

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A HAEMONCHUS CONTORTUS EN DOS RAZAS OVINAS CANARIAS

Álvaro Hernández Barral



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA FACULTAD DE VETERINARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Arucas JUNIO 2011





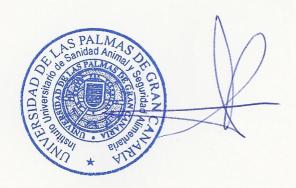
Anexo I

D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 15 de abril de 2011 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: "ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A HAEMONCHUS CONTORTUS EN DOS RAZAS OVINAS CANARIAS" presentada por el doctorando D. Álvaro Hernández Barral, dirigida por el Doctor D. Jorge Francisco González Pérez y codirigida por el Doctor D. José Manuel Molina Caballero y el Dr. D. Francisco Rodríguez Guisado.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a quince de abril de dos mil once.







Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria.

Programa de Doctorado: Sanidad Animal.

Título de la Tesis

"ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE HAEMONCHUS CONTORTUS EN DOS RAZAS CANARIAS"

Tesis Doctoral presentada por D. Álvaro Hernández Barral.

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

El Director,

El Codirector

El Codirector.

El Doctorando,

Jorge F. González Pérez. José M. Molina Caballero Francisco Bodríguez Guisado. Álvaro Hernández Barral.

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de abril de 2011.

D. JORGE FRANCISCO GONZÁLEZ PÉREZ, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, D. JOSÉ MANUEL MOLINA CABALLERO, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y D. FRANCISCO RODRÍGUEZ GUISADO, Catedrático del Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

INFORMAN:

Que D. Álvaro Hernández Barral, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado:

"ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A HAEMONCHUS CONTORTUS EN DOS RAZAS OVINAS CANARIAS"

El cual consideramos cumple la normativa vigente para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Arucas, a 5 de abril de 2011

El Director

El Codirector

El Codirector

Jorge Francisco González Pérez José Manuel Molina Caballero

Francisco Rodríguez Guisado





ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1. INTRODUCCIÓN	9
2. GENERALIDADES SOBRE HAEMONCHUS CONTORTUS Y OTROS	
NEMATODOS GASTROINTESTINALES DEL GANADO OVINO	10
2.1. Clasificación taxonómica y descripción morfológica	10
2.1.1. Superfamilia Trichostrongyloidea Cram, 1927	10
2.1.2. Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912	11
2.1.3. Género Haemonchus Cobb, 1898	11
2.1.4. Haemonchus contortus (Rudolphi, 1803)	11
2.2. El ciclo biológico de los tricostrongílidos en el ganado ovino,	
con especial referencia a H. contortus	12
2.3. Factores epidemiológicos de relevancia en la parasitación por <i>H. contortus</i>	14
2.3.1. Contaminación del pasto con huevos de H. contortus	14
2.3.2. Desarrollo larvario en las heces	15
2.3.3. Modelos epidemiológicos para H. contortus	15
2.3.3.1.Climas templados	15
2.3.3.2.Climas tropicales	17
2.3.3.3.Península Ibérica	17
2.3.3.4.Isla de Gran Canaria	17
2.4. Acción patógena de H. contortus	18
2.4.1. Signos clínicos y lesiones	19
2.5. El uso de fármacos antihelmíticos en la lucha frente a los	
nematodos gastrointestinales	21
2.5.1. Resistencias a los antihelmínticos	22
3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS	
NEMATODOS GASTROINTESTINALES	23
3.1. Introducción	23
3.2. Factores que influyen en la respuesta inmune	24
3.2.1. Edad	24
3.2.2. Sexo	24

3.2.3. Especie, raza e individuo	25
3.2.4. Estado hormonal	25
3.2.5. Nutrición	26
3.2.6. Tratamientos antihelmínticos	27
3.2.7. Patogenicidad de la cepa parasitaria	27
3.3. Inmunidad innata frente a parásitos	28
3.4. Inmunidad adaptativa	30
3.4.1. Presentación del antígeno y orientación de la respuesta inmunológica	30
3.4.1.1. Teoría común de la mucosa	32
3.4.1.2.El binomio Th1/Th2 en pequeños rumiantes	32
3.4.2. Mecanismos efectores de resistencia	33
3.4.2.1.Respuestas linfocitarias	33
a) Respuestas linfocitarias en inoculaciones primarias	34
b) Respuestas linfocitarias en inoculaciones secundarias	35
c) Marcadores de linfocitos T	35
3.4.2.2. Mastocitos, basófilos y leucocitos globulares	36
a) Activación de los mastocitos	37
b) Mastocitos y fenómeno de autocura	38
c) Asociación entre hiperplasia de mastocitos/leucocitos globulares y resistencia	38
d) Función de los mastocitos en la expulsión de nematodos gastrointestinales	39
3.4.2.3. Eosinófilos	40
a) Activación de los eosinófilos	41
b) Eosinofilia en infecciones primarias	42
c) Eosinofilia en infecciones secundarias. Inmunidad adquirida	42
3.4.2.4.Células mucosas y caliciformes	45
3.4.2.5. Efecto del mucus y de la motilidad gastrointestinal	46
3.4.2.6. Efecto de las citoquinas en la respuesta inmune frente	
a nematodos gastrointestinales en rumiantes	47
a) Perfiles de citoquinas en respuestas primarias y secundarias	49
3.4.2.7. Respuesta inmune humoral frente a nematodos gastrointestinales.	51
3.5. Manifestaciones de la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales	54
3.5.1. Frente a estadios larvarios	54
3.5.1.1.Hipobiosis	54
3.5.1.2. Fallo en el establecimiento larvario	55
3.5.2. Manifestaciones de resistencia frente a nematodos adultos	56
3.5.2.1. Expulsión de los vermes adultos	56
3.5.2.2. Cambios en la morfología	57

	Inaices
3.5.2.3. Reducción de la fecundidad	58
3.6. Evasión de la respuesta inmune por el parásito	59
4. ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE COMO	
MÉTODO ALTERNATIVO PARA EL CONTROL DE LOS	
NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN EL GANADO OVINO	60
4.1. Control nutricional	61
4.2. Vacunación	61
4.2.1. Uso de larvas atenuadas	62
4.2.2. Uso de antígenos naturales	62
4.2.3. Uso de antígenos ocultos	63
4.3. Selección genética de la resistencia a los nematodos gastrointestinales	63
4.3.1. Dentro del rebaño	64
4.3.2. Aprovechamiento de razas genéticamente resistentes	
a) Importancia y utilidad de las razas resistentes	67
Explotación de las razas en su medio natural	67
• Utilización de cruces entre razas	67
• Conservación de genes de resistencia	69
• Modelos de respuesta inmune y dianas farmacológicas	69
b) Razas descritas como resistentes frente a H. contortus	70
5. EL OVINO EN LAS ISLAS CANARIAS: OVINO CANARIO DE PELO	
Y OVINO CANARIO	73
5.1. Introducción	73
5.2. El Ovino Canario de Pelo	76
5.3. El Ovino Canario	78
MATERIAL Y MÉTODOS	83
1. ANIMALES	83
2. PARÁSITOS	83
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	84
3.1. Inoculación experimental	84
3.2. Recogida de sangre y suero	84
3.3. Recogida de heces	84
3.4. Recogida de muestras tras el sacrificio	85
3.4.1. Recogida de muestras para estudio histólogíco e inmunohistoquímico	85
3.4.2. Recogida del contenido abomasal	87

3.4.3. Recogida de mucosa gástrica	87
4. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS	88
4.1. Hematocrito	88
4.2. Proteínas plasmáticas	88
4.3. Recuento total de leucocitos	88
4.4. Recuento diferencial de leucocitos en sangre periférica	89
5. ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS	89
5.1. Recuento de huevos en heces	89
5.2. Recuento de vermes adultos en abomaso	90
5.3. Medida de hembras y recuento de huevos en útero	90
5.4. Recuento de vermes inmaduros presentes en el contenido abomasal	90
5.4.1. Medida de vermes inmaduros presentes en el contenido abomasal	91
5.5. Digestión de la mucosa gástrica y recogida de vermes inmaduros	91
6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN SUERO Y MUCUS MEDIANTE	
ELISA INDIRECTO	92
6.1. Preparación de los antígenos de vermes adultos de <i>Haemonchus contortus</i>	92
6.2. Preparación del antígeno somático de L3 de H. contortus	93
6.3. Análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	93
6.3.1. Reactivos	93
6.3.2. Equipos	94
6.3.3. Procedimiento	94
7. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	97
7.1. Preparación de cortes en parafina	97
7.2. Desparafinado	97
7.3. Tinciones	97
7.3.1. Tinción con hematoxilina-eosina	97
7.3.2. Tinción de Giemsa	97
7.4. Deshidratación y montaje	98
7.5. Recuentos celulares	98
7.5.1. Eosinófilos de la pared gástrica	98
7.5.2. Mastocitos	98
7.5.3. Leucocitos globulares	99
8. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	100
8.1. Preparación de los cortes	100
8.2. Anticuerpos primarios	100
8.3. Procedimiento	100
8.4. Recuentos celulares	101

	İndices
A ANÁLICIC ECTA DÍCTICO	102
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
9.1. Normalidad y homocedasticidad de las variables	103
9.2. Diferencias entre variables puntuales	103
9.3. Modelo General Lineal de medidas repetidas (GLM medidas repetidas)	103
9.4. Coeficiente de correlación de Spearman	104
9.5. Determinación de la ecuación de regresión	104
RESULTADOS	107
1. ESTUDIO PARASITOLÓGICO	108
1.1. Recuentos fecales de huevos	108
1.2. Recuento de vermes adultos	108
1.3. Longitud de los vermes hembras adultas y recuento de huevos en el útero	109
1.4. Recuento de larvas tisulares y luminales y longitud media de las larvas	
recogidas en la luz del abomaso	110
1.5. Correlaciones y regresiones entre variables parasitológicas	110
1.5.1. Ovino Canario	110
1.5.2. Ovino Canario de Pelo	111
2. ESTUDIO HEMATOLÓGICO	114
2.1. Hematocrito	114
2.2. Proteínas plasmáticas	114
2.3. Recuento de eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en sangre periférica	115
2.4. Correlaciones y regresiones entre variables hematológicas	117
2.4.1. Ovino Canario	117
2.4.2. Ovino Canario de Pelo	117
3. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO	
DE LA MUCOSA ABOMASAL	117
3.1. Células efectoras	120
3.1.1. Eosinófilos	120
3.1.2. Mastocitos	120
3.1.3. Leucocitos globulares	120
3.2. Linfocitos (CD2, CD4, CD5, CD8, CD45R, γδ, WC1)	121
3.3. Células presentadoras de antígeno (CD1 y MHC II)	123
3.4. Galectina-14 y galectina-15	123
3.5. Correlaciones entre los distintos tipos celulares	125
3.5.1 Ovino Canario	125

3.5.2. Ovino Canario de Pelo	125
4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL	128
4.1. Inmunoglobulinas específicas séricas	128
4.2. Inmunoglobulinas específicas en el mucus gástrico	129
4.3. Correlaciones entre las distintas inmunoglobulinas	129
4.3.1. Ovino Canario	131
4.3.2. Ovino Canario de Pelo	132
5. CORRELACIONES Y REGRESIONES ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES	139
5.1. Correlaciones entre variables parasitológicas y hematológicas	139
5.1.1. Ovino Canario	139
5.1.2. Ovino Canario de Pelo	139
5.2. Correlaciones entre variables parasitológicas e histológicas	142
5.2.1. Ovino Canario	142
5.2.2. Ovino Canario de Pelo	142
5.3. Correlaciones entre variables parasitológicas y niveles	
de inmunoglobulinas en suero y mucus	144
5.3.1. Ovino Canario	144
5.3.2. Ovino Canario de Pelo	147
5.4. Correlaciones entre variables hematológicas e histopatológicas	149
5.4.1. Ovino Canario	149
5.4.2. Ovino Canario de Pelo	150
5.5. Correlaciones entre variables hematológicas y niveles de inmunoglobulinas	152
5.5.1. Ovino Canario	152
5.5.2. Ovino Canario de Pelo	153
5.6. Correlaciones entre variables histopatológicas y niveles de inmunoglobulinas	154
5.6.1. Ovino Canario	154
5.6.2. Ovino Canario de Pelo	155
5.7. Regresión múltiple de las variables parasitológicas en función	
de las variables histopatológicas y los niveles de inmunoglobulinas	158
5.7.1. Ovino Canario	158
5.7.2. Ovino Canario de Pelo	158
DISCUSIÓN	163
1. INTRODUCCIÓN	163
2. PARASITOLOGÍA	165

2.1. La carga parasitaria fue menor en los ovinos Canarios de Pelo	
que en los ovinos Canarios	165
2.2. Los ovinos Canarios de Pelo presentaron recuentos fecales de huevos	
y fecundidad de los vermes más bajos	166
2.3. Los vermes presentes en los ovinos Canarios de Pelo	
tuvieron menor longitud que los presentes en los ovinos Canarios	167
2.4. La disminución de la fecundidad de los vermes fue la causa principal	
de los menores recuentos de huevos en heces de los ovinos Canarios de Pelo	168
2.5. No hubo diferencias con relación a la cantidad de vermes inmaduros	
ni a su longitud en ambas razas	169
2.6. Los resultados parasitológicos señalan que los ovinos Canarios de Pelo	
fueron más resistentes que los ovinos Canarios y que esta resistencia	
se manifiestó frente a los vermes adultos	170
3. HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	171
3.1. La pérdida de sangre fue menor en los ovinos Canarios de Pelo	
que en los Canarios	171
4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR	172
4.1. Recuentos de leucocitos en sangre	172
4.2. Recuentos de células en la mucosa abomasal	172
4.2.1. Los eosinófilos de la pared abomasal mostraron	
patrones distintos en función de la raza	173
4.2.2. La asociación entre las distintas células presentes en el abomaso	
parece variar según la raza	175
4.3. Asociación entre los recuentos de células en sangre y mucosa gástrica	176
5. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL	177
5.1. Los niveles de inmunoglobulinas séricas no mostraron diferencias entre razas	177
5.2. Diferencias entre razas en los niveles de IgA en mucus	
y en su correlación con los niveles séricos	178
6. CORRELACIONES Y REGRESIONES DE LAS DISTINTAS VARIABLES	179
6.1. Correlaciones entre variables parasitológicas y hematológicas	179
6.1.1. Los ovinos Canarios de Pelo mostraron una mayor resiliencia frente al parásito	179
6.2. Correlaciones entre variables parasitológicas	
y recuentos celulares en sangre y tejido	179
6.2.1. Los eosinófilos de sangre periférica no se relacionaron	
directamente con resistencia en ninguna de las razas	179
6.2.2. Los leucocitos sanguíneos no se asociaron con protección	
en ninguna de las dos razas	180

6.2.3. Los mecanismos de resistencia frente a los parásitos adultos en los	
ovinos Canarios de Pelo implicaron a los eosinófilos y a los linfocitos T $\gamma\delta/WC1^+$	180
6.2.4. Los niveles de linfocitos T CD4 ⁺ se relacionaron con resistencia	
exclusivamente en el ovino Canario	182
6.2.5. Los mastocitos y leucocitos globulares no parecieron desempeñar	
un papel protector en ninguna de las dos razas	182
6.3. Correlaciones entre variables parasitológicas y niveles de galectinas-14 y 15	183
6.4. Correlaciones entre variables parasitológicas y niveles	
de inmunogobulinas en suero y mucus	184
6.4.1. Los niveles de inmunoglobulinas séricas no se relacionaron	
con protección en ninguna de las razas	184
6.4.2. Las IgA del mucus tuvieron una función protectora diferente según la raza	184
6.5. Los componentes de la respuesta inmune protectora se correlacionaron	
positivamente con el hematocrito y las proteínas plasmáticas	186
6.6. Correlación entre recuentos celulares y niveles de inmunoglobulinas	187
6.6.1. Los recuentos de linfocitos en sangre y CD45R ⁺ en mucosa	
no se correlacionaron con los de inmunoglobulinas	187
6.6.2. Interacción entre eosinófilos tisulares, linfocitos T $\gamma\delta^+$ y niveles de IgA	
en el mucus en ovinos de raza Canaria de Pelo	187
6.6.3. El efecto conjunto de las IgA frente a vermes adultos y los linfocitos T CD4 ⁺	
se relaciona con la resistencia individual en los ovinos Canarios	189
6.7. Asociación positiva entre galectinas e IgA del mucus	189
7. ORIENTACIÓN DE ESTUDIOS POSTERIORES	190
CONCLUSIONES	195
BIBLIOGRAFÍA	199
RESUMEN	227
SUMMARY	231
AGRADECIMIENTOS	235
ANEXO I: Comparative experimental <i>Haemonchus contortus</i> infection	
of two sheep breeds native to the Canary Islands	241

ANEXO II: Fecundity in adult Haemonchus contortus parasites	
is correlated with abomasal tissue eosinophils and	
gamma-delta T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep	24′

ABREVIATURAS DE USO MÁS FRECUENTE

APC: células presentadoras de antígeno (antigen presenting cells)

CAN: Canario (ovino)

CAP: Canario de Pelo (ovino)

dpi: días post-inoculación

ES: excreción-secreción (antígenos de)

FEC: recuento fecal de huevos (*fecal egg count*)

GI: gastrointestinales (nematodos)

hpg: huevos por gramo de heces

IFN γ: interferón γ

IL: interleuquina

L3, **L4**: larvas 3 ó 4

MHC I/II: complejo mayor de histocompatibilidad I/II (major histocompatibility

complex)

pi: post inoculación

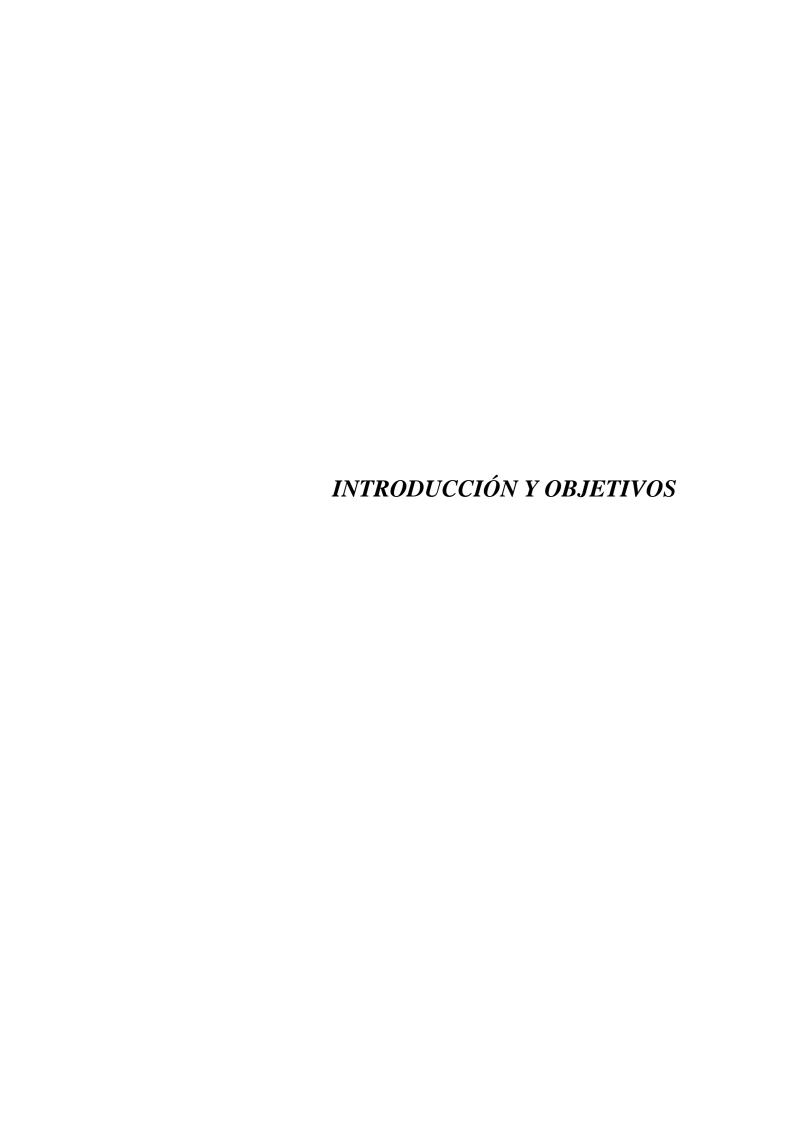
p.v.: peso vivo

p/v: peso / volumen

s: desviación estándar muestral

v/v: volumen/volumen

x: media muestral



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La enorme importancia de la ganadería ovina en España estriba no sólo en los productos derivados de la misma, leche y carne fundamentalmente, sino también en la gran cantidad de empleos directos e indirectos que genera, especialmente en áreas rurales. La cabaña ganadera ovina de las Islas Canarias representa un pequeño porcentaje del total nacional, y está orientada principalmente a la producción de queso, generalmente a base de mezcla de leche de oveja y cabra, así como a la de carne. Se trata de una ganadería en crecimiento, en la que las condiciones naturales de aislamiento han permitido la selección de razas autóctonas de gran interés productivo y genético, muy adaptadas al medio ambiente y a los sistemas de producción locales, entre las que destacan el ovino Canario (CAN) y el ovino Canario de Pelo (CAP).

Una de las mayores amenazas para la rentabilidad de la ganadería de pequeños rumiantes en todo el mundo son las gastroenteritis parasitarias, causadas por nematodos de la familia Trichostrongylidae. En climas tropicales y subtropicales destaca por su elevada prevalencia y patogenicidad la especie hematófaga *Haemonchus contortus*, que se aloja en el abomaso de ovejas y cabras.

Hasta hoy, el control de estos parásitos se ha basado en el uso de fármacos antihelmínticos de probada eficacia. Sin embargo, diversos factores, entre los que destacan la aparición de cepas resistentes del parásito a los distintos fármacos, y el interés creciente entre los consumidores por disminuir los residuos farmacológicos en los productos de origen animal, hacen necesaria la búsqueda de nuevos métodos de control complementarios y/o alternativos. Muchos de ellos tratan de estimular la respuesta inmune del hospedador, mediante la dieta, la administración de vacunas o la selección de animales que manifiesten resistencia natural frente al parásito.

La comprensión de la respuesta protectora frente a estos parásitos se plantea como una de las claves para afrontar con éxito la lucha contra los mismos en el futuro. El estudio de los mecanismos de resistencia natural a la parasitación por parte de algunas razas, proporcionaría modelos de respuesta eficaces, y sería de gran utilidad para el conocimiento de nuevas dianas farmacológicas, la síntesis de vacunas y la selección ganadera.

Tan sólo algunas pocas razas ovinas en todo el mundo han sido identificadas como resistentes frente a nematodos gastrointestinales. Habitualmente se trata de razas locales, de elevada rusticidad y censo reducido, dado su progresivo desplazamiento por otras razas de mayor

productividad. A su valor como fuente de riqueza y patrimonio cultural en sus regiones, se le sumaría en estos casos su capacidad para resistir estas parasitosis mejor que otras razas más comerciales. Por ello, organismos internacionales como la FAO han insistido en su conservación y promoción.

En análisis fecales realizados rutinariamente por la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, se había observado que los recuentos de huevos de nematodos del Orden Strongylida eran sistemáticamente más bajos en los Ovinos CAP que en los ovinos CAN en granjas en las que ambas razas se explotaban conjuntamente. Este dato sugirió la posibilidad de que la raza de pelo (CAP) fuera más resistente que el ovino CAN a la infección por nematodos gastrointestinales. Como planteamiento inicial de la presente Tesis Doctoral, se consideró comprobar experimentalmente estos resultados y ahondar en los mecanismos que potencialmente podrían explicar esta situación.

En el desarrollo de este trabajo se realizó una única inoculación experimental con L3 de *Haemonchus contortus* en ovinos de las dos razas. Asimismo, se llevó a cabo un seguimiento de la infección parasitaria, *in vivo*, mediante la determinación de los recuentos fecales de huevos y, tras el sacrificio de los animales, se contabilizaron y midieron los vermes en abomaso. Para valorar la tolerancia, en términos fisiopatológicos, o resiliencia de los hospedadores, se realizaron análisis hematológicos semanales de todos los animales. Finalmente, se llevó a cabo un estudio de la respuesta celular en sangre periférica y a nivel local en la pared del abomaso de los animales sacrificados y de la producción de inmunoglobulinas específicas, tanto en suero como en el mucus gástrico, así como de la producción local de algunas galectinas.

Los datos recogidos no sólo fueron expuestos de modo descriptivo, sino que también se analizaron estadísticamente en profundidad. Por un lado se evaluó la significación estadística de las diferencias observadas en las medias de los diferentes parámetros para ambas razas. A su vez, las diferentes variables fueron correlacionadas entre sí, intentando establecer una asociación entre ellas.

Por tanto, los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

Objetivo general:

Comparar los resultados parasitológicos, hematológicos y la respuesta inmune celular y
humoral tras una infección experimental con 20000 L3 de una cepa de *H. contortus* de
reconocida patogenicidad en dos razas ovinas autóctonas canarias, ovino Canario de Pelo
(CAP) y Canario (CAN)

Objetivos específicos:

Comparar, tras la inoculación experimental con *H. contortus* en ovinos CAP y CAN:

- 1. La resistencia a la infección por *H. contortus* en ambas razas, valorando:
 - a. Cargas parasitarias y longitud de los vermes.
 - b. Fecundidad parasitaria.
 - c. Establecimiento y desarrollo larvario.
- 2. La resiliencia / tolerancia a la infección en ambas razas, valorando:
 - a. Evolución semanal del valor hematocrito.
 - b. Evolución semanal de las proteínas plasmáticas.
- 3. La respuesta inmunitaria desarrollada por las dos razas ovinas, comparando:
 - a. Los recuentos de células efectoras (eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares), diversas subpoblaciones linfocitarias (CD4⁺, CD8⁺, γδ⁺, WC1⁺, CD2⁺, CD5⁺ y CD45R⁺) y células presentadoras de antígeno (CD1⁺ y MHC II⁺) y producción de galectinas-14 y 15; a los 7 y 28 dpi.
 - b. La evolución semanal de linfocitos, eosinófilos y neutrófilos, en sangre periférica.
 - c. La evolución semanal de la IgG y de la IgA séricas específicas de antígeno somático de L3 y verme adulto, así como de productos de excreción/secreción (ES) de estos últimos.
 - d. Niveles de IgA específica frente a antígeno somático de L3 y de adultos, así como frente a antígeno ES de adultos en mucus, a los 7 y 28 dpi.
- 4. Comparar las relaciones entre variables parasitológicas, hematológicas e inmunológicas en ambas razas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUCCIÓN

Entre los distintos parásitos que afectan al tracto gastrointestinal del ganado ovino y caprino, *Haemonchus contortus* destaca por su amplia distribución y por su elevada patogenicidad. Es un nematodo perteneciente al Orden Strongylida, Superfamilia Trichostrongyloidea, que se aloja en el abomaso de los pequeños rumiantes (**Soulsby, 1987**). Entre los efectos patógenos que produce destacan la anemia, la hipoproteinemia y el retraso en el crecimiento, llegando a provocar en ocasiones la muerte en animales jóvenes fuertemente parasitados. Actualmente el control se realiza mediante tratamientos estratégicos con antihelmínticos, lo que se estima corresponde al 10% del gasto mundial en fármacos veterinarios (**Kassai, 1999**).

Las pérdidas económicas debidas a este parásito son especialmente severas en países en vías de desarrollo. En Etiopía **Biffa** *et al.*, **2007** cuantificaron en 82 millones de dólares anuales las pérdidas causadas por nematodos GI en pequeños rumiantes y, sólo en fármacos, se calculó que la hemoncosis podría provocar gastos anuales del orden de 46 y 103 millones de dólares en Sudáfrica e India, respectivamente (**Mcleod, 2004; Waller y Chandrawathani, 2005**). Para Australia, un país desarrollado con una gran cabaña ovina, **Sackett** *et al.* **2006**, valoraron en 369 millones de dólares (AUD\$) las pérdidas debidas a nematodos GI.

A estas pérdidas han de añadirse los inconvenientes asociados al uso de fármacos antihelmínticos. A pesar de la magnífica aceptación que originariamente tuvieron entre ganaderos y veterinarios por su tremenda eficacia, en la actualidad su utilidad profiláctica y terapéutica se cuestiona, pues los parásitos han desarrollado resistencias a todos los grupos de antihelmínticos presentes en el mercado (FAO, 2004; van Wyk et al., 2006). Además, los consumidores exigen productos animales libres de residuos farmacológicos, lo que tiende a restringir su uso. Por todo ello, se plantea como una prioridad la búsqueda de métodos de control alternativos o complementarios. (Kassai, 1999). En esa línea, diferentes estudios han evaluado la eficacia de distintos procedimientos como la modificación de la dieta (Waller, 1997b; Bricarello et al., 2005; Valderrábano et al., 2006), la utilización de hongos vermicidas para el control de los estadios preparasíticos (Waller et al., 2004), o el uso de vacunas (Knox et al., 2003; Newton y Meeusen, 2003). La utilización de estos métodos en un programa integrado de control de gastroenteritis de origen parasitario, que incluya un uso racional de los

antihelmínticos y un manejo adecuado, podría minimizar las pérdidas antes reseñadas (**Stear** *et al.*, **2007**).

Por otra parte, no todos los animales son igualmente susceptibles a este parásito. Diversos factores relacionados tanto con el hospedador (tales como la edad, el estado nutricional, la alimentación, la especie, raza y el sexo), como con el parásito (tales como la carga y la cepa parasitaria involucrada en cada caso) influyen en esta mayor o menor susceptibilidad. Factores como la especie y raza hospedadora sugieren que, al menos parcialmente, existe una cierta base genética en estas diferencias. Múltiples trabajos evidencian que, incluso entre individuos de una misma raza sometidos a idénticos regímenes de infección, existen claras diferencias en el establecimiento y desarrollo parasitario, reforzando con ello la idea de que la resistencia a estas especies parásitas puede tener una base genética (Soulsby, 1987).

En cualquier caso, el avance en el control de las nematodosis gastrointestinales en general, y de la hemoncosis en particular, probablemente exige de un conocimiento exhaustivo de los mecanismos implicados en una respuesta inmune eficaz frente al parásito. Estos mecanismos brindarían nuevas dianas farmacológicas, permitirían optimizar el rendimiento de posibles vacunas y servirían para la selección de individuos resistentes. El estudio de la respuesta inmune protectora frente a *H. contortus* en razas e individuos naturalmente resistentes se ha planteado como un método válido para alcanzar estos fines (Gill *et al.*, 2000; Bricarello *et al.*, 2002; Amarante *et al.*, 2005).

2. GENERALIDADES SOBRE HAEMONCHUS CONTORTUS Y OTROS NEMATODOS GASTROINTESTINALES DEL GANADO OVINO

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

2.1.1. Superfamilia Trichostrongyloidea Cram, 1927

Esta superfamilia incluye vermes de cuerpo fino y bolsa copuladora bien desarrollada en los machos, que además poseen dos espículas que permiten diferenciar géneros y especies entre sí. La cápsula bucal es rudimentaria y no poseen corona radiada, presentando seis, tres o ningún labio (**Soulsby, 1987**). El ciclo biológico es directo, siendo la larva 3 (L3) envainada el estadio infectante. Las familias más importantes son Trichostrongylidae, Ollulanidae y Dictyocaulidae.

2.1.2. Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912

Las especies pertenecientes a esta familia son parásitos de pequeño tamaño, cuyas fases adultas, de entre 0,3 y 3 cm, se localizan en el tracto digestivo de rumiantes, équidos y otros vertebrados. Como rasgo distintivo, la bolsa copuladora del macho, bien desarrollada, presenta dos lóbulos laterales y un lóbulo dorsal más pequeño. Los géneros más importantes son *Trichostrongylus*, *Graphidium*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Marshallagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Haemonchus* y *Mecistocirrus*. Su distribución es mundial (**Kassai**, 1999).

2.1.3. Género Haemonchus Cobb, 1898

Las especies pertenecientes a este género se localizan en el abomaso de los rumiantes. Los adultos miden entre 10 y 30 mm, con una cápsula bucal pequeña que posee una lanceta. Las papilas cervicales son prominentes y la bolsa copuladora del macho es grande, siendo característico el lóbulo dorsal pequeño y asimétrico. La vulva suele estar protegida por una solapa o lengüeta (Soulsby, 1987).

Su distribución es mundial, siendo mayor su prevalencia en regiones tropicales y subtropicales. La especie que afecta a las ovejas y cabras se denomina *H. contortus*, y la del vacuno, *H. placei*, pudiéndose establecer entre ambas algunas diferencias morfológicas y genéticas (**Lindqvist** *et al.* 2001). Sin embargo, actualmente algunos autores consideran una sola especie, *H contortus*, con cepas adaptadas al ganado bovino y a los pequeños rumiantes (**Urquhart** *et al.*, 1996).

2.1.4. Haemonchus contortus (Rudolphi, 1803)

Esta especie se localiza principalmente en el abomaso de ovejas y cabras, aunque no se descarta que su ciclo pueda cerrarse de modo excepcional en el vacuno (**Mahieu y Aumont, 2009**). Los machos miden entre 10 y 20 mm, y son de un color rojizo uniforme. Las hembras miden entre 18 y 30 mm, y en su coloración se alternan el rojo y el blanco, debido a que el aparato digestivo, rojizo por la ingesta de sangre, se enrolla en espiral alrededor del reproductor, blanquecino. Esto le hace recibir en inglés el nombre de *barber's pole worm* ("gusano de cilindro de peluquero"). La bolsa copuladora del macho tiene lóbulos laterales alargados sustentados por radios largos y finos, mientras que el lóbulo dorsal está desviado hacia un lado, sustentado por un radio, muy característico, en forma de Y. Las espículas miden entre 0,46 y 0,51 mm, y presentan un pequeño repliegue en el extremo. El tamaño de la solapa vulvar de la hembra es variable, pudiendo ser muy prominente, o prácticamente inapreciable. Los huevos, de morfología

típicamente estrongiloide, miden 70-85 x 41-48 μm, y salen con las heces del hospedador conteniendo una mórula de 16-32 blastómeros (**Soulsby**, **1987**).



Fig. 1: Cilindro de peluquero

2.2. EL CICLO BIOLÓGICO DE LOS TRICOSTRONGÍLIDOS EN EL GANADO OVINO, CON ESPECIAL REFERENCIA A *H. CONTORTUS*

El ciclo biológico de *Haemonchus contortus* es directo, y no difiere del de otros tricostrongílidos. Los huevos eliminados con las heces eclosionan y la larva 1 muda a larva 2 en 1-2 días. Las dos primeras fases larvarias permanecen en las heces, alimentándose de materia orgánica y microorganismos presentes en las mismas. La larva 2 muda hasta el estadio infectante de larva 3, conservando la cutícula del estadio anterior que cubre completamente la larva a modo de vaina, aislándola del medio externo. Este estadio larvario migra hacia la hierba en condiciones de humedad adecuadas. El tiempo que transcurre entre la salida al exterior del huevo y la aparición de larvas infectantes podría ser de 5-6 días, aunque el desarrollo puede retrasarse incluso varios meses si la temperatura y la humedad no son las óptimas (**Lacroux**, **2006**).

Las L3 son ingeridas con el pasto por el hospedador, comenzando así su ciclo parasitario, descrito por Veglia, 1915. En el rumen se liberan de la vaina que las envuelve y se introducen en las glándulas epiteliales de la mucosa abomasal, preferentemente en la región del fundus, para continuar su desarrollo. Las L4 aparecen en la superficie de la mucosa a los 4-5 días del contagio, y tras una nueva muda se transforman en L5 o preadulto, que maduran sexualmente dando lugar a los adultos, que copulan y empiezan a producir huevos. El periodo de prepatencia oscila entre 15 días (Soulsby, 1987) y tres semanas (Bowman, 2004), a menos que se desarrolle un proceso de hipobiosis.

Tabla 1: Etapas del desarrollo de *H. contortus* en el hospedador (Veglia, 1915)

Presencia de L3 en la mucosa	Día 2
Muda de L3 a L4	Día 4-5
Muda de L4 a L5	Día 9-11
Aparición de los primeros adultos	Día 18

El fenómeno de hipobiosis o arresto larvario —presente también en otras especies de tricostrongílidos— consiste en la permanencia durante varios meses de las L4 en la mucosa en un estado de latencia, generalmente coincidiendo con situaciones ambientales adversas.

En el caso de *H. contortus*, parece ser que la escasa humedad ambiental es el factor selectivo que acompaña a este fenómeno. De hecho, en las regiones de clima tropical la hipobiosis tiene lugar en la estación seca (Bonfoh *et al.*, 1995; Fritsche *et al.*, 1993; Ng'ang'a *et al.*, 2004).

Con respecto a climas templados, **Langrova** *et al.*, **2008** realizaron un amplio estudio sobre la frecuencia con la que aparece el fenómeno de hipobiosis en las diferentes especies de tricostrongílidos, y los factores ambientales que influyen en su desarrollo en Europa central. En algunas especies, como *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* o *Nematodirus fillicolis*, el porcentaje de larvas hipobióticas durante los meses de invierno superó el 65%, mientras que para *Trichostrongylus spp.* estuvo en torno al 25%. Por su parte, las larvas de otras especies, como *Cooperia curticei*, *Oesophagostomum venulosum* o *Nematodirus battus*, no desarrollaron hipobiosis. *T. circumcincta*, *N. filicollis* y, en menor medida, *Trichostrongylus spp.* fueron las especies en las que la relación con las condiciones ambientales fue más relevante para el desarrollo del arresto larvario.

Blitz y Gibbs, 1971 llegaron a afirmar que la inhibición de las L4 de *H. contortus* durante el invierno obedece a factores exclusivamente ambientales, sin ninguna influencia de la respuesta inmune del hospedador, como demostró el hecho de que la inoculación en el mes de enero de L4 recogidas del abomaso de ovejas en pastoreo en animales que nunca habían estado en contacto con nematodos gastrointestinales (GI), determinó un periodo prepatente de 10-12 semanas, mucho más prolongado de lo habitual, a pesar de la escasa sensibilización previa de los animales inoculados.

En otras especies de nematodos GI, como *Ostertagia spp.*, se ha sugerido que la hipobiosis podría estar relacionada con una mayor exposición larvaria, y que el empleo de antiparasitarios que provocan una reducción de la población de adultos, facilitaría la reanudación del desarrollo

por parte de las larvas hipobióticas (**Dunsmore**, **1960**, **1963**). De esta manera, la hipobiosis sería un fenómeno que contribuiría a regular la población de vermes adultos en el abomaso.

Finalmente, la hipobiosis también podría considerarse como una consecuencia de la respuesta inmune del hospedador (**Barger** *et al.*, 1985), por lo que este fenómeno será analizado también en el apartado correspondiente a los efectos de la respuesta inmune sobre los estadios larvarios.

2.3. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS DE RELEVANCIA EN LA PARASITACIÓN POR *H. CONTORTUS*

La magnitud de la parasitación por *H. contortus* en un rebaño está condicionada por la contaminación de los pastos con huevos del parásito, y por las posibilidades de alcanzar el estadio infectante que les brinde el medio.

2.3.1. Contaminación del pasto con huevos de H. contortus

La contaminación con huevos de estos vermes en el medio por parte de los animales parasitados no es constante. Factores como la edad, el sexo o la raza condicionan la cantidad de huevos del parásito liberados con las heces. Uno de los fenómenos más reconocidos en los tricostrongílidos es el incremento de huevos en torno al periparto que manifiestan las hembras gestantes (Andrews et al., 1995; Dorny et al. 1995). Esta elevación es consecuencia de ciertos cambios hormonales (por ejemplo, en los niveles de prolactina) asociados al parto, que implican una relajación en la respuesta inmune del hospedador (Barger, 1993; Urquhart, 1996). De esta manera, se favorece el desarrollo de las larvas hipobióticas y se incrementa la fecundidad de los vermes hembras alojados en el abomaso. La eliminación masiva de huevos aseguraría una elevada presencia de L3 infectantes en el momento en que los corderos destetados salgan al pasto (Soulsby, 1987).

Parece ser que la activación de las larvas quiescentes no se debe exclusivamente a una reducción de la respuesta defensiva del hospedador, sino que está también relacionada con la mejora de las condiciones ambientales en el exterior, aunque los mecanismos que median esta activación son aún desconocidos (**Blitz y Gibbs, 1971; Gibbs, 1986**). Lógicamente, los momentos del año con climatología más favorable suelen coincidir con las parideras, por lo que los efectos de la elevación periparto y la activación de las larvas hipobióticas se suman. En zonas de climas templados, en los que ninguna larva puede sobrevivir en el pasto durante el invierno, la combinación de la activación de las larvas en hipobiosis y la elevación del número

de estas en el pasto durante el periparto parecen ser determinantes para el mantenimiento de la población parasitaria en los rebaños (Capitini et al., 1990; Waller y Chandrawathani, 2005).

2.3.2. Desarrollo larvario en las heces

El desarrollo de los huevos tiene como principales factores limitantes la temperatura y la humedad. En cuanto a la primera, se estima que los huevos de *H. contortus* no son capaces de desarrollarse por debajo de 12°C, siendo la temperatura óptima de 26-27°C. La humedad, por otra parte, parece ser el factor más importante para la supervivencia de los huevos y las larvas. Una humedad relativa en el pasto por debajo del 96 % retarda el desarrollo larvario (**Meana y Rojo, 1999**), y aunque las larvas son capaces de resistir fluctuaciones de humedad relativa a lo largo del día entre el 70 y 100%, son incapaces de sobrevivir cuando esta se mantiene en un nivel constante del 85% (**Soulsby, 1987**).

2.3.3. Migración de las larvas desde las heces hacia el pasto

La migración de las L3 desde las heces hacia el pasto depende también de las condiciones ambientales de temperatura y humedad, sirviendo las heces como reservorio larvario en periodos más secos. Cuando el agua de la lluvia o del rocío penetra en estas, las larvas salen al exterior y son capaces de resistir condiciones de desecación y rehidratación sucesivas, haciéndose infectantes cuando se incrementa de nuevo la humedad. Se estima que las larvas pueden llegar a sobrevivir en el pasto o en las heces entre 1 y 3 meses (Taylor et al., 2007).

2.3.4. Modelos epidemiológicos para H. contortus

Conociendo estos factores y relacionándolos con el clima, se pueden establecer distintos modelos epidemiológicos que permiten conocer los periodos de mayor riesgo de infección durante el año en una zona geográfica delimitada.

2.3.4.1. Climas templados

Si bien se considera a *H. contortus* como un parásito propio de climas tropicales o subtropicales, donde alcanza mayores prevalencias, lo cierto es que también está presente en multitud de países con climas templados o fríos. Por ejemplo, en un estudio coprológico realizado en Suecia sobre 152 granjas ovinas, la prevalencia de *H. contortus* fue del 37% (**Lindqvist** *et al.*, **2001**). Otro estudio desarrollado en la provincia de Heliongjang (China), reflejó prevalencias del 43,9%, a pesar de que las temperaturas medias anuales en esta zona oscilan entre los 5 y -5°C

(Wang et al. 2006), lo que manifiesta la capacidad de adaptación del parásito a distintas condiciones climatológicas, y sugiere la posibilidad de desarrollar distintos modelos epidemiológicos en climas templados y cálidos (Taylor et al., 2007).

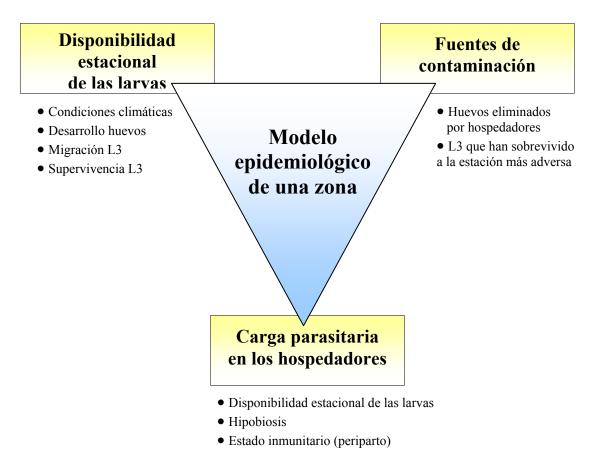


Figura 2.: Epidemiología de H. contortus

En climas templados húmedos se produce un aumento en el número de huevos liberados en el pasto a inicios de la primavera, como consecuencia de la activación de las larvas hipobióticas, y del incremento de huevos periparto de las hembras gestantes tras la salida de los animales a los pastos tras la estabulación invernal, produciéndose una parasitación masiva de los animales jóvenes en su primera estación de pastoreo, a lo largo del verano y a comienzos del otoño. Los parásitos que infectan a estos animales jóvenes pueden completar su ciclo, contaminando de nuevo el pasto a finales del otoño, o permanecer en un estado de hipobiosis hasta la siguiente primavera. Las bajas temperaturas serían, por tanto, el factor limitante para el desarrollo de la enfermedad en invierno, pues reducirían la presencia de L3 en el pasto (Urquhart, 1996).

2.3.4.2. Climas tropicales

En áreas tropicales, sin embargo, la humedad es el factor limitante para la supervivencia del parásito en el medio exterior. La presencia de L3 en el pasto y la consiguiente parasitación de los animales suelen ser constantes. En caso de existir una época de lluvias muy marcada, el fenómeno de la hipobiosis iría ligado a la estación seca, y la contaminación masiva del pasto se produciría en la época de lluvias (**Soulsby**, **1987**).

2.3.4.3. Península Ibérica

En las zonas de secano de la Península, diversos trabajos señalan la existencia de dos periodos característicos de contaminación del pasto, la primavera y el otoño. El primero se da asociado al periparto y a unas condiciones climatológicas favorables. En verano, pese a haber una importante carga parasitaria en los rebaños, debido a los bajos niveles de humedad la supervivencia de las larvas en el medio estaría muy comprometida, siendo frecuente en esta época la hipobiosis. La activación de las larvas se produce en otoño, y los huevos son liberados en el pasto coincidiendo con periodos en los que las larvas tienen más posibilidades de sobrevivir (Martínez González et al., 1998; Valcárcel et al., 2005).

En las zonas de regadío se producen tres picos en los niveles de larvas en el pasto. El primero, a finales del invierno, producto del los huevos liberados durante el pastoreo del otoño anterior. El segundo, a finales de la primavera, como consecuencia de la elevación periparto, y el tercero, en otoño, debido a los huevos eliminados a finales de verano (**Meana y Rojo, 1999**).

2.3.4.4. Isla de Gran Canaria

La isla de Gran Canaria muestra una climatología bastante diferente en el Norte de la isla con respecto al Sur, lo que genera distintos modelos en la epidemiología de *H. contortus*. El Norte de la isla, más húmedo y con mayor vegetación respondería al segundo modelo epidemiológico, existiendo una contaminación continua del pasto, dado que las temperaturas y la humedad favorecen el desarrollo larvario. En cambio en el Sur el clima es muy seco, y el único periodo de riesgo correspondería a la primavera, tras las lluvias que se producen en los meses de febreroabril.

