0.031	-0.019±0.02	-0.014±0.04
11	A	0.068±0.041	0.098±0.046	0.038±0.027	0.001±0.037	-0.009±0.03	-0.012±0.03
	B	0.078±0.087	0.104±0.109	0.039±0.071	0.025±0.026	0.005±0.03	-0.004±0.01

Tabla IV

Promedio de las variables diferencia de absorbancia obtenidos en el test de transformación linfoblástica por los animales del lote A1, B1 y B2 durante la segunda fase del experimento.

Semanas	Lotes	Diferencia de absorbancias					
		Cón A	PHA	PWM	Ag1	Ag2	Ag3
24	A1	0.037±0.055	0.066±0.077	0.024±0.06	0.023±0.082	0.013±0.09	0.01±0.081
	B1	0.148±0.096	0.163±0.059	0.048±0.057	0±0.014	-0.01±0.01	-0.031±0.04
	B2	0.166±0.066	0.19±0.024	0.207±0.033	0.064±0.041	0.024±0.044	0.027±0.084
25	A1	0.012±0.021	0.037±0.063	0.009±0.066	0.046±0.049	-0.035±0.1	-0.05±0.091
	B1	0.045±0.028	0.047±0.054	0.022±0.041	0.026±0.036	-0.016±0.03	-0.049±0.03
	B2	0.122±0.04	0.13±0.059	0.116±0.06	0.043±0.066	-0.002±0.09	-0.023±0.06
27	A1	0.06±0.036	0.06±0.036	0.046±0.051	0.005±0.035	-0.004±0.04	-0.017±0.03
	B1	0.078±0.04	0.083±0.052	0.052±0.024	0.111±0.081	0.041±0.051	0.054±0.066
	B2	0.087±0.007	0.114±0.022	0.072±0.005	-0.022±0.03	0.006±0.017	-0.012±0.02
29	A1	0.041±0.022	0.02±0.031	0.025±0.035	0.006±0.027	-0.003±0.02	-0.004±0.02
	B1	0.059±0.042	0.033±0.041	0.018±0.091	0.025±0.046	-0.103±0.2	-0.124±0.23
	B2	0.087±0.041	0.07±0.013	0.113±0.018	0.002±0.028	-0.005±0.03	-0.014±0.02
31	A1	0.05±0.029	0.05±0.03	0.068±0.038	0.008±0.029	-0.005±0.03	-0.011±0.03
	B1	0.068±0.041	0.058±0.06	0.037±0.06	0.032±0.072	0.015±0.053	-0.005±0.02
	B2	0.104±0.024	0.08±0.018	0.09±0.04	0.042±0.06	0.007±0.022	-0.015±0.02

Tabla V

Variable diferencia de absorbancias obtenidas al restar el valor promedio de absorbancias obtenidos por el lote inoculado (lote A) y el valor obtenido por los animales del lote testigo (lote B) a lo largo de la primera fase del experimento, tanto con antígeno crudo como con antígeno tratado con periodato sódico (NaIO₄).

Semanas	Diferencia de OD	
	Antígeno crudo	Antígeno con NaIO ₄
0	9.4	-2.07
1	5.56	6.22
2	3.73	3.72
3	7.52	16.79
4	34.83	34.78
5	17.42	20.02
6	17.24	23.61
7	17.22	16.97
8	19.4	20.57
9	26.49	11.51
10	19	10.15
11	20.89	14.33
12	32.72	36.4
13	31.67	29.98
14	12.84	24.64
15	12.03	18
16	13.78	9.71
17	13.4	11.11

Tabla VI

Variable diferencia de absorbancias obtenidas al restar el valor del promedio de absorbancias obtenidos por los distintos lotes entre sí, a lo largo de la segunda fase del experimento. Datos con antígeno crudo y tratado previamente con periodato sódico (NaIO₄)

Semanas	Diferencias de OD					
	A2-B1		A2-B2		B1-B2	
	Ag. crudo	NaIO ₄	Ag. crudo	NaIO ₄	Ag. crudo	NaIO ₄
23	22.55	12.72	21.66	16.83	-5.79	4.11
24	6.1	17.66	16.25	21.38	10.15	3.72
25	6.43	9.17	24.13	25.7	17.7	16.53
26	6.23	8.23	22.1	24.1	21.2	22.5
27	5.9	8.26	20.15	21.1	19.22	20.13
28	2.3	6.1	18.23	19.6	24.1	25
29	2.6	3.6	15.8	16.1	22.1	23
30	1.5	2.6	17.8	19	16.5	17.9
31	-0.5	2	17	18	15	16.1

Tabla VII

Valores de los parámetros del hemograma. Lote A, animales inoculados, lote B, grupo testigo durante la primera fase del experimento.