2.4. ACCIÓN PATÓGENA DE *H. CONTORTUS*

La infección por nematodos de la familia Trichostrongylidae produce en los pequeños rumiantes el denominado síndrome de gastroenteritis parasitaria. En la naturaleza es habitual la infección por varias especies distintas, y por tanto la patogenia y el cuadro clínico serán una combinación de los efectos de las distintas especies implicadas (**Meana y Rojo, 1999**). Aun teniendo en cuenta esto, es posible describir el efecto aislado de la parasitación de los ovinos por el nematodo abomasal *H. contortus*.

Tanto los estadios larvarios L4 y L5 como los adultos se caracterizan por su carácter hematófago, siendo la anemia el principal efecto patógeno del parásito. Los vermes adultos, de mayor tamaño, ingieren más cantidad de sangre, con lo que son los principales responsables de los cuadros clínicos. Se calcula que un adulto puede ingerir 0,05 ml de sangre al día, con lo que un rumiante infestado con 5000 vermes tendría una pérdida diaria mínima de sangre de 250 ml (Soulsby, 1987; Urquhart et al., 1996).

La anemia es, por tanto, el principal signo clínico de la parasitación por *H. contortus*. En una primera fase, a partir de la segunda semana de infección, se produce una caída brusca del hematocrito, en un momento en que la ingesta de sangre por el parásito todavía no puede ser compensada por el incremento de la eritropoyesis. Cuando ésta aumenta, se estabiliza el hematocrito (6-14 semanas post-infección). Sin embargo, la pérdida continua de hierro hace inviable mantener la hematopoyesis, con lo que vuelve a descender el hematocrito, esta vez a niveles en los que puede llegar a provocar la muerte del animal (**Soulsby, 1987**).

La anemia hemorrágica que sufre el animal supone una pérdida severa de proteínas que el hígado intenta compensar incrementando la síntesis de albúmina. Sin embargo, el progresivo agotamiento de las reservas metabólicas del animal genera finalmente hipoproteinemia, desencadenando extravasación de líquido y, consecuentemente, edemas.

Se ha demostrado un aumento del pH en los momentos siguientes a la infección por L3 infectantes de *H. contortus*. Probablemente como consecuencia de una alteración de la permeabilidad del epitelio, se produce la modificación de la Diferencia de Potencial Transmural (DPT), que se define como el potencial eléctrico a ambos lados de la pared digestiva, con un aumento de iones HCO₃⁻ en la luz, lo que eleva el pH. Este hecho dificulta la transformación del pepsinógeno en pepsina, alterándose la digestión de las proteínas en su primera fase, y agravándose con ello el déficit proteico (**Meana y Rojo, 1999**). Además, la subida de pH reduce sensiblemente el poder bactericida del mucus, lo que parece afectar el estado nutricional del

hospedador, puesto que la proteína microbiana es una fuente importante de nitrógeno (**Simpson**, **2000**). Esta modificación del pH gástrico parece ser esencial para la supervivencia de *H. contortus*, dado que este nematodo parece ser incapaz de sobrevivir a pH 2,8, valor habitual en el abomaso de animales sanos (**Eiler** *et al.*, **1983**; **Haag**, **1995**). Sin embargo, con un pH entre 4 y 4,5 no sólo tiene asegurada su supervivencia, sino que además su fecundidad es máxima (**Honde y Bueno**, **1982**).

Estas alteraciones se asocian temporalmente con la entrada de las larvas en la mucosa, su muda posterior y su salida a la luz intestinal a los cuatro días post-infección. Algunos autores relacionan los cambios fisiológicos descritos en el párrafo anterior con lesiones físicas producidas por las larvas en el epitelio. Sin embargo, algunos estudios evidencian que la inoculación de adultos de *H. contortus* en el abomaso produce un incremento del pH gástrico (Simpson *et al.*, 1997). Es posible que algunos productos de excreción-secreción (ES) del parásito sean responsables de modificar la actividad de las células epiteliales. De hecho, los tratamientos antihelmínticos recuperan el pH gástrico mucho antes de que las células puedan recuperarse (Meana y Rojo, 1999).

Otro efecto patógeno asociado a la presencia del parásito adulto en el abomaso es un aumento en los niveles séricos de gastrina y pepsinógeno (Simpson et al., 1997), así como en la secreción de gastrina. No está claro si este incremento en la producción de gastrina está relacionado con los productos de ES del parásito o es simplemente consecuencia del aumento de pH gástrico. Algunos autores atribuyen un importante papel en la regulación de este incremento a los mediadores de la inflamación al haber detectado que la hipergastrinemia se mantiene incluso tras recuperar los niveles normales de pH en el estómago (Lawton et al., 1996).

Finalmente, la anorexia aparece como una consecuencia directa de la parasitación (Sykes y Coop, 1977; Fox et al., 1989a). Si bien se desconocen los mecanismos parasitarios responsables de este proceso, la disminución en la motilidad gástrica (Grovum y Phillips, 1978), el dolor (Simpson, 2000), la hipergastrinemia y el aumento del pepsinógeno sérico (Fox et al., 1989 a,b; Dynes et al., 1998), e incluso el efecto de estos a nivel del sistema nervioso central podrían estar implicados (Fox et al., 2006).

2.4.1. Signos clínicos y lesiones

La parasitación por *H. contortus* provoca, al menos desde el punto de vista teórico, dos tipos de cuadro clínico, agudo y crónico, en función de factores relacionados con el hospedador, el parásito y las condiciones ambientales (**Soulsby, 1987**; **Taylor et** *al.*, **2007**).

El **cuadro agudo** se presenta habitualmente en animales jóvenes muy parasitados. La anemia aparece a partir de la segunda semana de infección, estabilizándose entonces el hematocrito gracias a la actividad hematopoyética de la médula ósea. Sin embargo, la pérdida continua de proteínas y hierro produce finalmente un agotamiento de la médula ósea, que al final es incapaz de reponer eficazmente las células perdidas. Con ello se agrava el proceso, que puede desencadenar la muerte del animal.

Los síntomas principales son la palidez de mucosas (Fig. 3), edema (especialmente submandibular y abdominal), letargia, presencia de heces oscuras y caída de la lana. La diarrea no suele ir asociada a este proceso, a diferencia de los causados por otros miembros de la familia Trichostrongylidae. En las hembras se produce agalactia (**Urquhart** *et al.*, 1996) y el análisis sanguíneo muestra anemia e hipoalbuminemia (**Kassai**, 1999).





Fig. 3: Mucosa pálida en animal con hemoncosis aguda (a) y rosada en animal sano (b)

Las canales aparecen pálidas y con edema acumulado en las zonas indicadas anteriormente. En el interior del abomaso se puede observar abundante líquido edematoso rojizo, y vermes de color también rojizo sobre la mucosa, en la que se aprecian numerosas petequias y erosiones (Fig. 4) (Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999).

En los escasos **cuadros hiperagudos**, producidos por infecciones masivas (Fig. 4b), pueden llegar a darse casos de muerte súbita de animales aparentemente sanos, incluso en el periodo de prepatencia, como consecuencia de una gastritis hemorrágica severa. En la necropsia se puede observar inflamación de la mucosa abomasal, que presenta un color rojizo, con abundantes vermes (maduros y/o inmaduros) y sangre en la cavidad gástrica.





Fig. 4: Abomaso de un animal con hemoncosis aguda (a) e hiperaguda (b)

El **cuadro crónico** se produce en animales con una carga parasitaria baja, de algunos cientos de vermes, en condiciones de alimentación deficiente debida, por ejemplo, a una prolongada estación seca que limite la disponibilidad de pasto. La morbilidad es muy alta, en torno al 100%, y la mortalidad, escasa. Los recuentos fecales no llegan a superar los 2000 huevos por gramo (hpg) (**Soulsby, 1987; Meana y Rojo, 1999**).

La continua pérdida de sangre en esta situación repercute en el metabolismo, produciendo pérdida de peso, debilidad e inapetencia. No se suelen observar manifestaciones de la anemia ni edemas (**Urquhart** *et al.*, 1996). Las lesiones son poco evidentes; la canal puede mostrar diversos grados de emaciación, observándose los vermes en el interior del abomaso y gastritis hiperplásica.

El número de vermes encontrados en el abomaso varía en función de la susceptibilidad de la raza y del individuo. En cualquier caso, los animales con una infección crónica suelen albergar entre 100 y 1000 adultos, y los que presentan un cuadro agudo entre 1000 y 10000. En cuadros hiperagudos podemos encontrar más de 10000 vermes en el abomaso del animal (**Soulsby**, 1987).

2.5. EL USO DE FÁRMACOS ANTIHELMÍTICOS EN LA LUCHA FRENTE A LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

Hasta el momento, el tratamiento y control de las nematodosis gastrointestinales se ha basado fundamentalmente en el uso de fármacos antihelmínticos, en combinación con determinadas medidas de manejo en el pastoreo que reduzcan el riesgo de infección.

El objetivo del tratamiento y control mediante fármacos es eliminar las dos fuentes principales de contaminación del pasto: los huevos eliminados en periparto y las larvas que han sobrevivido

al invierno en climas templados, o al verano en zonas tropicales o subtropicales (Soulsby, 1987).

La aplicación a gran escala de antihelmínticos de probada eficacia ha transformado la industria ganadera, especialmente en el caso de los rumiantes. Se llega a afirmar que la ganadería de rumiantes en su forma actual no sería posible sin fármacos antihelmínticos (**Stear** *et al.*, **2000**). Los fármacos más utilizados son los benzimidazoles y probenzimidazoles, los imidazotiazoles y las avermectinas. En el pasado también fueron usados los organofosforados, que dejaron de utilizarse debido a su elevada toxicidad.

2.5.1. Resistencias a los antihelmínticos

Como consecuencia del uso incontrolado de fármacos antihelmínticos han aparecido cepas resistentes de nematodos GI frente a estos fármacos en todo el mundo. En el ganado ovino el problema adquiere especial gravedad.

El fenómeno se pone de manifiesto cuando un fármaco con una eficacia mayor del 95% frente a nematodos GI es incapaz de mantenerla al administrar la dosis terapéutica recomendada.

Aparte de los factores relacionados con una mala administración (dosis insuficiente y frecuencia excesiva, fundamentalmente), se considera que un elevado potencial biótico del parásito favorece la aparición de resistencias (**Meana y Rojo, 1999**). Son muy abundantes las referencias bibliográficas que nos indican la aparición de cepas de *H. contortus* resistentes a los distintos grupos de fármacos antihelmínticos.

Las primeras citas de cepas de *H. contortus* resistentes a un benzimidazol, en concreto el tiabendazol, datan del año 1964 (Conway, 1964), al levamisol, del año 1976 (Le Jambre *et al.*, 1976), y a la ivermectina, del año 1987 (Carmichael *et al.*, 1987). Ya en 1997 Waller, y la FAO en 2004, alertan sobre la evidencia de resistencias en todos los continentes, siendo Oceanía, Sudáfrica y, sobre todo, Sudamérica, los territorios más afectados.

En España, la primera cita sobre la existencia de cepas de nematodos GI resistentes a antihelmínticos es de 1997 (Requejo Fernández et al., 1997). Posteriormente, diversos estudios han confirmado la aparición de resistencias a las tres grandes familias de antihelmínticos, sin que la situación, por ahora, parezca tan grave como en otros países (Álvarez Sánchez et al., 2006; Díez Baños et al., 2008).

Este problema quizá no fue valorado en su momento, al confiar en la comercialización de nuevos fármacos por parte de las empresas farmacéuticas. Sin embargo, durante 25 años no ha aparecido en el mercado ningún nuevo antihelmíntico destinado a animales de abasto, fundamentalmente por razones económicas (van Wyk el al., 2006).

Recientemente, han sido descubiertos nuevos grupos farmacológicos con efecto antihelmíntico, lo que permitirá disponer de fármacos, al menos temporalmente, libres de resistencias. Se pueden destacar los derivados del amino-acetonitrilo (AADs), en concreto el monepantel (Kaminsky et al., 2008) cuya comercialización ya ha sido aprobada en Europa para ganado ovino. Otros grupos de fármacos como los ciclooctadepsipéptidos (von Sammson Himmelstjerna et al., 2005), o los spiroindoles, también podrían ver la luz a corto plazo (Sangster, 2009).

En cualquier caso, se hace necesaria una nueva política en el tratamiento de estos parásitos, que implique un uso correcto y racional de los fármacos, con rotaciones de los mismos (Urquhart et al., 1996; van Wyk, 2001; Sangster, 2009) y tratamiento selectivo de los animales (van Wyk et al., 2006), y diferentes medidas de control.

3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

3.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los autores se muestran de acuerdo en que la respuesta inmune protectora que desarrollan los rumiantes frente a nematodos gastrointestinales (GI) es el resultado de una compleja interacción entre mecanismos específicos e inespecíficos vinculados tanto a la inmunidad celular como a la humoral (Miller, 1984; González et al., 2003).

La importancia de la inmunidad celular se ha evidenciado, por ejemplo, bloqueando sus mecanismos efectores mediante la administración de corticoides en infecciones experimentales por diversos tricostrongílidos tales como *Trichostrongylus colubriformis* y *H. contortus* (Adams, 1988; Jackson *et al.*, 1988; Emery *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 2004). A su vez, la exposición a nematodos GI genera un incremento en los niveles de inmunoglobulinas específicas, tanto en el suero como en las mucosas locales (abomaso e intestino) y sistémicas, y muchos autores las utilizan para evaluar la exposición a estos parásitos (Ploeger *et al.*, 1990; Schallig *et al.*, 1995; Martínez Valladares *et al.*, 2005a; Molina *et al.*, 2009).

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que generan esta protección y su base genética son aspectos de gran importancia para el desarrollo de programas de selección de ovinos resistentes a estos parásitos. Esta información también resultaría útil para optimizar la capacidad inmunogénica y protectora que podrían proporcionar futuras vacunas o la identificación de dianas terapéuticas (Miller y Horohov, 2006; Piedrafita et al., 2010).

3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune frente a los nematodos gastrointestinales se encuentra afectada por la influencia de distintos factores, dependientes del hospedador (constitución genética, edad, estado hormonal y nutricional), del parásito (especie, cepa...) y del manejo.

3.2.1. Edad

Como ya se ha señalado anteriormente, los corderos y cabritos de menos de un año de edad son más susceptibles que los adultos (Kassai, 1999; Schallig, 2000), y esta menor resistencia parece ser consecuencia de la deficiente inmunidad celular, que tarda en desarrollarse en rumiantes al menos entre cuatro y seis meses. La transferencia de factores de tolerancia en el calostro y un desarrollo progresivo de las respuestas inmunitarias frente a los distintos antígenos también podrían explicar esta susceptibilidad etaria (Soulsby, 1987). Muchos autores asumen que los corderos desarrollarán una respuesta inmunitaria protectora tras la exposición a las larvas presentes en el pasto, a partir de los 10-12 meses de edad, y sólo perderán esta capacidad en caso de malnutrición, enfermedad o estrés (Vlassoff et al., 2001).

Probablemente, estos datos expliquen que no se haya podido conferir protección tras la inmunización con L3 atenuadas de *H. contortus* en animales jóvenes, menores de seis meses (**Soulsby, 1987; Newton y Meeusen, 2003**) y sí en adultos, tal y como queda recogido en el apartado "4.2.1. Uso de larvas atenuadas".

3.2.2. Sexo

Los machos de los rumiantes son más susceptibles que las hembras a los nematodos GI (**Asanji**, **1988**; **Barger**, **1993**; **Mandonnet** *et al.*, **2003**), lo que se manifiesta en mayores FEC (recuento fecal de huevos, del inglés *faecal egg count*), tasas de establecimiento larvario y cargas parasitarias (**Aumont** *et al.*, **2003**; **Gauly** *et al.*, **2006**). En infecciones experimentales con *H. contortus* en Scottish Blackface, **Stear** *et al.*, **1995a** estiman la influencia del sexo del animal y sus interacciones sobre el peso, en la carga parasitaria, en un 14%. Dado que existe una

susceptibilidad distinta, se recomienda realizar experimentos de inmunización con animales de un único sexo (Adams, 1989).

3.2.3. Especie, raza e individuo

Entre las especies hospedadoras, el caprino manifiesta una mayor susceptibilidad que el ovino frente a la infección por nematodos GI, hecho que se refleja en distintos parámetros inmunológicos y parasitológicos (Huntley et al., 1995, Hoste et al., 2008). Las cabras, en particular, muestran dificultades para establecer una respuesta inmunitaria protectora tras inoculaciones repetidas de L3 de *H. contortus* y *T. circumcincta*, a diferencia de lo que ocurre en las ovejas (González, 2002). Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta a la hora de aplicar programas de control en sistemas de explotación en los que conviven cabras y ovejas, circunstancia muy habitual en la ganadería de las Islas Canarias. Evidentemente, este hecho diferencial deberá valorarse al escoger métodos de control alternativos al uso de fármacos.

Existe una variación importante entre razas e individuos en la resistencia a nematodos GI, probablemente causada por diferencias genéticas (Sayers y Sweeney, 2005; Stear et al., 2007). Diversas experiencias en corderos han estimado que existe una alta repetibilidad (0,3) en los recuentos fecales de huevos de nematodos GI en la primera y segunda estación de pastoreo, lo que indica que corderos con recuentos bajos probablemente serán adultos con recuentos bajos de huevos en heces (Stear et al., 2000a). Esta circunstancia puede ser aprovechada para disminuir los niveles de parasitación en el rebaño mediante selección reproductiva, y por ello será analizado en profundidad en el capítulo 4.3, "Selección genética de la resistencia a los nematodos GI".

3.2.4. Estado hormonal

La compleja interacción que se establece entre el sistema endocrino del hospedador y los agentes parasitarios puede llegar a modificar sustancialmente la respuesta inmune. Algunas especies parásitas se benefician directamente del efecto de determinadas hormonas que estimulan su crecimiento y multiplicación (Escobedo *et al.*, 2005) o bien lo hacen indirectamente, al inducir determinados estados hormonales situaciones de inmunosupresión de las que se benefician los parásitos.

El incremento de huevos fecales que experimentan durante el periparto las hembras parasitadas por nematodos gastrointestinales, tal y como se señaló anteriormente, podría ser consecuencia de cambios hormonales. Actualmente no se conocen en profundidad los mecanismos

inmunitarios implicados, pero sí se sabe que durante este periodo se produce un incremento de la susceptibilidad de los animales a adquirir nuevas infecciones, así como un incremento de la fecundidad de los vermes adultos, además de una maduración de las larvas hipobióticas (Soulsby, 1987). Algunos autores atribuyen a la prolactina algún papel en este fenómeno que experimentan las ovejas en torno al parto, puesto que al administrarla en corderos antes o después de ser inoculados con *H. contortus*, induce un aumento en los recuentos fecales de huevos y de la fecundidad de las hembras del parásito (Fleming, 1993). Sin embargo, no existe acuerdo unánime, puesto que otros autores no han logrado reproducir estos efectos en ovinos inoculados con *T. circumcincta* (Jeffcoate *et al.*, 1990; Barger, 1993).

La influencia de las hormonas adrenales en las infecciones por *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica* y *Schistosoma mansoni* es un hecho reconocido (**Escobedo** *et al.*, **2005**). En el caso concreto de *H. contortus*, el parásito podría verse favorecido por el incremento de los niveles de cortisol que se asocia a esta infección, fenómeno que podría inhibir a algunos mecanismos inmunológicos efectores como los relacionados con la activación de los mastocitos (**Fleming**, **1997**).

3.2.5. Nutrición

La respuesta inmune del hospedador eleva los requerimientos nutricionales, modifica la distribución de los recursos y, a causa de la anorexia, disminuye la disponibilidad de los mismos (**Colditz, 2008**; **Greer** *et al.*, **2008**). Por ello, una adecuada alimentación es importante para mantener una respuesta inmune adecuada.

Al ser el metabolismo proteico el más afectado durante las infecciones por nematodos GI, un aumento de proteína metabolizable en la dieta puede mejorar la resistencia y la tolerancia a la parasitación, aunque no pueda prevenir el establecimiento inicial del parásito. Por contra, cuando se suministran dietas con bajos aportes proteicos, las consecuencias de la enfermedad se agravan (Kassai, 1999; Coop y Kyriazakis, 2001) y los genotipos más resistentes pueden no mostrar ninguna superioridad en comparación con los más susceptibles (Bricarello et al., 2005; Martínez Valladares et al., 2005b). Este aporte proteico repercute directamente en la mejora de distintas respuestas efectoras, aumentando los niveles de mastocitos, eosinófilos y leucocitos globulares en la mucosa, e incrementando los niveles de anticuerpos sanguíneos. Es de esperar que las nuevas herramientas moleculares disponibles para el análisis de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos permitan conocer los factores que median en esta interacción (Athanasiadou y Huntley, 2008).

3.2.6. Tratamientos antihelmínticos

Cuando los tratamientos profilácticos se administran de forma excesiva, puede suceder que no exista contacto entre el parásito y el hospedador, impidiendo el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Por ello, se aconseja que, en general, al plantear la quimioprofilaxis se permita que se establezca esta relación entre el parásito y el hospedador (Claerebout, 2002; Taylor et al., 2007). Así, por ejemplo, programas de control que combinen el tratamiento antihelmíntico de los animales jóvenes con el traslado a pastos limpios, pueden provocar que el hospedador no desarrolle ninguna respuesta inmunitaria frente a nematodos GI, siendo estos individuos más susceptibles en sucesivas estaciones de pastoreo que otros animales que no se hayan tratado previamente de esta manera (Claerebout et al., 1998 a,b, 1999a).

3.2.7. Patogenicidad de la cepa parasitaria

La gran variabilidad genética de las distintas cepas de *H. contortus* les ha permitido responder a la presión de selección derivada del uso de antihelmínticos (**Roos** *et al.* **2004**). La selección por resistencia a fármacos puede haber generado distintos genotipos con diferencias en la inmunogenicidad y patogenicidad (**Barret** *et al.*, 1998). En ocasiones, resistencia frente a antihelmínticos y mayor patogenicidad pueden ir asociadas, como reflejaron **Kelly** *et al.*, 1978 al comparar ovinos inoculados con cepas de *H. contortus* resistentes o susceptibles a los benzimidazoles. Sin embargo, no se trata de una regla fija, puesto que **Maclean** *et al.*, 1987 observaron justamente lo contrario con una cepa de *Trichostrongylus colubriformis* resistente a benzimidazoles.

No se han podido constatar diferencias en la inmunogenicidad de las distintas cepas que afectan a los ovinos, aunque sí en su acción patógena, su establecimiento larvario y su fecundidad (Barret et al., 1998; Aumont et al., 2003).

Aumont *et al.*, 2003 realizan un estudio de inoculación en el que incluyen dos razas, la Barbados de Barriga Negra (resistente) y la INRA 401 (susceptible), y dos cepas de *H. contortus*, propias de las regiones en que se cría cada raza. Los resultados muestran, por una parte, una patogenicidad similar para ambas cepas, y a la vez, diferentes tasas de asentamiento larvario y fecundidad de las cepas en los ovinos Barbados de Barriga Negra.

3.3. INMUNIDAD INNATA FRENTE A PARÁSITOS

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a los parásitos. Comprende una serie de mecanismos celulares y moleculares, presentes antes del encuentro con el agente patógeno, y capaces de activarse rápidamente, de modo previo a la aparición de respuestas adaptativas. Estos mecanismos pueden reconocer los antígenos sin gran capacidad de discriminación, es decir, con independencia del tipo de antígeno identificado, aunque no parecen estar capacitados para desarrollar memoria inmunológica. Una serie de barreras externas físicas, químicas o biológicas previenen la entrada del agente infeccioso o parasitario; una vez que éste ha burlado estas barreras, y ha entrado en el organismo, intervienen células y factores solubles (Cutuli, 2007; de Veer et al. 2007).

En el aparato digestivo hay múltiples mecanismos de inmunidad innata. El pH gástrico y las enzimas contenidas en el mucus, así como la flora bacteriana, constituyen las principales barreras externas. En caso de que algunos agentes patógenos superen estas barreras, pueden entrar en acción algunas células fagocitarias (macrófagos y neutrófilos), una subpoblación de linfocitos conocidos como asesinos naturales (NK, *del inglés Natural Killer*), y diversos factores solubles, tales como los componentes de la vía alternativa del complemento, citoquinas y otros mediadores químicos de la inflamación.

Algunos componentes característicos de la inmunidad innata serán descritos a continuación, dado que, al menos teóricamente, podrían tener un papel relevante en la respuesta frente a nematodos GI. Se trata de los receptores tipo Toll, los linfocitos T $\gamma\delta$ y la subpoblación de linfocitos B-1a.

En el reconocimiento del antígeno y activación de los fagocitos intervienen receptores tipo Toll (TLR, del inglés toll-like receptors), presentes en la membrana de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés antigen-presenting cells), tales como macrófagos, células dendríticas y algunas células epiteliales. Estos receptores detectan moléculas expresadas frecuentemente por los agentes exógenos que no están presentes en los hospedadores, denominadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP, del inglés pathogen-associated molecular patterns) (Medzhitov y Janeway, 1997). Inducen señales internas que promueven, entre otras acciones, la destrucción microbiana en el fagosoma mediante rutas dependientes de oxígeno o del NO, la liberación de citoquinas estimuladoras de la inflamación, y la activación de los leucotrienos (Werling et al., 2006). En ovinos y bovinos se han identificado homólogos de los diez TLR reconocidos hasta el momento en humanos (Menzies e Ingham, 2006). El papel de los TLR en el reconocimiento de antígenos parasitarios y la activación de la respuesta efectora

ha sido poco estudiada hasta el momento, y algunos autores sugieren que podrían tener gran relevancia en el desarrollo de este tipo de respuestas (Jackson et al., 2006; Vanhoutte et al. 2007).

Mención particular merece la actividad de la población de **linfocitos T** $\gamma\delta$, denominados así por el tipo de cadenas presentes en su receptor TCR (del inglés, *T-cell receptor*). Intervienen en las respuestas innatas, expresando funciones efectoras y secretando citoquinas que estimulan la respuesta inmune adaptativa de base celular (**Cutuli, 2007**). En los rumiantes presentan varias particularidades. Son especialmente abundantes, y se estima que pueden llegar a constituir el 60 % de los linfocitos circulantes en animales jóvenes, frente al 5-15 % habitual en humanos y ratones (**Tizard, 2000**). Además, gran parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ expresan en su superficie un marcador de activación específico denominado WC-1 (del inglés, *Workshop cluster*). Las funciones de esta molécula no se conocen en profundidad, pero las células que los expresan son siempre T CD4⁻ CD8⁻, lo que nos permite establecer en el ovino una subpoblación definida de linfocitos T implicados en la respuesta innata (**Howard y Morrison, 1994**).

El aumento de la población de linfocitos B y T $\gamma\delta$ en mucosa, en detrimento de la de linfocitos T $\alpha\beta$, es un hallazgo frecuente en vacunos durante el curso de una infección primaria por *Ostertagia ostertagi*, aunque no siempre asociado a protección (**Almería et al., 1997a**). En el ovino y caprino se han realizado estudios histopatológicos de la mucosa abomasal en animales inoculados primariamente con *H. contortus* en los que se han encontrado elevadas cantidades de este tipo celular entre los días 3 y 13 pi, sugiriéndose su intervención en respuestas rápidas frente al parásito (**Balic et al. 2000a; Pérez et al., 2008**). Sin embargo, un estudio anterior en ovinos parasitados con *Trichostrongylus colubriformis* reveló que la depleción de linfocitos T WC1⁺, realizada con anticuerpos monoclonales, mejoraba la respuesta frente a una inoculación desafío en un 88% (**McClure et al., 1996**). Estos resultados son difíciles de comparar, debido a la variedad de especies parásitas y protocolos utilizados en cada caso, si bien señalan que la población de linfocitos T $\gamma\delta$ estaría jugando un papel importante en la respuesta inmune frente a nematodos GI, ya sea favoreciendo o dificultando la implantación de los parásitos.

Por otra parte, también existe una subpoblación importante de linfocitos B a la que se asigna un papel específico en la inmunidad innata. Los **linfocitos B-1a** expresan, junto con otras células, el marcador CD5, estimándose en el vacuno que un 5-35% de los linfocitos B de sangre periférica corresponde a esta subpoblación (**Howard y Morrison, 1994**). Sintetizan principalmente anticuerpos IgM de baja afinidad y especificidad antigénica. Estos anticuerpos podrían jugar un papel importante como primera barrera frente a agentes invasores o

componentes dañados del organismo, activando respuestas independientes de linfocitos T (Arjona, 2007).

La eficacia de estos mecanismos frente a nematodos GI es escasa, dado su gran tamaño y la dureza de su cutícula. Sin embargo, ponen en marcha mecanismos de inmunidad adquirida que potenciarán las respuestas innatas, especialmente las mediadas por mastocitos y eosinófilos.

3.4. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado que la inmunidad innata. Sus respuestas son específicas del antígeno reconocido y tienen la capacidad de desarrollar memoria inmunológica. Se activa cuando los patógenos han superado las barreras de la inmunidad innata y han penetrado en el organismo. Esta respuesta tarda varios días en instaurarse, el tiempo necesario para que el hospedador reconozca el antígeno y se produzca la diferenciación de los linfocitos T y B en células efectoras.

Desde un punto de vista puramente teórico, la inmunidad adaptativa incluye dos tipos de mecanismos con una función común: la eliminación de los agentes extraños. Por una parte, la **inmunidad celular**, mediada fundamentalmente por los linfocitos T, y por otra, la **inmunidad humoral**, mediada por los anticuerpos.

Independientemente del tipo de mecanismo que se ponga en juego, su desarrollo se divide en tres fases: reconocimiento del antígeno, activación de los linfocitos y respuesta efectora.

3.4.1. Presentación del antígeno y orientación de la respuesta inmunológica

El inicio de la respuesta inmune adaptativa se produce con el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T CD4⁺ cuando es presentado por las células presentadoras de antígeno, unido a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II, del inglés *major histocompatibility complex*). El reconocimiento por el TCR específico, desencadena una primera señal de activación que permite establecer interacciones de alta afinidad entre el TCR y el MHC II. Tras ello, otras moléculas de membrana contribuyen a la activación del linfocito T que ha contactado con su antígeno específico. Estas moléculas, denominadas coestimuladoras, desencadenan una segunda señal de activación, que amplifica la primera. De estas moléculas la más importante es el CD28. En ausencia de esta segunda señal se produce un efecto contrario a la activación, en un proceso de anergia en el que los linfocitos T específicos del antígeno se vuelven refractarios a cualquier activación.

Los linfocitos T CD4⁺ que han recibido primeras y segundas señales quedan atrapados en el órgano linfoide secundario en el que han contactado con el antígeno, dividiéndose durante 4-6 días, proceso en el que interviene la interleuquina 2 como estimulador. Durante este periodo no se pueden detectar linfocitos T específicos circulantes. Posteriormente podrán ser detectados en sangre y linfa, ya como células efectoras.

Otro tipo de presentación antigénica se produce cuando células infectadas presentan antígenos específicos unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC I), expresado por casi todas las células del organismo. En este caso los linfocitos que reconocen el antígeno son los T CD8⁺. El resultado de la interacción CD8-MHC I es la activación de los linfocitos T CD8⁺, y su transformación en células de alta capacidad citotóxica denominadas linfocitos citolíticos. Estos producen la lisis de la célula diana mediante la liberación de una serie de moléculas, principalmente perforinas y granzimas, presentes en vesículas de secreción, o bien a través de la activación de los mecanismos de apoptosis (**Aparicio**, **2007**).

Las **células dendríticas** son consideradas las células presentadoras de antígeno por excelencia, y sus características funcionales y morfológicas las convierten en un puente entre la inmunidad innata y adquirida.

Especialmente abundantes en piel y mucosas, poseen largas prolongaciones y están especializadas en capturar y presentar antígenos, siendo las únicas capaces de activar la subpoblación de linfocitos T vírgenes. Según se ha observado en estudios de canulación de vasos linfáticos aferentes, es probable que las células dendríticas que han capturado el antígeno viajen hasta los folículos linfoides, en donde presentan el antígeno a los linfocitos T. Por otra parte, tampoco se excluye la interacción directa entre las células dendríticas subepiteliales y los linfocitos presentes en la lámina propia (Akesson *et al.*, 2008; McNeilly *et al.*, 2009).

De modo excepcional, células dendríticas no infectadas pueden presentar antígenos en el contexto del MHC I, produciendo la activación del linfocito T CD8⁺, pero sin desencadenar la destrucción de la célula, en un mecanismo denominado "presentación cruzada" (**Albert** *et al.*, 1998).

Algunos autores señalan que las células dendríticas podrían tener un papel crucial en la orientación de la respuesta inmunológica frente a nematodos GI, de tal manera que la interacción entre los antígenos parasitarios y la célula podría desencadenar una respuesta protectora proinflamatoria, de tipo Th1 o Th2, o mecanismos de regulación de la respuesta inmune (Belkaid y Oldenhove, 2008; Diebold, 2008).

No existe un marcador específico y único para este tipo de células, y en el ovino se han utilizado, entre otras, las moléculas CD1b, CD11c, CD205 y CD 209 para su estudio inmunohistoquímico (**Gupta** *et al.*, 1993; **Ryan** *et al.*, 2000; **McNeilly** *et al.*, 2006; **Akesson** *et al.*, 2008, **Gulbahar** *et al.*, 2009). La molécula CD1 parece estar relacionada con la presentación de antígenos lipídicos y glucolipídicos en muchas especies (**Tizard**, 2000).

3.4.1.1. Teoría común de la mucosa

La captura de antígenos para su presentación, las características químicas de los antígenos que estimulan la respuesta inmune, y la circulación de los linfocitos hacia los órganos linfoides secundarios son, entre otras, cuestiones todavía no dilucidadas completamente.

En roedores de laboratorio se han demostrado interacciones entre determinadas estructuras de la mucosa y los linfonódulos locales. Estos circuitos de migración celular se exponen en la denominada "teoría común de la mucosa". Su extrapolación a los rumiantes ha de ser realizada con precaución, dado que aún no hay suficientes estudios que la confirmen.

Este circuito implica una migración linfocitaria desde los tejidos linfoides de la mucosa a los linfonódulos locales y posterior retorno a su lugar de origen en la mucosa. En el transporte de antígenos en la mucosa intestinal tienen un papel importante las denominadas células M. Se trata de células epiteliales especializadas situadas sobre las placas de Peyer capaces de capturar antígenos y transportarlos hacia el interior de la placa (sin llegar a tener funciones de APC), donde se produce la estimulación linfocitaria (**Owen, 1999**; **Nicoletti, 2000**; **Kanaya, 2007**). Posteriormente, los linfocitos B y T viajan a los linfonódulos locales donde se multiplican. Estos linfocitos diferenciados, especialmente las células de memoria, son capaces de retornar a la mucosa digestiva, coordinando una respuesta local específica (**González** *et al.*, 2003).

3.4.1.2. El binomio Th1/Th2 en pequeños rumiantes

Estudios realizados en roedores muestran que entre los linfocitos T colaboradores (Th, del inglés *T-helper*) existen dos subpoblaciones claramente diferenciadas, denominadas Th1 y Th2 (**Urban** *et al.*, **1992**). Se distinguen fundamentalmente por las citoquinas que producen, que orientarán la respuesta inmune hacia mecanismos efectores que determinan fundamentalmente la destrucción de patógenos intracelulares (respuesta Th1) o extracelulares (Th2). La resistencia a infecciones por helmintos es claramente dependiente de una respuesta Th2 en múridos, con liberación de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) que producen mastocitosis y eosinofilia en la mucosa digestiva y altas concentraciones de IgE séricas. En rumiantes, la dicotomía

Th1/Th2 es menos clara, suscrita por algunos autores (Gill et al., 2000; Lacroux et al., 2006) y puesta en duda por otros, en general porque en muchas inoculaciones experimentales con nematodos GI realizadas en bovinos y ovinos, junto con el patrón de citoquinas Th2, detectan importantes incrementos en el interferón (IFN) γ, una citoquina vinculada a respuestas Th1 (Almería et al., 1997a,b; Canals et al., 1997; Pernthaner et al., 1997, 2005, 2006; Brown et al., 1998; Miller y Horohov, 2006).

3.4.2. Mecanismos efectores de resistencia

El desarrollo de un grado de resistencia efectivo frente a nematodos gastrointestinales requiere en rumiantes infecciones repetidas (**Dobson** *et al.*, **1990a**, **Claerebout** *et al.*, **1996**). Esto sugiere que una respuesta inmune limitante por parte del hospedador sólo se consigue tras alcanzar un cierto umbral de estímulo, que puede variar según la especie implicada, la fase de desarrollo del parásito o incluso el grado de maduración del sistema inmune del hospedador. Este estímulo puede ser antigénico, aunque en el proceso también pueden estar involucrados factores como la lesión mecánica o enzimática de la mucosa provocados por el parásito (**Balic** *et al.* **2000b**).

Los mecanismos responsables de las manifestaciones de la resistencia no se conocen en su totalidad, aunque se suelen observar más o menos constantemente algunos cambios en la mucosa y linfonódulos locales en animales resistentes. Entre ellos destacan la hiperplasia de los mastocitos de la mucosa, la aparición o el incremento en el número de leucocitos globulares, la eosinofilia periférica y el aumento en la población de eosinófilos en las mucosas, el incremento de la producción de mucus, e incluso la aparición de sustancias inhibidoras de la actividad de las larvas y adultos en el mismo, así como la producción de anticuerpos específicos, tanto a nivel sistémico como en el propio mucus.

3.4.2.1. Respuestas linfocitarias

Tras la presentación del antígeno al linfocito T, éste regula las respuestas efectoras frente al parásito. La importancia del papel de los linfocitos T en la protección frente a nematodos GI está claramente contrastada en roedores de laboratorio (**Urban** *et al.*, 1991, **Koyama** *et al.*, 1995; **Rotman** *et al.*, 1997).

En los rumiantes algunas investigaciones han corroborado esta idea general. Así, la transferencia de linfocitos procedente de la linfa gástrica de ovinos inmunizados frente a *H. contortus* o *T. circumcincta* es capaz de inducir la adquisición de inmunidad frente a estos parásitos (**Smith 1984, 1986**). Posteriormente, otros estudios han demostrado que la depleción

in vivo de linfocitos T CD4⁺ mediante anticuerpos monoclonales anti-CD4 suprime la inmunidad frente a *H. contortus* en ovinos genéticamente resistentes (**Gill et al., 1993a**) o con inmunidad adquirida previamente frente al parásito (**Karanu et al., 1997**).

En general, la infección con nematodos GI produce un incremento en el número de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales. Sin embargo, las poblaciones linfocitarias que ven incrementado su número varían con la especie parasitaria, el hospedador y el tipo de infección (primaria o secundaria).

a) Respuestas linfocitarias en inoculaciones primarias

En infecciones primarias con *Ostertagia ostertagi* en vacunos, por ejemplo, se pueden observar hasta siete veces más linfocitos en la mucosa de terneros inoculados en relación con los recuentos observados en animales controles no infectados, alcanzando un pico máximo al cuarto día post inoculación y retornando a los niveles basales a los 28 días. Las poblaciones de linfocitos B y $\gamma \delta^+$ sufren por su parte el mayor incremento, siendo este menos relevante en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Este incremento del número de algunas poblaciones linfocitarias llega a traducirse en un aumento del peso de los linfonódulos abomasales, 12 veces mayor en los animales inoculados que en los controles el día 28 post inoculación (**Almería** *et al.*, **1997a**).

Otras investigaciones que ponen de manifiesto las diferentes evoluciones que pueden sufrir las poblaciones linfocitarias en el transcurso de unas u otras infecciones con nematodos GI son las realizadas por Gorrell *et al.*, 1988 y McClure *et al.*, 1992. Así, la inoculación primaria de ovinos con 20-30000 L3 de *T. colubriformis* produce un incremento temporal de linfocitos T a los 3 días post inoculación (dpi), (Gorrell *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 1992). Al aumentar el número de L3 inoculadas a 50000, los niveles de linfocitos T CD8⁺ se muestran muy por debajo del nivel basal a las cuatro semanas post inoculación, mientras que los linfocitos T CD4⁺ disminuyen ligeramente (Gorrell *et al.*, 1988). Por el contrario, Balic *et al.*, 2000a, en una inoculación primaria de ovinos con 50000 L3 de *H. contortus*, observan un incremento de linfocitos T y B en la mucosa, acompañado de un aumento de la subpoblación CD4⁺ a los 3 y 5 días tras la inoculación.

Por su parte, caprinos que recibieron una inoculación primaria con *H. contortus*, mostraron un incremento en la cantidad de linfocitos T en la mucosa abomasal a los 11 dpi, y de linfocitos T $CD4^+$ y $\gamma\delta^+$ entre los días 10 y 13 pi, con un incremento menos pronunciado de la subpoblación $CD8^+$. En linfonódulos locales el máximo incremento se observó en los linfocitos B (**Pérez** *et al.*, 2003; 2008).

b) Respuestas linfocitarias en inoculaciones secundarias

En infecciones secundarias con H. contortus en ovinos inmunizados se observa escasa infiltración linfocitaria en los animales que han conseguido impedir el asentamiento larvario. Sólo en los animales en los que las larvas consiguen invadir la mucosa se detecta un aumento significativo en las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta^+$, B y T CD4 $^+$ en la mucosa y de linfocitos B y T CD4 $^+$ activados en los linfonódulos locales (**Balic** *et al.* **2002**), resultados similares a los observados por **McClure** *et al.*, **1992** al inocular ovinos inmunizados con *T. colubriformis*. En este estudio, sólo los animales que eliminan las larvas tras su asentamiento en la mucosa muestran niveles incrementados de linfocitos T a nivel local (mucosa y linfonódulos abomasales).

Sin embargo, **Lacroux**, **2006** y **Lacroux** *et al.*, **2006** no observan ningún incremento en las poblaciones de linfocitos B o T de ovinos inoculados con *H. contortus* y *T. colubriformis* y sacrificados entre 3 y 28 dpi, cuando se comparan animales primoinfectados con otros que recibieron una inoculación secundaria.

Los distintos estudios muestran por tanto que, en general, la respuesta inmune frente a nematodos GI en rumiantes implica un incremento de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales, especialmente linfocitos T CD4 $^+$, $\gamma\delta^+$ y B, tanto en inoculaciones primarias como en inoculaciones secundarias en las que el animal desarrolla un rechazo tardío de las larvas. En cambio, los linfocitos T CD8 no parecen tener especial relevancia, o bien su papel en el desarrollo de los mecanismos defensivos no se encuentra ligado a un incremento manifiesto de su número.

c) Marcadores de linfocitos T

El estudio de las poblaciones de linfocitos T implicadas en la respuesta frente a nematodos GI ha sido llevado a cabo gracias a la utilización de anticuerpos monoclonales frente a moléculas que caracterizan las distintas subpoblaciones de linfocitos T.

Los linfocitos T quedan determinados por la presencia de la molécula CD3, que es un marcador exclusivo y presente en todas la subpoblaciones de esta célula. En rumiantes, a su vez, podemos definir tres grandes subpoblaciones de linfocitos T basándonos en la expresión de los antígenos CD4, CD8 y WC1, siendo cada uno de ellos excluyente de los otros dos. Las características y funciones de estos grupos celulares ya han sido explicadas en capítulos anteriores (Howard y Morrison, 1994).

Finalmente, la expresión de algunas moléculas de membrana determina el grado de activación de los linfocitos T. El marcador **CD2**, por ejemplo, es una molécula de adhesión intercelular implicada en la activación y diferenciación de linfocitos T. Es expresado por la mayoría de los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, y en ovinos, también por una pequeña subpoblación de macrófagos. No se expresa, en cambio, en los linfocitos T $WC1^+$, y por ello suele considerarse como marcador genérico de linfocitos T $\alpha\beta$ (**Baldwin** *et al.*, 1988; **Sopp** *et al.*, 1991; **Haig** *et al.*, 1991).

La molécula **CD5**, por su parte, es expresada por la mayoría de las células T maduras, aunque más fuertemente en las CD2⁺ que en las WC1⁺. Como se dijo anteriormente, también es expresada por la subpoblación de linfocitos B-1. Con respecto a su función en los linfocitos T, fue descrita inicialmente como una molécula coestimuladora de la unión del antígeno al TCR, y se investiga su papel regulador de la respuesta inmune (**Ceuppens y Baroja, 1986; Dalloul, 2009**).

3.4.2.2. Mastocitos, basófilos y leucocitos globulares

Los mastocitos y los basófilos son células con características similares, especialmente en lo que se refiere a la composición de sus gránulos y a sus mecanismos de activación. Comparten receptores de membrana para IgE y TLRs, y también se ha sugerido su procedencia de un antecesor común (**Arinobu** *et al.*, 2005). Sin embargo, tienen localizaciones muy distintas. Los basófilos se encuentran en el torrente circulatorio y los mastocitos, por su parte, se hallan en los tejidos, principalmente en áreas perivasculares y subepiteliales, y pueden responder rápidamente ante la acción de un agente invasor.

Mientras que los basófilos constituyen una población celular bastante homogénea, existen por el contrario poblaciones diferenciadas de mastocitos. Basándose en la diferente composición de sus gránulos se ha distinguido entre mastocitos del tejido conectivo (CTMC, del inglés conective tissue mast cells) y mastocitos de mucosa (MMC, del inglés mucosal mast cells). Dentro de la subpoblación de MMC las células pueden residir en la lámina propia o en el epitelio. Los mastocitos intraepiteliales se caracterizan por tener gránulos de mayor tamaño, especialmente en rumiantes. Se les denomina también leucocitos globulares y se consideran una última fase efectora de la célula, en una localización en la que liberan sus gránulos alterando el medio ambiente parasitario con una mínima lesión tisular (Balic et al., 2000b).

Los gránulos citoplásmicos de estas células incluyen potentes mediadores celulares que son liberados en pocos minutos tras la estimulación (mediadores primarios), como proteasas,

proteoglicanos o histamina. Los mediadores secundarios son sintetizados tras una adecuada estimulación. Entre ellos se encuentran leucotrienos, factor de activación plaquetaria (PAF, del inglés *platelet-activating factor*), prostaglandina D2 y diversas interleuquinas entre las que destaca la IL-4. Los efectos principales de la liberación de estas sustancias consisten en vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, contracción de la musculatura lisa y aumento de la secreción de mucus. Destaca la estrecha asociación entre la degranulación mastocitaria y el sistema nervioso entérico, estimulándolo mediante un incremento de las señales eléctricas y liberación de acetilcolina (McKay y Bienenstock, 1994). Con ello se incrementa el peristaltismo y se libera gran cantidad de fluidos a la luz, facilitándose la expulsión de los parásitos. El resultado de la activación de los mastocitos determina, por tanto, la creación de un ambiente hostil para el parásito, que facilita a su vez la activación de otros elementos de la respuesta inmune frente a helmintos (Balic *et al.*, 2000b).

a) Activación de los mastocitos

La activación de los mastocitos durante la infección por helmintos ocurre generalmente tras contactar con moléculas de excreción/secreción del parásito o procedentes del tejido como consecuencia del daño tisular inducido por este.

Los mastocitos participan en la inmunidad innata, al poder ser activados directamente por componentes de la vía alternativa del complemento, productos bacterianos u otras moléculas. Esta participación en los mecanismos de respuesta innata no es óbice para que puedan intervenir a modo de puente entre esta y la inmunidad adaptativa. En su membrana poseen receptores de alta afinidad para IgE (FcɛRI); los complejos antígeno-IgE unidos al FcɛRI desencadenan la degranulación mastocitaria, y por ello su papel principal se asocia a procesos de hipersensibilidad (Serrano y Uceda, 2007).