Semanas	Lotes	Hemograma			Serología	
		Hfc. (%)	Hb. (g/dl)	Leuc. Totales (ul)	Prof. P. Tot. (g/dl)	Fibrinogeno (mg/dl)
0	A	28.9 ± 3.4	8.9 ± 1	15830 ± 5789	5.9 ± 0.5	244 ± 133
	B	23.4 ± 4.1	8 ± 2.4	15167 ± 5810	4.9 ± 0.5	200 ± 200
1	A	24.1 ± 2.9	8 ± 0.7	16790 ± 6658	5.6 ± 0.6	289 ± 145
	B	24.4 ± 1.6	8.6 ± 0.6	14200 ± 2960	5.5 ± 0.6	133 ± 115
2	A	26.2 ± 3.2	8.4 ± 0.9	13840 ± 4340	6.1 ± 0.8	244 ± 194
	B	28.3 ± 4.2	8.8 ± 0.6	13400 ± 3143	5.7 ± 0.6	333 ± 230
3	A	25.5 ± 4.2	8 ± 1	10090 ± 3967	5.9 ± 0.7	340 ± 237
	B	25.9 ± 1.9	8 ± 0.5	11933 ± 1436	5.6 ± 0.4	267 ± 305
4	A	26.6 ± 2.8	8.6 ± 0.8	12890 ± 4960	5.9 ± 0.6	220 ± 148
	B	27.5 ± 5	8.9 ± 1.4	10300 ± 872	5.7 ± 0.9	400 ± 200
5	A	25.6 ± 3	8.7 ± 0.7	12720 ± 4100	6.3 ± 0.7	400 ± 231
	B	27.8 ± 4.5	8.8 ± 1.4	12000 ± 3242	5.7 ± 0.6	333 ± 115
6	A	26.9 ± 4	8.7 ± 1.3	13790 ± 2859	6.2 ± 0.7	260 ± 190
	B	30 ± 2.2	9.4 ± 1	14900 ± 2291	5.9 ± 0.9	400 ± 346
7	A	25.9 ± 4.6	8.4 ± 1	12050 ± 3628	5.8 ± 0.6	320 ± 140
	B	28 ± 3.5	8.9 ± 1.7	13500 ± 5927	5.7 ± 0.5	200 ± 200
8	A	27 ± 3.7	7.2 ± 1.5	13020 ± 4246	6.2 ± 0.7	370 ± 241
	B	28.7 ± 1.5	8.9 ± 2.2	18133 ± 6404	6.3 ± 0.6	600 ± 346
9	A	26.8 ± 3.6	8.1 ± 1.1	10960 ± 2530	6.2 ± 0.8	380 ± 199
	B	26.3 ± 4	9 ± 1.2	14667 ± 7995	5.8 ± 0.2	467 ± 305
10	A	25.6 ± 3.8	8.1 ± 1	11880 ± 3366	6.2 ± 0.8	320 ± 301
	B	29 ± 6.2	9.2 ± 1.6	14700 ± 4590	6.4 ± 0.4	467 ± 305
11	A	26.5 ± 3.1	8.4 ± 0.8	11500 ± 2853	6.4 ± 0.8	420 ± 175
	B	27.5 ± 4.2	9.2 ± 1.4	16267 ± 5204	6.3 ± 0.2	333 ± 231
12	A	26.3 ± 3.6	8.2 ± 0.9	11690 ± 4217	6.4 ± 0.8	520 ± 253
	B	28 ± 4	9 ± 1.6	15033 ± 7203	5.9 ± 0.2	600 ± 400
13	A	26.4 ± 3.8	8.5 ± 1.2	13710 ± 5782	6.4 ± 0.6	540 ± 164
	B	28.9 ± 4.7	9.6 ± 2	16467 ± 6561	5.9 ± 0.4	333 ± 115
14	A	25.9 ± 3.6	8 ± 1.3	16350 ± 5583	6.4 ± 0.7	370 ± 149
	B	30.7 ± 7.1	9.3 ± 2.7	15600 ± 6519	6.3 ± 0.3	267 ± 115
15	A	26.7 ± 5.1		18790 ± 5227	6.2 ± 0.5	530 ± 177
	B	28.3 ± 2.9		24023 ± 4694	6.4 ± 0.9	400 ± 200
16	A	27.5 ± 4.9		18672 ± 4870	6.1 ± 0.5	650 ± 369
	B	27.7 ± 2.5		22887 ± 4591	6.5 ± 0.8	500 ± 435
17	A	29.6 ± 4.2		21405 ± 2472	6.7 ± 0.6	520 ± 303
	B	29.7 ± 3.5		19858 ± 2276	6.2 ± 0.6	433 ± 208