En algunos casos, el patrón de liberación de sustancias por parte de los mastocitos puede ser dependiente de la estimulación de un determinado receptor o población de mastocitos, pudiendo diferir del modelo general producido por la estimulación con IgE. En la especie humana se ha observado que la liberación de IFN-α se produce únicamente cuando existe una activación a través del TLR-3, y no cuando se produce la unión de la IgE al FcεRI (**Kulka** *et al.*, 2004). Esto sugiere un papel de los mastocitos en el desarrollo y orientación de las respuestas adaptativas, al constituir uno de los primeros eslabones en la estimulación de la activación de los linfocitos T. A la vez, existe un creciente reconocimiento del papel protector específico de los mastocitos, derivado de sus funciones en la inmunidad innata (**Metcalfe, 2008**).

b) Mastocitos y fenómeno de autocura

La expulsión de la población adulta de *H. contortus* (denominada "autocura") tras la ingestión de nuevas larvas es una de las respuestas inmunológicas frente a helmintos mejor caracterizadas. Es provocada por la liberación de productos de excreción/secreción del parásito que se unen a IgE, provocando la degranulación masiva de los mastocitos de la pared abomasal, y la consiguiente expulsión de los vermes (McClure y Emery, 1994; Salinas 2007).

Sin embargo, este fenómeno de hipersensibilidad con características similares al asma bronquial no va asociado necesariamente a protección, ni confiere memoria inmunológica, y ha llegado a considerarse como un mecanismo de renovación de la población parasitaria presente en el abomaso, asociado a la aparición de las condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de larvas infectantes y la consiguiente reinfestación de los animales (Soulsby, 1987; Meana y Rojo 1999).

c) Asociación entre hiperplasia de mastocitos/leucocitos globulares y resistencia

En el modelo murino, las infecciones con nematodos GI dan lugar al aumento de los mastocitos en los tejidos parasitados, fenómeno dependiente de la IL-3 y de la IL-4 liberadas por linfocitos T activados (Lantz et al., 1998; Behnke et al., 2003). Este incremento se debe tanto a la multiplicación de los propios mastocitos de los tejidos afectados, como a la migración de células de los tejidos adyacentes, y al reclutamiento y maduración de precursores presentes en el torrente sanguíneo (Wang et al., 1998).

La hiperplasia de mastocitos de mucosa y la aparición de leucocitos globulares son fenómenos frecuentes en roedores y rumiantes infectados con nematodos GI (Rothwell, 1989; Balic et al., 2000b), coincidiendo estos procesos con la aparición de parásitos adultos (Salma y Duncan, 1984; Pfeffer et al., 1996; Winter et al., 1997; Balic et al., 2000a; Lacroux et al., 2006).

Esta hiperplasia de mastocitos también aparece frecuentemente asociada a la resistencia frente a la infección parasitaria, especialmente cuando se analizan los leucocitos globulares. En algunos estudios se han encontrado correlaciones negativas entre carga parasitaria y número de leucocitos globulares, lo que no se observa al relacionar los recuentos de vermes con los mastocitos de lámina propia (**Douch** *et al.*, 1986; Stear *et al.*, 1995b). Diversos estudios, en los que se comparan las respuestas locales en razas ovinas resistentes y susceptibles a nematodos GI, han permitido observar recuentos de leucocitos globulares significativamente mayores en los abomasos de las razas resistentes en comparación con las susceptibles, sin que dichas

diferencias se detectaran en los recuentos de mastocitos (Gamble y Zajac, 1992; Bricarello et al., 2004). En esta línea, Stankiewicz et al., 1993 describen un perfil similar al comparar dos grupos de corderos de raza Romney seleccionados atendiendo a sus recuentos altos/bajos de huevos de nematodos en heces.

d) Función de los mastocitos en la expulsión de nematodos gastrointestinales

Los datos sobre el papel de los mastocitos en la expulsión de los nematodos GI, inmaduros o adultos, son mucho más contradictorios. Mientras que Emery et al., 1993 indican una activación de estas células en el proceso de expulsión del parásito en el ovino, otros autores como Huntley et al., 1992 sugieren, por el contrario, que la hiperplasia de mastocitos no es un requisito para la expulsión del parásito, al encontrar altos niveles de resistencia sin incrementos en el número de estas células. En cualquier caso, parece bastante probable que la eficacia de la acción de los mastocitos dependa de la localización tisular del parásito, siendo mucho más efectiva frente a especies o estadios que se alojan en la mucosa que frente a aquellos localizados en la luz del órgano afectado (Anthony et al., 2007).

Como señalan distintos autores, la presencia de mastocitos y leucocitos globulares no es indicativa de su funcionalidad (Rothwell, 1989; Miller, 1996; Balic et al., 2000b). Se puede constatar su activación, y en particular el grado de degranulación, si se detectan los distintos mediadores químicos que liberan estas células. Así, por ejemplo, el estudio en ovinos de los niveles de proteasas derivadas de los mastocitos (SMCP, del inglés sheep mast cell proteinase) en el mucus y en los tejidos puede mostrar su relación con la expulsión inmediata de nematodos GI en animales inmunizados. Así, se pudo observar un pico de SMCP en el suero a las pocas horas de la inoculación con L3 de H. contortus en animales inmunizados, asociado a la expulsión inmediata de los vermes. Los niveles elevados de SMCP se mantuvieron en el mucus 48 horas después del desafío, pero no en la mucosa, lo que sugiere su liberación por los leucocitos globulares. Por el contrario, este pico no se produjo en animales no infectados previamente y pudo ser abolido con la administración de dexametasona (Huntley et al., 1987, 1992). Algunos autores consideran que la mayor susceptibilidad del caprino frente a los nematodos GI podría deberse, al menos parcialmente, a que muestran niveles más bajos de SMCP tisular que el ovino (Huntley et al., 1995).

Otros mediadores químicos evaluados como indicadores de la actividad de los mastocitos frente a nematodos GI son los leucotrienos y la histamina (Jones et al., 1990; Steel et al., 1990; Douch et al., 1996).

Algunos autores sugieren que el papel de los mastocitos/leucocitos globulares esté limitado a la expulsión inmediata de los vermes en animales hiperinmunizados, y sea muy poco relevante en mecanismos de expulsión larvaria más retardados. La inoculación de 50000 L3 de *H. contortus* en ovinos previamente inmunizados ha permitido observar dos modelos de distribución de estas células en la mucosa abomasal de los animales, ligados cada uno a un tipo de respuesta concreta. Sólo se observaron cambios en la cantidad de leucocitos globulares en la mucosa en aquellos animales en los que las larvas no alcanzaron el tejido, pues estas células mostraban un claro descenso a los 5 dpi. Por el contrario, en aquellos animales en los que las larvas llegaron a penetrar en la mucosa los niveles de leucocitos globulares permanecieron estables durante toda la experiencia (Balic et al., 2002). Esta posibilidad también está sustentada por estudios en los que se realizaron cultivos larvarios en secciones de mucosa abomasal extraídos de animales con diferentes grados de sensibilización. En ellos pudo observarse degranulación mastocitaria asociada a una expulsión inmediata de las larvas 3 de *H. contortus* y *T. circumcincta* únicamente en animales previamente sensibilizados (Jackson et al., 2004; Kemp et al., 2009)

Por otra parte, algunos autores han encontrado una correlación negativa entre los niveles de leucocitos globulares y la carga parasitaria de vermes adultos en animales con infección natural por nematodos gastrointestinales (**Douch** *et al.*, 1986), o en inoculaciones secundarias con 50000 L3 de *T. circumcincta* (**Stear** *et al.*, 1995b). Estos datos no justifican necesariamente un efecto directo de los niveles de mastocitos/leucocitos globulares sobre los recuentos de vermes adultos, ya que, como se indicó anteriormente, los niveles máximos de SMCP se producen poco después de la inoculación de las larvas, y el descenso en la carga parasitaria de vermes adultos podría derivar del efecto sobre el establecimiento larvario.

3.4.2.3. Eosinófilos

A diferencia de los mastocitos, los eosinófilos constituyen una población celular homogénea. Los eosinófilos maduros son continuamente transferidos en pequeñas cantidades desde la médula ósea a la sangre y de ahí a los tejidos, en los que se pueden encontrar habitualmente, de modo especial en la mucosa digestiva. En infecciones por helmintos es frecuente observar un incremento de los eosinófilos (eosinofilia) tanto en sangre como en tejidos (Balic et al., 2000b; Gill et al., 2000; Bricarello et al., 2002).

En las tinciones histológicas estas células muestran una fuerte apetencia por la eosina, lo que se debe a la composición de sus gránulos. En ellos existen proteínas fuertemente catiónicas, como son la proteína básica mayor, la peroxidasa eosinofílica, la proteína catiónica de los eosinófilos y la neurotoxina derivada de eosinófilos, e hidrolasas lisosomales. También producen lisofosfolipasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y peroxidasa (**Serrano y Uceda, 2007**).

Además, los eosinófilos activados producen metabolitos tóxicos derivados de oxígeno y sintetizan un amplio rango de mediadores lipídicos, como prostaglandinas, factor activador plaquetario y leucotrienos. También se ha demostrado su capacidad para producir una serie de citoquinas (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, GM-CSF, TNF-α, TGF-β, IFN-γ) y quimoquinas (MIP-1α, RANTES, eotaxina) (Balic *et al.*, 2000b; Rothenberg y Hogan, 2006).

Entre las sustancias liberadas por los eosinófilos se encuentra la galectina-14, considerada como un buen marcador de la actividad de estas células (Young et al., 2009). Los niveles de esta molécula en el mucus aparecen aumentados en animales parasitados en comparación con los que no lo están, así como en animales sometidos a un protocolo de inoculaciones repetidas en comparación con los que reciben una inoculación única (Kemp et al., 2009; Robinson et al, 2011).

a) Activación de los eosinófilos

La IL-5 es la citoquina responsable de la eosinofilia dependiente de linfocitos T en sangre y tejidos tras la infección por helmintos (**Balic** *et al.*, **2000b**). Sin embargo, se han observado niveles basales de eosinófilos en tejidos en ratones *knock-out* para la IL-5, probablemente mantenidos por otras citoquinas, tales como la IL-3 y GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (**Yoshida** *et al.*, **1996**).

La acción efectora del eosinófilos sobre los helmintos parece estar basada en la degranulación de estas células sobre el parásito, mediada por la unión de los receptores de membrana a anticuerpos específicos frente a los vermes. Los eosinófilos tienen receptores para diversas proteínas del complemento y distintas inmunoglobulinas: IgG, IgA y de baja afinidad para IgE (Balic et al., 2000b; Salinas, 2007). Por esto, se requiere normalmente una inmunidad adquirida que permita desarrollar anticuerpos específicos para que los eosinófilos puedan adherirse a los parásitos, y desarrollar, de este modo, su acción efectora. Estos mismos anticuerpos podrán estimular simultáneamente a otras poblaciones celulares, como los mastocitos, que además liberarían sustancias con efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos (Meeusen y Balic, 2000; Salinas, 2007).

b) Eosinofilia en infecciones primarias

Las infecciones primarias de larvas de nematodos GI producen una moderada eosinofilia. En ovinos primariamente infectados con *H. contortus* los mayores niveles de eosinófilos en el tejido se encuentran a los 5 días post-inoculación (dpi). A los 27 ó 36 días la eosinofilia es menor, aunque con niveles mayores que los observados en animales control (**Balic** *et al.*, **2000a**). En infecciones con *T. circumcincta* se observa también eosinofilia tisular a los 10 y 21 dpi (**Stevenson** *et al.*, **1994**).

En helmintos con fases larvarias que queden albergadas en estructuras quísticas se ha podido observar eosinofilia en el momento de la salida al exterior de los adultos a los 21-23 dpi en el caso de *Nematodirus battus* (Winter *et al.*, 1997), o de las larvas 4 de *Oesophagostomum columbianum*, a los 5 dpi (Shelton y Griffiths, 1967).

La eosinofilia en infecciones primarias por nematodos GI, se produce fundamentalmente asociada a los estadios larvarios, más que a la presencia de los vermes adultos, lo que podría deberse al elevado poder quimiotáctico de las larvas de estos helmintos sobre los eosinófilos (Adams y Colditz, 1991; Wildblood et al., 2005). Sin embargo, la repercusión de esta eosinofilia sobre el asentamiento y desarrollo larvario es escasa, probablemente por requerirse una mayor activación de los eosinófilos mediada por anticuerpos tal y como sugieren Meeusen y Balic, 2000 y Terefe et al., 2009.

Por otra parte, Gill *et al.*, 2000, al realizar un estudio en dos grupos de corderos seleccionados genéticamente por su resistencia a los nematodos GI, hallaron a los 28 días de una inoculación primaria con 20000 L3 de *H. contortus*, niveles más altos de eosinófilos y mastocitos en la mucosa abomasal de los ovinos más resistentes. Aunque no se recogieron datos previamente, ni se correlacionaron los parámetros celulares con las cargas parasitarias, estos datos sugieren que la resistencia de estos animales podría estar relacionada con la presencia de eosinófilos en el tejido. En este trabajo se resalta también el papel de los linfocitos T en la estimulación y proliferación de los eosinófilos, dado que, en los animales resistentes, los niveles de IL-5 producidos por los linfocitos de los linfonódulos locales fueron muy superiores a los observados en los animales susceptibles.

c) Eosinofilia en infecciones secundarias. Inmunidad adquirida

En infecciones secundarias por helmintos, los incrementos de eosinófilos en sangre y tejidos son sensiblemente superiores a los detectados en animales primoinfectados, existiendo una estrecha

asociación con las larvas del parásito localizadas en la mucosa (Shelton y Griffiths, 1967; Stevenson et al., 1994; Balic et al., 2003, 2006).

La eosinofilia en sangre muestra en estos casos sus valores más altos a los 12 días post infección tras la inoculación secundaria de ovinos Barbados Barriga Negra e INRA 401 con larvas 3 de *H. contortus*. Este pico también se observa en ovinos Barbados Barriga Negra, raza ovina resistente, al ser inoculados por primera vez, pero no en los pertenecientes a INRA 401, raza susceptible (**Aumont** *et al.*, **2003**). **Amarante** *et al.*, **1999** también observan niveles más altos de eosinófilos en sangre a los 21 dpi, en una inoculación secundaria con *H. contortus*, especialmente en la raza resistente Florida Native, en comparación con la raza Rambouillet, susceptible.

El papel de los eosinófilos en la inmunidad adquirida frente a nematodos GI se relaciona fundamentalmente con su asociación a un estado de resistencia (Gill et al., 2000) y con la observación histológica o *in vitro* de su efecto lesivo sobre las larvas del parásito (Rainbird et al., 1998; Balic et al., 2006).

Sin embargo, el papel de los eosinófilos como células protectoras no deja de ser controvertido. Es llamativo el efecto quimiotáctico de los productos de excreción/secreción de larvas y adultos sobre los eosinófilos, y el daño que producen las enzimas liberadas por el eosinófilo sobre los tejidos del propio hospedador. Algunos autores sugieren que el medio ambiente generado por los eosinófilos podría ser incluso beneficioso para los parásitos, y por tanto estos inducirían el reclutamiento de estas células (Klion y Nutman, 2004; Wildblood et al., 2005). Esto podría ser especialmente cierto en especies parásitas, como *Teladorsagia circumcincta*, que se alojan en las criptas gástricas, lo que dificultaría la interacción directa entre el eosinófilo y las fases evolutivas del parásito en esta localización (Balic et al., 2000b). Algunos autores han observado correlaciones positivas entre los niveles de eosinófilos en sangre y la longitud de los parásitos adultos, sugiriendo que la presencia de estas células podría favorecer el desarrollo de *T. circumcincta* en particular (Henderson y Stear, 2006), aunque también podría reflejar simplemente un mayor reclutamiento celular ante una mayor biomasa parasitaria.

De cualquier manera, su incremento en los tejidos parasitados sugiere un papel importante en la defensa frente a los parásitos, o al menos frente algunas especies. Numerosos estudios *in vitro* reflejan la unión específica de los eosinófilos de roedores y humanos a la superficie de las larvas de los parásitos, en un proceso mediado por anticuerpos y el complemento, que concluye con la muerte del parásito (**Butterwoth y Thorne, 1993**). En el caso de los ovinos, **Rainbird** *et al.*, **1998**, demuestran que los eosinófilos son capaces de unirse específicamente a las L3 de

H. contortus in vitro, en presencia de inmunoglobulinas específicas, IL-5 humana recombinante y complemento, y **Terefe** et al., 2007b, a su vez, observan una menor capacidad infectiva de las L3 de H. contortus cuando estas se incubaron en presencia de eosinófilos antes de inocularlas.

Se ha comprobado finalmente como los eosinófilos se congregan alrededor de las larvas de *H. contortus* en ovinos previamente inmunizados. Las larvas rodeadas presentan diferentes grados de lesión, indicando así que los eosinófilos pueden dañar o incluso matar las larvas de nematodos *in vivo*. El mecanismo de activación de los eosinófilos no pudo ser determinado en su totalidad, aunque los resultados obtenidos sugieren que los niveles de citoquinas en los tejidos pueden ser determinantes (**Balic** *et al.*, **2006**).

Además de este efecto citotóxico directo, los eosinófilos liberan leucotrienos, capaces de promover efectos similares a los leucotrienos liberados por los mastocitos (Costa et al., 1997; Weller, 1997).

La mayoría de los autores encuentran mayores recuentos de eosinófilos en sangre en ovinos seleccionados por su resistencia frente a nematodos GI que en ovinos susceptibles (**Dawkins** *et al.*, 1989; **Buddle** *et al.*, 1992). Sin embargo, esto no es una constante. Así, **Woolaston** *et al.*, 1996 sugieren excluir la eosinofilia sanguínea como criterio de selección de resistencia frente a nematodos GI al no encontrar diferencias entre líneas de Merino resistentes y susceptibles frente a *H. contortus*.

Por otra parte, niveles particularmente elevados de eosinófilos en los tejidos son un hallazgo frecuente en razas e individuos resistentes (Gill et al., 2000; Bricarello et al., 2002, 2004). En otros casos los recuentos no difieren entre razas resistentes y susceptibles, pero sólo se encuentran correlaciones negativas entre los eosinófilos en abomaso y los recuentos de huevos en heces en las razas resistentes (Amarante et al., 2005).

En general, se acepta que los nematodos adultos no suelen inducir eosinofilia, y que su expulsión está mediada por los mastocitos (autocura). En el caso de la expulsión larvaria, diferentes estudios sugieren que los eosinófilos están implicados en un fenómeno de expulsión diferida o tardía de las larvas que han alcanzado la mucosa. Dado que las distintas fases del parásito expresan distintos antígenos, se requieren varios contactos con el parásito para adquirir inmunidad, explicándose así la mayor efectividad de los eosinófilos en infecciones secundarias (Meeusen y Balic, 2000).

En resumen, el papel de esta población celular en la defensa frente a las infecciones parasitarias por nematodos GI no parece desarrollarse de forma similar en todos los casos, y se encuentra sujeta a numerosos factores, tanto relacionados con el hospedador como con la especie parásita implicada en cada caso. Por ello, los diferentes estudios realizados han obtenido resultados muy dispares, tal y como se ha reflejado en este capítulo. A su vez, algunas observaciones son referidas frecuentemente:

- los niveles de estas células aumentan en los animales parasitados, especialmente tras infecciones repetidas.
- los eosinófilos liberan sustancias al exterior de efecto proinflamatorio y lesivo para el parásito.
- su efecto parece limitarse a los estadios larvarios, requiriéndose una activación previa.

3.4.2.4. Células mucosas y caliciformes

Las células caliciformes, verdaderas glándulas unicelulares, se encuentran situadas en el intestino y aparato respiratorio. El abomaso carece de ellas, y en su lugar existe un epitelio de células productoras de mucus que tapiza las fosillas en las que se abren las glándulas gástricas y las crestas situadas entre ellas. También se encuentran células similares en el cuello de las glándulas (**Fawcett, 1991**). Estas células liberan a la luz el mucus, que protege la pared abomasal del efecto del HCl y la pepsina.

La hiperplasia de células mucosas y caliciformes, y la modificación de la composición del mucus (típicamente la glicosilación de la mucina) son fenómenos frecuentes en las infecciones por nematodos GI y parecen estar mediados por las células T (Nawa et al., 1994; Balic et al., 2000b; Khan y Collins, 2004). Sin embargo, no existe un acuerdo unánime. Así tras inducir la depleción de los linfocitos T en ratones infectados con el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*, no se observan diferencias importantes en el número de células caliciformes ni en la composición del mucus, si bien, este procedimiento reduce su producción y retrasa la expulsión de los vermes (Khan et al., 1995). Entre las citoquinas implicadas en la hiperplasia de las células mucosas y en el aumento de la producción de mucus se encuentran la IL-13, IL-4, IL-1 y la IL-12 (Kobayashi et al., 1991; Dahlman-Hoglund et al., 1996; Ishikawa et al., 1997; McKenzie et al., 1998; Wills-Karp et al., 1998).

En el ovino, la inoculación de larvas 3 y adultos de *T. circumcincta* produce hiperplasia de las células mucosas en la totalidad de la pared gástrica, así como menor actividad de las células

parietales. Esto implica un aumento del pH que podría favorecer la supervivencia larvaria (**Scott** *et al.*, 1998a). En el caso de *H. contortus*, se sugiere que la hiperplasia de células productoras de mucus pueda acompañarse de una adaptación de las células principales, productoras habitualmente de zimógeno, que podrían producir también mucus, manteniéndose los niveles séricos de pepsinógeno, aunque disminuya el numero de células principales (**Scott** *et al.*, 1998b).

3.4.2.5. Efecto del mucus y de la motilidad gastrointestinal

La capa de mucus situada sobre el epitelio gastrointestinal parece ejercer un efecto negativo sobre los parásitos. Su consistencia viscosa disminuye la motilidad del verme y dificulta su alimentación (**Douch** *et al.*, 1983; **Miller**, 1987; **Rothwell**, 1989). La importancia que pudiera tener el mucus en el control de la infección por nematodos GI en ovinos se ha puesto de manifiesto en algunos trabajos que demuestran que el mucus de ovejas inmunes es capaz de paralizar las larvas de nematodos (**Douch** *et al.*, 1983; **Jones** *et al.*, 1994).

Diversas sustancias liberadas en el mucus aumentan su acción nociva sobre el parásito. Histamina, leucotrienos y lectinas son algunas de ellas, y especialmente estas últimas han recibido una atención particular en los últimos años (**Young y Meeusen, 2004**).

Entre las sustancias liberadas exclusivamente por los eosinófilos se encuentra la galectina-14 (**Dunphy** *et al.*, **2002**), cuyas funciones se relacionan con la interacción entre diferentes carbohidratos y esta molécula. La galectina-14 parece estar implicada en favorecer la entrada de células inflamatorias en el tejido, dada su capacidad de unión a glicanos de la membrana de eosinófilos, linfocitos y neutrófilos. Por otra parte, se ha demostrado recientemente su alta afinidad por glicanos de la pared de *Schistosoma spp.*, interviniendo en su reconocimiento y en la inducción de una respuesta Th2, así como su capacidad de adhesión a la superfície de *Fasciola spp.* Además, su presencia en el mucus modifica sus características, haciéndolo más viscoso y aumentando su capacidad inmovilizadora (**Young** *et al.*, **2009**). Se expresa habitualmente por los eosinófilos en tejidos sanos, y se libera espontáneamente en la mucosa gastrointestinal ante la infección por helmintos, aumentando su concentración en animales infectados repetidamente con *H. contortus.* Por ello, su actividad se relaciona tanto con mecanismos de inmunidad innata como adquirida (**Kemp** *et al.*, **2009**; **Young** *et al.*, **2009**; **Robinson** *et al.*, **2011**).

La galectina-15, secretada por células del epitelio mucoso del abomaso, tendría una función similar y, tras la inoculación con *H. contortus*, de igual modo aparece aumentada en animales

sensibilizados previamente en comparación con animales primoinfectados (**Meeusen** *et al.*, **2005**). También es secretada por el epitelio uterino alrededor de la implantación embrionaria, pareciendo desempañar un papel clave en el reconocimiento y la adhesión del embrión (**Gray** *et al.*, **2004**).

Junto al mucus, el peristaltismo juega un papel fundamental en la expulsión de los vermes. El mucus impide la adhesión de los vermes a la mucosa, y de esta manera es más fácil que las contracciones de la musculatura lisa los hagan avanzar hacia regiones distales del tubo digestivo. Así, por ejemplo, se ha señalado que líneas de ratones con una mayor motilidad gastrointestinal tienen mayor resistencia frente a las infecciones por *Trichinella spiralis* (Vallance et al., 1997). En infecciones por nematodos GI se ha observado un aumento conjunto de la motilidad del tubo digestivo y de la producción de mucus, sugiriéndose una base inmunológica común (Vallance et al., 1998, 1999; Zhao et al., 2003, Finkelman et al., 2004; Khan y Collins, 2004, 2006).

3.4.2.6. Efecto de las citoquinas en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales en rumiantes

Las citoquinas son proteínas producidas fundamentalmente por células del sistema inmune que permiten la coordinación de sus diferentes componentes, participando en el crecimiento, diferenciación y activación leucocitaria (García, 2007).

Se conocen más de cien citoquinas distintas, destacando en los estudios realizados en infecciones por nematodos GI las siguientes (Lacroux, 2006; García, 2007; Beetz et al., 2008):

- Interleuquina 4 (IL-4): producida principalmente por linfocitos (αβ y γδ), mastocitos y basófilos y, secundariamente, también por los eosinófilos. Estimula la proliferación de los mastocitos, induce el cambio de isotipo a IgE e IgG1 en los linfocitos B, y promueve la diferenciación de los linfocitos T hacia la subpoblación Th2. Produce hiperplasia de las células productoras de mucus e hipermotilidad de la musculatura lisa.
- Interleuquina 5 (IL-5): producida por linfocitos y mastocitos fundamentalmente, estimula la multiplicación de los eosinófilos y la producción de IgE e IgA. Induce hiperplasia de las células productoras de mucus.

- Interleuquina 10 (IL-10): producida fundamentalmente por linfocitos Th2 y B, su función principal es la inhibición de la producción de citoquinas propias de la respuesta Th1: IFN-γ, IL2, IL-3, etc. Por otra parte, estimula la actividad de los mastocitos.
- Interleuquina 13 (IL-13): producida fundamentalmente por los linfocitos T CD4⁺ Th2, estimula la producción de IgE, la contracción del músculo liso y la hiperplasia de las células productoras de mucus.
- Eotaxina 1: es producida por los linfocitos T activados y pertenece al grupo de las quimiotaxinas, citoquinas que ejercen un efecto quimiotáctico sobre algún tipo celular, en este caso los eosinófilos.
- Interferón γ (IFN-γ): producido por los linfocitos Th1, γδ⁺, algunos CD8⁺ y por las células NK. Inhibe la producción de IL-4, y con ello la de IgE. Induce la producción de IgG2 por los linfocitos B. Aumenta la capacidad antimicrobiana de los macrófagos y la actividad de las células NK.
- Interleuquina 12 (IL-12): producida por los macrófagos principalmente, y también por los linfocitos B, monocitos y células dendríticas. Promueve la respuesta inmune de base celular, al estimular la producción de IFN-γ e IL-2, y aumentar la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y células NK. Inhibe la producción de IL-4, y con ello la de IgE.
- Interleuquina 2 (IL-2): es producida principalmente por los linfocitos T CD4⁺ y, en menor medida, por los CD8⁺, e induce la proliferación de linfocitos Th1 y CD8⁺ previamente activados por la IL-12, así como un aumento de la actividad de las células NK. Estimula la respuesta inmune de base celular.
- Factor de necrosis tumoral α (TNF-α) producido por múltiples células, entre las que se encuentran los macrófagos, los linfocitos T (αβ y γδ) y B y los mastocitos. Promueve la apoptosis de células tumorales e infectadas por virus e interviene en las respuestas inflamatorias.
- Factor β de crecimiento transformante (TGF-β): producido por macrófagos activados, plaquetas y linfocitos T y B. Actúa sobre la división celular, generando inmunosupresión y acelerando los fenómenos de fibrosis y cicatrización.

a) Perfiles de citoquinas en respuestas primarias y secundarias

Las citoquinas son un elemento fundamental en la respuesta inmune frente a tricostrongílidos. Como se señaló anteriormente, en roedores infectados por helmintos destaca la liberación de citoquinas relacionadas con la respuesta Th2: IL-4, IL-5 e IL-13, sin que pueda confirmarse todavía el paradigma Th1/Th2 en rumiantes.

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

Gill et al., 2000 al estudiar la respuesta producida por la estimulación con antígeno larvario en células obtenidas de linfonódulos abomasales y mesentéricos de corderos que habían recibido una inoculación primaria con 20000 L3 de *H. contortus*, observan que la producción de IFN-γ es similar o menor en los corderos inoculados que en los controles no infectados. En cambio, la producción de IL-5 fue significativamente mayor en los animales infectados que en los controles no infectados a los 5 dpi y a los 28 dpi. Además, los niveles de IL-5 se muestran más elevados en corderos seleccionados por su resistencia en relación con animales susceptibles. Dado que estos datos se encuentran asociados a mayores recuentos de mastocitos y eosinófilos en la mucosa abomasal en los animales resistentes, estos autores sugirieren una clara respuesta Th2 relacionada con la resistencia a la infección. De modo similar, Terefe et al., 2009, encuentran aumentados los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 en animales sometidos a una inoculación primaria con 10000 L3 de *H. contortus*, en comparación con los animales controles. En otros ensayos, sin embargo, al comparar estos mismos parámetros entre la raza Barbados de Barriga Negra (resistente) y la INRA 401 (susceptible), no llegaron a determinarse diferencias relevantes entre los niveles de citoquinas en ambas razas.

Los estudios de **Balic**, **2000a**, en cambio, no llevaron a esta conclusión, al observarse como una inoculación primaria de ovinos con *H. contortus* produce un aumento pasajero de IFN-γ e IL-10 en los linfonódulos abomasales a los 3 días post inoculación, descendiendo los niveles de estas citoquinas a valores basales a partir de los 5 dpi. La IL-2 mostró, a lo largo de los 36 días que

duró este estudio, niveles más bajos en los ovinos infectados que en los controles, mientras que los niveles de IL-10 e IL-4 fueron similares en los animales infectados y controles, tanto en la mucosa abomasal como en los linfonódulos locales. Finalmente, la expresión de IL-5 llegó a reducirse en los animales que albergaban vermes adultos.

Se han realizado también distintos estudios sobre los perfiles de citoquinas en la respuesta inmune frente a inoculaciones secundarias por *H. contortus*. **Meeusen** *et al*, **2005**, han podido observar un aumento de IL-5, IL-13 e IFN-γ a los 3 días post-inoculación, y de IL-4 a los 5 dpi en animales en los que las larvas alcanzaron la mucosa abomasal. Sin embargo, en animales en los que las larvas fueron expulsadas sin que pudieran penetrar en la mucosa, sólo se observaron niveles elevados de IL-4, tanto antes como después de la inoculación, mientras que las concentraciones de IL-5 y IL-13 no mostraron cambios relevantes. De estos resultados podría deducirse un papel prioritario de los mastocitos estimulados por la IL-4 en la expulsión inmediata de las larvas, mientras que la activación de los eosinófilos por la IL-5, se desencadenaría en caso de que las larvas infectantes alcanzasen el tejido.

Lacroux *et al.*, **2006** observan por su parte un patrón de citoquinas de tipo Th2 muy claro en inoculaciones primarias y secundarias con *H. contortus*, asociadas a eosinofilia y mastocitosis, aunque en ninguno de los casos se halla correlación entre los niveles de citoquinas y resistencia. En este estudio, los niveles de IL-4 se muestran aumentados desde el día 3 pi en los animales inoculados por segunda vez, y desde el día 7 pi en los animales con inoculación primaria, manteniéndose elevados hasta el final del estudio a los 28 dpi. También se observan niveles especialmente elevados de IL-5 e IL-13 en la mucosa del fundus a partir de los 7 dpi en ambas inoculaciones, primaria y secundaria, en comparación con los controles no infectados. Finalmente, no se observan diferencias entre animales infectados y no infectados en la expresión de IL-3, IL-10, IL-12, IFN-γ, TNF-α y eotaxina.

Por otra parte, **Pernthaner** *et al.*, **2006**, en estudios de inoculación secundaria con *T. colubriformis*, también observan un perfil mixto de citoquinas Th1/Th2.

Como ocurría con los estudios de inoculación primaria, los estudios de inoculación secundaria realizados hasta el momento no permiten suscribir una respuesta Th2 de modo claro e inequívoco, como tiene lugar en algunos modelos experimentales como el murino, porque aunque los aumentos en los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 son frecuentes, coinciden con aumentos en citoquinas propias de una respuesta Th1, como el IFN-γ, y además muchas veces no están asociados al desarrollo de resistencia a la infección.

Las distintas citoquinas tienen un papel controvertido en la respuesta inmune frente a nematodos GI, dada la disparidad de resultados obtenidos en los diversos estudios, algunos de ellos muy similares. Es indudable que se produce una alteración de los niveles de algunas de estas moléculas en los animales parasitados, especialmente tras infecciones repetidas, aunque el tipo de citoquinas implicadas en cada caso, y el comportamiento de las mismas suelen variar con frecuencia. El hallazgo más habitual es un aumento en los niveles de IL-4 y IL-5 en los animales parasitados, que se relaciona con un mayor reclutamiento y activación de células efectoras, como los mastocitos y eosinófilos. Sin embargo, este aumento no va asociado necesariamente con una mayor resistencia frente al parásito.

3.4.2.7. Respuesta inmune humoral frente a nematodos gastrointestinales

El uso de preparaciones antigénicas de diferentes fases del desarrollo del parásito y de distinto origen (somáticos o de excreción/secreción) hace dificilmente comparables los distintos estudios sobre la respuesta inmune humoral frente a nematodos GI en ovino. Pese a ello, es posible concluir que como respuesta a la parasitación existe una elevación de los niveles séricos de distintas inmunoglobulinas, IgG1 e IgE especialmente, así como de la liberación de IgA en el tejido afectado. La expresión de los diferentes isotipos varía dependiendo de las distintas fases del desarrollo del parásito. Además, esta respuesta humoral es más rápida y potente en las infecciones secundarias que en las infecciones primarias (Canals y Gasbarre, 1990; Schallig et al., 1995; Balic et al., 2000b, Pernthaner et al., 2006).

Las **IgGs** son los anticuerpos propios de la respuesta inmune secundaria. Dado su pequeño tamaño son capaces de salir del torrente circulatorio y dirigirse a los tejidos parasitados. Se unen a los antígenos parasitarios solubles y pueden ejercer una acción directa sobre el parásito al formar inmunocomplejos sobre los poros anal y oral de las larvas. Al menos en los bovinos se reconocen dos subtipos de esta inmunoglobulina, denominados IgG1 e IgG2, aunque no se descarta su presencia en otras especies rumiantes (**Gutiérrez, 2007**).

Se han observado incrementos séricos en los niveles de IgG1 específicas frente a antígenos somáticos de vermes adultos y L4-L5 así como excretor-secretor (ES) de L4 de *Ostertagia ostertagi*, alcanzando su pico a los 35 días de la infección en terneros primoinfectados, mientras que dicho pico aparece a los 14 (antígenos larvarios) y a los 21 días pi (antígenos adultos) en animales sensibilizados previamente (**Canals y Gasbarre, 1990**). Algo similar ocurre en ovinos inoculados con *H. contortus*. En general, se produce también un incremento en los niveles de IgG1 en animales primoinfectados e inmunizados cuando se utilizan antígenos larvarios, siendo

únicamente los animales sensibilizados los que muestran una respuesta de IgG1 similar frente a vermes adultos (Schallig et al., 1995; Gill et al., 2000).

Los niveles de IgG2 específicas aparecen especialmente elevados en ovinos parasitados con *T. circumcincta* (Yong *et al.*, 1991) y también en bovinos parasitados con *O. ostertagi* (Frankena, 1987). Este hecho puede sugerir distintas vías en la respuesta efectora frente a los distintos géneros de nematodos GI (Gill *et al.*, 1993b; Claerebout y Vercruysse, 2000) o incluso el desarrollo de mecanismos parasitarios de evasión de la respuesta inmune del hospedador.

Gill et al., 2000, por su parte, asocian la producción de IgG1 e IgE a resistencia frente a *H. contortus* al observar diferencias en los niveles de estas inmunoglobulinas entre ovinos resistentes y susceptibles, 28 días después de una inoculación primaria.

La **IgA** es la inmunoglobulina más abundante en las mucosas, responsable de prevenir la entrada de agentes patógenos (exclusión inmune), y de evitar reacciones exacerbadas frente a antígenos alimentarios inocuos (tolerancia oral). Es secretada en forma de dímero por las células plasmáticas de la mucosa, y liberada a la luz unida a un receptor presente en las células epiteliales denominado "componente secretor", que además evita su digestión por las proteasas del mucus (**Brandtzaeg, 1974; 2009**).

La elevación de los niveles de IgA, especialmente en las mucosas infectadas, suele asociarse a la parasitación por helmintos gastrointestinales, hecho que no suelen reflejar sus niveles séricos (Balic et al., 2000b). Existe una fuerte asociación entre los niveles de IgA en el mucus y la disminución de la longitud de adultos (Stear et al., 1995c; Stear y Bishop 1999; Strain et al., 2002; Martínez Valladares et al., 2005a; Henderson y Stear, 2006) y la fecundidad de las hembras de T. circumcincta (Stear et al., 1996; Martínez Valladares et al., 2005a). Este hecho podría estar relacionado con un bloqueo directo de los órganos sexuales del parásito (Salinas, 2007). Otros estudios muestran una clara influencia de la IgA en la respuesta inmune frente H. contortus (Amarante et al., 2005) y T. colubriformis (Pernthaner et al., 2006).

El papel de la **IgE** parece estar relacionado con un mecanismo de hipersensibilidad de tipo I, con activación de la degranulación de los mastocitos y eosinófilos, previa unión de los complejos antígeno-IgE a los FcɛRI de la membrana del mastocito, así como a los receptores de baja afinidad para IgE del eosinófilo.

Pernthaner et al., 2006 observan un doble pico de IgE e IgA (el primero coincidiendo con la primera muda larvaria, y el segundo con la aparición de adultos) tras la inoculación secundaria con *T. colubriformis* en ovinos con inmunidad adquirida. Asimismo, se señalan fuertes incrementos en los niveles de IgE totales y de IgE específicos frente a antígeno excretor/secretor de adultos en la inoculación secundaria de ovinos con *H. contortus*, si bien 2-3 semanas después de la inoculación primaria ya se puede observar un pico de IgE. Sin embargo, no se detecta la misma elevación utilizando antígeno somático de L3 (Kooyman et al., 1997). También Huntley et al., 1998 observan un claro incremento en los niveles de IgE en suero y vasos linfáticos locales en ovinos infectados con *T. circumcincta*, especialmente en animales previamente inmunizados.

Sin embargo, pese a que el aumento de IgE, tanto específica como inespecífica, es una de las respuestas más características en las infecciones por nematodos GI, el papel protector de esta inmunoglobulina aún no está aclarado (Shaw et al., 2009). Algunos autores cuestionan la función protectora de la IgE al observar que, si bien se produce un aumento de IgE tras la infección, lo habitual es que la producción de IgE inespecífica supere ampliamente la de IgE específica frente al parásito. Se sugiere por tanto que estas IgE inespecíficas podrían saturar los FceRI de los mastocitos impidiendo la unión de los complejos antígeno-IgE específica, y con ello la degranulación celular (Jarrett y Miller, 1982; Pritchard, 1993). Curiosamente, en bovinos infectados con O. ostertagi, algunos autores han encontrado correlaciones positivas (Baker y Gershwin, 1992) y otros negativas entre los niveles de IgE específicos y la resistencia a la parasitación (Thatcher et al., 1989; Baker y Gershwin, 1993), con lo que su papel es controvertido.

El papel de las **IgM** parece ser muy poco relevante. Dado el gran tamaño de esta molécula, es rara su salida a los tejidos desde la circulación, aunque se ha demostrado, al menos en el hombre, que es posible su secreción a la luz del tubo digestivo unida a una molécula transportadora, como ocurría con la IgA (**Brandtzaeg** *et al.*, 1968). La discreta elevación de los niveles de IgM en algunos animales inoculados parece más bien producto de reacciones cruzadas con antígenos víricos o bacterianos (**Schallig** *et al.*, 1995).

Los linfocitos B, diferenciados en células plasmáticas, son las células productoras de las diferentes inmunoglobulinas y su cuantificación puede ayudar a valorar la dinámica de infiltración celular local (Balic et al., 2000a; Lacroux et al., 2006; Pérez et al., 2008). Su marcaje inmunohistoquímico se realiza con diferentes anticuerpos monoclonales. En estudios realizados en la mucosa gástrica ovina es frecuente el uso de anticuerpos frente a la molécula CD45R, dado que, además de linfocitos B, tan sólo reconocen una pequeña subpoblación de

linfocitos T, prácticamente ausente en la pared abomasal (Meeusen et al., 1989; Balic et al., 2000a).

3.5. MANIFESTACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A NEMATODOS GASTROINTESTINALES

3.5.1. Frente a estadios larvarios

3.5.1.1. Hipobiosis

La inhibición del desarrollo larvario o hipobiosis es un fenómeno frecuente en la infección por nematodos GI en rumiantes, tal y como se ha comentado anteriormente. Se ha asociado a la resistencia frente a *Ostertagia ostertagi* (Michel, 1963) y *Haemonchus placei* (Roberts, 1957) en vacuno, y frente a *H. contortus* (Barger et al., 1985), *T. circumcincta* (Seaton et al., 1989a, Halliday et al., 2007)), *T. colubriformis* (Barnes y Dobson, 1993) y *Trichostrongylus vitrinus* en el ovino (Seaton et al., 1989b). Consiste en el cese temporal del ciclo del nematodo en un momento preciso del desarrollo parasitario, que sirve para sincronizar el desarrollo del parásito con las condiciones del hospedador y del ambiente (Soulsby, 1987).

Varios autores han señalado la hipobiosis como un mecanismo de resistencia frente *T. circumcincta* en el ovino, puesto que es observada en animales inmunizados, aunque no estén claros los mecanismos que provocan esta situación (**Stear** *et al.*, 1995b; **Halliday** *et al.*, 2007). **Stear** *et al.*, 1995b, postulan que la hipobiosis se asocia a los niveles de IgA frente a L4, de IgG1 frente a L3 y con la carga de vermes adultos. Sin embargo, en otro estudio, realizado también con ovinos infectados con *T. circumcincta*, no se llegó a observar ninguna asociación entre los niveles de IgA en linfonódulos abomasales y la hipobiosis larvaria (**Halliday** *et al.*, 2007).

Por otra parte, la hipobiosis se ha relacionado en múltiples trabajos con otros factores, como son la estacionalidad, la cepa del parásito o la carga parasitaria adulta, tal y como se señaló en el apartado 3 (Blitz y Gibbs, 1971; Eysker, 1997). La importancia epidemiológica de la hipobiosis radica en que promueve una presencia masiva en el pasto de L3 infectantes en momentos en los que hay gran disponibilidad de hospedadores susceptibles, asegurando la supervivencia del parásito en situaciones adversas para el mismo y en que, tras la activación masiva de un elevado número de larvas quiescentes, desencadena patologías graves en los hospedadores (Urquhart, 1996).

Se ha sugerido que la presencia de larvas quiescentes es una estrategia que permite al parásito mantener un nivel de carga parasitaria adulta mediante la renovación de los vermes adultos que van siendo eliminados con la movilización de larvas hipobióticas. Sin embargo, también se ha observado que animales hiperinmunizados son capaces de disminuir progresivamente la carga adulta hasta eliminar todos los vermes (Michel, 1963; Barger et al., 1985). En infecciones naturales de animales en pastoreo, y dado que la respuesta inmune individual es muy variable, la renovación paulatina de la carga parasitaria adulta por las larvas quiescentes, permite un cierto nivel de eliminación de huevos en el pasto que asegura el mantenimiento de la población parasitaria. El hecho de que la hipobiosis sea un fenómeno frecuente en distintas especies de nematodos GI podría sugerir que sea una estrategia de supervivencia efectiva mas que un mecanismo defensivo del hospedador (Balic et al., 2000b).

3.5.1.2. Fallo en el establecimiento larvario

La manifestación principal de la inmunidad adquirida frente a nematodos GI es la reducción del número de larvas que se asientan en la mucosa intestinal tras ser ingeridas (**Balic** *et al.*, 2000b). En este hecho parecen influir una serie de elementos clave:

- La resistencia al establecimiento larvario se expresa más contundentemente tras contactos repetidos con el parásito. Esto se ha observado en bastantes especies de nematodos GI tales como H. contortus (Barger et al., 1985), Trichostrongylus vitrinus (Seaton et al., 1989b), T. circumcincta (Seaton et al., 1989a), T. colubriformis (Dobson et al., 1990b) y Ostertagia ostertagi (Michel, 1973; Claerebout et al., 1996).
- Existen mecanismos específicos de resistencia para cada fase de desarrollo del parásito. Además, las distintas fases larvarias estimulan en distinto grado la respuesta inmune y activan distintos mecanismos efectores. Por ejemplo, animales inmunizados con inoculaciones repetidas de L3 de diferentes especies de la familia Trichostrongylidae adquieren antes la capacidad de inhibir el establecimiento larvario, que de reducir la carga parasitaria adulta (Chiejina y Sewell, 1974; Dobson et al., 1990b).
- Para la activación de la resistencia frente al establecimiento de las larvas de determinada especie se requieren múltiples reinfecciones por la misma especie, pero la expresión de esta resistencia puede afectar a múltiples especies presentes en el mismo tejido. De esta manera, animales que han adquirido inmunidad mediante inoculaciones con larvas de *T. colubriformis*, pueden expulsar otras larvas de nematodos intestinales, como *Nematodirus spathiger* o

Trichostrongylius vitrinus, pero no las de los nematodos gástricos T. circumcincta o H. contortus (Dineen et al., 1977; Barnes y Dobson, 1993; Emery et al., 1993).

• La infección natural de los animales que pastan en el campo puede tener una intensidad muy variable, desde periodos de gran carga parasitaria en el pasto, en los que la infección es continua, a temporadas en las que la supervivencia de las larvas en la hierba es prácticamente nula, lo que activa diferentes mecanismos de expulsión larvaria.

En el caso de las larvas, se contempla su expulsión inmediata, en un proceso en el que intervienen mastocitos intraepiteliales específicamente sensibilizados ("leucocitos globulares"), capaces de impedir el acceso de las larvas a la mucosa en caso de infecciones repetidas, en un mecanismo mediado por IgE. Una gran ventaja de este tipo de respuesta es la escasa inflamación de los tejidos del hospedador, al no producirse la penetración larvaria en los mismos.

Cuando el nivel de parasitación disminuye y los niveles de leucocitos globulares no son suficientes para expulsar las larvas, algunas de estas consiguen alcanzar la mucosa, desencadenando una respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia abundante de eosinófilos y linfocitos en las mucosas y la liberación de citoquinas, principalmente del tipo Th2. Estos eosinófilos son capaces de destruir las larvas alojadas en la mucosa liberando el contenido de sus gránulos, mecanismo también mediado por anticuerpos, en un proceso de expulsión retardada del parásito (Meeusen et al., 2005).

3.5.2. Manifestaciones de resistencia frente a nematodos adultos

3.5.2.1. Expulsión de los vermes adultos

La inmunidad frente a los estadios adultos se manifiesta fundamentalmente en la expulsión de los vermes, cambios en su morfología y reducción de la fecundidad de las hembras.

La expulsión de los vermes adultos tras una inoculación primaria es un fenómeno raro en rumiantes (Behnke et al., 1992), con la excepción de las infecciones por Nematodirus battus (Lee y Martin, 1976; Winter et al., 1997). En cambio, la expulsión de la población adulta como resultado de infecciones repetidas es un fenómeno frecuente en ovinos en las infecciones por H. contortus, (Barger et al., 1985), Ostertagia leptospicularis (Hertzberg et al., 1995), T. circumcincta (Seaton et al., 1989a), T. vitrinus (Seaton et al., 1989b) y T. colubriformis (Dobson et al., 1990b), así como en terneros, por O. ostertagi (Michel, 1963).

La expulsión de los vermes adultos es dependiente de la dosis infectante, al menos en las infecciones por *H. contortus* y *T. colubriformis* (Barger *et al.*, 1985; Dobson *et al.*, 1990b), siendo necesario un umbral mínimo para que se desencadene el proceso de eliminación.

En ovinos este fenómeno es atribuido a un mecanismo de hipersensibilidad inmediata desencadenado por la entrada de larvas, que afecta de modo inespecífico a los adultos, incluso de especies distintas a la de las larvas infectantes. Esta reacción, denominada de "autocura", es muy característica de la parasitación por *H. contortus*, y no necesariamente implica la adquisición de inmunidad frente a futuras infecciones (**Soulsby**, 1987; **Meana** y **Rojo**, 1999).

Sin embargo, existen datos que pueden hacer pensar en fenómenos de resistencia específicos frente a nematodos adultos. Se observa, por ejemplo, que la expulsión de las larvas y adultos de nematodos GI sucede de forma diferida en el tiempo. Por otra parte, existen evidencias de la capacidad que tienen los adultos de *T. colubriformis* de generar una resistencia específica frente a adultos en ausencia de inmunidad larvaria (Emery et al., 1992). Por ello, en general se considera que la expulsión de los nematodos adultos sería el resultado de mecanismos inespecíficos inducidos por larvas infectantes y de mecanismos específicos inducidos por los propios vermes adultos (Balic et al., 2000b).

3.5.2.2. Cambios en la morfología

Entre los cambios morfológicos descritos como manifestación de la respuesta inmune frente a los vermes adultos se encuentran la ausencia de solapa vulvar en las hembras y la disminución de la longitud total del verme.

Diversos autores han observado como el tamaño de los vermes se reduce como manifestación de la resistencia. Así, Coyne y Smith, 1992 mostraron como los vermes obtenidos en ovinos infectados con 30000 L3 de *H. contortus*, tras una inoculación previa con la misma cantidad de larvas y posterior desparasitación, fueron más cortos que los vermes de animales primoinfectados. En el caso de *H. contortus* el menor tamaño de los vermes adultos implica una menor ingesta de sangre, y por tanto, un menor grado de anemia. También **Douch**, 1988 observa como animales con bajos recuentos de huevos albergan hembras de *Trichostrongylus spp*. de menor tamaño que animales con recuentos altos. Por otra parte, **Seaton** *et al.*, 1989a, al medir los vermes de animales inoculados semanalmente con 1000 L3 de *T. circumcincta*, observaron curiosamente una disminución de la longitud en los vermes de los animales inoculados durante cuatro semanas en comparación con los que fueron inoculados durante ocho semanas, y que por tanto deberían haber desarrollado mayor inmunidad. Posteriormente, **Stear** *et al.*, 1995b

demuestran una clara influencia de la producción de IgA frente a productos de excreción/secreción de L4 en la longitud de los adultos de *T. circumcincta*, aunque en este caso la disminución de la longitud de los vermes podría ser consecuencia de los efectos de la respuesta inmune frente a los estadios larvarios.

El desarrollo anómalo de la solapa vulvar en los vermes hembra ha sido constatado como una manifestación de la inmunidad adquirida tras sucesivas infecciones con *O. ostertagi* (**Michel** *et al.*, 1973) y *T. circumcincta* (**Denham, 1969**), pero en *H. contortus* este hecho aún no ha podido ser confirmado.

3.5.2.3. Reducción de la fecundidad

Una menor fecundidad en las hembras adultas se observa frecuentemente como un mecanismo de regulación de las poblaciones de nematodos GI. Esta reducción en la fecundidad está frecuentemente vinculada a la carga parasitaria, bien porque llega a alcanzarse un umbral suficiente para desencadenar la respuesta inmune específica, o bien porque un número elevado de vermes sea capaz de provocar una competencia intraespecífica (Balic et al., 2000b).

La reducción de la fecundidad se ha descrito tras infecciones repetidas con *T. colubriformis* (Gibson y Parfitt, 1973; Barnes y Dobson, 1990; Bisset et al., 1996), *H. contortus* (Dineen y Wagland, 1966) y *T. circumcincta* (Smith et al., 1985a; Stear et al., 1995b) en ovinos; con *T. colubriformis* en caprino (Pomroy y Charleston, 1989) y en vacuno infectado con *O. ostertagi* (Michel, 1963), y en general se acepta como una de las consecuencias de la instauración de una respuesta protectora, aunque en algunos casos no se haya observado esta reducción en la fecundidad (Coyne et al., 1991; Coyne y Smith, 1992).

Los mecanismos propuestos por los diferentes autores como implicados en la reducción de la fecundidad de los vermes son variados. Se ha subrayado la estrecha asociación existente entre la longitud de los vermes y su fecundidad, tanto en *H. contortus* como en *T. circumcincta* (Stear et al., 1999; Martínez Valladares et al., 2005a; Lacroux et al., 2006; Rowe et al., 2008), llegándose a plantear la hipótesis de que el control de la fecundidad de los vermes tenga lugar de forma indirecta, mediante la regulación inmunológica del desarrollo de los vermes, en un proceso mediado por IgA (Strain y Stear, 2001; Rowe et al., 2008). Sin embargo, la IgA también podría tener un efecto directo sobre la fecundidad mediante el bloqueo directo de los órganos sexuales del parásito (Salinas et al., 2007). Finalmente, también se ha descrito la disparidad en la proporción hembras / machos como un posible mecanismo de reducción de la fecundidad de los vermes (Preston y Allonby, 1979).

3.6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR EL PARÁSITO

Los parásitos han desarrollado múltiples sistemas para evitar la respuesta inmune del hospedador. En algunos casos existen mecanismos de resistencia a los sistemas efectores del hospedador, en otros se dificulta el reconocimiento de antígenos, o incluso se liberan sustancias que producen inmunosupresión, o que hacen la respuesta menos efectiva (Salinas, 2007).

En el caso de los nematodos GI, diversos mecanismos les permiten evadir la respuesta inmune del hospedador. Es llamativo el hecho de que el grado de protección inducido por las distintas especies sea muy distinto, sugiriendo esto una capacidad variable de evasión de la respuesta inmune según la especie parásita. En algunos casos, como el de *Oesophagostomum radiatum*, la exposición leve frente al parásito induce una inmunoprotección adecuada y duradera. Otras especies, como *Ostertagia spp.* o *H. contortus*, inducen protección tras un periodo prolongado de exposición. Además, se trata de una protección poco duradera, que requiere de sucesivas reinfecciones para mantenerse (**Gasbarre**, 1997).

En algunos casos el parásito dificulta la exposición de sus antígenos o resulta poco accesible a los mecanismos efectores. Esto lo consiguen de diversas maneras: a veces desarrollan nódulos en las mucosas como en el caso de *Oesophagostomum spp.*, otras se mueven con rapidez, dificultando el contacto con las células defensivas del hospedador, como es el caso de *H. contortus*. Además, las diferentes fases del desarrollo del parásito pueden mostrar diversos antígenos somáticos y de excreción/secreción a lo largo de su ciclo endógeno, comportándose, a efectos de reconocimiento antigénico, como parásitos distintos.

En el caso de *O. ostertagi* en vacuno y *T. circumcincta* en el ovino, sí parece haber una presentación adecuada de antígenos, como sugieren el incremento del volumen de los ganglios locales, la infiltración linfocitaria de la mucosa por linfocitos T específicos y la generación de respuestas humorales periféricas (**Gasbarre**, 1997). Sin embargo, estas respuestas no parecen ser del todo efectivas, dada la poca reactividad de estos linfocitos frente a mitógenos inespecíficos, fenómeno al menos demostrado en sangre periférica en terneros y cabras (**Wiggin y Gibbs, 1990; González, 2002**). A su vez, se han descrito en *O. ostertagi* sustancias liberadas por estos parásitos que bloquean mecanismos concretos de respuesta inmune, como antígenos de L4 y adultos que inhiben, al menos *in vitro*, la linfoproliferación inducida por las L3, o proteasas capaces de degradar la IgG (**de Marez** *et al.*, 1997; Geldhof *et al.*, 2000).

Los helmintos se caracterizan por liberar sustancias inmunomoduladoras que modifican la respuesta inmune en su beneficio, hecho que no deja de suscitar controversia entre los

científicos (Maizels et al., 2004; Hewitson et al., 2009). Así, en referencia a T. circumcincta, algunos autores señalan que la escasa activación de la respuesta inflamatoria, quizás provocada por el parásito, redundaría también en beneficio del hospedador, al ocasionar menor lesión tisular y diarrea, y que el cuadro agudo sería el resultado de una respuesta inmune anómala, exacerbada (Greer et al., 2008). Para H. contortus se ha descrito cómo la expresión de moléculas similares a galectinas ejerce un efecto quimiotáctico in vitro sobre los eosinófilos. Paradójicamente, esto podría crear un ambiente más adecuado para la supervivencia y alimentación de los vermes adultos (Wildblood et al., 2005; Turner et al., 2008). En algunos casos se plantea incluso el posible uso terapéutico de estas moléculas de origen parasitario en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune (Falcone y Pritchard, 2005; Kujik y van Die, 2010).

4. ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA EL CONTROL DE LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN EL GANADO OVINO

En teoría, el uso combinado de antihelmínticos y medidas de manejo en pastoreo debería ser suficiente para controlar las nematodosis gastrointestinales. Sin embargo en la actualidad existen algunos elementos que han comprometido la eficacia de estos métodos tradicionales.

El problema más grave, ya analizado con anterioridad, es la aparición masiva y múltiple de resistencias frente a fármacos antihelmínticos. El descubrimiento de nuevos fármacos no solucionaría este problema, dado que sería muy probable la aparición de cepas resistentes a corto-medio plazo, tal y como ha ocurrido con los fármacos de los que se dispone actualmente. Además, el consumidor muestra cada vez más preocupación por la presencia de residuos farmacológicos en los alimentos de origen animal, y crece la demanda de productos de ganadería ecológica, en la que la administración de fármacos está restringida.

Estas y otras razones han llevado a buscar métodos alternativos o, al menos, complementarios a un control de las gastroenteritis parasitarias fundamentado en el uso de antihelmínticos. El objetivo es encontrar un modelo de control de la enfermedad sostenible económicamente y eficaz a largo plazo.

4.1. CONTROL NUTRICIONAL

Una alimentación adecuada es necesaria para mantener la salud y el bienestar de los animales, y es determinante para evitar el desarrollo de cuadros clínicos en los animales parasitados. De hecho, la mayor parte de las hemoncosis clínicas ocurren en animales con nutrición deficiente y, en cualquier caso, ningún antihelmíntico mejorará la ganancia de peso de los animales a no ser que se acompañe de una ración adecuada (Craig, 2006). Las principales dificultades que tienen los productores para optimizar al máximo las dietas son los costes y el incremento de trabajo que esto supone (Stear et al., 2007).

Diversos trabajos han demostrado que incrementos en la proteína y/u oligoelementos en la dieta permiten al hospedador minimizar los efectos del parásito y aumentar la productividad (Waller, 1997b; Strain y Stear, 2001; FAO, 2004; Stear et al., 2007). En animales inoculados con H. contortus, Bricarello et al., 2005 observaron una mejora en la resistencia y tolerancia en la raza ovina resistente Santa Inés cuando se incrementaba la proteína metabolizable en la dieta, y también observaron una mejora de la tolerancia en la raza susceptible Ile de France, alimentada de forma similar. Otros autores han constatado que el aporte de urea como fuente de nitrógeno no proteico incrementa la respuesta frente a los nematodos GI (Knox y Steel, 1999; Stear et al., 2000b; FAO, 2004), y que las hembras gestantes que mantienen una adecuada condición corporal gracias a aportes energéticos extras muestran menores incrementos en los recuentos de huevos en heces durante el periodo del periparto (Valderrábano et al., 2006).

4.2. VACUNACIÓN

Ante el gran éxito obtenido en el desarrollo de las vacunas frente a virus y bacterias, se ha planteado como alternativa su búsqueda frente a parásitos. La obtención de una vacuna frente al nematodo pulmonar del ganado bovino *Dictyocaulus viviparus* (Anonymous, 1959; Jarrett *et al.*, 1960), con larvas atenuadas, estimuló la investigación para el desarrollo de vacunas frente a otros nematodos de la familia Trichostrongylidae. A pesar del carácter hematófago de *H. contortus*, que permitiría a las inmunoglobulinas séricas entrar fácilmente en contacto con el parásito, y su alta fecundidad, que facilitaría la obtención de antígeno, no se han obtenido hasta el momento vacunas comerciales. En esta especie, las investigaciones se han desarrollado sobre tres planteamientos: el uso de larvas atenuadas, de antígenos expuestos al sistema inmune del hospedador en infecciones naturales y de antígenos ocultos del parásito, que no quedan expuestos al sistema inmune del hospedador.

En otras especies de tricostrongílidos no hematófagas, como *T. circumcincta* o *T. colubriformis*, los estudios de vacunación se orientan, dadas las características biológicas de estos parásitos, a estimular la inmunidad local, y también se han encontrado algunas moléculas inmunogénicas cuyo aprovechamiento como posibles vacunas ha de ser investigado en profundidad (**Knox** *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2008; McClure, 2009).

4.2.1. Uso de larvas atenuadas

La inmunización de ovinos con larvas atenuadas de *H. contortus* sólo ha obtenido resultados positivos en animales adultos, que por otra parte suelen ser resistentes al parásito (**Smith y Christie**, 1979; **Stear** *et al.*, 1999).

Por otra parte, la complejidad que entraña el mantenimiento de las cepas de parásitos impide disponer de un número elevado de larvas, lo que, sumado a la dificultad para alcanzar niveles reproducibles de atenuación y a la rápida caducidad de las vacunas, hace muy complicada la comercialización de vacunas atenuadas, al menos a corto-medio plazo (Meeusen y Piedrafita, 2003).

4.2.2. Uso de antígenos naturales

La búsqueda de antígenos somáticos o de productos de excreción-secreción que generen una resistencia adquirida ha constituido la siguiente fase en la búsqueda de una vacuna frente a H. contortus. Se han conseguido buenas inmunizaciones con productos de excreción-secreción que contenían proteínas de 15 y 24 kD, con proteínas somáticas de L3 de 70-83 kDa y proteínas somáticas de vermes adultos de 23-26 kDa, si bien estas respuestas no se reproducen cuando se utilizan proteínas recombinantes (Jacobs et al., 1999; Vervelde et al., 2002; García Coiradas et al., 2010). En cualquier caso, pese a identificarse gran cantidad de estos productos somáticos o de excreción-secreción, no se ha logrado encontrar ninguna proteína que, de forma aislada, sea capaz de inducir una respuesta inmune protectora (Yatsuda et al., 2003). Hoy en día se considera que durante la infección, el sistema inmune del hospedador reconoce una gran variedad de moléculas (Hilderson et al., 1993; Schallig et al., 1994; McCririe et al. 1997), y que la resistencia parece estar relacionada con ese reconocimiento de múltiples antígenos del parásito (Stear et al. 2005). A la vez, la búsqueda de adyuvantes adecuados y de vías alternativas de administración del antígeno, explotando los mecanismos inmunológicos característicos de las mucosas, se proponen como tareas necesarias para lograr una inmunización más eficaz (Jacobs et al., 1999; Sedgmen et al., 2004).

4.2.3. Uso de antígenos ocultos

La utilización de estos antígenos en el desarrollo de vacunas frente a nematodos GI resulta muy atractiva, porque se trata de moléculas que no han estado sometidas a una presión selectiva previa. Estas moléculas no son reconocidas por el sistema inmune del hospedador en la infección natural, ya que no son accesibles al sistema inmune, y parecen ser antígenos muy adecuados en inmunizaciones frente a parásitos hematófagos como *H. contortus*. Esta difícil accesibilidad al sistema inmune hace que se requieran sucesivas revacunaciones para mantener el nivel de protección, porque la inmunidad que puedan conferir estos antígenos no se estimula durante las infecciones naturales, como sí podría ocurrir si se emplearan como inmunógenos larvas irradiadas o antígenos naturales (Miller y Horohov, 2006; Taylor et al., 2007). En cualquier caso, se han obtenido resultados prometedores en corderos utilizando algunos antígenos ocultos, tales como las glicoproteínas H11 y H-gal-GP (Knox et al., 2003).

Sin embargo, como ocurre también con vacunas a partir de antígenos no ocultos, estos niveles de protección no se mantienen al repetir la vacunación con la proteína recombinante (Newton y Meeusen, 2003; Redmond y Knox, 2004; Stear et al., 2007), probablemente porque las fracciones glucídicas que no incorporan las moléculas recombinantes juegan un importante papel en el reconocimiento antigénico (Hein y Harrison, 2005). A la vez, puede que los protocolos de expresión proteica, habitualmente desarrollada en E. coli, o de inmunización no estén siendo los adecuados (García Coiradas et al., 2010). Por todo ello, recientemente se ha planteado la posibilidad de extraer directamente las proteínas nativas de los parásitos de animales infectados y proceder a su posterior comercialización, al menos en regiones donde las infecciones por H. contortus supongan un gran problema por su elevada prevalencia y por el desarrollo de resistencias múltiples a los fármacos (Smith y Taylor, 2009).

4.3. SELECCIÓN GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES

Otra posible alternativa para el control de las nematodosis gastrointestinales, consiste en la cría de animales que manifiesten de forma innata una mayor resistencia al parásito y/o una mayor tolerancia a la enfermedad. A pesar de la controversia que la selección de animales resistentes suscita, algunos autores la consideran sostenible, posible y deseable (Stear et al., 2001). Para ello se podrían utilizar como reproductores los animales más resistentes del rebaño (selección dentro de raza), utilizando razas resistentes al parásito o realizando cruces entre razas susceptibles y resistentes.

4.3.1. Dentro del rebaño

Existe una variación sustancial en la susceptibilidad individual frente a nematodos gastrointestinales (GI) que muestran los animales de un mismo rebaño (Zajac, 1990; Romjali et al., 1996; Woolaston y Baker, 1996), siendo una pequeña proporción de animales la que aloja la mayor parte de la población parásita (Stear et al., 1998, Kassai, 1999). Este fenómeno tiene una base genética y se relaciona con diferencias en la respuesta inmune que desarrollan los hospedadores frente a los parásitos (Woolaston y Windon, 2001; Miller y Horohov, 2006).

Por tanto, es posible seleccionar los animales resistentes (en inglés, *responder*) en detrimento de los no resistentes (en inglés, *non-responder*). Para ello, primero se debería definir el carácter a mejorar (objetivo de selección), para luego determinar cómo se medirá (criterio de selección) y finalmente, el peso que se atribuye a cada una de las medidas (índice de selección) (**Nicholas**, 1987).

La respuesta a la selección de un carácter depende en gran medida de su heredabilidad. Este factor se define como la proporción de la variación que se debe al efecto medio de los genes, y su valor indica en qué medida el fenotipo está determinado por los genes trasmitidos por los progenitores, y también cuál será el grado de semejanza de la descendencia (Falconer, 1989). La heredabilidad de los recuentos fecales de huevos se estima en torno a 0,2-0,49, un valor similar a otros parámetros tales como la producción lechera o la tasa de crecimiento que se emplean tradicionalmente en la selección ganadera (Woolaston y Baker, 1996; Vanimisetti et al., 2004a; Stear et al., 2007). A la vez hay que valorar que la paulatina incorporación de animales al rebaño con reducidos FEC tendría, a la larga, otro efecto beneficioso, reduciendo la contaminación de los pastos y disminuyendo con ello las posibilidades de reinfección.

La mayor dificultad para incluir la resistencia frente a gastroenteritis parasitarias en los programas de selección es lo dificil que resulta cuantificar esta resistencia (**Dominik**, **2005**). La utilidad del FEC en la selección de la resistencia frente a nematodos GI es limitada. Su desventaja principal es que no es capaz de detectar esta resistencia cuando los animales no están parasitados y se hace necesario retirar el control antihelmíntico para observar diferencias en los animales, lo que puede afectar a la productividad del rebaño (**Kassai**, **1999**; **Dominik**, **2005**). Por este motivo, la identificación de marcadores de resistencia a los parásitos es una clara prioridad.

Se han sugerido los niveles de anticuerpos, especialmente IgG1 (**Douch** *et al.*, **1996**), o de eosinófilos en sangre como marcadores fenotípicos. El problema de estos parámetros, de nuevo,

es que sólo podrían ser valorados en animales adultos que hayan sufrido la parasitación y hayan tenido tiempo para desarrollar inmunidad, por otro lado, el tamaño muestral debería ser grande, pues sería necesario conocer los valores medios del rebaño.

La detección de genes asociados a caracteres cuantitativos (QTL, del inglés *quantitative trait loci*) relacionados con la resistencia parece la opción con más futuro, puesto que permitirían identificar animales resistentes en el rebaño sin necesidad de padecer la infección y de forma relativamente sencilla. Múltiples estudios han sido realizados con este objetivo, con muy distintos planteamientos y resultados (**Dominik**, **2005**).

El alelo G2 del locus DRB1 del complejo mayor de histocompatibilidad ovino, por ejemplo, ha sido descrito como marcador de resistencia frente a *T. circumcincta* en la raza Scottish Blackface (Schwaiger *et al.*, 1995), aunque otros autores no han logrado confirmar estos resultados, evidenciando la complejidad de estos estudios (Buitkamp *et al.* 1996). También la región INFG del cromosoma 3 ha sido relacionada en distintos estudios con la variación de parámetros de resistencia frente a *T. circumcincta* (Coltman *et al.*, 2001), *Trichostrongylus colubriformis* (Beh *et al.*, 2002) y un inóculo de múltiples especies (Paterson *et al.*, 2001). Raadsma *et al.*, 2002, a su vez, describen la presencia de QTLs específicos segregando en un rebaño de ovino cruce de la raza Indonesia de Cola Fina x Merino inoculado con *H. contortus* y seleccionado según el FEC.

Es importante señalar que frecuentemente los QTLs de resistencia frente a nematodos GI identificados en animales jóvenes y adultos no coinciden (Gutiérrez Gil et al., 2009; Marshall et al., 2009). Esto corroboraría la teoría de algunos autores según la cual, en función de la edad, la respuesta inmune frente a estos parásitos dependería de la expresión de diferentes genes, que activarían distintos mecanismos inmunológicos (Stear et al., 1999).

La detección de QTLs de resistencia frente a nematodos GI es un área de investigación relativamente nueva y extremadamente compleja, y requiere de más trabajos que ayuden, en primer lugar, a identificar genes que podrían ser objeto de selección en un futuro, y a profundizar posteriormente en su estudio, de modo que al final se pueda disponer de marcadores genéticos de resistencia a la infección por nematodos GI en los pequeños rumiantes (**Dominik**, **2005**).

4.3.2. Aprovechamiento de razas genéticamente resistentes

La comparación de la respuesta de diferentes razas frente a *H. contortus* ha demostrado que algunas razas son mucho más resistentes que otras. Estas suelen ser razas autóctonas, rústicas, de regiones tropicales o subtropicales, capaces de tolerar o resistir las enfermedades más habituales en su medio ambiente. Probablemente esto refleja que estas razas han estado sometidas durante mucho siglos a un proceso de selección natural para la resistencia frente a los parásitos en ausencia de tratamientos antihelmínticos (**Baker y Gray, 2004**).

Quizá el principal inconveniente para la introducción de estas razas sea su limitada capacidad productiva, menor que las razas mejoradas propias de climas templados. Esta afirmación ha de ser tomada con cautela, pues las razas mejoradas requieren la aportación de los mejores recursos alimenticios, manejo, atención sanitaria, etc, para expresar todo su potencial genético. En regiones subdesarrolladas estas condiciones suelen ser inviables, y en esas circunstancias las razas autóctonas habitualmente tienen una mayor productividad que las mejoradas (Baker y Gray, 2004; Piedrafita et al., 2010). A la vez, debe tenerse en cuenta que poseen por lo general una mayor capacidad para resistir algunas enfermedades. Es importante recordar que reducir el efecto de los parásitos sobre el hospedador va ligado necesariamente a un aumento de la productividad y la eficiencia en el aprovechamiento de los recursos (Piedrafita et al., 2010). Son además razas en las que se ha aplicado una selección escasa en cuanto a la producción, y aunque en muchos casos se desconoce cuál será su respuesta a esta selección, se presume que podría ser alta (Waller, 1997b).

En cualquier caso, no ha de olvidarse la posibilidad de realizar cruzamientos con razas superiores desde un punto de vista productivo. Por otra parte, si estas razas autóctonas poseen marcadores genéticos asociados a la resistencia podría ser posible introducir o seleccionar estos genes en razas más productivas con el resultado de incrementar la resistencia sin comprometer su productividad (Van der Waaij et al., 1999). Por tanto, dado el extraordinario valor genético de estas razas, la FAO ha recordado en numerosas ocasiones la necesidad de conservarlas con estos fines (FAO 2002, 2004, 2007a,b).

a) Importancia y utilidad de las razas resistentes

• Explotación de las razas en su medio natural.

La expansión de razas altamente productivas por todo el mundo ha permitido en muchas ocasiones rentabilizar la explotación de ganado ovino. El desarrollo de la ganadería intensiva, las vacunas y los tratamientos veterinarios han permitido la difusión de estas razas sin necesidad de una adaptación al entorno. Esto ha ido en perjuicio de las razas autóctonas, seleccionadas lentamente a lo largo del tiempo, y habitualmente menos productivas que las razas introducidas. En los últimos quince años del siglo pasado desaparecieron 300 de las 6000 razas ovinas, caprinas y bovinas reconocidas por la FAO, mientras que otras 1350 se encontraban en situación de riesgo (Scherf, 2000).

Las razas de alta producción suelen criarse en condiciones de producción intensiva o semiintensiva, con un alto nivel de tecnificación. De esta manera, son capaces de alcanzar sus
máximos niveles productivos. Sin embargo, es habitual que estas razas estén peor adaptadas a
las condiciones ambientales de una zona determinada y sean más susceptibles frente a las
enfermedades de la región que las razas locales. En ocasiones, como es el caso de las Islas
Canarias, las peculiares características del relieve, el clima, la forma de explotación, entre otras,
prácticamente excluyen la explotación de razas de alta producción. Además el ganado ovino y
caprino de las Islas Canarias está declarado oficialmente libre de brucelosis, y la importación de
animales desde zonas de estatus sanitario inferior está restringida (Decisión 93/52/CEE).

Por el contrario, las razas propias de cada región son las mejor adaptadas a sus características, al haber sido sometidas a un proceso selectivo, por lo que sería necesario conservarlas y promocionarlas, al ser las únicas capaces de mantener una producción sostenible, en zonas donde existan enfermedades endémicas, o en las que los recursos nutritivos para el ganado sean escasos

Utilización de cruces entre razas.

En situaciones de difícil explotación de razas de alta producción se propone con frecuencia la realización de cruzamientos entre estas razas y razas autóctonas. De esta manera se procura aunar la productividad de las primeras y la rusticidad de las segundas.

En comparación con los estudios realizados intra y entre razas, son pocos los trabajos publicados sobre cruzamientos entre razas para seleccionar resistencia frente a nematodos, y habitualmente suponen una segunda fase en el estudio de una raza resistente. Un concepto clave en los programas de cruzamiento es el de heterosis. Se define como el incremento del valor medio en la descendencia en relación a los valores medios de las razas puras progenitoras, expresado en porcentaje (**Falconer**, 1989). Los resultados obtenidos reflejan como los cruces entre razas resistentes y razas productivas suelen determinar individuos con características mejoradas tanto en la resistencia a enfermedades como en los parámetros productivos, es decir, con índices de heterosis positivos.

Hielscher *et al.*, **2006** comparando corderos de razas puras Rhön, susceptibles frente a *H. contortus*, y Merinoland, resistentes, con corderos cruzados de ambas razas, observaron una mejoría en la mayor parte de los parámetros productivos y parasitológicos en los corderos provenientes del cruce de machos Rhön con hembras Merinoland, lo que se reflejó en los porcentajes de heterosis.

Li *et al.*, 2001 recogieron datos sobre resistencia y productividad a lo largo de dos años de animales procedentes del cruce de ovinos Suffolk (raza susceptible) y Gulf Coast (raza resistente). Esta F1 presentó elevados porcentajes de heterosis en los FEC (33-81%) y hematocrito (6-20%), siendo el porcentaje de heterosis en el peso algo menor (1,2-3,8%).

Otro estudio reflejó como el cruce de Merino Rambouillet (susceptible) con Florida Native (resistente) mejoró enormemente los parámetros de resistencia de los ovinos Merino a partir de la F2, pudiendo ser un buen medio para mejorar las características de ambas razas a la espera de analizar como se afectan los parámetros productivos (Amarante *et al.*, 1999).

Finalmente, en Indonesia, **Romjali** *et al.*, **1996** compararon ovinos locales de raza Sumatra, resistentes a nematodos GI, con la F1 derivada del cruce con otras razas foráneas de mejor aptitud productiva. Los resultados mostraron que los cruces mejoran sustancialmente los parámetros de crecimiento de la raza local, sin verse afectada especialmente la resistencia frente nematodos GI.

Todos estos datos muestran como los programas de cruzamiento de razas resistentes con razas de alta producción pueden tener efectos beneficiosos a corto plazo, mucho antes que seleccionando la resistencia dentro de una raza productiva o viceversa. Si bien hacen falta estudios que evalúen si pueden constituir una estrategia de selección a largo plazo, sí parece que

podrían aplicarse en cruces finalizadores en la producción de carne en países en que las gastroenteritis parasitarias sean causa de grandes pérdidas (Li et al., 2001).

• Conservación de genes de resistencia.

Atendiendo a su censo, el ovino y las otras especies ganaderas rumiantes no pueden considerarse, evidentemente, amenazadas. Sin embargo, es indudable que están perdiendo diversidad genética por distintas causas (**Taberlet** *et al.*, 2008).

La desaparición de razas autóctonas supone la pérdida de genes de gran interés, aunque su valor sea difícilmente cuantificable en términos económicos, frente a la producción de leche, carne o lana. La rusticidad de las razas locales, entendida como la adaptación a su medio natural, les lleva a aprovechar al máximo los recursos naturales de la zona, manifestar una especial facilidad para el manejo y el pastoreo o adquirir resistencia a determinadas enfermedades. Esta última característica de las razas autóctonas sugiere la conservación del máximo material genético posible, pues se desconoce qué problemas sanitarios serán más relevantes en un futuro a largo plazo.

Por otra parte, las razas de alta producción, pese a tener un gran censo, poseen en realidad un escaso tamaño efectivo de población, debido al reducido número de machos reproductores. La selección se ha realizado en función únicamente de caracteres productivos, olvidando el patrimonio genético global de cada raza. De esta manera, es inevitable la endogamia, que repercute en la aparición de caracteres indeseables (**Taberlet** *et al.*, **2008**).

La conservación de razas autóctonas en su medio natural ha de constituir una prioridad, y dado que su utilidad a corto plazo puede ser poco percibida por los ganaderos, habrá de ser fomentada por las instituciones públicas. A la vez es de gran importancia el estudio científico, que identifique los caracteres positivos de cada raza, en orden a conservar el máximo patrimonio genético de una especie (**Tapio** *et al.*, **2006**).

• Modelos de respuesta inmune y dianas farmacológicas

Gran parte de los métodos de control de las gastroenteritis parasitarias alternativos al uso de antihelmínticos buscan explotar las respuestas inmunes (innatas o adquiridas) del hospedador frente al parásito. Las razas autóctonas genéticamente resistentes a los nematodos GI han demostrado su resistencia frente al parásito en un periodo de tiempo mucho más largo que las líneas seleccionadas dentro de una determinada raza (Miller y Horohov, 2006). Sin embargo,

los mecanismos inmunes que subyacen en esta resistencia no están claros y podrían ser novedosos (**Piedrafita** *et al.*, **2008**, **2010**), y su conocimiento se revela extremadamente importante para el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas. Es muy posible que los antígenos que estimulan la respuesta inmune en algunas razas, puedan ser utilizados como vacunas, o que el estudio más profundo de la interacción parásito/hospedador pueda ofrecer nuevas dianas farmacológicas (**Meeusen y Piedrafita**, **2003**). Además, la identificación de los mecanismos que explican la mayor protección de estas razas puede facilitar una aproximación más racional a la búsqueda de genes marcadores de resistencia.

b) Razas descritas como resistentes frente a *H. contortus* (Tabla 2)

En la literatura científica se recogen estudios que avalan la resistencia de algunas pocas razas ovinas frente a *H. contortus*. Además, si bien los estudios de resistencia frente a otras especies de Trichostrongylidae son escasos, no hay que descartar una resistencia conjunta frente a diferentes parásitos (**Gruner** *et al.*, 2004).

Los parámetros estudiados y los criterios utilizados para determinar la resistencia son bastante variables, aunque pueden resumirse en el estudio de variables parasitológicas (número y longitud de los vermes, fecundidad, huevos por gramo de heces...) y hematológicas (hematocrito y proteínas plasmáticas). A su vez, algunos autores señalan limitaciones habituales en el diseño experimental de estos estudios, dado que frecuentemente el número de animales es bajo (5-10), no se tiene en cuenta influencia individual de los progenitores, ni se especifican los criterios de elaboración de los grupos experimentales (**Baker y Gray, 2004**).

Por ello es importante hacer notar que determinadas razas han sido señaladas como resistentes en varios estudios independientes, y por ello existe un consenso importante a la hora de valorarlas como resistentes. Se trata de algunas razas presentes en el Caribe y Sur de Estados Unidos (St. Croix, Gulf Coast Native, Florida Native y Barbados Barriga Negra) y en África tropical (Roja Africana o, en inglés, *Red Massai*) (Tabla 2).

En algunas razas se ha llegado a estudiar la base inmune de esa resistencia, valorando el tipo de células efectoras, la producción de anticuerpos y citoquinas, etc, obteniéndose resultados muy dispares. Esto podría reflejar que las diferentes razas ovinas estarían siguiendo distintos mecanismos para alcanzar la protección, lo que muestra la complejidad que entraña el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora frente a estos parásitos (**Piedrafita** *et al.*, 2008, 2010). Sin embargo, también habría de tenerse en cuenta que la utilización de diferentes razas

susceptibles como elemento de comparación podría contribuir a esta disparidad en los resultados.

La raza Florida Native se define como resistente al ser comparada con el Merino Rambouillet. Así los recuentos de huevos en heces y la carga parasitaria de vermes adultos son menores en la raza resistente, a la vez que el hematocrito es más elevado tras una primera infección natural, seguida de una inoculación con 6000 L3 de *H. contortus* (Amarante et al., 1999). Por otra parte, se observa una menor longitud en los vermes alojados en la raza resistente (Radhakrishnan et al., 1972). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en los recuentos de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares en la mucosa abomasal. Estos autores sugieren por ello que la resistencia de estas razas no se basaría en diferencias cuantitativas en estas poblaciones celulares, y podría ser el resultado, por tanto, de diferencias en su capacidad funcional (Amarante et al., 1999).

Una situación similar es encontrada por **Amarante** *et al.*, **2004**, **2005** cuando evalúan la resistencia de otra raza local, la Sta. Inés, comparándola con las razas europeas Suffolk e Ile de France. La Sta. Inés muestra FEC y cargas parasitarias menores que las otras razas; sin embargo, no se hallan diferencias en los recuentos celulares en el abomaso ni en los niveles de IgA en mucus.

La raza resistente Barbados Barriga Negra, al ser comparada con la raza INRA 401 muestra menores FEC y cargas parasitarias. A pesar de ello, el hematocrito es superior en la raza susceptible (**Aumont** *et al.*, 2003). También se encuentran diferencias entre razas en la longitud y fecundidad de los vermes, más pronunciadas en la inoculación primaria que en la reinoculación (**Terefe** *et al.*, 2007a). En este último estudio se comparan varias poblaciones celulares de la pared del abomaso y no se hallan diferencias significativas entre razas. El estudio de citoquinas permite observar una respuesta Th2 más pronunciada en la raza resistente, al encontrarse diferencias en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13.

Estudios realizados tras inocular corderos de las razas Merinoland (resistente) y Rhön (susceptible) muestran menores FEC y mayores niveles de hematocrito en los ovinos Merinoland, así como una diferencia en la fecundidad de los vermes, mucho mayor en la raza Rhön. Sin embargo, las cargas parasitarias y la longitud de los vermes son muy similares (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006).

Existen razas resistentes en las que sí se han podido verificar diferencias cuantitativas en las poblaciones de células inflamatorias. Es el caso de la raza brasileña Criolla Lanuda, que al ser

comparada con la Corriedale en infecciones naturales con *H. contortus* muestra menores FEC y cargas parasitarias, y mayores niveles de hematocrito y proteínas séricas. Entre estas razas existen diferencias significativas en los recuentos de eosinófilos y leucocitos globulares de la pared abomasal (**Bricarello** *et al.*, 2004).

A su vez, la raza St. Croix es más resistente que la Dorset en función de sus menores FEC y cargas parasitarias, tras infecciones naturales e inoculaciones experimentales. La evaluación de la linfoproliferación y de la respuesta humoral mostró una escasa activación de la respuesta inmune, aunque se contabilizaron más leucocitos globulares en la mucosa abomasal en la raza resistente (Gamble y Zajac, 1992).

La raza Gulf Coast Native presenta una resistencia natural frente a *H. contortus* al ser comparada con la raza Suffolk, mostrando menores FEC y cargas parasitarias, así como mayores niveles de hematocrito. Esta resistencia está asociada a una mayor activación de la respuesta inmune, con elevados niveles de IgE e IL-4 en sangre y mayores recuentos de células inflamatorias en el abomaso en la raza resistente (Bahiratan *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998; Shakya *et al.*, 2009). El papel de los linfocitos T CD4⁺ en la resistencia de esta raza se demostró tras la administración de anticuerpos anti-CD4 y la posterior inoculación con *H. contortus* en corderos. Los animales a los que se les administró el anticuerpo tuvieron mayores cargas parasitarias y FEC, aunque no se observaron diferencias en los hematocritos (Peña *et al.*, 2006).

La raza Roja Africana ha sido comparada con la Dorper, observándose en la primera menores recuentos de huevos y cargas parasitarias, vermes más cortos, hematocrito más altos y tasas de mortalidad más bajas (**Preston y Allonby 1978, 1979; Mugambi** *et al.*, **1996, 2005**). En este caso se observan diferencias significativas en los recuentos de eosinófilos en sangre periférica, elevados de forma significativa en la raza resistente (**Mugambi** *et al.*, **1996**).

Es importante señalar que la resistencia frente a *H. contortus* es una característica frecuente en las razas de pelo, siendo ésta una adaptación más a las condiciones del medio en que viven. Además de algunas ya reseñadas (Barbados de Barriga Negra, Roja Africana, St.Croix o Sta. Inés), cuya resistencia ha sido estudiada en profundidad, otras razas de pelo, como la Indonesia de Cola Fina, la Sabi o la Katahdin, han sido señaladas recientemente en la literatura como resistentes en comparación con razas de lana (Subandriyo, 2002; Matika *et al.*, 2003; Vanimisetti *et al.*, 2004b). Los estudios de MacKinnon *et al.*, 2009, 2010, comparando rebaños formados por cruces entre razas de lana, confirman este hecho. Ante la inoculación primaria de *H. contortus* los animales de pelo

son claramente más resistentes que los de lana, manifestando una mayor expresión de genes relacionados con la motilidad gástrica, la producción de citoquinas proinflamatorias y la infiltración celular. Este hecho determina mayores recuentos de eosinófilos en el tejido, así como en un aumento de los niveles de IgA séricas específicas.

Se puede concluir de todo ello que la existencia de variabilidad entre razas en la resistencia frente a la parasitación por *H. contortus* es un hecho ampliamente documentado, especialmente en razas tropicales y subtropicales. A la vez, aunque es posible una influencia de diferentes factores ambientales en la aparición de esta resistencia (nutrición, manejo), existe un componente genético importante en su base, que se manifiesta en mecanismos específicos de respuesta inmune frente al parásito, que podrían ser distintos entre unas y otras razas resistentes (Baker y Gray, 2004; Dominik 2005; Bishop y Morris, 2007; Piedrafita *et al.*, 2010).

5. EL OVINO EN LAS ISLAS CANARIAS: OVINO CANARIO DE PELO Y OVINO CANARIO

5.1. INTRODUCCIÓN

Cuando los conquistadores castellanos llegaron a las Islas Canarias encontraron una raza ovina que era explotada por los aborígenes y que en lugar de lana tenía pelo. El historiador Abreu y Galindo escribe: "críase en esta isla (La Palma) cierto género de carneros y ovejas que no tienen lana, sino pelo liso como una cabra...". Esta raza ovina aborigen dio lugar, tras sucesivos y variados cruces con otras razas ovinas peninsulares, a las tres razas ovinas reconocidas como autóctonas de las Islas Canarias según el Catálogo Nacional de Razas de Ganado de España (RD 2129/08): el ovino Palmero, el Canario y el Canario de Pelo (Anónimo, 2005). El ovino Canario, de buena aptitud lechera, ha tenido siempre una mejor aceptación que las otras dos razas locales. De hecho, su expansión por todas las islas, junto con el ganado caprino, ha constituido un grave riesgo para la conservación del ovino Palmero, hoy casi desaparecido, y del Canario de Pelo, actualmente en expansión, pero por momentos casi extinguido (Esteban, 2003; Anónimo, 2005). Finalmente, también ha constituido un riesgo para la conservación de estas razas locales el fenómeno de despoblación rural propio de las últimas décadas, con la consecuente falta de mano de obra y abandono de las tierras, junto con la intensificación de los sistemas productivos en búsqueda de mayores rendimientos de las explotaciones, lo que lleva a despreciar la cría ganadera en extensivo.

Tabla 2: Razas resistentes a H. contortus

				Parámetros	Mecanismos	
Raza resistente	Localización principal	Raza (s) susceptible (s)	Tipo de infestación	parasitológicos que definen la resistencia	inmunológicos relacionados	Referencias¹
Florida Native	EE.UU	Merino Rambouillet	Doble: Natural/AH/6000 L3	HPG, Carga Parasitaria, Longitud	,	Radhakrishnan <i>et</i> al., 1972 Amarante et al., 1999
Sta. Inés	Brasil	Suffolk Ile de France	Natural	HPG, Carga Parasitaria		Amarante <i>et al.</i> , 2004, 2005
Barbados Barriga Negra	Caribe, Sur de EE.UU	INRA 401	- Única: 10.000 L3 -Doble: 10.000/AH/10.000 L3	HPG, Carga Parasitaria, Longitud, Fecundidad	Citoquinas Th2	Gruner <i>et al.</i> , 2003 Aumont <i>et al.</i> , 2003 Terefe <i>et al.</i> , 2007a
Criolla Lanuda	Centroamérica y Sudamérica	Corriedale	Natural	HPG, Carga Parasitaria	Eosinófilos, Leucocitos Globulares	Bricarello et al., 2004
Katahdin	Caribe, Sur de EE.UU.	Dorset Dorper	Única: 10.000 L3	HPG		Vanimisetti <i>et al.</i> , 2004b
St. Croix	Caribe, EE.UU.	Dorset	-Natural -Única : 20.000 L3	HPG, Carga Parasitaria	Leucocitos Globulares	Gamble y Zajac, 1992 Burke y Miller, 2004
Criollo	México	Suffolk	Múltiple : $1.000 \mathrm{L3 x}$ 6	HPG, Carga Parasitaria	-	Alba Hurtado <i>et al.</i> , 2010

Miller <i>et al.</i> 1998 Peña <i>et al.</i> , 2006 Shakya <i>et al.</i> , 2009	Mugambi <i>et al.</i> , 1996, 2005	Matika et al., 2002	Saddiqi <i>et al.</i> , 2010	Subandriyo, 2002	Nimbkar <i>et al.</i> , 2003	Gauly <i>et al.</i> , 2002 Hielscher <i>et al.</i> , 2006
IgE, linfocitos T CD4 Citoquinas Th2 Eosinófilos, Mastocitos, Leucocitos Globulares	Eosinofilia sanguínea		Mastocitos y Eosinófilos			
HPG, Carga Parasitaria	HPG, Carga Parasitaria, Longitud	HPG	HPG, Carga Parasitaria		HPG	HPG, Fecundidad
Natural	-Múltiple: 1.000 L3 x 8 -Doble: Natural/AH/ 2500 ó 1250 L3 x7	Natural	Única : 10.000 L3		-Natural -Única : 4.000 ó 10.000 L3	Única: 5.000 L3
Suffolk	Dorper	Dorper	Kachhi y Tahli		Deccani y Bannur	Rhön
Sur de EE.UU.	Africa Oriental	Zimbawe	Pakistán	Indonesia	India	Alemania
Gulf Coast Native	Roja Africana (Red Massai)	Sabi	Lohi	Indonesia de cola fina	Garole	Merinoland

AH : antihelmíntico ¹Se incluyen únicamente algunas de las publicaciones más relevantes

Las instituciones locales, nacionales e internacionales, muestran gran interés en la conservación de estas razas locales, por su valor histórico y genético, y por su capacidad de integrarse en sistemas de producción sostenibles. Existen Libros Genealógicos para las tres razas (**Órdenes de 13 de agosto de 2001; 21 de Mayo de 2003 y 21 de junio de 2006, del Gobierno de Canarias**), pertenecientes a la categoría de "razas autóctonas en peligro de extinción", según el Catálogo Nacional anteriormente citado. Actualmente no existen programas oficiales de selección y conservación, con lo que queda en manos de los ganaderos particulares.



Fig. 5: Ovino Canario y ovino Canario de Pelo criados conjuntamente

El ovino Canario y el ovino Canario de Pelo están oficialmente reconocidos por la FAO (http://dad.fao.org/). Para ambas razas se incide en su elevada rusticidad y en su capacidad para explotarse en zonas tropicales y subtropicales con escasos recursos, a la vez que se recuerda que están libres de brucelosis. El ovino Canario de Pelo es considerada por la FAO en la última edición del "World watch list for domestic animal diversity" como una raza "amenazada" (Scherff, 2000) Si bien en la actualidad, con la notable expansión que ha experimentado en esta última década, es probable que la raza haya salido de esa categoría, sin embargo no se dispone de censos oficiales que permitan asegurarlo tajantemente.