Tabla VIII

Valores de los parámetros del hemograma. Lote A, animales inoculados, lote B, grupo testigo durante la primera fase del experimento.

Semanas	Lotes	Hemograma			Serología	
		Htc (%)	Hb (g/dl)	Leuc. Totales (μl)	Prot. P. Tot. (g/dl)	Fibrinógeno (mg/dl)
23	A2	27.5 ± 4.5	8.7 ± 1.3	11940 ± 1769	6.3 ± 0.4	600 ± 141
	B1	28.5 ± 3.6	9.4 ± 1.6	14233 ± 8420	6.3 ± 0.4	500 ± 100
	B2	28 ± 5.1	9.1 ± 1.4	14670 ± 6218	5.7 ± 0.3	450 ± 212
24	A2	29.2 ± 5.7	7.4 ± 2.9	10660 ± 1161	5.9 ± 1.1	300 ± 173
	B1	27.7 ± 2.1	7 ± 1.5	17100 ± 4887	6.2 ± 0.2	533 ± 115
	B2	26.3 ± 4	9.03 ± 1.2	14667 ± 7995	5.8 ± 0.2	467 ± 305
25	A2	29.4 ± 3.9	8.3 ± 1.9	10660 ± 3716	6.9 ± 0.4	440 ± 89
	B1	28 ± 1.7	8.4 ± 0.8	18633 ± 2581	6.3 ± 0.4	667 ± 503
	B2	29 ± 6.2	9.2 ± 1.6	14700 ± 4590	6.4 ± 0.4	467 ± 305
26	A2	29.5 ± 5.2	8.3 ± 1.5	12300 ± 2681	6.7 ± 0.3	560 ± 261
	B1	31.7 ± 9.9	8.9 ± 3.3	15767 ± 3350	5.9 ± 0.3	600 ± 200
	B2	27.5 ± 4.2	9.2 ± 1.4	16267 ± 5204	6.3 ± 0.2	333 ± 231
27	A2	25.8 ± 6.3	6.1 ± 2.4	11320 ± 3068	6.5 ± 0.4	720 ± 363
	B1	27.7 ± 2.5	5.7 ± 1.1	18533 ± 5311	5.4 ± 1.1	767 ± 493
	B2	28 ± 4	9 ± 1.6	15033 ± 7204	5.9 ± 0.2	600 ± 400
28	A2	28 ± 4.3	7.6 ± 2.5	8280 ± 2411	7.1 ± 0.5	760 ± 219
	B1	28.3 ± 3.5	6.4 ± 2.1	14400 ± 9297	6.3 ± 0.2	600 ± 400
	B2	28.9 ± 4.7	9.6 ± 2	12700 ± 990	5.9 ± 0.4	333 ± 115
29	A2	26.8 ± 4.5	8.2 ± 1.1	9880 ± 2842	7 ± 0.5	480 ± 228
	B1	28.7 ± 3.8	8.4 ± 1.1	18867 ± 3677	6.4 ± 0.3	467 ± 115
	B2	30.7 ± 7.1	9.3 ± 2.7	15600 ± 6520	6.2 ± 0.2	77 ± 133
30	A2	26.5 ± 4.8	9.3 ± 0.9	11560 ± 2855	6.4 ± 0.5	420 ± 148
	B1	28.4 ± 5.5	9.5 ± 1.4	14167 ± 6799	6.2 ± 0.5	400 ± 200
	B2	29.3 ± 5	9.4 ± 2	16300 ± 5125	5.8 ± 0.4	300 ± 115
31	A2	27.1 ± 4.4	8.7 ± 1.7	10530 ± 2831	7 ± 0.4	512 ± 280
	B1	28 ± 4.3	8.4 ± 1.2	15322 ± 5112	6.5 ± 0.2	495 ± 150
	B2	28.7 ± 6	9.1 ± 1.3	16222 ± 6308	6.1 ± 0.3	230 ± 213