5.2. EL OVINO CANARIO DE PELO

Esta raza se considera relacionada con los ovinos peludos de África Occidental, que dieron lugar a una raza ovina de pelo presente en Canarias antes de la colonización de las Islas. Tras el descubrimiento de América, y al ser las Islas Canarias un lugar de paso en los viajes de las embarcaciones hacia el Nuevo Mundo, se importaron ovinos de pelo desde Canarias a América,

que dieron lugar a importantes razas de pelo americanas como la Barbados de Barriga Negra, el Pelibuey, etc., extendidas fundamentalmente en zonas tropicales (Esteban, 2003).

La población autóctona de ovinos de pelo entró en clara regresión, pero la introducción desde América en las últimas décadas de importantes núcleos de oveja de pelo, y su rápida expansión en las Islas, ha elevado enormemente el censo de la raza Canaria de Pelo.



Fig. 6: Ovino Canario de Pelo

A la buena aceptación de la raza por parte de los ganaderos contribuyen especialmente sus posibilidades productivas, relacionadas con la producción de carne y, sobre todo, de estiércol, en conexión con la agricultura intensiva, sumada a ello su elevada rusticidad. De esta manera, la expansión de cultivos intensivos como los de plataneras o de tomateros, no ha ido en detrimento, sino más bien en beneficio, de la expansión de esta raza. Además, por carecer de lana, no es necesario esquilarla, con lo que el manejo es más sencillo.

Entre las características morfológicas que definen a la raza encontramos la capa, generalmente roja, aunque se admiten otras tonalidades, la ausencia de lana, si bien puede aparecer en el dorso de modo vestigial, el perfil de la cabeza subconvexo en las hembras, y convexo en los machos, el gran desarrollo testicular en el macho, el poco desarrollo de la mama en la hembra, aunque está bien implantada, además del carácter acorne de ambos sexos, admitiéndose de modo extraordinario la presencia de pequeños cuernos en algunos individuos (**Orden 13 de agosto de 2001; Esteban, 2003**).

Se considera un animal de continua actividad reproductora a lo largo del año, con buenos índices de fertilidad y prolificidad (Anónimo, 2005; Camacho et al., 2007). Aunque los partos

dobles son frecuentes, no son deseables, dado que la baja producción lechera de la raza dificulta la supervivencia de ambos corderos.

Dentro de las aptitudes productivas clásicas del ganado ovino, la cárnica es la más desarrollada en esta raza, que puede alcanzar el peso comercial, entre 12 y 18 kg, a los 90 días, presentando un rendimiento a la canal en torno al 50% (**Esteban, 2003**). Actualmente se suele criar en estabulación en relación con cultivos intensivos, de los que suele aprovechar subproductos como alimento, utilizándose además el estiércol como fertilizante de estos cultivos.

Es difícil establecer el censo actual de esta raza, que, como se indicó, se encuentra en clara expansión. El último censo de ganado ovino publicado por el Gobierno de Canarias en 2009 señala 75000 cabezas, sin especificar la raza. El número de estos animales pertenecientes a la raza Canaria de Pelo se ha estimado en torno a 9-10000 en 2003 (Camacho *et al.*, 2007) y de unas 40000 cabezas en 2005 (Anónimo, 2005). El censo anterior señala que aproximadamente un 50% de las hembras no se ordeñan, por lo que la última estimación parece más probable, ya que el Ovino Canario de Pelo es la única raza de aptitud cárnica presente en el Archipiélago. En el año 2009, tras un estudio genético realizado en granjas de la isla de Tenerife, se publicó un Catálogo de sementales, como medio para facilitar la selección y mejora de los rebaños (Gobierno C.A. Canarias, 2009).

5.3. EL OVINO CANARIO

El ovino Canario surge como resultado del cruce de ovinos de pelo autóctonos de las Islas con ovinos de lana larga y basta traídos por los colonos castellanos y ovinos de lana africanos (**Esteban, 2003**). La selección realizada por los ganaderos ha ido enfocada hacia la producción de leche, consiguiéndose un animal muy rústico, perfectamente adaptado a las condiciones del medio en que vive, con una producción bastante aceptable.

Se trata de un animal de capa muy variable, existiendo individuos de color blanco o negro uniforme y otros con grandes manchas negras o rojas sobre fondo blanco, siendo la lana larga y de escasa calidad. Los machos presentan grandes cuernos en espiral, mientras que las hembras son generalmente acornes. Destaca el gran desarrollo mamario en las hembras. De ciclo ovárico continuo, suele cubrirse una vez por año, con una alta prolificidad, alrededor de 1,5 corderos por parto (**Orden 12/6/2006**; **Esteban, 2003**).

Su aptitud productiva fundamental es la lechera, siendo un animal que aprovecha los escasos recursos del medio para lograr una producción alta, en torno a los 150-200 litros por animal y

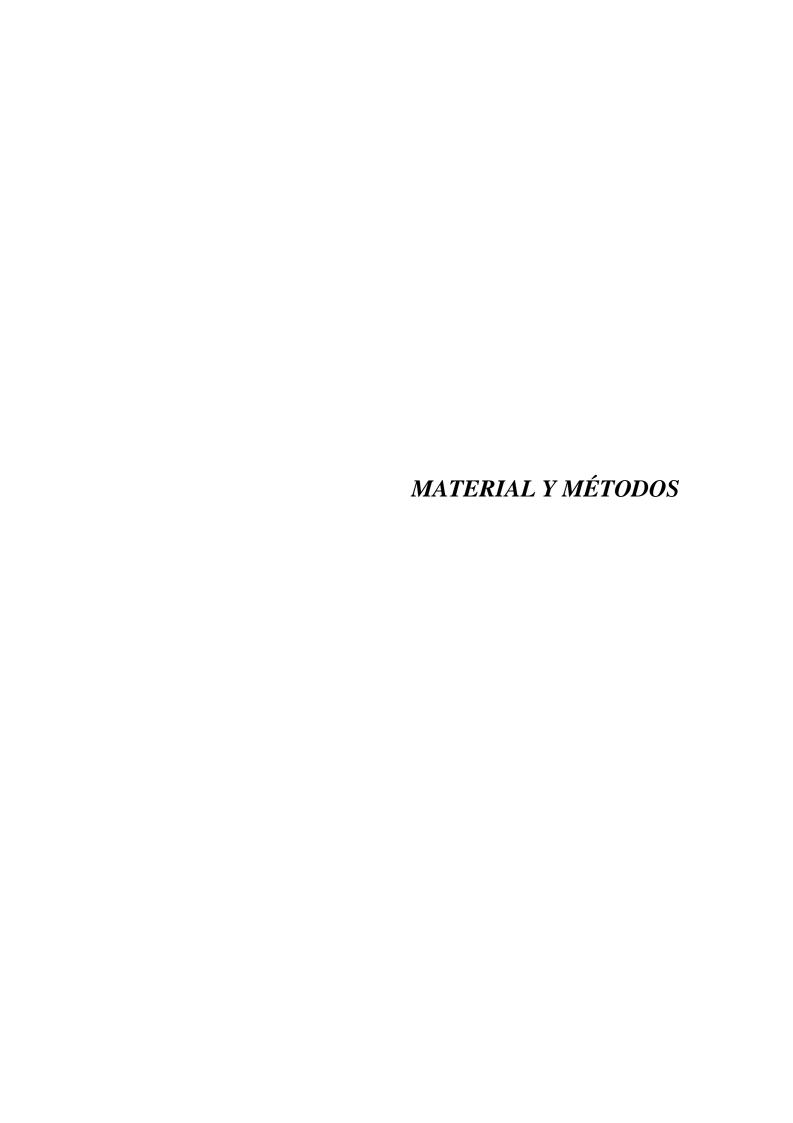
lactación, que se prolonga unos 200 días. La leche es destinada habitualmente a la producción de quesos, incluyendo algunos con denominación de origen.

La rusticidad es una de las características principales de esta raza, criada frecuentemente en sistema extensivo, en zonas poco favorables para el ganado por su relieve y climatología, con escasas precipitaciones y pastos de baja calidad (**Scherff, 2000; Esteban, 2003**). Es común la cría conjunta de ganado caprino y ovino, especialmente en zonas costeras (**Esteban, 2003**).

Como se indicó en el apartado anterior, resulta difícil conocer el censo de cada raza por separado, pero se puede estimar en torno a 30-40000 cabezas para el ovino Canario.



Fig. 7: Ovino Canario



MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

En esta experiencia se emplearon catorce corderos de la raza ovina Canaria de Pelo y otros catorce de la raza ovina Canaria, de aproximadamente ocho meses de edad. Los animales se alojaron en las instalaciones de la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria, recibiendo agua *ad libitum* así como pienso y forraje adecuado a su edad. Uno de los corderos de pelo murió de clostridiosis poco antes de iniciar la experiencia.

Los animales fueron desparasitados con levamisol (Cyver, Fort Dodge Veterinaria) (1ml/10 kg p.v.) al adquirirlos y diez días antes de realizar las inoculaciones, que se efectuaron cuatro meses después de su llegada a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Todos los animales tuvieron coprologías negativas antes del inicio de la experiencia.

2. PARÁSITOS

Para la inoculación experimental se utilizaron larvas 3 (L3) de una cepa de contrastada patogenicidad de *Haemonchus contortus*, cedida por los Doctores David Knox y David Bartley (*Moredun Research Institute*, Edimburgo, Reino Unido). Las larvas fueron recogidas dos semanas antes del inicio de la experiencia, lo que garantizó su viabilidad.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.1. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos:

- **Grupo CAP 1**: Animales de raza ovina Canaria de Pelo inoculados con 20000 L3 de *H. contortus* y sacrificados 7 días después de la inoculación (n=5).
- **Grupo CAN 1**: Animales de raza ovina Canaria, inoculados con 20000 L3 de *H. contortus* y sacrificados 7 días después de la inoculación (n=5).
- **Grupo CAP 2**: Animales de raza ovina Canaria de Pelo inoculados con 20000 L3 de *H. contortus* y sacrificados 28 días después de la inoculación (n=8).
- **Grupo CAN 2**: Animales de raza ovina Canaria inoculados con 20000 L3 de *H. contortus* y sacrificados 28 días después de la inoculación (n=9).

Las inoculaciones se realizaron mediante punción intrarruminal en la fosa del ijar, en el costado izquierdo de cada animal.

3.2. RECOGIDA DE SANGRE Y SUERO

Con el fin de realizar análisis hematológicos y serológicos de todos los animales, se obtuvieron semanalmente muestras de sangre mediante punción yugular los días 29, 22, 14 y 9 previos a la inoculación, el día de la inoculación y los días 6, 13, 20 y 27 post inoculación (pi) (ver tabla 1) en tubos colectores de 3 ml con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y tubos siliconados (Becton Dickinson). Las muestras en EDTA se conservaron en refrigeración (4°C) hasta su posterior procesado, mientras que las muestras recogidas en tubos siliconados, tras su almacenamiento en refrigeración durante 90 min, se centrifugaron a 3500 rpm (centrífuga REyCO 41), y el suero obtenido se recogió y almacenó a -20°C.

3.3. RECOGIDA DE HECES

Los días 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 27 pi se recogieron heces directamente del recto de cada animal, para realizar el recuento de huevos de nematodos. Además, la víspera de la inoculación se recogieron también muestras de heces para comprobar la ausencia de huevos de nematodos del Orden Strongylida.

3.4. RECOGIDA DE MUESTRAS TRAS EL SACRIFICIO

Los animales fueron sacrificados en el Matadero Insular de Gran Canaria, recogiéndose los abomasos, tras ligar previamente el píloro y cardias y se llevaron a los Laboratorios de la Unidad de Parasitología del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, para su posterior procesado.

3.4.1. Recogida de muestras para estudio histólogíco e inmunohistoquímico

Para el estudio histológico, se tomó una muestra de aproximadamente 2x2 cm de la curvatura mayor del abomaso correspondiente al fundus gástrico, que fue conservada en formol tamponado al 10 % (tabla 3). Tras su fijación, las muestras se sometieron a baños de alcoholes de distinta graduación y xilol y posteriormente se incluyeron en parafina para su corte histológico.

Tabla 3: Preparación del formol tamponado al 10%

dH ₂ O	900 ml
Formalina pura (Panreac)	100 ml
Fosfato sódico monobásico (Merck)	4 g
Fosfato sódico dibásico (Merck)	6,5 g

Para el estudio inmunohistoquímico se recogió otra muestra similar del abomaso, para cuya congelación se utilizó un recipiente con isopentano (PRS Panreac Química SA), el cual se mantuvo en una cámara a -80°C durante unas horas antes del procesado y tratamiento de las muestras. —El isopentano actúa como crioprotector al mantener la morfología celular e impedir la destrucción tisular por choque térmico—. Las muestras previamente recubiertas con O.C.T. (Optimal Cutting Temperature, Tissue Tek®; Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude,

Tabla 4: Protocolo Experimental

ą.		D	ías previ	os a la in	Días previos a la inoculación					Día	s posteri	ores a la	Días posteriores a la inoculación	ón			
		-29	-22	-14	6-	-1	0	9	7	13	15	18	20	22	25	7.7	28
Grupo	=	Sg	Sg	Sg	Sg	Нс	Inc Sg	Se	Sac	Hc Sg	Нс	Нс	Hc Sg	Нс	Нс	Hc	Sac
CAP 1	5	+	+	+	+	+	+	+	+								
CAN 1	5	+	+	+	+	+	+	+	+								
CAP 2	~	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
CAN 2	6	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+

Sg: Recogida de sangre y suero; Hc: Recogida de heces; Inc: Inóculo de 20000 L3 de H. contortus; Sac: Sacrificio; +: Se realiza esa actividad

Holanda) se sumergieron en isopentano durante unos minutos, hasta que el O.C.T. adquiriera una consistencia sólida. Una vez obtenidos los bloques con las muestras recubiertas por O.C.T., se almacenaron en cámara a -80°C hasta su posterior procesado. Muestras de un grosor de 4 μm se obtuvieron en un criostato (Reichert-Jung 2800 Frigocut N) a -20°C.



Figura 8: Criostato utilizado para cortes en congelación

3.4.2. Recogida del contenido abomasal

El abomaso se abrió a través de la curvatura mayor, recogiéndose el contenido abomasal en una batea. Para retirar los vermes que pudieran quedar en la mucosa, se procedió a lavar la víscera con un volumen conocido de agua. A continuación, se homogenizó la suspensión y se recogió una alícuota de 300 ml a la que se añadieron 30 ml de formol (formaldehído 35-40% v/v, Panreac) para su conservación hasta su posterior procesado (modificado de MAFF, 1989).

3.4.3. Recogida de mucosa gástrica

Finalmente, con la ayuda de un portaobjetos, se realizó un raspado profundo de la totalidad de la mucosa gástrica para estimar la población de vermes inmaduros presentes en el interior de la mucosa en el momento del sacrificio. A continuación, se pesaron las muestras recogidas de cada animal y el tejido se conservó en congelación, a -20° C hasta su posterior procesado.

4. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

Durante el periodo experimental, se valoraron diversos parámetros hematológicos en los animales inoculados.

4.1. HEMATOCRITO

Para determinar la proporción relativa de glóbulos rojos respecto al plasma, la sangre se centrifugó (Mixtasel, Selecta) a 8000 r.p.m. durante 7 minutos en capilares de microhematocrito (Marienfeld, Glassware), utilizándose una escala comercial para calcular el hematocrito de cada animal.

4.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La concentración de las proteínas plasmáticas (g/dl) se halló con ayuda de un refractómetro (Comecta SA). El plasma se obtuvo a partir de las centrifugaciones efectuadas para determinar los hematocritos.

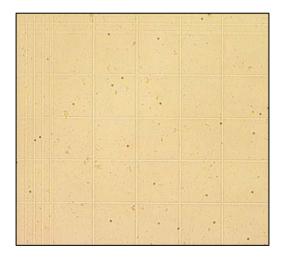


Fig. 9: Recuento de leucocitos en cámara de Neubauer

4.3. RECUENTO TOTAL DE LEUCOCITOS

Se realizó una dilución de la sangre de cada animal (1:20) en líquido de Türck (Panreac SA). De este modo, se produce la hemólisis y se tiñen los núcleos de los leucocitos (**Voigt, 2003**). El recuento total de los glóbulos blancos se realizó para cada animal con ayuda de una cámara de Neubauer (Tiefe). Se contabilizaron los leucocitos presentes en un volumen de 0,02 µl de

sangre. El resultado se multiplicó por 50 y de este modo se obtuvo el nº de leucocitos/μl de sangre (Fig.9).

4.4. RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA

Para realizar el recuento diferencial de leucocitos, se tiñeron extensiones de sangre de cada animal con panóptico rápido (Panreac SA). A continuación se procedió al recuento diferencial de 100 leucocitos en cada preparación, discriminando entre neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. A partir de este dato y del número total de leucocitos/µl de sangre, se calculó el número de células de cada tipo leucocitario/µl de sangre.

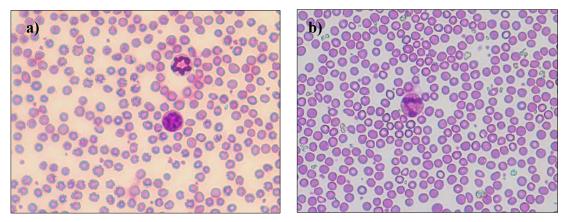


Fig 10: Frotis sanguíneos (400x) en los que se pueden observar un linfocito y un neutrófilo (a), y un eosinófilo (b).

5. ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS

En este estudio se utilizaron diversas técnicas parasitológicas que permitieron comparar la implantación y posterior desarrollo de las larvas de *H. contortus* en el abomaso, así como la fecundidad y longitud de los vermes adultos en ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) tras la infección experimental con 20000 L3 de *H. contortus*.

5.1. RECUENTO DE HUEVOS EN HECES

Las heces de cada animal fueron procesadas inmediatamente después de su recogida mediante flotación en solución salina saturada (MAFF, 1989), con el propósito de valorar cualitativamente la presencia o ausencia de huevos de *H. contortus* en ellas.

Los huevos presentes en las muestras positivas fueron contabilizados por medio del método de McMaster modificado (MAFF, 1989). Brevemente, se homogenizó un gramo de heces con

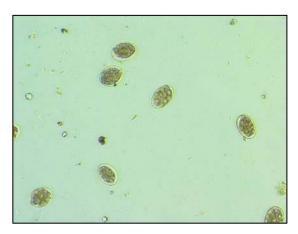


Fig. 11: Huevos de *H. contortus* (100x)

solución salina saturada hasta alcanzar un volumen total de 30 ml. Posteriormente, se contabilizaron todos los huevos presentes en 0,3 ml de esta suspensión, de modo que cada huevo encontrado en la cámara equivalía a 100 huevos por gramo de heces.

5.2. RECUENTO DE VERMES ADULTOS EN ABOMASO

Se contabilizaron separadamente todos los vermes adultos machos y hembras presentes en cada alícuota de 300 ml de contenido abomasal de cada animal, con ayuda de una lupa binocular (Wild, Heerbrugg) a 6x. El número total de vermes de cada animal se calculó considerando el volumen total de líquido recogido (Wood et al., 1995).

5.3. MEDIDA DE HEMBRAS Y RECUENTO DE HUEVOS EN ÚTERO

De cada animal se recogieron al azar 30 hembras de *H. contortus*, que fueron medidas a seis aumentos en una lupa binocular que disponía de una regla graduada en uno de los oculares. Posteriormente, se rompieron los vermes cuidadosamente con ayuda de un cubreobjetos y se contabilizaron todos los huevos presentes en el útero de cada verme hembra (100x) (**Strain y Stear, 2001**).

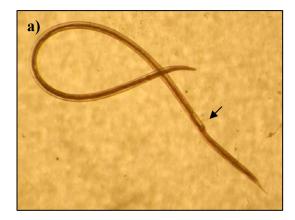
5.4. RECUENTO DE VERMES INMADUROS PRESENTES EN EL CONTENIDO ABOMASAL

Igualmente, se procedió al recuento de los vermes presentes en las alícuotas de 30 ml de contenido abomasal obtenidas de los animales sacrificados a los 7 dpi. El número total de

vermes inmaduros se calculó considerando el volumen total de contenido gástrico. Atendiendo a sus características morfológicas, todos los vermes inmaduros recogidos correspondieron a larvas 4 (Fig. 12) (Anderson, 1992).

5.4.1. Medida de vermes inmaduros presentes en el contenido abomasal

Posteriormente se midieron 30 vermes inmaduros obtenidos de los lavados de abomaso realizados a los animales sacrificados a los 7 días post-inoculación. En algunos animales, las formas inmaduras recogidas presentaban primordio genital (L4 tardías), midiéndose exclusivamente los vermes hembras, mientras que en otros corderos no se podía distinguir entre sexos (L4 tempranas) (Anderson, 1992; Gómez Muñoz, 1996; Lacroux et al., 2006). La longitud de las formas inmaduras se determinó con ayuda del paquete informático ProgRes CapturePro 2.0 (Jenoptik). Las imágenes necesarias para realizar la medición de los parásitos se obtuvieron con una cámara digital, (ProgRes C12 Plus, Jenoptik), conectada a un microscopio (Olympus CKX 41).



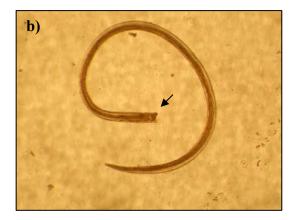


Fig. 12: Larva 4 hembra (a) y macho (b) de *H. contortus* a 50x, mostrando el primordio genital (flecha)

5.5. DIGESTIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA Y RECOGIDA DE VERMES INMADUROS

Tras descongelar previamente, se digirió una muestra de aproximadamente 15 g de la mucosa gástrica de cada animal, mediante incubación con 2 ml de una solución de pepsina y HCl (Tabla 5) por cada g de mucosa, durante 30 min, a 37 °C y en agitación (modificado del **MAFF, 1989**). Posteriormente se determinó el volumen resultante y se contabilizaron las formas inmaduras del verme en una alícuota de 20 ml con la ayuda de una lupa (Wild Heerbrugg) a 16x.

Tabla 5: Composición de la solución de digestión para mucosa abomasal

dH ₂ O	Completar hasta 100 ml
NaCl (Panreac)	0,85 g
HCl 37 % (Panreac)	2 ml
Pepsina (Sigma)	0,8 g

6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN SUERO Y MUCUS MEDIANTE ELISA INDIRECTO

6.1. PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE *HAEMONCHUS* CONTORTUS

Los vermes adultos necesarios para obtener antígeno somático y excretor/secretor se recogieron de dos ovinos inoculados con 7000 L3 de *H. contortus*, sacrificados 25 días post inoculación. Tras el sacrificio se vertió el contenido de cada abomaso en una batea, lavando con 700 ml de agua corriente.

El contenido abomasal se mezcló con una solución de agar (Sigma) en agua destilada al 1,7%, a una temperatura de 43 °C, sobre un paño, incubándose en vertical en una cubeta con PBS a 37 °C durante 1 hora y media. Los vermes que habían atravesado el agar se recogieron del fondo de la cubeta y traspasaron a una placa de Petri con PBS sobre una placa caliente, a 37 °C, para eliminar los restos de agar. Los vermes se traspasaron a tubos de 20 ml con PBS atemperado a 37 °C y se centrifugaron a 200 rpm durante 5 min, procedimiento realizado en dos ocasiones.

Tras el lavado se introdujeron los vermes en cubetas de cultivo celular (Nunc), estériles, que contenían medio RPMI (Sigma) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂, recogiéndose el sobrenadante a las 24 y 48 horas. Este sobrenadante se filtró (0,22 μm, Acrodisc, Pall Corporation), fue concentrado por centrifugación a 4000 g en tubos Amicon de 10 kD (Millipore) durante 30 min y el producto resultante fue utilizado antígeno excretor/secretor (ES) de verme adulto.

Tabla 6: Composición del medio RPMI para recogida de antígeno ES de adultos de *H. contortus*

RPMI-1640 medium (Gibco)	Completar hasta 500 ml
L-glutamina (Sigma)	2 mM
D-Glucosa	1 % (p/v)
Penicilina-Streptomicina	0,01 % (p/v)
Anfotericina B	0,0125 % (p/v)
Gentamicina	0,0025 % (p/v)
Hepes (Sigma)	20 mM

Los adultos, tras ser lavados en PBS-Tween 20 (Sigma) al 0,1%, se homogenizaron mecánicamente (Ultraturrax, IKA) y mediante ultrasonidos (UP100H, Hielscher) a 4 °C, centrifugándose a 4500 g (Centrifuge 5804R, Eppendorf) durante 20 min. Se recogió el sobrenadante y el *pellet* volvió a ser homogeneizado y centrifugado, añadiéndose este nuevo sobrenadante al anterior. La concentración proteica del antígeno fue determinada mediante el método de Bradford.

6.2. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO SOMÁTICO DE L3 DE H. CONTORTUS

El antígeno somático de larvas 3 (L3) de *Haemonchus contortus* se obtuvo tras someter a 10⁶ L3 a tres ciclos de congelación y descongelación (-80 °C/ 25 °C), posterior homogenización mecánica y con ultrasonidos a 4 °C, y ultracentrifugación a 30000 g (Optima L-100 XP Ultracentrifuge, Beckmann Counter) (**Lacroux** *et al.*, 2006). La concentración proteica del sobrenadante fue determinada mediante el método de Bradford.

6.3. ANÁLISIS DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La respuesta humoral (IgG e IgA) específica de los animales inoculados fue estudiada mediante un método de ELISA indirecto frente a antígenos somáticos y de excreción/secreción de vermes adultos y somáticos de L3 de *H. contortus*.

6.3.1. Reactivos

- Peróxido de hidrógeno (Panreac).

- Buffer de dilución del antígeno. Tampón carbonato.

Tabla 7: Composición del Buffer de dilución de antígeno

Buffer Carbon	ato pH 9,6
NaHCO ₃ al 8,4%	45,3 ml
NaCO ₃ al 10,6%	18,2 ml
dH ₂ O	936,5 ml

- PBS-Tween 20 (Sigma) al 0.05%.
- Albúmina sérica bovina (BSA, Sigma)
- Azida de sodio (Sigma).
- Conjugado sueros policionales Anti-IgG (*Donkey anti sheep IgG peroxidase conjugate*, Sigma) y Anti-IgA (*Rabbit anti sheep IgA HRP conjugated*, Bethyl) marcados con peroxidasa
- Hidroclorato de orto-fenil diamina (OPD, Sigma)
- Solución de fosfato sódico al 2,8 % (p/v)
- Solución de ácido cítrico al 2,1 % (p/v)
- Solución de ácido sulfúrico 2M

6.3.2. Equipos:

- Placa ELISA (Corning Incorporated, Costar)
- Lector de placa de ELISA (Multiskan Ascent)
- Estufa (P-selecta)
- Pipeta multicanal (Slamed)
- Micropipetas (Glison)
- Balanza de precisión (Scaltec)
- pH-metro (Crisol)

6.3.3. Procedimiento

Tras incubar la placa durante 24 h con el antígeno diluido en buffer carbonato pH 9,6, se realizaron tres lavados de cinco minutos con 200µl de PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) para

eliminar el antígeno que no se había fijado. La concentración final de cada uno de los antígenos utilizados se encuentra recogida en la Tabla 8.

Para evitar el desarrollo de reacciones inespecíficas, las placas se incubaron a 37° C durante 45 minutos con una solución de albúmina sérica bovina al 3% (p/v) en PBS al 0,01 M, a razón de 200 μl /pocillo, tras la que se repitió el lavado de la placa con PBS-Tween 20 al 0,05% en las condiciones antes descritas.

Cada una de los sueros problema se diluyó en una solución de PBS-Tween 20 al 0,05% que contenía ázida de sodio al 0,02% (p/v). Se dispensaron por duplicado 100 μl/pocillo, y se incubó durante 1 hora a 37°C, procediendo posteriormente a un nuevo lavado de la placa.

El revelado de la reacción se llevó a cabo mediante la adición de $100 \,\mu\text{l/pocillo}$ de una solución de conjugado en PBS-Tween 20 al 0.05% incubando 45 minutos a 37°C . Tras el lavado correspondiente para eliminar el conjugado libre, se añadió el sustrato (12,2 ml de ácido cítrico al 2,1%, 12,8 ml de fosfato sódico al 2.8% y 10 mg de OPD). A la solución anterior, se le añadieron $50 \,\mu\text{l}$ de H_2O_2 y se dispensó a razón de $100 \,\mu\text{l/pocillo}$, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente en oscuridad durante $5 \,\text{minutos}$.

Finalmente, la reacción se frenó mediante la adición de 50 µl/pocillo de una solución de ácido sulfúrico 2M, llevándose a cabo la determinación de las densidades ópticas mediante un lector de placa de ELISA (Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 492 nm. En el caso de los ELISA realizados en suero, se usaron como controles negativos sueros de animales no inoculados, mientras que en los ELISA realizados en mucus se utilizó el mucus abomasal de animales sacrificados en matadero procedentes de granjas libres de nematodos gastrointestinales.

Como controles positivos se utilizaron sueros y mucus de animales inoculados con 7000 L3 de *H.contortus*, desparasitados a las 12 semanas pi y posteriormente reinoculados con 7000 L3, que se sacrificaron 20 días después de esta reinoculación.

Para cada animal se consideró la densidad óptica (OD, *optical density*) media de los dos pocillos, en que se dispensó el suero o mucus.

Tabla 8: Tabla resumen de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos específicos en suero (a) y mucus (b) empleada en esta experiencia.

a)

Isotipo	Tipo de antígeno	Concentración del antígeno	Dilución del suero	Dilución del conjugado
IgG	Somático de L3	5 μg/ml	1:100	1:3000
IgG	Somático adulto	5 μg/ml	1:100	1:3000
IgG	ES adulto	2 μg/ml	1:100	1:1000
IgA	Somático adulto	10 μg/ml	1:10	1:100
IgA	ES adulto	5 μg/ml	1:2	1:500
IgA	Somático L3	5 μg/ml	1:10	1:500

b)

Isotipo	Tipo de antígeno	Concentración del antígeno	Dilución del mucus	Dilución del conjugado
IgA	Somático adulto	10 μg/ml	1:5	1:100
IgA	ES adulto	2,5 μg/ml	1:5	1:100
IgA	Somático L3	10 μg/ml	1:2	1:100

Con el fin de eliminar las diferencias interplaca en caso de los ELISA realizados en suero, los datos de OD fueron transformados en densidades ópticas relativas (ODI, *optical density index*), que fueron calculadas según la siguiente fórmula:

(Strain y Stear, 2001)

7. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

7.1. PREPARACIÓN DE CORTES EN PARAFINA

Las muestras de mucosa del fundus del abomaso de cada animal fueron talladas y embebidas en parafina. La pared del abomaso se orientó de modo que las glándulas fúndicas del cuajar se cortaran longitudinalmente, lo que permitió diferenciar fácilmente las distintas capas de la mucosa. A continuación se prepararon secciones de 5 µm con un microtomo (RM 3135, Leica) para su posterior tinción.

7.2. DESPARAFINADO

Tras mantener los cortes en una estufa a 100°C durante 30 minutos, se procedió al desparafinado mediante dos pases sucesivos de dos minutos en xilol, otros dos en etanol 100°, y tres pases sucesivos en etanol 70° y agua destilada.

7.3. TINCIONES

7.3.1. Tinción con hematoxilina-eosina

Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina permitieron contabilizar los eosinófilos y los leucocitos globulares de la mucosa del abomaso

Tras el desparafinado los cortes se tiñeron con hematoxilina de Harris (Thermo) durante 15 minutos y se diferenció mediante 4 pases en alcohol clorhídrico (solución al 1% de HCl en etanol al 70%). Después de un breve lavado con agua corriente se realizaron 15 pases en agua amoniacal (solución de amoniaco al 0.2%) y se volvieron a lavar las secciones con agua corriente durante 15 minutos. A continuación se tiñeron las preparaciones con eosina-floxina (100 ml de eosina al 1%, 10 ml de floxina al 1%, 4 ml de ácido acético glacial y 780 ml de etanol al 95%) durante 4 minutos.

7.3.2. Tinción de Giemsa

Esta tinción permite reconocer los mastocitos gracias al fenómeno de metacromasia, por el que los gránulos de estas células son teñidos por los derivados del azur que contiene el colorante,

proporcionando un color violáceo, distinguible del azul que normalmente se obtiene con este colorante en el resto del tejido.

Como solución de Giemsa se utilizó una gota de solución madre de Giemsa (Merck) por cada ml de agua destilada. Las preparaciones se mantuvieron en esta solución durante 25 minutos.

7.4. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

Se procedió a la deshidratación de las secciones mediante dos pases sucesivos de dos minutos cada uno en etanol 96°, etanol 100° y xilol. El montaje se realizó en medio DPX (Panreac).

7.5. RECUENTOS CELULARES

7.5.1. Eosinófilos de la pared gástrica

En las muestras de mucosa abomasal teñidas con hematoxilina-eosina se procedió al recuento de eosinófilos en, al menos, 30 campos de 0,044 mm², en un área de tejido situada sobre la unión de la capa muscular de la mucosa y la lámina propia, a 500 aumentos. El resultado final se expresó en eosinófilos /mm².

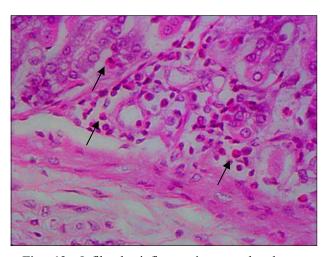


Fig. 13: Infiltrado inflamatorio con abundantes eosinófilos (flechas) en el tercio inferior de la mucosa. Tinción con hematoxilina-eosina (500x).

7.5.2. Mastocitos

A partir de las preparaciones de abomaso teñidas con Giemsa se realizó el recuento de mastocitos en, al menos, 30 campos de 0,044 mm², en un área de tejido situada sobre la unión

de la capa muscular de la mucosa y la lámina propia, a 500 aumentos. El resultado final se expresó en mastocitos /mm².

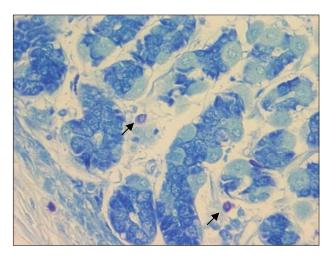


Fig. 14: Mastocitos (flechas), con gránulos metacromásicos, en el tercio inferior de la mucosa. Tinción de Giemsa (500x)

7.5.3. Leucocitos globulares

Los leucocitos globulares (mastocitos intraepiteliales) se contabilizaron en 30 campos de 0,044mm² en el tercio superior de la mucosa del abomaso, a partir de secciones teñidas con hematoxilina-eosina (500x). El resultado final se expresó en leucocitos globulares /mm².

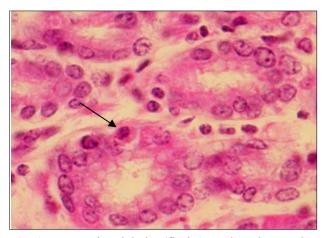


Fig. 15: Leucocito globular (flecha) en el tercio superior de la mucosa, con localización intraepitelial. Tinción con hematoxilina-eosina (500x).

8. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

8.1. PREPARACIÓN DE LOS CORTES

A partir de las muestras de abomaso en congelación se obtuvieron secciones de 4 μm en un criomicrotomo (Frigocut N 2800, Reichert Jung), y tras secarse durante 30-45 min se conservaron a -80 °C. Los portaobjetos fueron tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma).

8.2. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Los anticuerpos primarios utilizados (Tabla 9) fueron cedidos por los Dres. Els Meeusen y David Piedrafita (Monash University, Melbourne, Australia).

Tabla 9: Anticuerpos utilizados para el estudio inmunohistoquímico de la mucosa abomasal

	Clon	Células identificadas	Dilución
CD 1	20.27	Células dendríticas	1:5
CD 2	36F	Linfocitos T, células Natural Killer	1:5
CD 4	SBU-T4 pool	Linfocitos T colaboradores	1:6
CD 5	SBU-T1; 25.91	Linfocitos T WC1 ⁻ , subpoblación de linfocitos B	1:50
CD 8	SBU-T8; 36.65	Linfocitos T citotóxicos	1:6
CD 45RA	SBU-P220; 20.96	Linfocitos B	1:50
γδ	86D	Linfocitos T γδ	1:20
WC-1	19.19	Linfocitos T γδ activados	1:5
Galectina 14	EL 1.2	Eosinófilos	1:50
Galectina 15	ovGalH5.4	-	1:50
MHC II	SBU-II; 28.1	Células presentadoras de antígeno	1:50

8.3. PROCEDIMIENTO

Las muestras se descongelaron a 4º C durante 20 minutos, con el fin de evitar condensaciones que dificultaran los recuentos, y posteriormente se mantuvieron 15 minutos a temperatura ambiente. Se fijaron durante 5-10 min en etanol 100%, añadiéndole H₂O₂ al 1% v/v para bloquear la peroxidasa endógena.

Tras dejar secar las preparaciones, se procedió a su incubación con suero normal de conejo (Dako Cytomation) diluido en PBS 1:100 v/v, para bloquear los lugares inespecíficos de unión del anticuerpo primario.

Posteriormente se dispensó sobre las preparaciones el correspondiente anticuerpo primario diluido en un medio compuesto por RPMI (RPMI-1640 Medium. Dutch Modification. Sigma) y suero fetal bovino (Biochrome AG) al 5% v/v. El tiempo de incubación fue de 90 min a temperatura ambiente.

Seguidamente se realizó una incubación de 30 min con el anticuerpo secundario biotinado antiratón (Dako) diluido 1:20 v/v en RPMI-suero fetal bovino a una concentración final del 5%. Tras ello se incubaron las preparaciones en oscuridad durante 1 hora con el complejo avidinabiotina peroxidasa (Vector) diluido 1:100 v/v en PBS.

El revelado se llevó a cabo con una solución de 3,3'-Tetrahidrocloruro de diaminobenzidina hidratada (Sigma Aldrich), diluida al 0,035% p/v, a la que se adicionó H_2O_2 al 0,1% v/v en el momento previo a la incubación. La contratinción fue realizada con hematoxilina de Harris (Thermo). Finalmente, tras deshidratar las preparaciones se procedió a su montaje en medio DPX (Panreac).

8.4. RECUENTOS CELULARES

Los recuentos de cada tipo celular se realizaron a 500 aumentos en 40 campos de 0,044 mm² situados en los bordes superior e inferior de la mucosa.

En los ensayos para la determinación de los niveles de galectina-15, molécula que es liberada al mucus por las células epiteliales, se definió una escala ordinal (0-3) (Fig. 18), de menor a mayor producción (atendiendo a la intensidad de la tinción), siendo valorada por dos investigadores distintos.

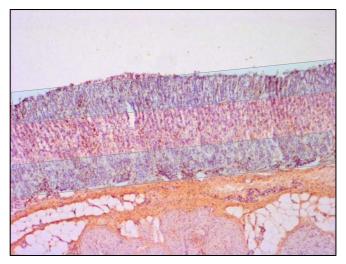


Fig. 16: Estudio inmunohistoquímico de la pared abomasal con anticuerpos frente a linfocitos T CD2⁺ (40x). Las áreas de recuento se muestran sombreadas.

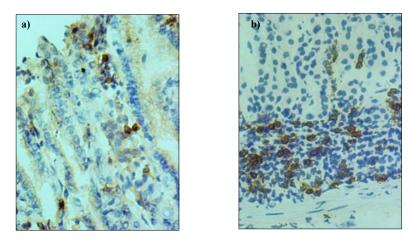


Fig. 17: Estudio inmunohistoquímico de la mucosa abomasal (400x). Las células aparecen marcadas con anticuerpos frente a linfocitos T CD8 en el borde superior de la mucosa (a) y frente a linfocitos T $\gamma\delta$ en el borde inferior (b).

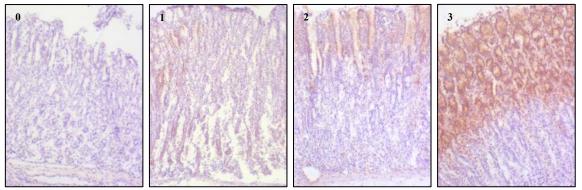


Fig. 18: Inmunohistoquímica de la pared abomasal con anticuerpos frente a galectina 15 (100x). El grado de tinción del mucus gástrico se valoró en una escala de 0 a 3.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete informático PASW versión 18.0.

9.1. NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD DE LAS VARIABLES

Para la aplicación de algunos test estadísticos fue necesario la comprobación del ajuste de la variable correspondiente a una distribución normal. Se utilizó para ello el test de Shapiro-Wilk. Para comprobar la homogeneidad de la varianza u homocedasticidad se utilizó el test de Levene.

9.2. DIFERENCIAS ENTRE VARIABLES PUNTUALES

Se utilizó el test *t* de Student para contrastar si existían diferencias significativas entre razas en las variables que se ajustaban a la distribución normal (longitud de los vermes adultos e inmaduros y número de huevos en útero).

Para contrastar si existían diferencias entre razas en las variables puntuales que no se ajustaban a la distribución normal, (número de vermes inmaduros en mucosa y cavidad abomasal, carga parasitaria final, recuentos celulares en la pared gástrica y niveles de inmunoglobulinas específicas en mucus), se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Withney.

Las diferencias entre razas se consideraron significativas cuando el valor p fue menor o igual que 0,05.

9.3. MODELO GENERAL LINEAL DE MEDIDAS REPETIDAS (GLM MEDIDAS REPETIDAS)

Para comparar entre razas las variables tomadas en diferentes momentos a lo largo del tiempo en cada animal (hematocrito, recuentos fecales de huevos, proteínas plasmáticas, eosinófilos en sangre, niveles séricos de inmunoglobulinas), se utilizó el Modelo General Lineal de medidas repetidas, previa contrastación de la normalidad mediante el Test de Shapiro-Wilk y homogeneidad de la varianza mediante el test de Levene.

Con el fin de que se ajustaran a la normalidad, las variables recuento acumulado de huevos en heces y eosinófilos en sangre periférica se transformaron tomando la raíz cuadrada del valor +1

antes de aplicar el GLM medidas repetidas. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad fue menor o igual que 0,05.

9.4. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN

Con el propósito de correlacionar las variables parasitológicas (indicadoras de resistencia a la infección), concentración de proteínas plasmáticas y valores hematocritos (indicadoras de tolerancia a la infección) y las variables inmunológicas (indicadoras de respuesta inmune) se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Las correlaciones se consideraron significativas cuando la probabilidad fue menor o igual que 0,05.

9.5. DETERMINACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESIÓN

En aquellas interacciones entre variables en las que se observó una fuerte correlación (carga parasitaria adulta y recuento de huevos 27 dpi; eosinófilos en abomaso y fecundidad de los vermes, etc) se calculó las ecuación de regresión simple o múltiple en cada raza por separado.

El análisis de regresión múltiple permite evaluar la influencia de varios factores tomados conjuntamente sobre una variable dependiente. La ecuación de regresión, del tipo $y = a+bx_1+cx_2+...nx_n$ incluye todos los factores independientes, y se ajusta mediante el método de mínimos cuadrados, tratando de explicar la máxima proporción de variación de la variable independiente. Esta tasa de variación se estima mediante el coeficiente de regresión (R^2), que indica la proporción de variación de la variable independiente explicada mediante la ecuación de regresión. La significación del modelo de regresión se calcula mediante el análisis de la varianza.



RESULTADOS

Según quedó detallado en el apartado "Material y Métodos", a lo largo de esta experiencia se recogieron regularmente muestras de sangre y heces de todos los ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) inoculados, con el propósito de determinar los recuentos fecales de huevos de *H. contortus*, así como de analizar los niveles de inmunoglobulinas específicas (IgA e IgG) en el suero, la evolución del valor hematocrito, la concentración de proteínas plasmáticas y el recuento de leucocitos en los animales investigados.

Tras el sacrificio de los animales, se contabilizaron las formas inmaduras en la mucosa gástrica, previa digestión de la misma, y las larvas y vermes adultos presentes en el contenido abomasal a los 7 y 28 días post-inoculación (dpi), respectivamente. Asimismo, se midieron treinta larvas y treinta vermes hembras adultas recogidas aleatoriamente del contenido abomasal de cada uno de los animales sacrificados a los 7 y 28 dpi, y se contabilizaron los huevos en útero en cada una de las hembras adultas analizadas. También se recogieron muestras de la mucosa para realizar un estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la mucosa abomasal, llevándose a cabo recuentos de una amplia gama de poblaciones celulares por mm² de mucosa, y valorándose la presencia de las galectinas-14 y 15 en la misma. El estudio de la respuesta inmune se completó, finalmente, con la cuantificación de las IgA específicas presentes en el mucus gástrico frente a antígeno somático de larvas y vermes adultos, así como antígeno excretor/secretor (ES) de adultos.

El estudio se completó con el análisis estadístico de los datos, mediante la comparación de los resultados obtenidos entre las dos razas, y las relaciones existentes entre las distintas variables parasitológicas, hematológicas e inmunológicas.

1. ESTUDIO PARASITOLÓGICO (Tabla 10)

1.1. RECUENTOS FECALES DE HUEVOS (Fig. 19)

Al final de la experiencia, los ovinos Canarios de Pelo (CAP) habían eliminado casi cinco veces menos huevos que los ovinos Canarios (CAN). El periodo prepatente de la infección fue de 18 días en ambas razas, y a partir de este momento la eliminación de huevos fue siempre en aumento, alcanzándose los valores máximos de huevos por gramo de heces (hpg) a los 27 dpi. Las diferencias entre razas en los recuentos de huevos fueron significativas desde el día 20 pi hasta el final de la experiencia.

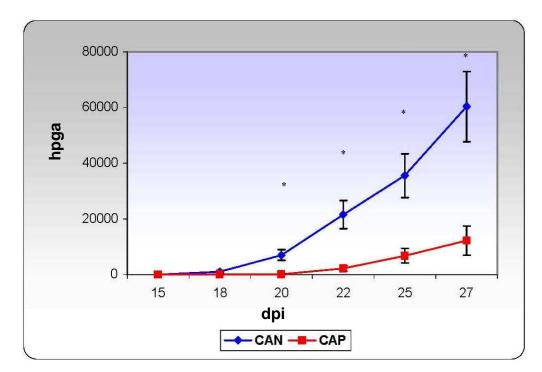


Fig. 19: Recuento de huevos por gramo de heces acumulados (hpga) en los ovinos Canarios de Pelo (n=8) y Canarios (n=9) infectados con 20000 L3 de H. contortus. Cada punto representa la media de los corderos de cada raza \pm el error típico de la media a lo largo de la infección. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas (p \leq 0.05) en el modelo general lineal (GLM) de medidas repetidas, previa transformación de la variable en raíz cuadrada del valor + 1.

1.2. RECUENTO DE VERMES ADULTOS

Al llevar a cabo el análisis del contenido gástrico de los animales estudiados a los 28 dpi, se observaron 2,4 veces más vermes adultos en los abomasos de los ovinos CAN que en los ovinos CAP (Tabla 10), aproximándose dichas diferencias a la significación estadística (p = 0,06). De

las 20000 L3 inoculadas, se desarrollaron hasta adultos un 23% en el caso de los ovinos CAN y un 10 % en los ovinos CAP.

El ratio vermes hembras/machos fue de $1,66 \pm 0,95$ (x \pm s) para los ovinos CAP y $1,36 \pm 0,63$ en los ovinos CAN, sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa.

Tabla 10: Parámetros parasitológicos

		7 d	pi	
	Larvas Totales	Larvas Intramurales	Larvas Luminales	Longitud Lv Lm
CAN	5691 ± 1989	2298 ± 1485	3393 ± 671	4,51 ± 0,64
CAP	6825 ± 1983	1974 ± 668	4851 ± 2219	4,47 ± 0,30

			2	8 dpi		
	Larvas Totales	Vermes Adultos	Longitud (mm)**	Huevos en útero**	Hpg 27 dpi*	Hpg acumulados**
CAN	18 ± 32	4666 ± 3293	17,02 ± 0,12	205 ± 127	24778 ± 17888	60322 ± 37890
CAP	7 ± 11	1926 ± 1696	15,73 ± 0,10	102 ± 82	5443 ± 7047	12229 ± 13860

Tabla 10: Parámetros parasitológicos en los ovinos CAP y CAN sacrificados a los 7 y 28 días postinoculación (dpi). Larvas totales: Inmaduros mucosa + inmaduros luminales; Larvas Intramurales: formas larvarias recogidas tras la digestión de mucosa; Larvas Luminales: formas larvarias recogidas en el contenido abomasal; Longitud Lv Lm: longitud de las formas larvarias recogidas en el contenido abomasal; Longitud: longitud de las hembras adultas; Huevos en útero: huevos en el útero de las hembras adultas; Hpg 27 dpi: recuento de huevos por g de heces el día 27 pi; Hpg acumulados: sumatorio de todos los recuentos de huevos por gramo de heces. En todos los casos se presenta $x \pm s$. Los asteriscos indican diferencias significativas entre razas (*, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$)

1.3. LONGITUD DE LOS VERMES HEMBRAS ADULTAS Y RECUENTO DE HUEVOS EN EL ÚTERO

Los hembras adultas de *H. contortus* recogidas a los 28 dpi fueron 1,29 mm más largas en los ovinos CAN que en los ovinos CAP (Tabla 10), siendo esta diferencia estadísticamente significativa y equivalente al 7,6 % de la longitud media de las hembras en los ovinos CAN.

Por otro lado, las hembras de *H. contortus* presentes a los 28 dpi en el abomaso de los ovinos CAN contenían el doble de huevos que las presentes en el abomaso de los ovinos CAP (Tabla 10).

También se puede analizar la fecundidad de las hembras del parásito en ambos grupos experimentales, calculando el ratio entre el recuento acumulado de huevos en las heces y el

número de vermes hembras, y también así se observaron diferencias significativas entre ambas razas [11 \pm 11 para los ovinos CAP ($\bar{x} \pm s$) frente a 35 \pm 34 en los ovinos CAN; p=0,027].

1.4. RECUENTO DE LARVAS TISULARES Y LUMINALES; LONGITUD MEDIA DE LAS LARVAS RECOGIDAS EN LA LUZ DEL ABOMASO

No existieron diferencias significativas entre razas en el número de larvas de la mucosa abomasal a los 7 dpi. Por su parte, a los 28 dpi apenas se recogieron larvas tras las digestiones de la mucosa de los abomasos de los animales sacrificados, sin que se observaran diferencias significativas entre ambas razas.

Tampoco se apreciaron diferencias en los recuentos de larvas recogidas en el contenido abomasal (Tabla 10) a los 7 dpi, siendo en su mayoría larvas 4 tardías (**Anderson, 1992**), en las que ya se reconocía el primordio genital, con la única excepción de un ovino Canario, que tenía un elevado porcentaje de larvas 4 tempranas. La longitud media de las formas inmaduras localizadas en la cavidad abomasal fue muy similar en ambas razas.

Sumando las larvas localizadas en la mucosa gástrica, (obtenidas tras la digestión), y las encontradas en la luz del abomaso, el porcentaje de establecimiento larvario en los ovinos CAP a los 7 dpi fue del 34,1%, mientras que en los ovinos CAN fue del 28,5%, sin que estas diferencias fueran significativas. La mayor parte de las larvas recogidas a los 7 dpi se encontraban en la luz del abomaso, tanto en los ovinos CAP (70%) como en los ovinos CAN (60%).

1.5. CORRELACIONES Y REGRESIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS (Tablas 11 y 12)

1.5.1. Ovino Canario

Al analizar las relaciones entre las variables parasitológicas a los 7 dpi en los ovinos CAN, se observó que el recuento de larvas (totales y tisulares) y su longitud, estaban relacionados, si bien estas asociaciones no fueron estadísticamente significativas (Tabla 11).

A los 28 dpi, se observó una fuerte asociación entre distintas variables parasitológicas. La carga parasitaria de vermes adultos se correlacionó positiva y significativamente con la longitud de estos (Fig. 20b), y con los recuentos de huevos en las heces a los 27 dpi (Fig. 20a) y en útero, aunque en este último caso la asociación no fue estadísticamente significativa (Tabla 12). La

longitud de los vermes se correlacionó positivamente con los recuentos de huevos en útero y heces (Tabla 12). Algo más débil fue la asociación encontrada entre los recuentos de huevos en útero y heces (Tabla 12).

El análisis de regresión múltiple mostró que el recuento de huevos fecales en el momento del sacrificio dependió, en esta raza, de la interacción entre la carga parasitaria y la longitud de los vermes, tomados estos parámetros como variables independientes (Fig. 21), perdiéndose la significación cuando se introdujo en el modelo la fecundidad de los vermes (huevos en útero) ($R^2 = 0.83$; p = 0.052). Por su parte, la fecundidad de las hembras fue también dependiente de la interacción carga parasitaria-longitud ($R^2 = 0.70^*$).

1.5.2. Ovino Canario de Pelo

Al analizar las correlaciones entre variables parasitológicas a los 7 dpi en los ovinos CAP, se observó una fuerte asociación positiva entre la longitud de las larvas luminales y los recuentos de larvas tras la digestión de la mucosa, no existiendo relación entre el número de larvas obtenidas tras la digestión de la mucosa del abomaso y las presentes en el lumen en esta raza (Tabla 10).

Al estudiar las correlaciones entre variables parasitológicas a los 28 dpi, éstas se asociaron de forma diferente a lo observado en los ovinos CAN (Tabla 12).

En contraste con la raza más susceptible, en los ovinos CAP la carga parasitaria no evidenció correlaciones significativas con los recuentos de huevos en heces (Fig. 20a) ni en útero (Tabla 12), ni con la longitud de los vermes (Fig. 20b).

El recuento de huevos en heces a los 27 dpi, al igual que ocurrió en los ovinos CAN, mostró una tendencia a la asociación con la longitud de los vermes, sin llegar a alcanzar significación estadística (Tabla 12). En cambio, a diferencia de lo constatado en la raza Canaria, estos recuentos de huevos en heces se correlacionaron significativamente con la fecundidad de los vermes (Tabla 12). Longitud y fecundidad de las hembras también estuvieron relacionadas, aunque el coeficiente de correlación de Spearman no alcanzó significación estadística (Tabla 12).

En contraste con lo observado en los ovinos CAN, el recuento de huevos en las heces al final del experimento no estuvo asociado con la interacción carga parasitaria-longitud (Fig. 21), ni con el efecto conjunto carga parasitaria-longitud-huevos en útero ($R^2 = 0.70$; p = 0.25). La

fecundidad de los vermes tampoco estuvo asociada con la interacción carga parasitaria-longitud ($R^2 = 0.41$, p = 0.27).

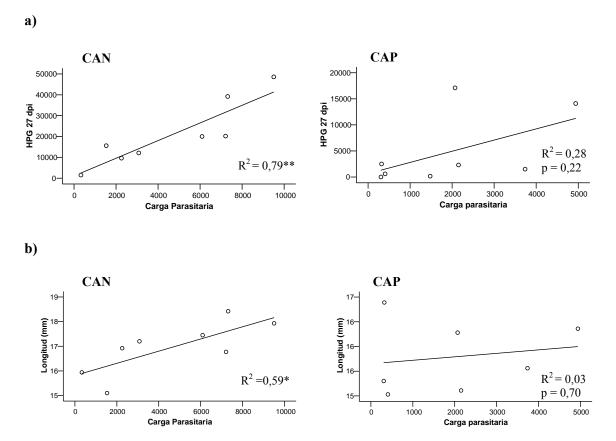


Figura 20: Relación entre variables parasitológicas en ovinos CAN y CAP. a) Carga parasitaria vs. Huevos por gramo de heces 27 dpi; b) Carga parasitaria vs. Longitud vermes. Los asteriscos indican significación estadística $(*, p \le 0.05; **, p \le 0.01)$

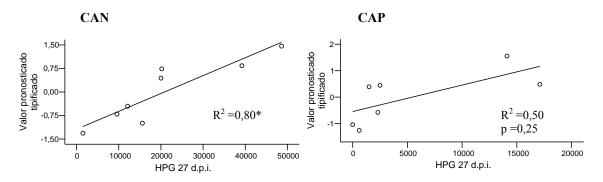


Figura 21: Regresión del recuento de huevos en las heces a los 27 dpi frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = 585,2 [longitud mm] + 4,1 [carga parasitaria adulta] – 8155,3 (CAN) e y = 4628,3 [longitud mm] + 1,7 [carga parasitaria adulta] – 71067,3 (CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media = 0 y desviación típica = 1. El asterisco indica significación estadística (*, p \leq 0,05)

Tabla 11: Correlaciones parasitológicas 7 dpi

		Lv totales	Lv Im	Lv Lm	Longitud Lv Lm
	Total		0,358	0,936**	0,188
Lv	CAN		0,9*	0,9*	0,600
totales	CAP		-0,100	1**	-0,100
	Total	0,358		0,225	0,721*
Lv Im	CAN	0,9*		0,700	0,800
	CAP	-0,100		-0,100	1**
	Total	0,936**	0,225		0,073
Lv Lm	CAN	0,9*	0,700		0,200
	CAP	1**	-0,100		-0,100
	Total	0,188	0,721*	0,073	
Longitud	CAN	0,600	0,800	0,200	
Lv Lm	CAP	-0,100	1**	-0,100	

Tabla 10: Correlaciones entre variables parasitológicas en los ovinos CAN y CAP sacrificados a los 7 dpi. Lv totales: recuento total de larvas (Lv Im+Lv Lm), Lv Im: larvas intramurales, contabilizadas tras la digestión de la mucosa; Lv Lm: larvas luminales, Longitud Lv Lm: longitud de larvas luminales. Los asteriscos indican significación estadística (*: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$).

Tabla 12: Correlaciones parasitológicas 28 dpi

		Carga Par.	Longitud	Huevos en útero	HPG 27 dpi
	Total		0,664**	0,518*	0,795**
Carga Par.	CAN		0,810*	0,595	0,929**
	CAP		0,143	0,107	0,524
	Total	0,664**		0,879**	0,695**
Longitud	CAN	0,810*		0,786*	0,643
	CAP	0,143		0,679	0,679
	Total	0,518**	0,879**		0,710**
Huevos	CAN	0,595	0,786*		0,381
en útero	CAP	0,107	0,679		0,857*
	Total	0,795**	0,695**	0,710**	
HPG	CAN	0,929**	0,643	0,381	
27 dpi	CAP	0,524	0,679	0,857*	

Tabla 12: Correlaciones entre variables parasitológicas en los ovinos CAP y CAN sacrificados a los 28 dpi. Carga Par.: carga parasitaria; Longitud: longitud de los vermes hembra; HPG 27 dpi: recuento de huevos por gramo de heces a los 27 dpi. Los asteriscos indican significación estadística (*: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$).

2. ESTUDIO HEMATOLÓGICO

2.1. HEMATOCRITO (Fig. 22)

En ambas razas se observó una importante reducción en el hematocrito a partir de la segunda semana post-inoculación (pi). Sin embargo, esta pérdida fue mayor en los ovinos CAN que en los CAP, encontrándose en general diferencias significativas entre razas al aplicar el Modelo General Lineal (GLM) de medidas repetidas (p = 0,002), así como al comparar cada una de las semanas que duró la experiencia ($p \le 0,02$). La diferencia entre los valores medios del hematocrito de cada raza fue en aumento a lo largo del estudio (4,4 el día de la inoculación y 9,1 a los 28 dpi).

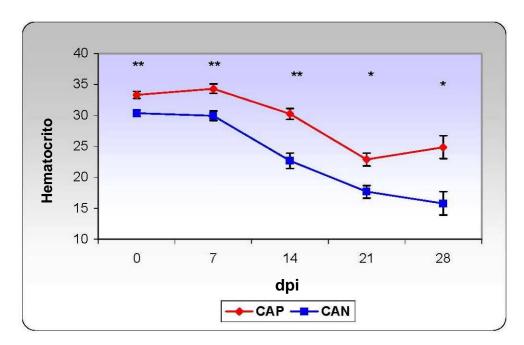


Figura 22: Valor hematocrito de los ovinos CAP y CAN. El valor basal de cada animal se corresponde con la media de los valores hematocritos determinados para cada animal las cuatro semanas anteriores al comienzo del estudio. Cada punto representa la media observada en los corderos de cada raza \pm el error típico de la media a lo largo de la infección. Los asteriscos indican diferencias significativas entre razas, (*= $p\le0,05$;**= $p\le0,01$).

2.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS (Fig. 23)

También se observó una reducción de los niveles de proteínas plasmáticas en animales de ambas razas a partir de la 2ª semana de infección, si bien esta pérdida fue mayor en los ovinos Canarios (GLM; p≤0,01). Las diferencias entre razas fueron significativas en las semanas 0, 2, 3 y 4 pi. Además, a partir de la 2ª semana estos valores se mantuvieron por debajo de 6 g/dl en los ovinos

CAN, valor considerado por algunos autores el umbral de la hipoproteinemia en ovinos (**Jain**, **1993**), mientras que en los ovinos CAP se mantuvieron siempre dentro del rango considerado fisiológico a lo largo de toda la experiencia.

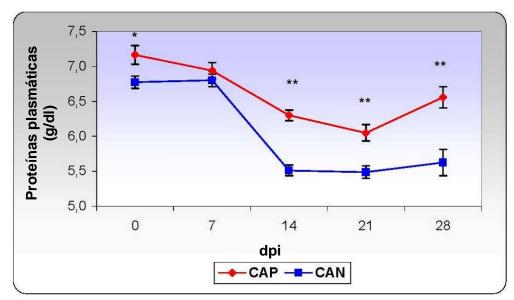


Figura 23: Valores medios de las proteínas plasmáticas (g/dl) en los ovinos CAP y CAN a los largo de la experiencia. Cada punto representa la media observada en los corderos de cada raza \pm el error típico de la media a lo largo de la infección. El valor basal de cada animal se corresponde con la media de los valores de proteínas plasmáticas obtenidos las cuatro semanas anteriores al comienzo del estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre razas (**= $p\le0,01$;*= $p\le0,05$).

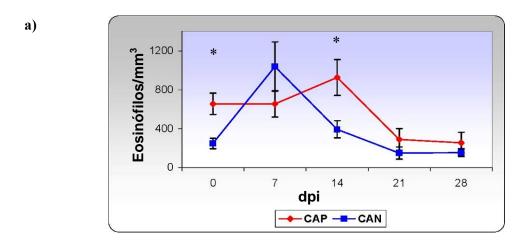
2.3. RECUENTO DE EOSINÓFILOS, LINFOCITOS Y NEUTRÓFILOS EN SANGRE PERIFÉRICA (Fig. 24)

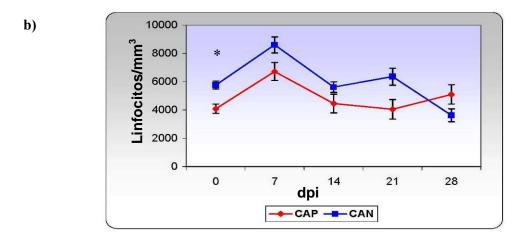
El recuento diferencial de leucocitos por mm³ de sangre en ambas razas, permitió observar un pico en el número de eosinófilos en la 1ª semana pi en los ovinos Canarios (CAN) y en la 2ª semana pi en los ovinos Canarios de Pelo (CAP). En general, los recuentos de eosinófilos en sangre fueron más elevados en los ovinos CAP (Fig. 24a).

Los linfocitos en sangre, habitualmente más numerosos en los ovinos CAN, mostraron un patrón similar en ambas razas, con una elevación en el número de estas células en la primera semana pi (Fig. 24b).

Finalmente, los neutrófilos permanecieron en niveles similares o inferiores a los basales a lo largo de la experiencia, salvo en la tercera semana pi, en el caso de los ovinos CAN (Fig. 24c).

Al aplicar el GLM de medidas repetidas no se observaron diferencias significativas entre razas a lo largo de la experiencia, si bien en el caso de los eosinófilos se pudo constatar una tendencia a la significación estadística (p = 0.075).





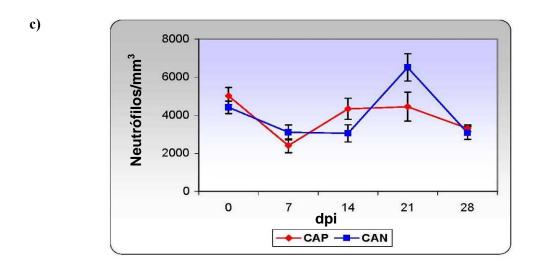


Figura 24: Recuentos de células por mm³ en sangre periférica en los ovinos CAP y CAN a lo largo de la experiencia: a), eosinófilos; b) linfocitos; c) neutrófilos). Cada punto representa la media observada en los corderos de cada raza \pm el error típico de la media a lo largo de la infección. El valor basal de cada animal se calculó como la media de las cuatro semanas anteriores al comienzo del estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas (p \le 0,05), aplicando el GLM de medidas repetidas para la variable trasformada según la raíz cuadrada del valor más uno.

2.4. CORRELACIONES Y REGRESIONES ENTRE VARIABLES HEMATOLÓGICAS (Tabla 13)

2.4.1. Ovino Canario

En esta raza los hematocritos (hto) de las distintas semanas estuvieron fuertemente correlacionados entre sí, mientras que entre los niveles de proteínas plasmáticas de las distintas semanas también estuvieron positivamente correlacionados entre sí, pero más débilmente y casi siempre lejos de la significación estadística. Además, los hto tendieron a estar correlacionados con los niveles de proteínas plasmáticas de la misma semana (Tabla 13).

Los linfocitos (7 dpi) y los eosinófilos (7 y 14 dpi) no estuvieron, en general, relacionados con el resto de parámetros hemáticos analizados. Los neutrófilos (21 dpi), por el contrario, si estaban asociados negativamente con los hto y las proteínas plasmáticas (Tabla 13).

2.4.2. Ovino Canario de Pelo

Los valores hematocrito de las dos últimas semanas se correlacionaron entre sí, pero no con los de las primeras semanas, tendencia también observada cuando estudiamos las correlaciones entre los distintos valores de proteínas plasmáticas. A su vez, la correlación entre hto y proteínas plasmáticas fue en general positiva, alcanzándose significación estadística en la primera semana del estudio (Tabla 13).

Las distintas poblaciones celulares estudiadas en sangre, no mostraron asociación ni con el hto ni con las proteínas plasmáticas, y tampoco se asociaron entre sí (Tabla 13).

3. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA MUCOSA ABOMASAL

En la mucosa abomasal de los animales sacrificados se realizó el recuento de una serie de poblaciones celulares implicadas, según se recoge en la literatura científica, en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales. Como ya se comentó en el capítulo de "Material y Métodos", para la visualización de los eosinófilos y los leucocitos globulares se utilizó la tinción del tejido con hematoxilina-eosina, y para la de los mastocitos, el azul de Giemsa.

Tabla 13: Correlaciones entre variables hematológicas

				Hto					PP			E	os.	Linf.
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	7 dpi	14 dpi	7 dpi
	Total		0,805**	0.763**	0,520*	0,654**	0,539**	0,178	0,752**	0,446	0,593*	-0,024	0,227	-0,218
Hto	CAN		0,652*	0,862**	0,633	0,867**	0,141	-0,347	0,721*	0,078	0,146	0,066	0.009	-0,033
Basal	CAP		0,792**	-0,110	-0,410	-0,393	0,731**	0,572*	-0,319	-0,587	0,126	0,159	-0,500	-0,220
	Total	0,805**		0,694**	0,576*	0,725**	0,344	0,183	0,700**	0,571*	0,615*	-0,042	0,141	-0,390*
Hto	CAN	0,652*		0,790*	0,720*	0,778*	-0,278	-0,338	0,686*	0,605	0,122	0,024	-0,167	-0,351
7 dpi	CAP	0,792**		-0,568	-0,608	-0,154	0,646*	0,582*	-0,510	-0,510	0,234	0,143	-0,401	-0,299
	Total	0,763**	0,694**		0,836**	0,819**	0,221	-0,304	0,819**	0,694**	0,628*	0,161	0,335	-0,619**
Hto	CAN	0,862**	0,790*		0,653	0,854**	-0,017	-0,513	0,630	0,274	-0,061	-0,109	-0,059	-0,435
14 dpi	CAP	-0,110	-0,568		0,758*	0,168	-0,872**	-0,783*	0,224	0,040	0,113	0,356	-0,184	-0,540
	Total	0,520*	0,576*	0,836**		0,882**	0,101	-0,089	0,719**	0,780**	0,625*	0,044	0,131	-0.544*
Hto	CAN	0,633	0,720*	0,653		0,883**	0,150	0,129	0,730*	0,667*	0,512	-0,183	-0,317	-0,200
21 dpi	CAP	-0,410	-0,608	0,758		0,818*	-0,771*	-0,469	0,265	0,407	0,385	0,169	-0,096	-0,410
200230001	Total	0,654**	0,725**	0,819**	0,882**	1.00000000	0,394	0,028	0,713**	0,717**	0,649**	-0,021	0,019	-0,369
Hto	CAN	0,867**	0,778*	0,853**	0,883**		0,250	-0,077	0,730**	0,425	0,317	-0,021	-0,333	-0,183
28 dpi	CAP	-0,393	-0,154	0,168	0,818*		-0,286	0,147	0,060	0,493	0,450	-0,036	-0,333	0,143
	Total	0.539**	0,344	0,221	0,101	0.394	-,	0.740**	0.544*	0,292	0,603*	0,024	0,250	0,282
PP	CAN	0,141	-0,278	-0,017	0,150	0,250		0,588*	0,464	-0,182	0,244	0,024		0,282
Basal	CAP	0,731**	0,646*	-0,872**	-0,771*	-0,286		0,886**	-0,115	-0,153	0,288	-0,132	0,250 -0,262	0,214
Dasai	Total	0,178	0,183	-0,304	-0,089	0,028	0.740**	0,000	0,097	0,110	0,448	The section		0.00000000
PP	CAN	-0,347	-0,338	-0,513	0,129	-0,077	0,740		0,097	0,170	0,557	-0,117 0,042	-0,196	0,237 0,291
7 dpi	CAP	- 10	0,582*	-0,783*	-0,469	0,147	0,886**		-0,060	0,020	0,556	-0,328	-0,103 -0,371	0,252
7 api	Total	0,572*	0,362	0.819**	0.719**	0,147	0,544*	0.097	-0,000	0,020	0,336		72 1075100	77 - 0711111
												0,077	0,406	-0,356
PP	CAN	0,721*	0,686*	0,630	0,730*	0,730*	0,464	0,097		0,616	0,215	0,292	0,129	0,026
14 dpi	CAP	-0,319	-0,510	0,224	0,265	0,060	-0,115	-0,060		0,651	0,603	-0,421	-0,332	0,077
	Total	0,446	0,571*	0,694**	0,780**	0,717**	0,292	0,110	0,869**		0,775**	0,015	0,237	-0,322
PP	CAN	0,078	0,605	0,274	0,668*	0,425	-0,182	0,170	0,616		0,256	-0,225	-0,277	-0,390
21 dpi	CAP	-0,587	-0,510	0,040	0,407	0,493	-0,153	0,020	0,651		0,477	-0,051	-0,064	0,383
	Total	0,593*	0,615*	0,628*	0,625*	0,649**	0,603*	0,448	0,795**	0,775**		-0,114	-0,092	-0,213
PP	CAN	0,146	0,122	-0,061	0,512	0,317	0,244	0,557	0,215	0,256		0,171	-0,781*	0,366
28 dpi	CAP	0,126	0,234	0,113	0,385	0,450	0,288	0,556	0,603	0,477		-0,487	-0,847*	-0,072
	Total	-0,024	-0,042	0,161	0,044	-0,021	0,024	-0,117	0,077	0,015	-0,114		0,368	-0,127
Eos.	CAN	0,066	0,024	-0,109	-0,183	-0,117	0,422	0,042	0,292	-0,225	0,171		0,483	0,013
7 dpi.	CAP	0,159	0,143	0,356	0,169	-0.036	-0,132	-0,328	-0,421	-0,051	-0,487		0,190	-0,385
	Total	0,227	0,141	0,335	0,131	0,019	0,250	-0,196	0,406	0,237	-0,092	0,368		-0,120
Eos.	CAN	0,009	-0,167	-0,059	-0,317	-0,333	0,250	-0,103	0,129	-0,277	-0,781*	0,483		0,083
14 dpi	CAP	-0,500	-0,401	-0,184	-0,096	-0,214	-0,262	-0,371	-0,332	-0,064	-0,847*	0,190		0,143
	Total	-0,218	-0,390*	-0,619**	-0,544*	-0,369	0,282	0,237	-0,356	-0,322	-0,213	-0,127	-0,120	
Linf.	CAN	-0,033	-0,351	-0,435	-0,200	-0,183	0,598*	0,291	0,026	-0,390	0,366	0,013	0,083	
7 dpi	CAP	-0,220	-0,299	-0,540	-0,410	0,143	0,214	0,252	0,077	0,383	-0,072	-0,385	0,143	
	Total	-0,297	-0,277	-0,599*	-0,746**	-0,599*	-0,083	0,025	-0,630**	-0,669**	-0,372	-0,091	-0,169	0,277
Neut.	CAN	-0,583	-0,644	-0,603	-0,700*	-0,667*	-0,400	-0,112	-0,842**	-0,555	0,024	0,017	-0,117	0,067
21 dpi	CAP	-0,571	0,701	-0,614	-0,855**	-0,643	0,690	0,395	-0,345	-0,281	-0,234	-0,095	-0,048	0,452

Tabla 13: Coeficientes de correlación de Spearman entre hematocrito, proteínas plasmáticas y células sanguíneas en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) a niveles basales (media de las tres semanas anteriores a la inoculación) y los días 7, 14, 21 y 28 pi. En el caso de las células sólo se hace referencia a las semanas en que se observó un pico en el recuento. Hto: hematocrito, **PP:** proteínas plasmáticas, **Eos**.: eosinófilos, **Linf.**: linfocitos, **Neut**.: neutrófilos (*, $p \le 0.05$; ***, $p \le 0.01$).

La tinción inmunohistoquímica del tejido con anticuerpos monoclonales permitió el recuento de diferentes poblaciones de linfocitos (se utilizaron anticuerpos frente a CD2, CD4, CD5, CD8, CD45R, γδ y WC1) y células presentadoras de antígeno (anticuerpos frente a MHCII y CD1), así como para evaluar la presencia de galectinas-14 y 15 en eosinófilos y mucus, respectivamente. Las células marcadas mediante esta técnica inmunohistoquímica se contabilizaron en los tercios superior e inferior de la mucosa, valorándose ambos datos por separado y en conjunto. Los datos por grupos e individuos se encuentran recogidos en la Tabla 14.

Tabla 14: Recuentos celulares en mucosa abomasal

		Fee	Dff = =4	1.0		CD4			CD8	
		Eos.	Mast.	L.G.	Total	Inf.	Sup.	Total	Inf.	Sup.
CAN	7 d.p.i.	165±79 ^a	9±8ª	6±2ª	36±21 ^a	20±11 ^a	17±17 ^a	189±20 ^a	74±34 ^a	115±21 ^a
CAN	28 d.p.i.	42±20 ^b	15±11 ^a	5±7ª	146±101 ^b	107±83 ^b	42±35°	217±48 ^a	117±50 ^a	100±31 ^a
CAP	7 d.p.i.	94±96 ^a	5±2 ^a	4±5 ^a	23±22ª	13±17 ^a	9±5ª	138±120 ^a	68±58 ^a	70±67 ^a
CAF	28 d.p.i.	86±68 ^a	13±8 ^a	4±3 ^a	104±60 ^b	53±30 ^a	50±39 ^b	264±153 ^a	107±31 ^a	157±131 ^a
			γδ			WC1			CD45R	
		Total	Inf.	Sup.	Total	Inf.	Sup.	Total	Inf.	Sup.
CAN	7 d.p.i.	89±42 ^a	43±25°	46±19 ^a	55±18 ^a	29±11 ^a	24±13 ^a	182±117°	114±80 ^a	67±48 ^a
0,	00 4-1		2		Annual Control of the			192±152 ^a	00.778	0.4 - 0.03
	28 d.p.i.	132±58 ^a	65±31 ^a	67±36°	68±33	33±24 ^a	35±14 ^a	192±152	98±77°	94±86 ^a
CAP	7 d.p.i.	132±58° 61±57°	65±31° 28±23°	67±36° 33±39°	68±33 33±25°	33±24° 15±10°	35±14° 19±19°	264±185 ^a	208±189 ^a	62±48°
CAP				CARCON COLORS (CA	100000000000000000000000000000000000000					
CAP	7 d.p.i.	61±57 ^a	28±23°	33±39 ^a	33±25°	15±10 ^a	19±19 ^a	264±185ª	208±189ª	62±48 ^a
CAP	7 d.p.i.	61±57 ^a	28±23°	33±39 ^a	33±25°	15±10 ^a	19±19 ^a	264±185ª	208±189ª	62±48 ^a

				CD2			CD5			CD1	
			Total	Inf.	Sup.	Total	Inf.	Sup.	Total	Inf.	Sup.
ſ	CAN	7 d.p.i.	51±40° *	31±27° *	16±12 ^a	290±132°	173±70 ^a	116±65ª	27±5°	15±5ª	10±6ª
I	CAN	28 d.p.i.	222±191 ^b	146±112 ^b	75±84 ^a	238±177°	175±108 ^a	68±76 ^a	86±62 ^b	50±37 ^b	34±24 ^b
I	CAP	7 d.p.i.	255±213 ^a *	175±147 ^a *	80±85 ^a	196±188 ^a	137±129 ^a	59±80 ^a	56±57 ^a	46±55 ^a	10±7 ^a
l	CAL	28 d.p.i.	210±189 ^a	107±86ª	102±113 ^a	183±79 ^a	114±63 ^a	61±49 ^a	102±95 ^a	57±66ª	45±31 ^a

			MHCII		Gal-15	G	ialectina-1	4
		Total	Inf.	Sup.		Total	Inf.	Sup.
CAN	7 d.p.i.	588±378 ^a	325±207 ^a	262±202°	2,4±0,9 ^a	109±100 ^a	84±86 ^a	25±30 ^a
CAN	28 d.p.i.	356±197°	212±137 ^a	145±64 ^a	0,9±1,2 ^b *	101±82 ^a	78±73°	23±19 ^a
CAP	7 d.p.i.	393±218 ^a	324±200 ^a	69±39 ^a	2±1ª	105±106 ^a	97±109 ^a	8±6ª
CAI	28 d.p.i.	452±192°	303±116 ^a	149±88 ^a	2,1±0,9 ^a *	135±76°	103±76 ^a	33±30 ^b

Tabla 14: Recuentos medios de células en la mucosa abomasal en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). El valor representa $\bar{x} \pm s$. Eos.: eosinófilos, Mast.: mastocitos, L.G.: leucocitos globulares, Gal-15: grado de tinción del mucus con anticuerpos frente a galectina-15. En algunas células se señala el recuento en el tercio inferior de la mucosa (Inf.), en el tercio superior (Sup.), y la suma de ambos (Total). Letras distintas indican diferencias significativas en los recuentos de diferentes días de sacrificio, 7 ó 28 p.i., en animales de la misma raza. El asterisco "*" señala diferencias significativas entre razas en los animales sacrificados el mismo día ($p \le 0.05$).

3.1. CÉLULAS EFECTORAS (Fig. 25)

3.1.1. Eosinófilos

En la mucosa abomasal de los ovinos CAN se observaron casi dos veces más eosinófilos que en los CAP a los 7 dpi si bien, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Esta tendencia se invirtió en los animales sacrificados a los 28 dpi. Así, los ovinos CAP mostraron más del doble de eosinófilos que los ovinos CAN, pero estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas.

En los ovinos CAN se observaron cuatro veces más eosinófilos en la mucosa abomasal a los 7 dpi que a los 28 dpi (p=0,003), siendo estas diferencias significativas. Sin embargo, en los ovinos CAP no hubo diferencias reseñables en los recuentos efectuados a los 7 y 28 dpi (Fig. 25).

3.1.2. Mastocitos

Si bien no existió significación estadística, tanto a los 7 dpi como a los 28 dpi se observaron más mastocitos en los ovinos Canarios (CAN) en relación a los ovinos Canarios de Pelo (CAP).

En las dos razas se duplicó el número de mastocitos en la mucosa del abomaso a los 28 dpi, en relación con este parámetro a los 7 dpi, aunque este incremento tampoco fue estadísticamente significativo (Fig. 25).

3.1.3. Leucocitos globulares

No se observaron diferencias significativas en los recuentos de leucocitos globulares entre razas tanto a los 7 dpi como a los 28 dpi. Tampoco se observaron diferencias significativas intraraciales, cuando se compararon los recuentos de estas células a los 7 y 28 dpi dentro de cada raza (Fig. 25).

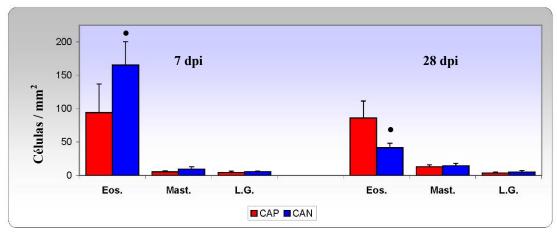


Fig. 25: Recuentos de eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares en la mucosa abomasal de ovinos Canarios de Pelo y Canarios sacrificados 7 y 28 dpi El borde superior de la barra indica el recuento medio, y la línea de error señala el error típico de la media. El punto " \bullet " señala diferencias dentro de raza para distintos días de sacrificio (p \leq 0,05).

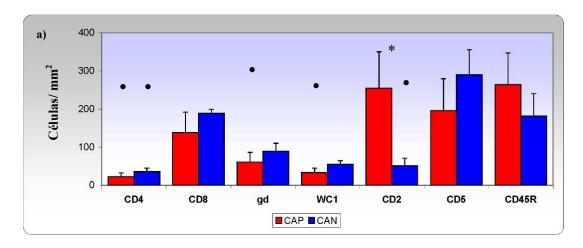
3.2. LINFOCITOS (CD2, CD4, CD5, CD8, CD45R, γδ, WC1). (Fig 26)

Los anticuerpos monoclonales utilizados permitieron identificar las principales subpoblaciones de linfocitos que expresan el TCR $\alpha\beta$, como son los CD4⁺ y CD8⁺, así como aquellos linfocitos que expresan el TCR $\gamma\delta$, y su principal subpoblación, mediante el marcaje con anticuerpos anti-WC1. Los anticuerpos frente a las moléculas CD2 y CD5 fueron utilizados como marcadores de activación de linfocitos T, y el CD45R, como un marcador específico en ovinos, de linfocitos B (Meeusen *et al.*, 1989; Balic *et al.*, 2000a).

En los ovinos Canarios (CAN), algunas poblaciones de linfocitos aumentaron del día 7 al 28 pi $(CD2^+ \ y \ CD4^+ \ significativamente, \ y \ \gamma\delta^+)$, y el resto de marcadores estudiados se mantuvieron estables $(CD8^+, CD5^+, WC1^+ \ y \ CD45R^+)$. Es destacable el incremento de los linfocitos $T \ CD4^+$, especialmente en el tercio inferior de la mucosa, donde el recuento de esta célula es cinco veces mayor a los 28 dpi que a los 7 dpi y de los linfocitos $T \ CD2^+$, en los que la cantidad de células se cuadruplica entre la $1^a \ y \ la \ 4^a \ semana \ pi \ (Tabla 14)$.

En los ovinos Canarios de Pelo (CAP), las poblaciones linfocitarias que aumentaron a lo largo del estudio fueron los $CD4^+y$ $WC1^+$, significativamente, y también los $CD8^+y$ $\gamma\delta^+$. En todos los casos se trató de incrementos importantes; en el caso de los linfocitos T $WC1^+$, por ejemplo, el número de células se triplicó entre los días 7 y 28 dpi, y en los T $CD4^+$ se quintuplicó.

En esta raza, los linfocitos CD2⁺ y CD5⁺ mantuvieron recuentos similares en ambos momentos de sacrificio, y los CD45R⁺ experimentaron un notable descenso, especialmente en el tercio inferior de la mucosa, aunque sin alcanzar significación estadística (Tabla 14).



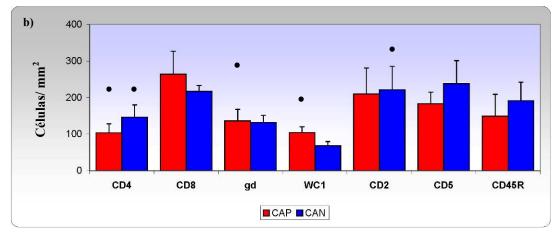


Fig. 26: Recuentos celulares de distintas poblaciones linfocitarias en la mucosa abomasal de ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) sacrificados a los 7 dpi. (a) y 28 dpi. (b): $T CD4^+$, $T CD8^+$, $T γδ^+$ (gd), $T γδ WC1^+$, $B (CD45R^+)$, $CD2^+$ y $CD5^+$. El borde superior de la barra indica el recuento total medio, suma de los recuentos en el tercio superior e inferior de la mucosa y la línea de error señala el error típico de la media. El asterisco señala diferencias entre razas para el mismo día de sacrificio. El punto "•" señala diferencias dentro de raza para distintos días de sacrificio (p≤0,05).

Sólo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre razas al comparar las células CD2⁺ a los 7 dpi. También las diferencias entre razas en los recuentos de células WC1⁺ mostraron una fuerte tendencia a la significación estadística tanto a los 7 como a lo 28 dpi.

La distribución de las células en la mucosa fue variable, aunque habitualmente las células tendieron a ser más abundantes en el tercio inferior de la mucosa o a mantener una distribución homogénea por todo el tejido. En este aspecto no existieron, en general, diferencias relevantes entre razas. Solamente a los 28 dpi, los linfocitos T CD4⁺ y CD2⁺ en los ovinos CAN fueron mucho más abundantes en el tercio inferior de la mucosa que en el tercio superior, mientras que en los ovinos CAP la distribución fue homogénea (Tabla 14).

3.3. CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CD1 y MHC II). (Fig. 27)

Los anticuerpos monoclonales utilizados permitieron identificar células presentadoras de antígeno en el contexto del MHC de clase II, y aquellas células que expresan la molécula CD1, fundamentalmente células dendríticas.

En ambas razas las células CD1⁺ experimentaron un incremento en su población tisular, estadísticamente significativo en el caso de los CAN, entre los días 7 y 28 pi. Sin embargo, el patrón seguido por las células MHC II⁺ varió según la raza. En los ovinos CAN se redujo su población en la pared del abomaso a los 28 dpi, mientras que en los ovinos CAP se produjo un ligero aumento, debido principalmente al incremento del número de estas células en el tercio superior de la mucosa (Tabla 14).

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre razas al comparar los recuentos de estas células en la pared del abomaso.

Con respecto a su distribución, ambas células se localizaron preferentemente en el tercio inferior de la mucosa del abomaso (Tabla 14).

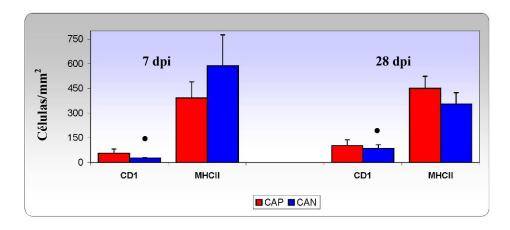


Fig. 27: Recuentos de células CD1⁺ y MHCII⁺ en la mucosa abomasal de ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) sacrificados a los 7 y 28 dpi. El borde superior de la barra indica el recuento total medio, de los recuentos en el tercio superior e inferior de la mucosa y la línea de error señala el error típico de la media. El punto " \bullet " señala diferencias dentro de raza para distintos días de sacrificio (p \leq 0,05)

3.4. GALECTINA-14 Y GALECTINA-15 (Fig. 28-29)

Utilizando el anticuerpo frente a la galectina-14, únicamente se observó inmunorreacción en el citoplasma de los eosinófilos, siendo más abundantes en el tercio inferior de la mucosa de todos

los animales (Tabla 14). En los ovinos CAN los niveles de estas células permanecieron estables a lo largo de la experiencia, mientras que en los ovinos CAP se observó un ligero incremento entre los días 7 y 28 pi, debido probablemente al aumento, significativo estadísticamente, de estas células en el tercio superior de la mucosa (Tabla 14). No se observaron diferencias entre razas en ambos tiempos de sacrificio (Fig. 28).

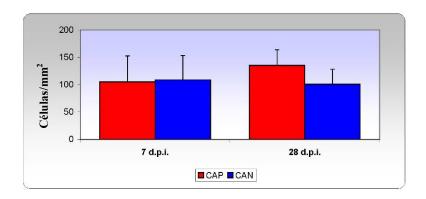
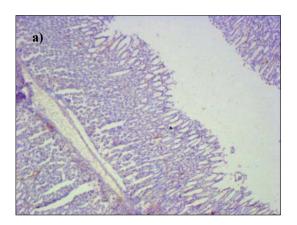


Fig. 28: Recuento de células marcadas con galectina-14 en la mucosa abomasal de los ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) sacrificados a los 7 y 28 dpi. El borde superior de la barra indica el valor medio, y la línea de error señala el error típico de la media.



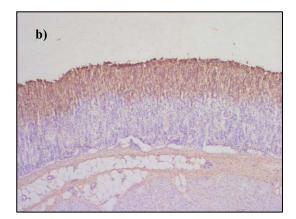


Fig. 29: Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a Galectina-15 en animales sacrificados a los 28 dpi. Ambas imágenes son representativas de los ovinos Canarios (a) y Canarios de Pelo (b).

La presencia de galectina-15 pudo constatarse en el mucus, y los cortes fueron clasificados ordinalmente en una escala de 0 a 3, de menor a mayor reacción inmunohistoquímica, tal y como se recoge en el apartado correspondiente de "Material y Métodos". En los ovinos CAN se produjo una clara disminución en la cantidad de galectina-15 en el mucus entre los días 7 y 28 pi, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En los ovinos CAP, en cambio, los niveles de galectina-15 fueron similares en ambos momentos de sacrificio.

A los 28 dpi los niveles de esta molécula fueron claramente superiores en los ovinos CAP en comparación con los ovinos CAN, alcanzándose significación estadística siguiendo el procedimiento de cuantificación antes reseñado (Fig. 29, Tabla 14).

3.5. CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES (Tabla 15)

3.5.1. Ovino Canario

A los 7 dpi se pueden destacar las correlaciones positivas y estadísticamente significativas existentes entre mastocitos y linfocitos WC1⁺; entre leucocitos globulares y linfocitos T CD4⁺ del tercio superior de la mucosa (r = 0.92*) y entre linfocitos T CD8⁺ y células MHC II+. Por otra parte, se observó una fuerte tendencia a la asociación inversa entre linfocitos T $\gamma\delta$ y células CD8⁺ y MHC II⁺; entre células CD2⁺ y mastocitos y linfocitos T WC1⁺; y entre células galectina-14⁺ y mastocitos (Tabla 15a).

A los 28 dpi (Tabla 15b) se pueden destacar algunas asociaciones negativas entre variables: entre mastocitos y células CD8⁺; entre las células CD45R⁺ y los eosinófilos y mastocitos y, sin significación estadística, entre eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ y células galectina-14⁺ del tercio inferior de la mucosa (r = 0,3; p =0,43 en este último caso).

A su vez, las células galectina-14⁺ se correlacionaron positivamente con varias poblaciones celulares: MHCII⁺, linfocitos T CD4⁺ (p = 0,07) y WC1⁺. Finalmente, también eosinófilos y mastocitos estaban positivamente correlacionados en esta raza a los 28 dpi.

3.5.2. Ovino Canario de Pelo

Se observaron diferencias importantes en las relaciones entre células en los ovinos CAP en comparación con los ovinos CAN.

Así, a los 7 dpi (Tabla 15a) destacaron las correlaciones entre algunas poblaciones celulares y ciertas subpoblaciones de las mismas: linfocitos T $\gamma\delta^+$ y WC1 $^+$, por una parte, y eosinófilos y células galectina-14 $^+$ por otra, estuvieron correlacionados positivamente. A su vez las células MHC II $^+$ se correlacionaron fuertemente con los leucocitos globulares y con los linfocitos T CD4 $^+$. En este momento de sacrificio también destacó la correlación positiva entre linfocitos CD5 $^+$ y CD2 $^+$; entre eosinófilos y células CD45R $^+$ y CD5 $^+$; así como entre estas dos células (CD5 $^+$ y CD45R $^+$) y entre mastocitos y la producción de galectina-15. Finalmente, los mastocitos se asociaron negativamente con los linfocitos CD8 $^+$ y $\gamma\delta^+$.

A los 28 dpi (Tabla 15b) se observó una fuerte correlación positiva entre eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ (en los ovinos CAN la correlación fue inversa). Por su parte, como ya ocurriera a los 7 dpi, linfocitos T $\gamma\delta^+$ y WC1⁺ aparecieron fuertemente correlacionados, mientras que en los ovinos CAN la correlación entre estas células fue inversa a los 7 dpi y débilmente positiva a los 28 dpi. También fueron significativas las correlaciones entre las células CD1⁺ y los linfocitos T CD4⁺; entre las células MHC II⁺ y los eosinófilos y niveles de galectina-15 y entre las células CD45R⁺ y la producción de esta galectina.