Tabla IX

Valores promedios de las fórmulas leucocitarias (μ l) para el lote A (inoculado) y el lote B (testigo) durante la primera fase del experimento.

Semanas	Lotes	Fórmula leucocitaria				
		Neutrófilos segmentados	Neutrófilos bastonados	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos
0	A	6867 ± 2017	59 ± 80	8135 ± 4340	315 ± 433	429 ± 608
	B	7390 ± 3432	47 ± 82	7122 ± 2495	342 ± 276	265 ± 45
1	A	9177 ± 4531	0 ± 0	7058 ± 2768	406 ± 336	149 ± 97
	B	8404 ± 1591	99 ± 90	5412 ± 1258	140 ± 126	144 ± 131
2	A	6740 ± 3126	52 ± 83	6146 ± 3078	117 ± 145	785 ± 557
	B	6517 ± 1314	151 ± 173	5839 ± 2325	341 ± 298	506 ± 504
3	A	6263 ± 3764	57 ± 78	6070 ± 2334	135 ± 157	574 ± 500
	B	5904 ± 1417	34 ± 59	5807 ± 1273	0 ± 0	188 ± 105
4	A	6465 ± 3239	0 ± 0	5756 ± 2299	272 ± 161	396 ± 681
	B	4938 ± 913	62 ± 107	4904 ± 2113	196 ± 152	200 ± 174
5	A	6334 ± 2025	11 ± 35	5371 ± 2102	473 ± 413	488 ± 784
	B	5899 ± 1504	78 ± 74	5656 ± 1889	282 ± 105	85 ± 147
6	A	6566 ± 1592	25 ± 80	6533 ± 2195	244 ± 182	421 ± 463
	B	7410 ± 3425	0 ± 0	6914 ± 1797	346 ± 87	230 ± 217
7	A	6347 ± 2392	36 ± 58	5211 ± 1867	221 ± 249	241 ± 290
	B	5983 ± 1577	27 ± 47	7128 ± 4152	240 ± 315	162 ± 37
8	A	6621 ± 2648	73 ± 81	5922 ± 1850	177 ± 171	226 ± 272
	B	9700 ± 5067	64 ± 110	7806 ± 6374	240 ± 416	306 ± 344
9	A	4887 ± 1179	25 ± 41	5588 ± 1768	77 ± 109	283 ± 263
	B	7440 ± 2780	0 ± 0	7041 ± 5221	147 ± 80	39 ± 68
10	A	4814 ± 1593	25 ± 53	6632 ± 2359	123 ± 169	286 ± 424
	B	6001 ± 1231	0 ± 0	8418 ± 3636	80 ± 139	201 ± 185
11	A	4775 ± 883	22 ± 47	6128 ± 1915	196 ± 163	380 ± 518
	B	7647 ± 1492	0 ± 0	8352 ± 4634	89 ± 78	178 ± 156
12	A	5336 ± 2405	32 ± 102	5963 ± 3096	285 ± 173	59 ± 86
	B	5479 ± 1124	0 ± 0	9366 ± 6037	111 ± 117	39 ± 67
13	A	5506 ± 2624	29 ± 52	7769 ± 6038	199 ± 203	170 ± 236
	B	5417 ± 1408	85 ± 74	10332 ± 5187	160 ± 138	473 ± 469
14	A	7584 ± 2952	142 ± 309	7913 ± 3644	402 ± 398	307 ± 375
	B	6169 ± 2089	77 ± 133	8698 ± 4490	238 ± 209	419 ± 141
15	A	5247 ± 2773	51 ± 85	5810 ± 1750	427 ± 334	442 ± 460
	B	2803 ± 1396	0 ± 0	6521 ± 4442	174 ± 85	204 ± 210
16	A	4939 ± 3373	40 ± 93	8259 ± 2086	859 ± 1038	473 ± 776
	B	4995 ± 420	0 ± 0	8643 ± 4064	322 ± 297	422 ± 220
17	A	4699 ± 1144	21 ± 46	6809 ± 1810	166 ± 160	328 ± 227
	B	4658 ± 975	0 ± 0	11690 ± 1565	95 ± 135	455 ± 436