Tabla 15a: Correlaciones entre células a los 7 dpi

		Eos.	Mast.	L.G.	CD4	CD8	γδ	WC1	CD45R	CD2	CD5	CD1	MHCII	Gal-15
	Total		0,024	0,474	0,733*	0,000	0,167	0,435	0,550	-0,117	0,683*	0,139	0,733*	0,572
Eos.	CAN		0,000	0,224	0,300	0,800	-0,800	0,200	0,000	-0,200	0,400	0,300	0,800	0,335
	CAP		0,500	0,447	0,700	-0,600	0,200	0,359	1**	0,800	0,900*	0,300	0,700	0,632
	Total	0,024		-0,325	0,119	-0,143	-0,321	0,360	0,464	-0,536	0,071	-0,405	0,536	0,360
Mast.	CAN	0,000		-0,783	0,200	0,400	-0,400	1**	0,400	-1**	-0,800	-0,300	0,400	0,224
	CAP	0,500		0,000	0,500	-1**	-1**	-0,866	0,500	0,500	0,500	-0,500	0,500	1**
	Total	0,474	-0,325		0,798**	-0,362	0,190	0,035	0,173	-0,259	0,121	-0,056	0,518	0,105
L.G.	CAN	0,224	-0,783		0,447	-0,258	0,258	-0,775	-0,775	0,775	0,775	-0,112	-0,258	-0,125
	CAP	0,447	0,000		0,894*	-0,335	0,335	0,344	0,447	-0,112	0,112	0,224	0,894*	0,177
	Total	0,733*	0,119	0,798**		-0,250	0,283	0,385	0,333	-0,383	0,283	-0,212	0,617	0,434
CD4	CAN	0,300	0,200	0,447		0,200	-0,200	0,800	-0,200	-0,800	-0,600	-0,700	0,200	0,224
	CAP	0,700	0,500	0,894*		-0,600	0,200	0,308	0,700	0,200	0,500	0,000	1**	0,316
	Total	0,000	-0,143	-0,362	-0,250		0,400	0,695*	-0,283	-0,383	-0,333	0,267	-0,067	-0,429
CD8	CAN	0,800	0,400	-0,258	0,200		-1**	0,400	0,600	-0,400	0,200	0,400	1**	-0,258
	CAP	-0,600	-1**	-0,335	-0,600		0,600	0,462	-0,600	-0,600	-0,700	0,100	-0,600	-0,791
	Total	0,167	-0,321	0,190	0,283	0,400		0,695*	-0,117	-0,150	-0,033	0,100	-0,200	-0,019
γδ	CAN	-0,800	-0,400	0,258	-0,200	-1**		-0,400	-0,600	0,400	-0,200	-0,400	-1**	0,258
	CAP	0,200	-1**	0,335	0,200	0,600		0,975**	0,200	-0,200	-0,100	0,300	0,200	-0,474
	Total	0,435	0,360	0,035	0,385	0,695*	0,695*		0,059	-0,561	-0,017	-0,109	0,268	0,009
WC1	CAN	0,200	1**	-0,775	0,800	0,400	-0,400		0,400	-1,000	-0,800	-0,600	0,400	0,258
	CAP	0,359	-0,866	0,344	0,308	0,462	0,975**		0,359	-0,051	0,103	0,205	0,308	-0,406
	Total	0,550	0,464	0,173	0,333	-0,283	-0,117	0,059		0,367	0,533	0,167	0,667*	0,130
CD45R	CAN	0,000	0,400	-0,775	-0,200	0,600	-0,600	0,400		-0,400	-0,200	0,400	0,600	-0,775
	CAP	1**	0,500	0,447	0,700	-0,600	0,200	0,359		0,800	0,900*	0,300	0,700	0,632
	Total	-0,117	-0,536	-0,259	-0,383	-0,383	-0,150	-0,561	0,367		0,300	0,533	-0,317	0,037
CD2	CAN	-0,200	-1**	0,775	-0,800	-0,400	0,400	-1**	-0,400		0,800	0,600	-0,400	-0,258
	CAP	0,800	0,500	-0,112	0,200	-0,600	-0,200	-0,051	0,800		0,900*	0,300	0,200	0,791
	Total	0,683*	0,071	0,121	0,283	-0,333	-0,033	-0,017	0,533	0,300		-0,083	0,433	0,503
CD5	CAN	0,400	-0,800	0,775	-0,600	0,200	-0,200	-0,800	-0,200	0,800		0,800	0,200	-0,258
	CAP	0,900*	0,500	0,112	0,500	-0,700	-0,100	0,103	0,900*	0,900*		0,000	0,500	0,632
	Total	0,139	-0,405	-0,056	-0,212	0,267	0,100	-0,109	0,167	0,533	-0,083		-0,100	-0,132
CD1	CAN	0,300	-0,300	-0,112	-0,700	0,400	-0,400	-0,600	0,400	0,600	0,800		0,400	-0,447
	CAP	0,300	-0,500	0,224	0,000	0,100	0,300	0,205	0,300	0,300	0,000		0,000	0,474
	Total	0,733*	0,536	0,518	0,617	-0,067	-0,200	0,268	0,667*	-0,317	0,433	-0,100		0,130
MHCII	CAN	0,800	0,400	-0,258	0,200	1**	-1**	0,400	0,600	-0,400	0,200	0,400		-0,258
	CAP	0,700	0,500	0,894*	1**	-0,600	0,200	0,308	0,700	0,200	0,500	0,000		0,316
	Total	0,572	0,360	0,105	0,434	-0,429	-0,019	0,009	0,130	0,037	0,503	-0,132	0,130	
Gal-15	CAN	0,335	0,224	-0,125	0,224	-0,258	0,258	0,258	-0,775	-0,258	-0,258	-0,447	-0,258	
	CAP	0,632	1,000	0,177	0,316	-0,791	-0,474	-0,406	0,632	0,791	0,632	0,474	0,316	
	Total	0,612	-0,476	0,704*	0,552	-0,567	-0,067	-0,251	0,550	0,383	0,683*	0,079	0,500	0,289
Gal-14	CAN	0,400	-0,900*	0,783	-0,100	0,200	-0,200	-0,800	-0,200	0,800	1**	0,500	0,200	-0,224
	CAP	0,900*	0,500	0,671	0,900*	-0,800	0,000	0,154	0,900*	0,600	0,800	0,100	0,900*	0,632

Tabla 15b: Correlaciones entre células a los 28 dpi

0,607* 0,190 0,821* 0,197 0,371 0,000 0,268 0,313 0,432	0,607* 0,468 0,472 -0,097 0,207 -0,189 0,037 -0,253
0,821* 0,197 0,371 0,000 0,268 0,313 0,432	0,472 -0,097 0,207 -0,189 0,037 -0,253
0,197 0,371 0,000 0,268 0,313 0,432	-0,097 0,207 -0,189 0,037 -0,253
0,371 0,000 0,268 0,313 0,432	0,207 -0,189 0,037 -0,253
0,000 0,268 0,313 0,432	-0,189 0,037 -0,253
0,268 0,313 0,432	0,037 -0,253
0,313 0,432	-0,253
0,432	
0.153	0,505
0,152	-0,128
0,286	0,110
0,257	0,123
0,393	0,087
0,190	-0,110
0,200	-0,093
0,327	0,032
0,024	-0,083
0,771	0,309
0,571*	0,476
0,333	0,495
0,464	-0,094
0,050	-0,013
-0,072	-0,401
0,536	0,869*
-0,136	0,154
-0,167	0,000
0,000	0,472
-0,046	0,023
-0,405	0,115
0,600	0,154
0,375	0,263
0,429	0,255
0,357	0,246
	0,514*
	0,294
	0,756*
0,514*	
0,294	
0,756*	
0,604*	0,432
0,714*	0,303
0,679	0,529
0 1 2 6 1 2 2	5 0,393 0 0,190 1 0,200 2 0,327 6 0,024 4 0,771 9 0,571* 5 0,333 9 0,464 2 0,050 7 -0,072 3 0,536 1 0,000 3 -0,465 4 0,600 0,375 0,429 0,357 5 9 7 3 0,514* 5 0,294 6 0,714*

Tabla 15: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre recuentos celulares en la pared abomasal en ovinos Canarios de Pelo (CAP) y Canarios (CAN) sacrificados a los 7 (a) y 28 (b) dpi. Eos.: eosinófilos; Mast.: mastocitos; L.G.: leucocitos globulares; Gal-15: grado de tinción del mucus con anticuerpos frente a galectina -15; Gal-14: galectina 14. Los asteriscos indican significación estadística (*: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$)

4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL

Mediante la técnica ELISA indirecta se valoraron los niveles de IgA en el mucus y de IgA e IgG en el suero de los animales inoculados frente a diversos antígenos del parásito: somático y excretor/secretor (ES) de vermes adultos, y somático de larvas 3 (L3). En el caso de los estudios séricos se calculó un valor basal, utilizando la media de las tres semanas anteriores a la inoculación para cada animal, y se realizó una determinación semanal hasta el final de la experiencia. En el caso de los estudios en mucus, se realizó la evaluación de los niveles de inmunoglobulinas en cada uno de los días de sacrificio, 7 y 28 post-inoculación (pi). En todos los casos se midieron los niveles de inmunoglobulinas en cada animal, y a partir de estos valores se calculó el valor medio de cada lote.

4.1. INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS SÉRICAS (Fig. 30)

Las principales diferencias entre las dos razas al analizar los niveles de inmunoglobulinas séricas se pueden resumir en tres puntos:

- La mayor producción de IgG total específica frente al antígeno ES de adulto en ovinos CAN.
- La mayor producción de IgA sérica frente a antígeno somático de L3 en ovinos CAN a los 7 dpi.
- La aparición de un pico de IgG específicas frente a este mismo antígeno larvario a los 21 dpi únicamente en los ovinos CAP, aunque en este último caso, sin significación estadística.

Por lo demás, los perfiles séricos fueron muy similares en ambas razas.

Los niveles de IgA frente a los distintos antígenos mostraron una elevación importante en la segunda semana pi, con independencia de que el antígeno fuera larvario o de adulto, siendo este incremento significativo respecto al valor basal, únicamente cuando se antigenaron las placas con antígeno ES. En las siguientes semanas los niveles de esta inmunoglobulina se aproximaron a los valores basales.

En cambio, se observó un incremento significativo en los niveles de IgG específica del antígeno larvario a partir de la 1^a semana pi, mientras que frente a los antígenos de adulto este incremento (significativo en el caso del antígeno ES de adulto) se observó a partir de la 2^a semana pi.

Además los niveles de IgG frente a antígeno larvario y ES de adulto se mantuvieron elevados hasta el final de la experiencia (Fig. 30).

Los niveles de inmunoglobulinas fueron habitualmente superiores en los ovinos Canarios (CAN), con excepción de la IgA frente antígeno ES (adulto) (Fig. 30c). Sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas entre razas utilizando el Modelo General Lineal (GLM) de medidas repetidas al comparar los niveles de IgG frente a antígeno ES de adulto, tal y como se señaló anteriormente.

4.2. INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS EN EL MUCUS GÁSTRICO (Fig. 31)

También en este caso ambas razas siguieron un patrón similar, con niveles más elevados de IgA a los 28 dpi que a los 7 dpi independientemente del antígeno estudiado, si bien estos incrementos sólo fueron significativos en la raza CAP.

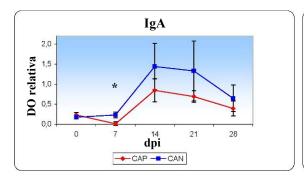
Al contrario de lo observado en suero, las concentraciones de inmunoglobulinas específicas fueron siempre sensiblemente superiores en los ovinos CAP en comparación con los CAN. Aunque las diferencias no fueron significativas, en el caso de los niveles de estas inmunoglobulinas frente al antígeno ES (p=0,059) y somático (p=0,077) de vermes adultos a los 28 dpi, estas diferencias estuvieron muy próximas a la significación estadística.

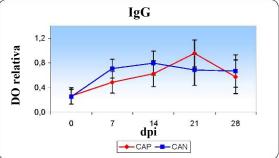
4.3. CORRELACIONES ENTRE LAS DISTINTAS INMUNOGLOBULINAS (Tablas 16-19)

En el análisis de las correlaciones entre los niveles de las distintas inmunoglobulinas específicas se valoraron los siguientes aspectos:

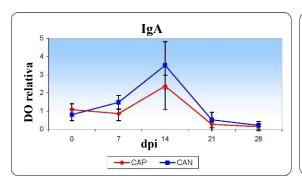
- cómo se correlacionaron entre sí los datos de diferentes semanas para el mismo isotipo de inmunoglobulina (IgA o IgG) y antígeno (somático de adulto, excretor-secretor de adulto y somático larvario) (Tabla 16 a-c).
- cómo se correlacionaron entre sí los niveles de IgA e IgG séricas producidas frente al mismo antígeno (Tabla 16 a-c).
- cómo se correlacionaron entre sí los datos del mismo isotipo frente a diferentes antígenos (Tabla 17 a,b y Tabla 18).
- cómo se correlacionaron entre sí los niveles de IgA séricas y del mucus (Tabla 19)

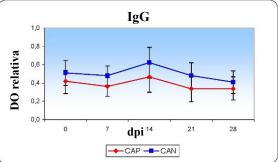
a) IgA e IgG frente a antígeno somático de L3



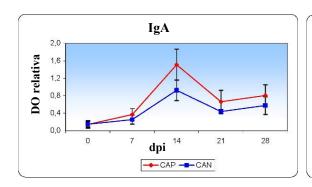


b) IgA e IgG frente a antígeno somático de adulto





c) IgA e IgG frente a antígeno ES de adulto



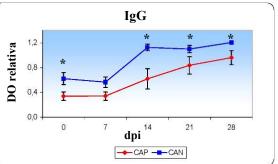
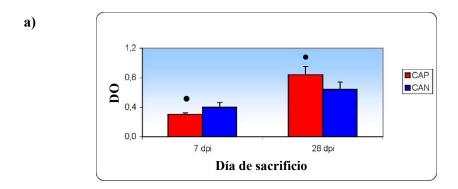
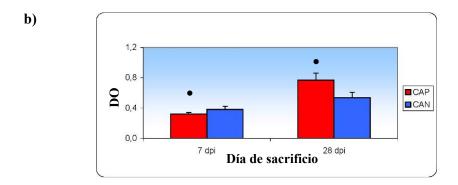


Fig. 30: Niveles de inmunoglobulinas específicas (Ig) séricas en los animales inoculados a lo largo del estudio, expresados en densidades ópticas (DO) relativas. El valor basal de cada animal se calculó como la media de los valores obtenidos las tres semanas anteriores al comienzo del estudio. Cada punto representa la media observada en los corderos de cada raza \pm el error típico de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas entre razas, (*= p \leq 0,05).





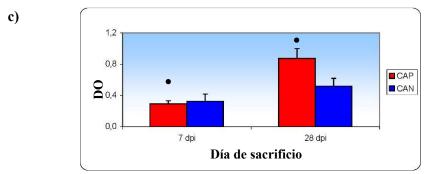


Fig. 31: Niveles de inmunoglobulinas específicas (Ig) A en el mucus gástrico de los animales inoculados a los 7 y 28 días post-inoculación (dpi), expresados en densidades ópticas (DO). Antígenos utilizados: somático larvario (a), somático de vermes adultos (b), excretor/secretor de vermes adultos (c). El borde superior de la barra indica el valor medio, y la línea de error señala el error típico de la media. El punto "•" indica diferencias significativas entre días de sacrificio, 7 ó 28 pi, para corderos de la misma raza ($p \le 0.05$).

4.3.1. Ovino Canario

Los niveles de las distintas inmunoglobulinas específicas de cada semana estaban correlacionados en estos animales con los de las semanas adyacentes, así como con los niveles basales, y también se observó una fuerte asociación entre los dos isotipos de inmunoglobulinas estudiados en el suero (IgA e IgG) (Tabla 16 a-c).

Tal y como sucedía cuando se analizaron conjuntamente todos los animales, en la raza CAN la producción de un mismo isotipo de inmunoglobulina frente a distintos antígenos estaba positivamente relacionado, tanto en suero (Tabla 17 a, b) como en mucus (Tabla 18).

En esta raza, las correlaciones entre los niveles de IgA en suero y mucus fueron, fuertemente positivas, con la única excepción de los niveles de IgA frente a antígeno somático de L3 a los 7 dpi (Tabla 19).

4.3.2. Ovino Canario de Pelo

Los niveles de las IgG específicas estudiadas (ES de adulto, somático adulto y larvario) obtenidos cada semana estaban correlacionados con los de la semana anterior y posterior, tal y como sucedió en los animales de la otra raza (CAN). Lo mismo aconteció con los valores de IgA específicas de antígenos larvarios. Sin embargo, en el caso de los niveles de IgA específicos de antígenos adultos, especialmente el ES, las semanas 2ª, 3ª y 4ª pi no se correlacionaron entre sí ni con los valores basales. Tampoco fue tan clara la asociación entre IgA e IgG sérica (Tabla 16 a-c). Por otra parte, al estudiarse las relaciones entre las IgG determinadas frente a los tres antígenos analizados, estas mostraron mayor asociación entre sí que la que se observó entre los diversos niveles de IgA específicas determinados (Tabla 17a,b).

Respecto a los niveles de IgA específica en mucus, las producidas frente a antígenos somáticos larvarios y de adultos estaban relacionadas entre sí, pero no con las de antígeno ES de adulto (Tabla 18), a diferencia de lo observado en ovinos CAN.

Finalmente, al correlacionar los niveles de IgA de suero y mucus se observaron diferencias importantes entre razas, dado que en los ovinos CAP estas correlaciones fueron negativas, si bien muy alejadas de la significación estadística (Fig. 32, Tabla 19).

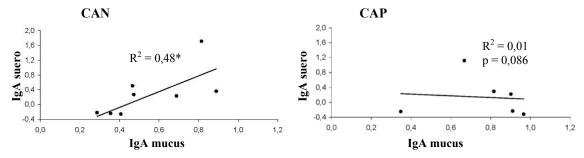


Fig. 32: Regresión de los niveles de IgA séricos frente a antígeno somático de adulto sobre los niveles de IgA en mucus frente al mismo antígeno a los 28 dpi (*: $p \le 0.05$).

Tabla 16a: Correlación entre IgA e IgG séricas frente a Ag somático de adulto

		lgA basal	lgA 7 dpi	lgA 14 dpi	lgA 21 dpi	lgA 28 dpi	lgG basal	lgG 7 dpi	lgG 14 dpi	lgG 21 dpi	lgG 28 dpi
	Total		0,545**	0,426	0,524*	0,212	0,184	0,121	*695,0	0,466	0,656**
lgA Basal	CAN		0,468	0,367	0,600	0,133	0,446	0,349	0,850**	*057,0	0,750*
	CAP		0,725**	0,024	0,012	0,214	660'0-	-0,154	0,357	0,143	0,571
	Total	0,545**		0,534*	0,250	-0,147	0,233	0,265	0,098	0,360	0,403
lgA 7 dpi	CAN	0,468		0,666*	0,417	-0,100	0,499	0,552*	0,383	0,683*	0,600
	CAP	0,725**		0,095	-0,108	-0,321	-0,181	-0,214	-0,548	-0,262	0,000
	Total	0,426	0,534*		0,510*	0,253	980'0	0,015	0,047	0,113	0,406
lgA 14 dpi	CAN	0,367	*799'0		*792,0	0,333	0,367	0,117	0,233	0,617	0,717*
	CAP	0,024	0,095		0,084	0,143	-0,619	-0,595	-0,524	-0,786*	-0,179
	Total	0,524*	0,250	0,510*		0,414	0,292	0,092	0,310	0,369	0,505*
lgA 21 dpi	CAN	0,600	0,417	0,767*		0,567	0,350	0,117	0,517	0,583	0,850**
	CAP	0,012	-0,108	0,084		0,198	0,347	0,024	-0,120	0,120	-0,018
	Total	0,212	-0,147	0,253	0,414		0,103	0,182	0,456	0,244	0,524*
lgA 28 dpi	CAN	0,133	-0,100	0,333	0,567		-0,050	0,017	0,217	0,133	0,333
	CAP	0,214	-0,321	0,143	0,198		0,643	0,607	0,750	0,464	0,821*
	Total	0,184	0,233	0,086	0,292	0,103		0,808**	0,706**	0,738**	0,571*
lgG Basal	CAN	0,446	0,499	0,367	0,350	-0,050		0,855**	0,800**	0,717*	009'0
	CAP	660'0-	-0,181	-0,619	0,347	0,643		0,648*	0,714*	0,833**	0,714
	Total	0,121	0,265	0,015	0,092	0,182	0,808**		0,662*	0,574*	0,368
lgG 7 dpi	CAN	0,349	0,552*	0,117	0,117	0,017	0,855**		0,633	0,450	0,333
	CAP	-0,154	-0,214	-0,595	0,024	0,607	0,648*		0,810*	0,786*	0,536
	Total	.699,0	0,098	0,047	0,310	0,456	**907,0	0,662*		0,811**	0,779**
lgG 14 dpi	CAN	0,850**	0,383	0,233	0,517	0,217	0,800	0,633		0,717*	0,683*
	CAP	0,357	-0,548	-0,524	-0,120	0,750	0,714*	0,810*		0,786*	0,786
	Total	0,466	0,360	0,113	0,369	0,244	0,738**	0,574*	0,811**		0,806**
lgG 21 dpi	CAN	0,750*	0,683*	0,617	0,583	0,133	0,717*	0,450	0,717*		**006,0
	CAP	0,143	-0,262	-0,786*	0,120	0,464	0,833**	0,786*	0,786*		0,714
	Total	0,656**	0,403	0,406	0,505*	0,524*	*175,0	0,368	0,779**	0,806**	
lgG 28 dpi	CAN	0,750*	0,600	0,717*	0,850**	0,333	0,600	0,333	0,683*	**006'0	
	CAP	0,571	0,000	-0,179	-0,018	0,821*	0,714	0,536	0,786*	0,714	

Tabla 16a: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre IgG e IgA séricas frente a antígeno somático de adultos de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). El dato basal fue calculado como el valor medio de las tres semanas previas a la inoculación; el resto de medidas corresponden a la media de los corderos de cada raza, en cada una de las cuatro semanas post-inoculación. Los asteriscos señalan significación estadística (* = $p \le 0,05$; ** = $p \le 0,01$)

Tabla 16b: Correlación entre IgA e IgG séricas frente a Ag ES de adulto

		lgA Basal	IgA 7 dpi	IgA 14 dpi	IgA 21 dpi	lgA 28 dpi	lgG Basal	lgG 7 dpi	lgG 14 dpi	lgG 21 dpi	lgG 28 dpi
	Todos		0,684*	0,480	0,424	0,191	0,479*	666,0	0,240	0,262	0,174
IgA Basal	CAN		**079,0	0,383	0,633	0,133	0,714**	0,719**	0,883**	0,817**	0,367
	CAP		0,692**	0,429	0,262	0,429	0,148	-0,033	-0,119	-0,095	0,214
	Todos	0,684**		0,623**	0,353	0,394	0,279	0,234	0,162	0,284	0,115
IgA 7 dpi	CAN	0,670**		*799'0	0,400	0,100	0,393	0,591*	0,817**	0,833*	0,400
	CAP	0,692**		0,690	0,357	0,500	0,313	0,005	0,143	0,119	0,393
	Todos	0,480	0,623**		0,549*	0,612*	960'0	0,076	0,002	0,199	0,200
IgA 14 dpi	CAN	0,383	*299'0		0,350	0,650	-0,033	0,183	0,367	0,283	0,567
	CAP	0,429	0,690		0,571	0,321	0,452	0,190	0,286	0,429	0,321
	Todos	0,424	0,353	0,549*	241	0,621**	0,571*	0,451	0,449	.995'0	0,518*
IgA 21 dpi	CAN	0,633	0,400	0,350		0,517	0,717*	009'0	0,567	0,500	0,750*
	CAP	0,262	0,357	0,571		0,714	0,833**	0,429	0,690	0,738*	0,750
	Todos	0,191	0,394	0,612*	0,621**		0,035	0,106	900'0	0,159	0,494
lgA 28 dpi	CAN	0,133	0,100	0,650	0,517		0,033	0000	0,050	-0,033	0,733*
	CAP	0,429	0,500	0,321	0,714		0,500	0,500	0,464	0,679	0,500
	Todos	0,479*	0,279	0,098	0,571*	0,035		0,827**	0,730**	0,686**	0,683**
lgG Basal	CAN	0,714**	0,393	-0,033	0,717*	0,033		0,868**	0,550	0,683*	009'0
	CAP	0,148	0,313	0,452	0,833**	0,500		0,643*	0,857**	0,690	1**
	Todos	666,0	0,234	9/0'0	0,451	0,106	0,827*		0,694**	0,735**	0,659**
lgG 7 dpi	CAN	0,719**	0,591*	0,183	009'0	0,000	0,868**		0,783*	0,883**	009'0
	CAP	-0,033	0,005	0,190	0,429	0,500	0,643*		0,762*	0,738*	1**
	Todos	0,240	0,162	0,002	0,449	900'0	**067,0	0,694**	100	0,917**	0,641**
lgG 14 dpi	CAN	0,883**	0,817**	0,367	0,567	0,050	0,550	0,783*		0,950**	0,233
	CAP	-0,119	0,143	0,286	069'0	0,464	0,857**	0,762*		0,857**	0,929**
	Todos	0,262	0,284	0,199	0,566*	0,159	**989'0	0,735**	0,917**		0,653**
lgG 21 dpi	CAN	0,817**	0,833**	0,283	009'0	-0,033	0,683*	0,883**	0,950**		0,283
	CAP	-0,095	0,119	0,429	0,738*	0,679	069'0	0,738*	0,857**		0,821*
	Todos	0,174	0,115	0,200	0,518*	0,494	0,682**	0,656**	0,641**	0,653**	
lgG 28 dpi	CAN	0,367	0,400	0,567	0,750*	0,733*	009'0	0,500	0,233	0,283	
	CAP	0.214	0.393	0.321	0.750	0,500	*	*	0.929**	0.821*	

Tabla 16b: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre IgG e IgA séricas frente a antígeno ES de adultos de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). El dato basal fue calculado como el valor medio de las tres semanas previas a la inoculación; el resto de medidas corresponden a la media de los corderos de cada raza, en cada una de las cuatro semanas post-inoculación. Los asteriscos señalan significación estadística (* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$)

Tabla 16c: Correlación entre IgA e IgG séricas frente a Ag somático de L3

		lgA Basal	lgA 7 dpi	lgA 14 dpi	lgA 21 dpi	lgA 28 dpi	lgG Basal	lgG 7 dpi	lgG 14 dpi	lgG 21 dpi	lgG 28 dpi
	Todos		0,580**	0,314	0,267	0,521	0,709**	0,651**	0,426	0,255	0,453
IgA Basal	CAN		0,556*	0,183	0,100	0,083	0,644*	**999'0	0,067	-0,233	0,117
50 600	CAP		0,758**	0,500	0,452	0,821*	0,714**	0,681**	0,524	0,500	0,679
	Todos	0,580**		0,441	0,275	0,350	0,675**	0,764**	0,387	906,0	0,621**
IgA 7 dpi	CAN	0,556*		0,733*	0,717*	0,450	0,635*	0,631*	0,583	0,400	0,650
	CAP	0,758**		0,190	0,071	0,393	0,978**	0,951**	0,429	0,667	0,893**
	Todos	0,314	0,441		0,917	0,838	0,228	0,223	0,456	0,419	0,526*
IgA 14 dpi	CAN	0,183	0,733*		**£86'0	0,867**	0,250	0,317	0,433	0,350	0,483
	CAP	0,500	0,190		**976,0	0,964**	0,071	0,048	0,452	0,476	0,393
	Todos	0,267	0,275	0,917		908'0	0,172	0,127	0,417	0,426	0,479
IgA 21 dpi	CAN	0,100	0,717*	0,983**		**006'0	0,233	0,283	0,450	0,400	0,500
	CAP	0,452	0,071	**9/6'0		0,893**	-0,071	-0,095	0,286	0,381	0,250
	Todos	0,521	0,350	0,838	908'0		0,185	0,141	0,350	0,338	0,412
lgA 28 dpi	CAN	0,083	0,450	0,867**	**006'0		0000'0	0,100	0,317	0,383	0,450
5	CAP	0,821*	0,393	0,964**	0,893**		0,286	0,214	0,536	0,464	0,429
	Todos	0,709**	0,675**	0,228	0,172	0,185		0,937**	0,613**	0,574*	0,756**
lgG Basal	CAN	0,644*	0,635*	0,250	0,233	000'0		0,956**	0,567	0,333	0,583
	CAP	0,714**	0,978**	0,071	-0,071	0,286		0,967**	0,452	0,595	0,857*
	Todos	0,651**	0,764**	0,223	0,127	0,141	**756,0		0,627**	0,564*	**008'0
lgG 7 dpi	CAN	0,666**	0,631*	0,317	0,283	0,100	0,956**		0,733*	0,500	0,733*
	CAP	0,681**	0,951**	0,048	-0,095	0,214	0,967**		0,476	0,643	0,929**
	Todos	0,426	0,387	0,456	0,417	0,350	0,613**	0,627**		0,858**	0,871**
lgG 14 dpi	CAN	290'0	0,583	0,433	0,450	0,317	0,567	0,733*		0,883**	**006,0
	CAP	0,524	0,429	0,452	0,286	0,536	0,452	0,476		0,643	0,679
	Todos	0,255	906,0	0,419	0,426	0,338	0,574*	0,564*	0,858**		0,924**
lgG 21 dpi	CAN	-0,233	0,400	0,350	0,400	0,383	0,333	0,500	0,883**		0,917**
8	CAP	0,500	0,667	0,476	0,381	0,464	0,595	0,643	0,643		0,964**
	Todos	0,453	0,621**	0,526*	0,479	0,412	**957,0	0,800**	0,871**	0,923**	
lgG 28 dpi	CAN	0,117	0,650	0,483	0,500	0,450	0,583	0,733*	**006'0	0,917**	
2	CAP	0,679	0,893**	0,393	0,250	0,429	0,857*	0,929**	0,679	0,964**	

Tabla 16c: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre IgG e IgA séricas frente a antígeno somático de L3 de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). El dato basal fue calculado como el valor medio de las tres semanas previas a la inoculación; el resto de medidas corresponden a la media de los corderos de cada raza, en cada una de las cuatro semanas post-inoculación. Los asteriscos señalan significación estadística (* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$)

Tabla 17a: Correlación entre IgA séricas frente a diferentes antígenos

		Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som L3				
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Som Ad	Todos						0,348	0,270	0,289	0,304	0,218
Basal	CAN						0,530	0,547*	0,217	0,183	0,217
	CAP						0,148	0,071	0,333	0,262	0,286
Som Ad	Todos						0,263	0,520**	0,426	0,341	0,179
7 dpi	CAN						0,486	0,662	0,633	0,617	0,500
	CAP						0,126	0,231	-0,286	-0,262	-0,286
Som Ad	Todos						0,147	0,233	0,684**	0,635**	*975,0
14 dpi	CAN						0,117	009'0	0,817**	**008'0	0,800**
	CAP						0,095	-0,476	0,310	0,452	0,286
Som Ad	Lodos						0,174	0,260	.865,0	0,762**	0,497*
21 dpi	CAN						-0,017	0,583	0,717*	0,733*	0,617
	CAP						0,455	0,240	0,431	0,527	0,342
Som Ad	Todos						0,297	0,124	0,635**	.889,0	0,659**
28dpi	CAN						-0,117	0,133	009'0	0,583	0,517
	CAP						0,786*	0,393	0,857*	0,750	0,893**
ES Ad	Todos	0,266	0,382	0,015	0,279	0,032	0,684**	0,621**	0,130	0,076	0,224
Basal	CAN	0,459	0,349	000'0	0,117	0,183	0,705**	0,402	0,017	-0,067	-0,100
***************************************	CAP	0,176	0,357	0,143	0,671	0,179	0,775**	0,758**	0,214	0,262	0,429
ES Ad	Todos	0,082	0,263	0,164	0,429	0,368	0,430*	0,310	0,321	0,380	0,347
7 dpi	CAN	0,112	0,327	0,200	0,383	0,633	0,262	0,248	0,450	0,333	0,133
	CAP	-0,005	0,027	0,190	0,467	0,286	0,643*	0,368	0,333	0,357	0,607
ES Ad	Todos	0,326	0,007	0,397	0,514*	0,479	0,422	0,137	0,583*	0,537*	.265'0
14 dpi	CAN	0,567	0,133	0,633	0,683*	0,733*	0,200	0,200	009'0	0,517	0,550
	CAP	-0,095	-0,119	0,238	0,156	0,393	0,405	0,405	0,619	0,595	0,714
ES Ad	Todos	0,257	0,208	0,385	0,342	0,447	0,632**	0,471	0,502*	0,424	0,582*
21 dpi	CAN	0,750*	0,750*	0,533	0,583	0,017	0,383	0,683*	0,350	0,333	0,267
	CAP	-0,048	-0,143	0,190	0,108	0,964**	0,667	0,548	0,690	0,619	0,857*
ES Ad	Todos	0,482	0,085	0,671**	0,742**	0,474	0,382	0,065	0,556*	0,656**	0,659**
28dpi	CAN	0,583	0,333	0,733*	0,750*	0,450	0,033	0,250	0,567	0,617	0,800**
	CAP	-0,321	-0,393	0,571	0,667	0,643	0,536	0,000	0,714	0,821*	0,643

Tabla 17a: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre IgA séricas frente a diferentes antígenos de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Som Ad: Ag somático de adulto; ES Ad: Ag excretor-secretor de adulto; Som L3: Ag somático de larvas 3. El dato basal fue calculado como el valor medio de las tres semanas previas a la inoculación; el resto de medidas corresponden a la media de los corderos de cada raza, en cada una de las cuatro semanas post-inoculación. Los asteriscos señalan significación estadística (* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$)

Tabla 17b: Correlación entre IgG séricas frente a diferentes antígenos

		Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som Ad	Som L3				
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Som Ad	Todos						0,814**	0,742**	0,613**	0,549*	0,712**
Basal	CAN						**668,0	0,859**	0,533	0,350	0,650
	CAP						0,703**	0,643*	0,714*	0,810*	0,857*
Som Ad	Todos						0,771	0,750	0,453	0,279	0,538
7 dpi	CAN						0,846**	0,855**	0,283	0,117	0,400
	CAP						0,676*	0,665*	0,595	0,524	0,750
Som Ad	Todos						965'0	0,620	0,897	0,684	0,741
14 dpi	CAN						0,733*	0,883**	0,750*	0,517	0,667*
	CAP						0,310	0,333	0,833**	0,524	0,607
Som Ad	Todos						**059,0	0,721**	0,792**	0,772**	0,891**
21 dpi	CAN						0,567	0,733*	*797,0	**008'0	0,933**
	CAP						0,571	0,643	0,690	0,762*	0,857*
Som Ad	Todos						*465,0	0,641**	0,935**	0,897**	0,885**
28dpi	CAN						0,500	0,683*	0,933**	0,933**	0,983**
	CAP						0,536	0,571	0,964*	0,821*	0,714
ES Ad	Lodos	-0,019	0,159	0,130	-0,018	0,053	0,561**	0,617**	0,422	0,235	*795,0
Basal	CAN	0,323	0,367	0,250	0,133	-0,117	0,820**	0,727**	0,333	0,233	0,533
	CAP	-0,495	-0,610	-0,238	0,072	0,821*	0,423	0,500	0,571	0,476	0,750
ES Ad	Todos	-0,077	090'0	-0,059	980'0	0,165	*174,0	0,503**	0,409	0,243	0,518*
7 dpi	CAN	0,297	0,319	290'0	0,117	0,150	0,758**	0,710**	0,317	0,117	0,383
	CAP	-0,390	-0,692**	-0,452	0,383	0,821*	0,225	0,269	0,548	0,667	0,750
ES Ad	Lodos	0,032	0,042	0,007	-0,074	0,441	0,346	0,463	0,436	0,147	0,374
14 dpi	CAN	0,350	0,217	0,000	0,233	0,417	0,650	0,717*	0,483	0,400	0,467
	CAP	-0,286	-0,667	-0,262	-0,120	0,786*	0,405	0,476	0,548	0,333	0,536
ES Ad	Todos	-0,071	0,029	0,093	0,118	*765,0	0,316	0,392	0,400	0,194	0,418
21 dpi	CAN	0,183	0,350	0,033	0,183	0,417	0,717*	0,717*	0,367	0,250	0,383
	CAP	-0,310	-0,524	-0,024	0,168	0,821*	0,190	0,286	0,333	0,405	0,536
ES Ad	Lodos	0,291	0,353	0,485	0,337	0,424	608'0	0,426	*905'0	0,271	0,526*
28dpi	CAN	*799,0	0,800**	*797,0	*799,0	0,267	0,517	0,633	0,617	0,533	0,750*
	CAP	-0,143	-0,607	-0,286	0,180	0,821*	0,607	0,643	0,679	0,643	0,750

en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Som Ad: Ag somático de adulto; ES Ad: Ag excretor-secretor de adulto; Som L3: Ag somático de larvas 3. El dato basal fue calculado como el valor medio de las tres semanas previas a la Tabla 17b: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre IgG séricas frente a diferentes antígenos de H. contortus inoculación; el resto de medidas corresponden a la media de los corderos de cada raza, en cada una de las cuatro semanas postinoculación. Los asteriscos señalan significación estadística (* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$)

Tabla 18: Correlación entre IgA presentes en el mucus gástrico

			Mismo día	
		Som Ad	ES Ad	Som L3
Som Ad	Todos		0,559	0,906**
7 dpi	CAN		1**	0,800
	CAP		0,205	0,975**
Som Ad	Todos		0,939**	0,835**
28 dpi	CAN		0,817**	0,833**
	CAP		0,943**	0,600
ES Ad	Todos	0,559		0,588
7 dpi	CAN	1**		0,800
	CAP	0,205		0,300
ES Ad	Todos	0,939**		0,706**
28 dpi	CAN	0,817**		0,633
	CAP	0,943**		0,486
Som L3	Todos	0,906**	0,588	
7 dpi	CAN	0,800	0,800	
	CAP	0,975**	0,300	
Som L3	Todos	0,835**	0,706**	
28 dpi	CAN	0,833**	0,633	
	CAP	0,600	0,486	

Tabla 18: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre los niveles de IgA en mucus frente a diferentes antígenos de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Los datos de los días 7 ó 28 postinoculación (dpi) de un antígeno se correlacionaron con los del mismo día de sacrificio para los otros antígenos. Som Ad: antígeno somático de adulto; ES Ad: antígeno excretor-secretor de adulto; Som L3: antígeno somático de larvas 3. Los asteriscos señalan significación estadística (** = $p \le 0.01$)

Tabla 19: Correlación entre IgA del suero y mucus

	Som Ad 7 dpi	Som Ad 28 dpi	ES Ad 7 dpi	ES Ad 28 dpi	Som L3 7 dpi	Som L3 28 dpi
Todos	0,158	0,218	0,418	0,361	-0,079	0,484
CAN	0,800	0,683*	0,600	0,350	-0,300	0,733*
CAP	-0,564	-0,429	-0,700	-0,086	0,100	-0,086

Tabla 19: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre los niveles de IgA en mucus y suero frente a diferentes antígenos de H. contortus en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Los datos de los días 7 ó 28 postinoculación (dpi) de IgA en mucus frente a cada antígeno se correlacionaron con los de IgA sérica del mismo día de sacrificio y antígeno. Som Ad: antígeno somático de adulto; ES Ad: antígeno excretor-secretor de adulto; Som L3: antígeno somático de larvas 3. El asterisco señala significación estadística (* = $p \le 0.05$)

5. CORRELACIONES Y REGRESIONES ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES

Las relaciones entre variables parasitológicas, hematológicas e inmunológicas (células e inmunoglobulinas) se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman (Tablas 20-31). Asimismo, en algunos casos en los que se observaron correlaciones significativas, se efectuaron diversos análisis de regresión entre los datos obtenidos en los animales sacrificados a los 7 y 28 dpi.

5.1. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y HEMATOLÓGICAS (Tablas 20 y 21)

5.1.1. Ovino Canario

No se observaron correlaciones significativas entre las variables parasitológicas y hematológicas en los animales de raza Canaria (CAN) sacrificados a los 7 dpi, aunque se observó una fuerte relación negativa entre el hematocrito y la longitud y número de larvas en la mucosa gástrica (Tabla 20).

Igualmente, en los animales de esta raza sacrificados a los 28 dpi se observaron asociaciones negativas entre las variables parasitológicas y hematocrito y proteínas plasmáticas, siendo en ocasiones significativas (Tabla 21). El análisis de regresión múltiple mostró que la variable proteínas plasmáticas de la 4ª semana pi era dependiente en esta raza de la interacción carga parasitaria-longitud (Fig. 34).

Los recuentos de eosinófilos a los 14 dpi se correlacionaron de forma positiva con la carga de vermes adultos y su longitud (Tabla 21; Fig. 33)

5.1.2. Ovino Canario de Pelo

El estudio de los animales de la raza Canaria de Pelo (CAP) sacrificados a los 7 dpi no mostró ninguna relación significativa entre hematocrito y/o proteínas plasmáticas y las variables parasitológicas estudiadas, siendo además la correlación siempre positiva. Las correlaciones entre los niveles de células sanguíneas en la 1ª semana pi y el número de larvas tisulares y la longitud de los vermes inmaduros fue variable en esta raza, al ser inversa con los neutrófilos y eosinófilos (no significativas en este caso) y directa con los linfocitos (Tabla 20).

Al estudiar los animales de la raza CAP sacrificados a los 28 dpi, se observaron correlaciones negativas entre las distintas variables parasitológicas y el valor hematocrito, siendo significativa en el caso de la carga parasitaria. Las correlaciones entre las distintas variables parasitológicas y la concentración de proteínas plasmáticas fueron más débiles que en los ovinos CAN, aunque siempre fueron negativas (Tabla 21).

En esta raza, el análisis de regresión múltiple del valor hematocrito mostró esta variable como dependiente del efecto conjunto de carga parasitaria-fecundidad ($R^2 = 0.83*$), mientras que en los ovinos CAN este modelo no era relevante ($R^2 = 0.47$; p = 0.21). Sin embargo, en los ovinos CAP los niveles de proteínas plasmáticas de la 4^a semana pi no se explican por el efecto conjunto de la carga parasitaria adulta y la longitud de los vermes (Fig. 34), como ocurría en el caso de los ovinos CAN.

Como ocurría en general con la raza CAN, los recuentos de células sanguíneas a los 28 dpi no se correlacionaron con los parámetros parasitológicos (Tabla 21).

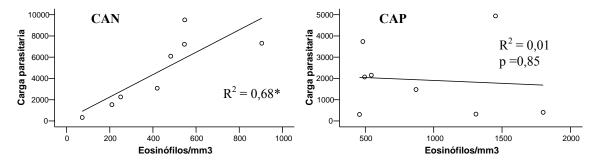


Figura 33: Relaciones entre eosinófilos semana 2 p.i. y carga parasitaria adulta en los ovinos CAN y CAP. (*: $p \le 0.05$)

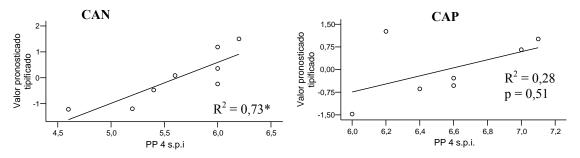


Figura 34: Regresión del valor de proteínas plasmáticas de la cuarta semana pi frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -0.26 [longitud mm] $-6.33*10^{-5}$ [carga parasitaria adulta] +10.39 (CAN) e y = 0.22 [longitud mm] $-6.34*10^{-5}$ [carga parasitaria adulta] -10.17 (CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media = 0 y desviación típica = 1 (*: $p \le 0.05$).

Tabla 20: Correlación entre variables hematológicas y parasitológicas a los 7 dpi

		Larvas Totales	Larvas Intramurales	Larvas Luminares	Longitud Larvas Luminares
	Todos	0,210	-0,438	0,477	-0,420
Hto	CAN	-0,500	-0,700	-0,200	-0,800
	CAP	0,738	0,158	0,738	0,158
	Todos	0,475	0,685*	0,480	0,469
PP	CAN	0,205	0,462	0,051	0,462
	CAP	0,205	0,872	0,205	0,872
	Todos	-0,321	-0,188	-0,438	0,418
Eosinófilos	CAN	-0,300	-0,400	-0,500	0,100
	CAP	-0,400	-0,800	-0,400	-0,800
	Todos	-0,297	0,164	-0,116	-0,030
Linfocitos	CAN	-0,800	-0,600	-0,600	-0,600
	CAP	-0,100	1*	-0,100	1*
	Todos	-0,309	-0,200	-0,395	-0,055
Neutrófilos	CAN	-0,500	-0,100	-0,600	0,100
	CAP	0,300	-0,900*	0,300	-0,900*

Tabla 20: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre variables hematológicas y parasitológicas en los ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) sacrificados a los 7 dpi. En cada parámetro hematológico se indica el valor a los 7 dpi. Hto: hematocrito; PP: concentración de proteínas plasmáticas. El asterisco señala significación estadística (* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$).

Tabla 21: Correlación entre variables hematológicas y parasitológicas a los 28 dpi

		Carga	Longitud	Huevos	HPG
		Parasitaria	Longitud	en útero	27 dpi
	Todos	-0,835**	-0,385	-0,432	-0,820**
Hto	CAN	-0,714*	-0,524	-0,262	-0,917**
21 dpi	CAP	-0,982**	-0,036	0,000	-0,327
Hto	Todos	-0,783**	-0,483	-0,576*	-0,893**
28 dpi	CAN	-0,619	-0,286	-0,286	-0,850**
	CAP	-0,893**	-0,286	-0,321	-0,714
PP	Todos	-0,576*	-0,463	-0,503	-0,675*
21 dpi	CAN	-0,250	-0,350	-0,075	-0,425
	CAP	-0,355	-0,177	0,197	-0,099
PP	Todos	-0,711**	-0,785**	-0,744**	-0,692**
28 dpi	CAN	-0,805**	-0,952**	-0,683	-0,659
	CAP	-0,396	-0,342	-0,468	-0,396
Eos.	Todos	0,232	0,189	0,068	-0,034
7 dpi	CAN	0,286	0,048	0,095	0,133
	CAP	0,179	0,464	0,000	-0,071
Eos.	Todos	0,271	0,129	0,089	0,026
14 dpi	CAN	0,976**	0,833**	0,619	0,467
	CAP	0,214	0,000	0,464	0,250
Linf.	Todos	0,279	0,179	0,289	0,352
7 dpi	CAN	-0,024	-0,310	-0,286	0,083
	CAP	0,036	0,107	0,429	0,143
Neut	Todos	0,489	0,171	0,075	0,545*
21 dpi	CAN	0,119	-0,071	-0,333	0,517
	CAP	0,821*	0,500	0,214	0,464

Tabla 21: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre variables hematológicas y parasitológicas en los ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) sacrificados a los 28 dpi. Se recogen los valores de Hto y PP a los 21 y 28 dpi y en el caso de las células se hace referencia a las semanas en que se observó un pico en el recuento. Carga parasitaria: recuento de vermes adultos en abomaso; HPG 27 dpi: recuento fecal de huevos 27 dpi; Longitud: Medida de los vermes adultos; Hto: hematocrito; PP: concentración de proteínas plasmáticas; Leuc.: leucocitos; Eos: eosinófilos; Linf.: linfocitos; Neut.: neutrófilos. Los asteriscos señalan significación estadística (*= $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$).

5.2. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS (Tabla 22)

5.2.1. Ovino Canario

En los animales de raza CAN sacrificados a los 7 dpi, destaca la relación negativa entre la galectina-15 del mucus y los recuentos y longitud de las larvas (Tabla 22). También se pueden destacar las correlaciones negativas observadas entre los leucocitos globulares y linfocitos T $CD4^+$ del tercio superior de la mucosa (r = -0.87; p = 0.054) y el número de larvas luminales, que, aunque no alcanzaron significación estadística, reflejaron una tendencia a la asociación entre estas variables.