Tabla X

Valores promedios de las fórmulas leucocitarias (μl) para el lote A2 (reinoculado), el lote B1 (primoinoculado) y el lote B2 (testigo) durante la segunda fase del experimento.

Semanas	Lotes	Fórmula leucocitaria				
		Neutrófilos segmentados	Neutrófilos bastonados	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos
23	A2	4872 ± 1011	57 ± 127	6643 ± 2030	248 ± 180	91 ± 103
	B1	4733 ± 1866	63 ± 55	9198 ± 6730	108 ± 121	131 ± 159
	B2	7345 ± 1780	0 ± 0	7344 ± 4252	128 ± 101	453 ± 315
24	A2	6454 ± 1422	129 ± 167	3545 ± 1442	183 ± 238	348 ± 185
	B1	7833 ± 2990	50 ± 86	4776 ± 1014	91 ± 158	183 ± 234
	B2	7440 ± 2780	0 ± 0	7041 ± 5221	1470 ± 80	39 ± 68
25	A2	6806 ± 2157	26 ± 58	3198 ± 1588	148 ± 188	482 ± 434
	B1	9662 ± 1840	172 ± 174	7296 ± 4922	244 ± 93	1259 ± 348
	B2	6001 ± 1231	0 ± 0	8418 ± 3636	80 ± 139	201 ± 185
26	A2	5571 ± 991	49 ± 68	4940 ± 1379	285 ± 236	1454 ± 506
	B1	5888 ± 1745	161 ± 146	8582 ± 3588	298 ± 119	1172 ± 899
	B2	7980 ± 1819	0 ± 0	8353 ± 4634	111 ± 117	178 ± 156
27	A2	4874 ± 1567	27 ± 60	4910 ± 1263	164 ± 100	1346 ± 651
	B1	10789 ± 5298	0 ± 0	6999 ± 5107	446 ± 214	300 ± 520
	B2	5479 ± 1124	39 ± 67	9366 ± 6038	160 ± 139	39 ± 68
28	A2	3551 ± 1098	30 ± 46	4064 ± 1426	91 ± 126	544 ± 629
	B1	5719 ± 3867	102 ± 127	7385 ± 5018	289 ± 74	822 ± 509
	B2	5417 ± 1408	85 ± 74	10332 ± 5187	238 ± 209	473 ± 469
29	A2	4582 ± 1123	58 ± 131	4671 ± 1920	65 ± 99	484 ± 230
	B1	8597 ± 2058	0 ± 0	8845 ± 2104	205 ± 233	1219 ± 1257
	B2	6169 ± 2089	77 ± 133	8698 ± 4490	238 ± 209	419 ± 141
30	A2	5347 ± 1358	87 ± 87	5624 ± 1702	367 ± 83	135 ± 127
	B1	5251 ± 1740	0 ± 0	7941 ± 3998	471 ± 548	503 ± 517
	B2	5635 ± 1931	0 ± 0	10221 ± 5320	315 ± 218	685 ± 315
31	A2	5010 ± 1205	0 ± 0	5231 ± 1830	85 ± 320	204 ± 130
	B1	6213 ± 1932	0 ± 0	8314 ± 2222	483 ± 444	212 ± 98
	B2	6035 ± 1248	0 ± 0	9451 ± 3321	131 ± 148	605 ± 235