En los animales sacrificados a los 28 dpi, pudieron constatarse correlaciones inversas estadísticamente significativas entre algunos tipos celulares, linfocitos T CD4⁺ y células presentadoras de antígeno, y distintas variables parasitológicas (Tabla 22).

Los linfocitos T CD4⁺ totales se correlacionaron con la carga parasitaria y la longitud de los vermes (Tabla 22, Figura 37 b, c) lo que también ocurrió con los recuentos de estas células en el tercio inferior de la mucosa (r = -0.86** y -0.81*, respectivamente); a su vez, los recuentos del tercio superior lo hicieron con la carga parasitaria y el recuento de huevos en heces 27 dpi (r = 0.71* y -0.75*, respectivamente).

Los recuentos de células CD1⁺ se correlacionaron negativa y significativamente con el recuento de huevos en heces a los 27 dpi, mientras que las células MHCII⁺ lo hicieron con la longitud de los vermes (Tabla 22).

El análisis de regresión múltiple permitió constatar que el efecto conjunto de los linfocitos T $CD4^+$ y los leucocitos globulares explicaría gran parte de la variación de la longitud de los vermes y de la carga parasitaria en esta raza ($R^2 = 0.75*$ y 0.89**, respectivamente) (Fig. 35 y 36).

5.2.2. Ovino Canario de Pelo

Al estudiar los animales de raza CAP sacrificados a los 7 dpi (Tabla 22) se observó una fuerte correlación inversa entre los mastocitos presentes en la mucosa abomasal y las distintas variables parasitológicas. Este dato, sin embargo, debe interpretarse con cuidado, porque se deterioraron dos muestras y sólo se pudo hacer el recuento de mastocitos en tres ovinos CAP.

 $R^2 = 0.08$ p = 0.88

16.5

17,0

Por otra parte, las galectinas 14 y 15 (significativamente en este último caso) se correlacionaron inversamente con la longitud de los vermes inmaduros y con los recuentos de larvas intramurales.

Los leucocitos globulares, por su parte, se correlacionaron de manera directa con la carga parasitaria total y con las formas inmaduras presentes en la luz del abomaso, a diferencia de los ovinos CAN, en que esta correlación fue inversa.

En los animales de raza CAP sacrificados a los 28 dpi también se observaron correlaciones inversas entre células y variables parasitológicas, tal y como ocurrió con los ovinos CAN, pero las células y parámetros parasitológicos implicados, en general, no coincidieron en ambas razas.

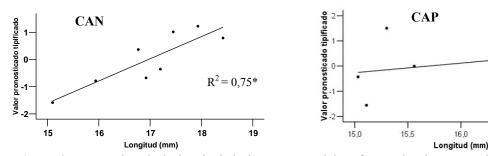


Figura 35: Regresión de la longitud de los vermes adultos frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -0,008 [CD4] -0,039 [leucocitos globulares] +18,26 (CAN) e y = 0,003 [CD4] -0,036 [leucocitos globulares] +15,49 (CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media =0 y desviación típica =1 (*: $p \le 0,05$).

En la raza CAP destacaron cuatro tipos celulares cuyos recuentos totales se correlacionaron significativamente con la fecundidad de los vermes: eosinófilos, linfocitos T $\gamma\delta$, WC1⁺ y MHCII⁺. Estas células también correlacionaron negativamente con los recuentos de huevos en heces a los 27 dpi, siendo esta asociación significativa en todos los casos, excepto en los recuentos de células WC1⁺ (Tabla 22).

Es importante señalar que los recuentos de algunas de estas células (Tabla 14) siguieron patrones distintos en función de la raza, y que el aumento en el número de células en los ovinos CAP en ocasiones estuvo asociado con una correlación inversa con los datos parasitológicos, en particular, en el caso de los eosinófilos y los linfocitos WC1 $^+$ (Figura 37 a, d). Igualmente, las correlaciones entre los linfocitos T $\gamma\delta^+$ del tercio superior de la mucosa, zona en la que pudo observarse un claro incremento de estas células entre los días 7 y 28 pi únicamente en la raza CAP, y la fecundidad o el recuento de huevos en heces a los 27 dpi, fueron estadísticamente

significativas (r = 0.89* y 0.83*, respectivamente), en contraste con lo observado en los ovinos CAN.

En esta raza no se halló ninguna asociación entre células que permitiera explicar de modo satisfactorio la variación en ninguna variable parasitológica. Aunque diversos recuentos celulares (eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$, p.ej.) se correlacionaron individualmente con los huevos en útero de los vermes, cuando se construyó un modelo de regresión múltiple incluyendo estos factores no se obtuvo un coeficiente de regresión significativo (R² = 0,67; p = 0,19).

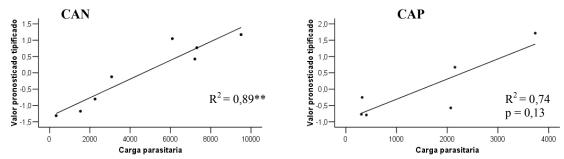


Figura 36: Regresión de la carga parasitaria adulta frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -22,1 [CD4] -235,2 [leucocitos globulares] +8927,2 (CAN) e y = -3,1 [CD4] +373,3 [leucocitos globulares] +267,4 (CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media =0 y desviación típica =1 (**: $p \le 0,01$).

5.3. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS EN SUERO Y MUCUS (Tablas 23-25)

5.3.1. Ovino Canario

Las correlaciones entre los niveles séricos de inmunoglobulinas y las variables parasitológicas fueron poco relevantes en los ovinos CAN, tanto a 7 como a 28 dpi. Se pueden destacar las correlaciones directas observadas entre los niveles de IgG frente a antígenos ES de adulto y diversas variables relacionadas con los vermes adultos a los 28 dpi (Tabla 24).

En cambio, los niveles de IgA en el mucus frente a los tres antígenos estudiados se correlacionaron inversa y significativamente con la longitud de los vermes inmaduros (Tabla 25). Además, la IgA frente al antígeno somático de larvas 3 también estuvo correlacionada negativamente con el recuento de larvas (Tabla 25). Por el contrario, las correlaciones de los niveles de inmunoglobulinas en mucus con variables relacionadas con los vermes adultos no reflejaron ninguna tendencia clara (Tabla 25).

Tabla 22: Correlaciones entre recuentos celulares y variables parasitológicas

		Eos.	Mast.	L.G.	CD4	CD8	γδ	WC1	CD45R	CD2	CD5	CD1	MHCII	Gal-15	Gal-14
Sacrificio 7 dpi	7 dpi														
Larvas	Lodos	-0,091	0,119	0,268	-0,042	0,083	0,050	0,008	0,433	0,083	-0,333	0,515	0,333	-0,546	-0,018
Totales	CAN	00000	0,500	-0,447	-0,100	009'0	-0,600	0,400	*	-0,400	-0,200	0,400	009'0	-0,671	-0,300
	CAP	0,300	-1**	0,894*	0,700	0,100	0,700	0,667	0,300	-0,300	-0,100	0,300	0,700	-0,158	0,400
	Lodos	-0,515	-0,143	-0,324	-0,479	0,467	-0,167	0,025	-0,033	-0,050	-0,317	-0,030	-0,067	-0,921**	-0,370
Lv Im	CAN	-0,200	0,200	-0,112	00000	0,600	-0,600	0,400	1,000	-0,400	-0,200	0,300	009'0	-0,894*	-0,100
	CAP	-0,600	-1**	-0,447	-0,500	0,800	0,400	0,359	-0,600	-0,600	-0,500	-0,500	-0,500	-0,949*	-0,700
	Lodos	-0,122	0,120	0,313	-0,012	0,134	0,201	0,113	0,293	0,008	-0,469	0,444	0,251	-0,478	-0,061
Lv Lm	CAN	-0,200	0,700	-0,783	-0,300	009'0	-0,600	0,400	*	-0,400	-0,200	0,300	009'0	-0,447	-0,600
	CAP	0,300	-1**	0,894*	0,700	0,100	0,700	0,667	0,300	-0,300	-0,100	0,300	0,700	-0,158	0,400
Longitud	Lodos	0,103	-0,429	0,044	0,042	0,733*	0,067	0,410	0,050	-0,233	-0,067	0,091	002'0	-0,651*	0,030
Lv Lm	CAN	0,200	-0,200	0,447	0,300	0,800	-0,800	0000'0	0,800	0,000	0,400	0,300	0,800	-0,783	0,400
	CAP	-0,600	-1**	-0,447	-0,500	0,800	0,400	0,359	-0,600	-0,600	-0,500	-0,500	-0,500	-0,949*	-0,700
Sacrificio 28 dpi	28 dpi														
Carga	Todos	-0,314	0,041	968'0-	-0,389	-0,349	-0,108	-0,339	-0,159	-0,407	-0,137	-0,437	-0,495	-0,638*	-0,521*
Parasitaria	CAN	-0,286	0,120	-0,565	-0,762*	-0,357	-0,048	-0,476	-0,132	-0,429	-0,571	-0,464	-0,643	-0,575	-0,690
Adulta	CAP	-0,179	-0,393	0,018	-0,371	-0,429	-0,314	0,143	-0,286	-0,571	0,086	-0,536	-0,321	-0,605	-0,214
Longitud	Lodos	-0,382	0,016	-0,254	-0,218	-0,455	-0,262	-0,575*	600'0	0,261	-0,170	-0,007	-0,758**	-0,507	-0,493
Adultos	CAN	-0,095	0,072	-0,540	-0,714*	-0,548	-0,143	-0,190	-0,395	0,095	-0,071	-0,214	-0,929**	-0,370	-0,548
	CAP	-0,536	-0,500	-0,036	0,429	-0,371	-0,657	-0,286	0,179	0,536	-0,543	-0,036	-0,607	-0,227	-0,179
soxanH	Todos	-0,446	080'0	-0,250	-0,055	-0,464	-0,429	-0,664**	-0,007	0,282	-0,231	-0,103	-0,732**	+995'0-	-0,471
en útero	CAN	0,262	0,335	-0,491	-0,190	-0,571	-0,310	-0,286	-0,515	0,214	-0,143	0,071	-0,643	-0,460	-0,333
	CAP	-0,857*	-0,286	-0,126	-0,486	-0,600	-0,886*	-0,786*	0,036	0,393	-0,543	-0,464	-0,786*	-0,227	-0,464
9dH	Todos	-0,724**	-0,033	-0,314	960'0-	-0,370	0,020	-0,553*	0,108	-0,260	-0,132	-0,556*	-0,722**	-0,662**	-0,442
27 dpi	CAN	-0,567	-0,243	-0,332	-0,267	-0,033	0,417	-0,317	0,251	-0,517	-0,238	-0,810*	-0,595	-0,523	-0,533
	CAP	-0,893**	-0,214	-0,144	-0,371	-0,771	*-	-0,536	-0,250	0,214	-0,486	-0,429	-0,857*	-0,567	-0,321

de Pelo (CAP). Las cuatro primeras variables parasitológicas, referidas a vermes inmaduros, se correlacionaron con los recuentos de células a los 7 dpi, y el resto, referidas a vermes adultos, con los recuentos a los 28 dpi. Larvas Totales: Lv Im+ Lv Lm; Lv Im: larvas intramurales, presentes en la mucosa Tabla 22: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre recuentos celulares y variables parasitológicas en ovinos Canarios (CAN) y Canarios abomasal; Lv Lm: larvas luminares, presentes en la cavidad abomasal; Carga parasitaria adulta: vermes adultos contabilizados en el abomaso; HPG 27

Resultados

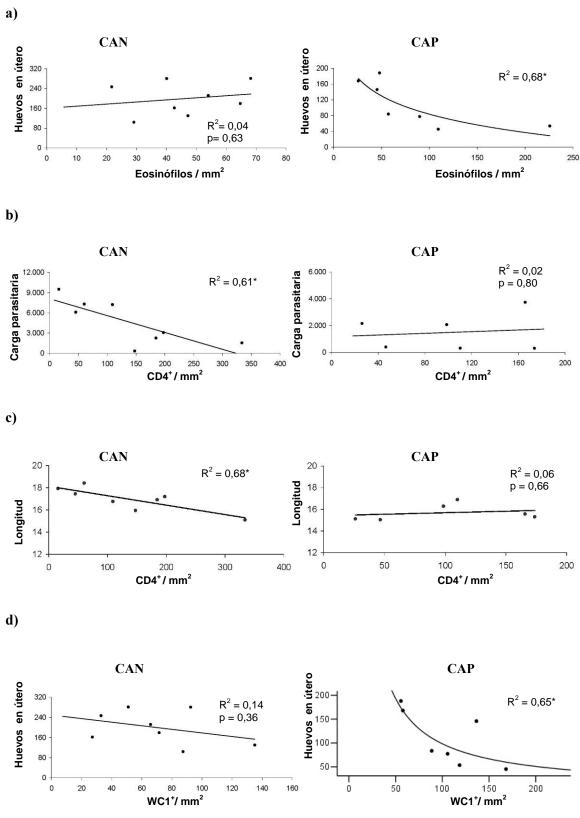


Figura 37: Relaciones entre recuentos de células en la mucosa abomasal y variables parasitológicas obtenidos en los ovinos CAN y CAP sacrificados a los 28 dpi. a) Eosinófilos vs huevos en útero; b) Linfocitos T CD4⁺ vs carga parasitaria; c) Linfocitos T CD4⁺ vs longitud vermes; d) Linfocitos T WC1⁺ vs huevos en útero (*: $p \le 0.05$).

5.3.2. Ovino Canario de Pelo

Los niveles séricos de inmunoglobulinas y los datos parasitológicos obtenidos a los 7 y 28 dpi no estuvieron correlacionados significativamente en esta raza, ni siquiera los niveles de IgG específica de antígeno ES, que si correlacionó significativamente en la raza de lana, tal y como se señaló anteriormente (Tablas 23 y 24).

Sin embargo, los niveles de IgA específica en mucus estuvieron negativa y fuertemente correlacionados con las variables parasitológicas, en claro contraste con los ovinos CAN, dado que esta fuerte asociación sólo tuvo lugar entre IgA frente a antígenos de vermes adultos y variables relacionadas con los vermes adultos (Tabla 25, Fig. 38).

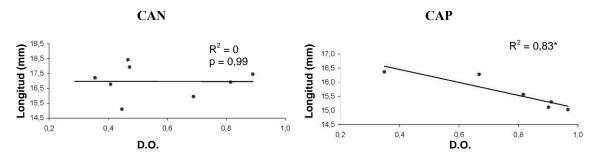


Fig. 38: Regresión de los niveles de IgA en mucus frente a antígeno somático de adulto sobre la longitud de los vermes adultos en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) sacrificados 28 dpi. D.O.: densidad óptica. (*: $p \le 0.05$)

Tabla 23: Correlación entre variables parasitológicas a los 7 dpi y niveles de Ig séricas específicas

		lgA s	érica	IgA s	érica	IgA s	érica	lgG s	érica	IgG s	érica	IgG s	sérica
		Ag Sc	m Ad	Ag E	S Ad	Ag So	om L3	Ag So	m Ad	AgE	SAd	Ag S	om L3
		Basal	7 dpi	Basal	7 dpi	Basal	7 dpi	Basal	7 dpi	Basal	7 dpi	Basal	7 dpi
Larvas	Todos	-0,176	-0,176	0,176	0,079	0,115	-0,091	-0,091	0,224	0,200	-0,224	0,285	0,115
Tot.	CAN	-0,600	-0,700	0,100	0,100	-0,500	-0,300	0,500	0,100	0,300	0,400	0,300	-0,300
	CAP	0,100	0,300	0,000	-0,200	0,300	0,100	-0,500	0,200	0,300	-0,500	0,100	0,300
	Todos	-0,152	-0,103	0,527	0,091	0,455	0,394	0,539	0,394	0,127	0,370	0,552	0,382
Lv Im	CAN	-0,200	-0,600	0,300	0,200	-0,200	0,100	0,700	0,300	0,600	0,700	0,400	-0,100
	CAP	-0,200	0,100	0,600	0,100	0,900*	0,800	0,400	0,500	-0,400	-0,200	0,800	0,900*
	Todos	-0,219	-0,116	0,079	0,024	0,176	-0,122	-0,261	0,188	0,036	-0,432	0,255	0,146
Lv Lm	CAN	-0,800	-0,500	0,000	0,300	-0,700	-0,600	0,200	0,000	0,100	0,300	0,100	-0,400
	CAP	0,100	0,300	0,000	-0,200	0,300	0,100	-0,500	0,200	0,300	-0,500	0,100	0,300
Long.	Todos	-0,115	-0,212	0,370	-0,261	0,491	0,564	0,661*	0,503	0,382	0,442	0,685*	0,552
Lv Lm	CAN	0,200	-0,600	0,300	-0,200	0,200	0,500	0,800	0,300	0,600	0,500	0,500	0,100
	CAP	-0,200	0,100	0,600	0,100	0,900*	0,800	0,400	0,500	-0,400	-0,200	0,800	0,900*

Tabla 23: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre niveles de Ig séricas específicas y variables parasitológicas en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) sacrificados a los 7 dpi. Larvas Tot.: recuento total de larvas (Lv Im+ Lv Lm); Lv Im: larvas intramurales, presentes en la mucosa abomasal; Lv Lm: larvas luminales, presentes en la cavidad abomasal; Long Lv Lm: Longitud de larvas luminares. Las inmunoglobulinas reconocieron los siguientes antígenos (Ag) de H. contortus: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas 3 (Som L3). El asterisco indica significación estadística (*: $p \le 0,05$).

Tabla 24: Correlación entre variables parasitológicas a los 28 dpi y niveles de Ig séricas específicas

			ΙgΑ	sérica Ag	Som Ad			IgG s	érica Ag S	Som Ad	
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Carga	Todos	0,236	0,357	0,254	0,234	0,264	0,193	0,136	0,200	0,271	0,236
Parasitaria	CAN	0,190	0,381	0,119	0,024	0,262	0,429	0,405	0,405	0,405	0,190
Adulta	CAP	0,321	0,107	0,250	0,595	0,179	0,250	-0,214	-0,179	-0,321	0,071
Longitud	Todos	0,307	0,132	0,107	0,073	0,514*	0,096	0,139	0,489	0,439	0,475
Adultos	CAN	0,429	0,143	0,119	0,310	0,643	0,381	0,310	0,643	0,500	0,476
	CAP	0,679	-0,071	-0,250	-0,631	0,250	0,321	0,214	0,536	0,143	0,464
Huevos	Todos	0,361	-0,021	0,139	0,046	0,354	0,064	0,079	0,496	0,396	0,371
en útero	CAN	0,643	0,048	0,095	0,405	0,405	0,238	-0,071	0,619	0,500	0,500
	CAP	0,286	-0,714	-0,143	-0,342	0,214	0,429	0,393	0,607	0,143	0,214
HPG	Todos	0,094	0,305	0,162	-0,116	0,162	0,280	0,450	0,325	0,181	0,078
27 dpi	CAN	0,050	0,383	-0,117	-0,117	-0,033	0,517	0,633	0,400	0,100	-0,100
	CAP	0.321	-0.607	0.143	-0.126	0.429	0.393	0.286	0.500	-0.107	0.250

			IgA	sérica Ag	ES Ad			IgG :	sérica Ag	ES Ad	
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Carga	Todos	0,629*	0,461	0,300	0,236	-0,007	0,564*	0,511	0,525*	0,564*	0,382
Parasitaria	CAN	0,619	0,810*	0,333	0,405	-0,238	0,595	0,762*	0,762*	0,810*	0,214
Adulta	CAP	0,821*	0,821*	0,714	0,143	0,250	0,036	0,036	-0,179	-0,071	0,036
Longitud	Todos	0,114	0,161	0,107	0,093	-0,082	0,411	0,368	0,757**	0,646**	0,421
Adultos	CAN	0,714*	0,952**	0,619	0,500	0,143	0,357	0,667	0,905**	0,857**	0,310
-	CAP	-0,286	-0,036	0,357	0,107	-0,464	0,179	0,179	0,250	0,000	0,179
Huevos	Todos	0,032	0,139	0,011	0,018	-0,011	0,382	0,336	0,718**	0,518*	0,507
en útero	CAN	0,452	0,738*	0,548	0,500	0,095	0,095	0,286	0,595	0,476	0,190
1	CAP	-0,071	0,286	0,250	0,000	-0,143	0,393	0,393	0,429	0,036	0,393
HPG	Todos	0,303	0,235	0,059	0,131	-0,175	0,734**	0,662**	0,721**	0,661**	0,562*
27 dpi	CAN	0,550	0,667*	0,017	0,233	-0,467	0,667*	0,800**	0,533	0,683*	0,167
	CAP	0,143	0,571	0,679	0,286	0,143	0,429	0,429	0,464	0,250	0,429

			IgA	sérica Ag	Som L3			IgG s	érica Ag	Som L3	
		Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
Carga	Todos	0,318	0,596*	0,439	0,243	0,264	0,279	0,296	0,221	0,175	0,314
Parasitaria	CAN	0,429	0,429	0,214	0,048	-0,095	0,524	0,524	0,167	0,143	0,262
Adulta	CAP	0,571	0,393	0,536	0,571	0,571	0,250	0,036	-0,071	0,107	0,071
Longitud	Todos	0,057	0,436	0,339	0,057	0,086	0,214	0,318	0,493	0,304	0,350
Adultos	CAN	0,286	0,333	0,262	0,143	0,048	0,476	0,571	0,452	0,476	0,452
	CAP	0,143	0,179	0,179	-0,036	0,321	0,286	0,179	0,571	0,107	0,036
Huevos	Todos	0,064	0,389	0,189	-0,057	0,036	0,111	0,225	0,464	0,150	0,207
en útero	CAN	0,048	0,214	0,048	-0,071	-0,167	0,310	0,524	0,595	0,571	0,452
	CAP	0,214	0,036	0,071	-0,071	0,286	0,214	0,071	0,393	-0,143	-0,071
HPG	Todos	0,356	0,581*	0,365	0,132	0,168	0,233	0,284	0,187	-0,187	0,068
27 dpi	CAN	0,683*	0,517	0,167	0,050	-0,233	0,667*	0,567	0,000	-0,317	-0,033
	CAP	0,393	0,071	0,500	0,393	0,643	0,143	-0,036	0,321	-0.107	-0,071

Tabla 24: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre niveles de Ig séricas específicas y variables parasitológicas en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) sacrificados a los 28 dpi. Carga parasitaria adulta: vermes adultos contabilizados en el abomaso; HPG 27 dpi: recuento de huevos en heces a los 27 dpi. Las inmunoglobulinas reconocieron los siguientes antígenos (Ag) de H. contortus: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas 3 (Som L3). El asterisco indica significación estadística (*: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01).

Tabla 25: Correlación entre variables parasitológicas y niveles de IgA en mucus

			7 dp	oi			28	dpi	
		Larvas			Long.	C.P.	Longitud	Huevos	HPG
		Totales	Lv Im	Lv Lm	Lv Lm	Adulta	Adultos	en útero	27 dpi
IgA mucus	Todos	-0,128	-0,255	0,030	-0,219	-0,477	-0,455	-0,582*	-0,672**
Ag som Ad	CAN	-0,500	-0,600	-0,100	-0,900*	-0,119	0,167	-0,262	-0,417
70,90	CAP	0,462	0,205	0,462	0,205	-0,771	-0,943**	-0,657	-0,829*
IgA mucus	Todos	-0,285	-0,455	-0,195	-0,758*	-0,512	-0,477	-0,613*	-0,731**
Ag ES Ad	CAN	-0,500	-0,600	-0,100	-0,900*	-0,286	-0,048	-0,262	-0,600
	CAP	0,000	-0,600	0,000	-0,600	-0,714	-0,829*	-0,771	-0,886*
IgA mucus	Todos	-0,309	-0,527	-0,097	-0,370	-0,189	-0,092	-0,264	-0,488
Ag som L3	CAN	-0,700	-0,900*	-0,400	-0,900*	0,048	0,333	0,024	-0,400
27	CAP	0,300	0,100	0,300	0,100	-0,371	-0,657	-0,600	-0,543

Tabla 25: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre niveles de IgA en mucus y variables parasitológicas en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Las variables referidas a vermes inmaduros se correlacionaron con los niveles de IgA en mucus a 7 dpi., y las referidas a vermes adultos con los niveles a 28 dpi. Larvas Totales: Lv Im+ Lv Lm; Lv Im: larvas intramurales, presentes en la mucosa abomasal; Lv Lm: larvas luminales, presentes en la cavidad abomasal; Long Lv Lm: Longitud de larvas luminares; C.P. adulta: carga parasitaria adulta (vermes adultos contabilizados en el abomaso); HPG 27 dpi: recuento de huevos en heces 27 d.p.i. Las inmunoglobulinas reconocieron los siguientes antígenos (Ag) de H. contortus: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas 3 (Som L3). El asterisco indica significación estadística (*: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01).

5.4. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES HEMATOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS (Tablas 26-28)

Estas correlaciones permitieron valorar las posibles asociaciones entre los recuentos de un determinado tipo celular en el abomaso y los hematocritos y concentraciones de proteínas plasmáticas (Tabla 28), y también comparar los niveles de algunas células en sangre y tejidos, especialmente eosinófilos y linfocitos (Tablas 26 y 27, respectivamente).

5.4.1. Ovino Canario

No se detectaron correlaciones de interés entre los hematocritos y las proteínas plasmáticas y las diferentes poblaciones celulares estudiadas en la pared del abomaso (Tabla 28) en los ovinos Canarios (CAN) sacrificados a los 7 dpi. Sin embargo, los recuentos de linfocitos sanguíneos y los de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en el tejido estaban positivamente correlacionados entre sí (Tabla 27), al igual que los eosinófilos en sangre y abomaso de estos animales (Tabla 26).

En los animales sacrificados a los 28 dpi, las células CD1⁺ se correlacionaron positivamente con los hematocritos de la 3^a y 4^a semana pi y con las concentraciones de proteínas plasmáticas de la 3^a semana pi (Tabla 28). Las proteínas plasmáticas de la 4^a semana pi también estuvieron correlacionadas positivamente con los de linfocitos T CD4⁺ y células MHCII⁺ (Tabla 28).

Los niveles de eosinófilos sanguíneos en la 3ª semana pi se correlacionaron fuertemente con los recuentos en el abomaso a los 28 dpi (Tabla 26). Por otra parte, al comparar los niveles de linfocitos en sangre y tejidos de los animales sacrificados 28 dpi, se pudo observar una fuerte asociación entre los recuentos de linfocitos en sangre a las 3 semanas pi y los recuentos en mucosa de linfocitos T CD4⁺ en el borde inferior (r = 0,65*), T CD8⁺ (Tabla 26) y CD45R⁺ (r = 0,83**) en el borde superior.

5.4.2. Ovino Canario de Pelo

En los ovinos Canarios de Pelo (CAP) sacrificados a los 7 dpi se observó una correlación positiva entre el hematocrito (hto) y los recuentos de los linfocitos T $\gamma\delta^+$ y de su subpoblación WC1⁺ (Tabla 27). Por su parte, a los 7 dpi la concentración de proteínas plasmáticas se correlacionó positivamente con el recuento total de linfocitos T CD8⁺, y negativamente con la producción local de galectina-15 (Tabla 28).

La relación entre eosinófilos en sangre periférica y abomaso a los 7 dpi fue bastante más débil que la observada en la otra raza (Tabla 25). A su vez, los niveles de linfocitos en sangre, basales y a los 7 dpi, se correlacionaron positivamente con los de linfocitos T WC1 $^+$ en el tercio superior de la mucosa (r = 1*** y 0,9*, respectivamente), al contrario de lo observado en los ovinos CAN (r = 0,63, p = 0,37; r = 0,95, p = 0,051, respectivamente). Los linfocitos CD8 $^+$ contabilizados en la pared del abomaso estuvieron positivamente correlacionados con los niveles basales de linfocitos en sangre periférica (Tabla 27).

Los niveles de galectina-15 a los 28 dpi estuvieron positivamente relacionados en esta raza con el hematocrito a los 28 dpi y con la concentración de las proteínas plasmáticas a los 21 dpi. Las proteínas plasmáticas a los 28 dpi se correlacionaron significativamente con los recuentos tisulares de células galectina-14⁺ (Tabla 28).

Aunque se observó una correlación positiva entre los recuentos de eosinófilos en sangre y tejidos a las 4 semanas pi, no fue estadísticamente significativa (Tabla 26). Finalmente, la asociación entre los recuentos de linfocitos en sangre (21 y 28 dpi) y en tejido fue poco evidente en esta raza (Tabla 27).

Tabla 26: Correlaciones entre eosinófilos en sangre y mucosa del abomaso

				Eosinó	filos en	sangre	
			Basal	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
*		Todos	-0,176	0,745*			
	7 dpi	CAN	0,700	0,900*			
Eosinófilos		CAP	-0,600	0,600			
en mucosa		Todos	0,491	0,232	0,071	0,596*	0,487
	28 dpi	CAN	0,150	0,133	0,100	0,639*	0,192
		CAP	0,357	0,321	-0,393	0,396	0,714

Tabla 26: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre los recuentos de eosinófilos en sangre y mucosa abomasal en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). En los recuentos en sangre se recogió el valor basal (media de las cuatro semanas anteriores a la inoculación) y a los 7, 14, 21 y 28 dpi. En el tejido, se realizó el recuento tras el sacrificio de los animales, 7 ó 28 días post inoculación (dpi). El asterisco indica significación estadística ($p \le 0.05$).

Tabla 27: Correlaciones entre linfocitos en sangre y en mucosa del abomaso

			CD4	CD8	γδ	WC1	CD45R	CD2	CD5
Sacrifi	cio 7 dpi	ĺ							
		Todos	0,006	0,450	0,717*	0,343	-0,483	-0,167	-0,083
	Basal	CAN	-0,200	-0,400	0,400	-1*	-0,400	1,000	0,800
Niveles de		CAP	-0,300	0,900*	0,700	0,616	-0,500	-0,700	-0,600
linfocitos		Todos	-0,188	0,150	0,583	0,134	-0,650	-0,133	-0,333
en sangre	7 dpi	CAN	-0,100	-1*	1**	-0,400	-0,600	0,400	-0,200
		CAP	-0,500	0,800	0,400	0,359	-0,600	-0,600	-0,500
Sacrific	io 28 dp	i							
		Todos	-0,011	0,096	-0,068	-0,374	0,312	-0,259	0,011
	7 dpi	CAN	0,083	0,450	0,083	-0,017	-0,276	-0,600	-0,048
	4950	CAP	-0,371	-0,429	-0,429	-0,750	0,536	0,071	0,257
Niveles de	7.0	Todos	0,329	0,100	0,068	-0,374	0,599*	-0,015	0,029
linfocitos	21 dpi	CAN	0,617	0,683*	0,217	-0,233	0,410	-0,167	0,214
en sangre		CAP	-0,429	-0,200	-0,143	-0,393	0,607	0,357	-0,486
		Todos	-0,578*	0,073	-0,134	0,064	-0,025	-0,575*	-0,016
	28 dpi	CAN	-0,357	0,333	0,238	0,024	0,072	-0,714*	-0,464
		CAP	-0,943**	-0,371	-0,257	-0,536	-0,179	-0,429	0,657

Tabla 27: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre recuentos de linfocitos en sangre y en la mucosa del abomaso. En los recuentos en sangre se recogió el valor basal (media de las cuatro semanas anteriores a la inoculación) y los de diferentes semanas post inoculación. En el tejido, se realizó el recuento de distintas poblaciones linfocitarias tras el sacrificio de los animales, 7 ó 28 días post inoculación (dpi). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$).

Tabla 28: Correlaciones entre parámetros hematológicos y poblaciones celulares en mucosa

		Eos.	Mast.	L.G.	CD4	CD8	γδ	WC1	CD45R	CD2	CD5	CD1	MHCII	Gal-15	Gal-14
Sacrificio	7 dpi														
	Todos	0,056	0,157	0,067	0,130	0,162	0,638	0,462	0,034	0,009	-0,366	0,259	-0,196	0,245	-0,154
Hto 7 dpi	CAN	0,000	0,500	-0,335	0,300	-0,400	0,400	0,600	-0,400	-0,600	-0,800	-0,700	-0,400	0,894*	-0,600
	CAP	0,264	-1*	0,412	0,211	0,527	0,949*	0,892*	0,264	-0,105	-0,105	0,580	0,211	-0,250	0,053
	Todos	-0,587	-0,582	-0,098	-0,506	0,451	0,281	-0,030	-0,341	0,119	-0,528	0,389	-0,409	-0,881**	-0,253
PP 7 dpi	CAN	-0,359	-0,667	0,287	-0,564	-0,200	0,200	-0,800	0,200	0,800	0,600	0,616	-0,200	-0,803	0,564
DOC ENGINEERING	CAP	-0,564	-1*	-0,229	-0,462	0,975**	0,667	0,553	-0,564	-0,667	-0,667	-0,051	-0,462	-0,892*	-0,718
Sacrificio	28 dpi														
	Todos	0,465	0,172	0,198	0,065	0,038	-0,233	0,225	-0,139	0,512*	-0,183	0,673**	0,396	0,593*	0,367
Hto 21 dpi	CAN	0,567	0,435	0,238	0,117	-0,250	-0,467	0,017	-0,243	0,450	-0,024	0,952**	0,524	0,413	0,350
	CAP	0,018	0,364	-0,101	0,406	0,319	0,203	-0,164	0,255	0,673	-0,232	0,491	0,218	0,539	0,218
	Todos	0,545*	0,013	0,381	-0,036	0,159	-0,039	0,391	-0,036	0,464	0,095	0,567*	0,475	0,689**	0,371
Hto 28 dpi	CAN	0,517	0,310	0,315	0,000	-0,250	-0,267	0,200	-0,293	0,583	0,405	0,810*	0,286	0,440	0,267
	CAP	0,500	0,143	0,198	0,371	0,486	0,600	0,000	0,571	0,429	-0,086	0,464	0,643	0,850*	0,321
	Todos	0,395	0,039	0,386	-0,160	-0,042	-0,338	0,010	0,118	0,286	-0,027	0,358	0,402	0,468	0,214
PP 21 dpi	CAN	0,043	0,165	0,350	0,130	-0,182	-0,451	-0,589	0,331	0,338	0,457	0,717*	0,321	-0,172	-0,009
The second second	CAP	0,099	-0,039	0,676	-0,507	0,305	-0,372	-0,630	0,670	0,394	0,395	0,020	0,374	0,761*	0,374
	Todos	0,433	0,000	0,429	0,219	0,186	0,122	0,430	0,085	0,121	0,162	0,252	0,575*	0,594*	0,578*
PP 28 dpi	CAN	0,244	0,049	0,591	0,805*	0,512	0,293	0,268	0,221	-0,024	0,148	0,185	0,852*	0,275	0,610
	CAP	0,396	0,342	0,573	0,319	-0,319	0,232	0,126	0,342	0,414	0,486	0,631	0,685	0,572	0,955**

Tabla 28: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre los niveles de hematocrito (Hto) y de proteínas plasmáticas (PP) y los recuentos celulares en mucosa en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). Se comparó el recuento de células en los animales sacrificados 7 ó 28 dpi con los parámetros hematológicos de la correspondiente semana post inoculación. Eos.: eosinófilos; Mast.: mastocitos; L.G.: leucocitos globulares; Gal-15: grado de tinción del mucus con anticuerpos frente a galectina -15; Gal-14: galectina 14. Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$).

5.5. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (Tablas 29 y 30)

El estudio de estas correlaciones permite valorar la influencia de los niveles de IgA e IgG específicos en suero (Tabla 29) e IgA específica en mucus (Tabla 30) sobre el hematocrito (hto) y los niveles de proteínas plasmáticas.

5.5.1. Ovino Canario

En esta raza no se observaron correlaciones reseñables entre niveles de inmunoglobulinas en el suero y el hematocrito o la concentración de proteínas plasmáticas (Tabla 29), ni tampoco entre los niveles de IgA específicos del mucus y las variables hematológicas a los 7 dpi (Tabla 30). En cambio, en el caso de los ovinos Canarios sacrificados a los 28 dpi se observó una fuerte correlación positiva entre el hematocrito y los niveles de IgA en mucus frente al antígeno excretor-secretor (ES) de adulto y somático larvario (Tabla 30).

5.5.2. Ovino Canario de Pelo

Tampoco fueron, en general, destacables, las asociaciones entre las distintas inmunoglobulinas específicas analizadas en el suero y los hematocritos y concentración de proteínas plasmáticas en esta raza (Tabla 29). Igualmente, los niveles de IgA específicas en el mucus fue independiente a los hematocritos y proteínas plasmáticas obtenidas a los 7 dpi (Tabla 30). De nuevo, las IgA específicas en mucus estuvieron positivamente relacionadas con el hematocrito, al igual que sucedió en la raza ovina CAN. En este caso, además, las proteínas plasmáticas a los 28 dpi estuvieron positivamente relacionadas con la IgA del mucus específica del antígeno somático larvario (Tabla 30).

Tabla 29: Correlaciones entre Ig séricas y parámetros hematológicos

			Hto	1			Р	Р	4
		7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
	Todos	-0,242	-0,054	-0,025	0,077	0,357	0,068	0,078	-0,168
IgA	CAN	-0,206	0,176	0,100	0,300	0,394	0,498	-0,208	-0,512
Som Ad	CAP	0,151	0,037	-0,388	-0,286	0,348	-0,026	0,315	0,487
	Todos	0,036	0,153	-0,236	0,221	0,197	0,296	-0,044	0,238
IgA	CAN	-0,287	0,285	-0,133	0,567	0,005	0,146	-0,416	0,073
ES Ad	CAP	0,316	-0,196	-0,325	-0,357	0,289	0,089	0,038	0,432
	Todos	-0,333	0,038	-0,123	-0,059	0,485*	0,134	0,048	0,107
IgA	CAN	-0,276	0,209	-0,117	0,400	0,505	0,249	-0,373	0,171
Som L3	CAP	0,341	0,258	-0,253	-0,679	0,668*	0,536	-0,064	0,198
	Todos	-0,287	0,022	-0,059	0,041	0,195	0,004	0,025	-0,065
IgG	CAN	-0,559*	-0,151	-0,017	0,317	0,054	-0,421	-0,390	-0,244
Som Ad	CAP	0,067	0,552	0,349	-0,036	0,289	0,524	0,894**	0,324
	Todos	-0,589**	-0,498*	-0,456	-0,443	-0,081	-0,507*	-0,329	-0,356
IgG	CAN	-0,559*	-0,109	-0,517	-0,033	-0,054	-0,120	-0,390	-0,073
ES Ad	CAP	-0,299	0,282	0,205	-0,071	-0,110	0,741*	0,370	0,541
	Todos	-0,168	0,085	0,204	0,019	0,435*	0,104	0,208	-0,011
IgG	CAN	-0,393	0,243	0,417	0,267	0,279	0,155	-0,026	-0,244
Som L3	CAP	0,294	0,356	-0,048	0,179	0,589*	0,294	0,600	0,631

Tabla 29: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre parámetros hematológicos e inmunoglobulinas en el suero de los ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP). La correlación se estableció entre los datos obtenidos el mismo día post-inoculación (dpi). Las inmunoglobulinas reconocieron los siguientes antígenos (Ag) de H. contortus: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas 3 (Som L3). Hto: hematocrito; PP: proteínas plasmáticas. El asterisco indica significación estadística (*: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$).

Tabla 30: Correlación entre parámetros hematológicos y niveles de IgA en mucus

7 dpi		Hto	PP
	Todos	0,418	-0,040
Ag som Ad	CAN	0,500	-0,051
i.	CAP	0,730	0,289
	Todos	0,136	-0,327
Ag ES Ad	CAN	0,500	-0,051
a a	CAP	-0,316	-0,821
	Todos	0,562	-0,259
Ag som L3	CAN	0,600	-0,308
	CAP	0,632	0,154

28 dpi		Hto	PP
	Todos	0,770**	0,492
Ag som Ad	CAN	0,533	-0,171
	CAP	0,943**	0,406
	Todos	0,795**	0,515
Ag ES Ad	CAN	0,683*	-0,073
	CAP	0,886*	0,319
	Todos	0,657**	0,353
Ag som L3	CAN	0,667*	-0,195
	CAP	0,714	0,841*

Tabla 30: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre niveles de IgA en el mucus abomasal y diversos parámetros hematológicos en ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP), sacrificados 7 ó 28 dpi. Hto: hematocrito en el día de sacrificio; PP: niveles de proteínas plasmáticas en el día de sacrificio. Las inmunoglobulinas reconocieron los siguientes antígenos (Ag) de *H. contortus*: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas 3 (Som L3). El asterisco indica significación estadística (*, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$).

5.6. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS Y NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (Tabla 31 a y b)

Mediante el estudio de estas correlaciones se pudo valorar, teniendo en cuenta el día de sacrificio, la asociación existente entre los niveles de inmunoglobulinas en suero y mucus y los recuentos celulares en la mucosa abomasal.

Es reseñable el hecho de que las correlaciones entre los recuentos de linfocitos CD45R⁺ (linfocitos B) y los niveles de inmunoglobulinas séricas y del mucus fueron negativas o débilmente positivas en ambos días de sacrificio.

5.6.1. Ovino Canario

En general, se observaron pocas asociaciones relevantes entre inmunoglobulinas séricas y recuentos tisulares de células en estos animales. Así, por ejemplo, se encontraron correlaciones positivas con los recuentos de eosinófilos y mastocitos a los 28 dpi (Tabla 31b).

Respecto a las IgA específicas del mucus, la mayoría de las correlaciones significativas fueron negativas, como ocurrió entre los linfocitos CD45R⁺ y las IgA frente a antígeno somático de L3 a los 7 dpi (Tabla 31a), o entre los linfocitos T $\gamma\delta^+$ y las IgA frente a antígeno ES de adulto en el mucus a los 28 dpi (Tabla 31b), si bien los linfocitos T $\gamma\delta^+$ a los 7 dpi estuvieron positivamente relacionados con la producción local de IgA específica (Tabla 31a).

5.6.2. Ovino Canario de Pelo

En esta raza, como ocurrió con los ovinos CAN, no se observaron asociaciones relevantes entre niveles séricos de inmunoglobulinas y recuentos celulares.

En cambio, sí pudieron constatarse fuertes correlaciones positivas entre algunos tipos celulares y los niveles de IgA en el mucus.

A los 7 dpi (Tabla 30a), los recuentos totales de linfocitos T WC1⁺, CD5⁺ y células galectina-14⁺, y los recuentos en el tercio inferior de la mucosa de linfocitos CD45R⁺ (r = 0.90* con IgA frente a antígeno ES de adulto) y células MHCII⁺ (r = 0.90* con IgA frente a antígeno ES de adulto), se correlacionaron con los niveles de IgA frente a los distintos antígenos de vermes adultos ensayados, mientras que a los 28 dpi (Tabla 31b) destacó la correlación positiva observada entre los linfocitos T $\gamma\delta^+$ (al contrario que los ovinos CAN) y CD8⁺ con las IgA frente a antígeno ES de adulto, con las que también los eosinófilos manifestaron una fuerte correlación, con tendencia a la significación estadística (r = 0.71; p = 0.11). También a los 28 dpi, las IgA frente a antígenos somáticos larvarios se correlacionaron positivamente con algunos recuentos (linfocitos CD45R⁺, células MHCII⁺ y galectina-15 en mucus) (Tabla 31b).

Tabla 31a: Correlaciones entre niveles de inmunoglobulinas y recuentos celulares en mucosa del abomaso a los 7 dpi

٦			Eos.	Mast.	L.G.	CD4	CD8	3/2	WC1	CD45R	CD2	CDS	CD1	MHCII	Gal-15	Gal-14
	IgA sérica	Todos	-0,382	-0,524	0,156	-0,152	-0,100	0,167	-0,318	-0'167*	-0,133	-0,233	-0,030	-0,517	660'0-	-0,103
	Ag Som Ad	CAN	-0,400	-0,600	0,112	-0,600	-0,800	0,800	-0,800	-0,800	0,800	0,400	0,100	-0,800	0,224	0,300
		CAP	-0,700	-0,500	0,224	-0,200	0,400	0000	-0,205	-0,700	-0,800	-0,900	0,200	-0,200	-0,316	-0,500
	IgA sérica	Todos	-0,358	-0,048	-0,312	-0,455	0,200	0,367	0,017	-0,333	000'0	0000'0	0,236	-0,400	-0,151	-0,358
_	Ag ESAd	CAN	-0,800	-0,200	-0,335	-0,800	-0,400	0,400	-0,400	0,400	0,400	0,000	0,300	-0,400	-0,447	-0,100
Б	8	CAP	-0,300	-0,500	-0,447	-0,700	0,600	0,200	0,051	-0,300	0,000	-0,400	0,700	-0,700	0000'0	-0,600
	IgA sérica	Todos	-0,188	-0,929**	0,125	-0,055	0,400	0,467	0,033	-0,517	0,100	-0,117	0,164	-0,483	-0,507	0,115
s	Ag Som L3	CAN	-0,100	*006,0-	0,894*	0,100	-0,400	0,400	*-	-0,400	:-	0,800	0,100	-0,400	-0,447	0,800
,		CAP	-0,600	-1**	-0,335	-0,600	1,000	0,600	0,462	-0,600	-0,600	-0,700	0,100	-0,600	-0,791	-0,800
_	lgG sérica	Todos	-0,091	-0,667	-0,031	-0,188	0,583	0,617	0,259	-0,250	0,150	-0,150	0,527	-0,350	-0,526	-0,030
-	Ag Som Ad	CAN	-0,300	-0,700	0,224	-0,700	-0,200	0,200	-0,800	0,200	0,800	009'0	0,700	-0,200	-0,671	009'0
ပ		CAP	-0,300	-1*	-0,224	-0,500	0,900	0,700	0,564	-0,300	-0,300	-0,500	0,500	-0,500	-0,474	-0,600
æ	IgG sérica	Todos	0,200	-0,143	-0,231	0,042	0,183	0,250	0,301	0,367	0,200	0,617	-0,127	290'0	-0,118	0,091
s	Ag ES Ad	CAN	-0,700	-0,300	0,112	-0,300	-0,400	0,400	-0,400	0,400	0,400	0000'0	0,200	-0,400	-0,894*	0,100
		CAP	0,600	0,500	-0,447	-0,100	-0,300	-0,100	0,051	009'0	*006'0	0,800	0,100	-0,100	0,474	0,300
	lgG sérica	Todos	-0,103	-0,810	0,162	-0,139	0,433	0,500	0,134	-0,400	0,017	-0,133	0,321	-0,267	-0,559	0,152
	Ag Som L3	CAN	-0,100	+006'0-	0,447	-0,600	-0,400	0,400	*-	-0,400	‡	0,800	009'0	-0,400	-0,335	0,800
		CAP	-0,500	-1**	-0,112	-0,300	0,900	0,700	0,616	-0,500	-0,700	-0,600	-0,200	-0,300	-0,949*	-0,600
-	lgA mucus	Todos	0,231	0,048	0,028	0,103	0,234	0,904**	0,651	-0,084	-0,234	0,276	-0,073	-0,075	0,211	000'0
- 7	Ag Som Ad	CAN	-0,500	0000'0	-0,447	-0,600	‡	*	-0,400	-0,600	0,400	-0,200	-0,100	‡ -	0,447	-0,300
סס	e P	CAP	0,616	-0,500	0,229	0,359	0,205	0,821	0,921*	0,616	0,308	0,462	0,154	0,359	-0,162	0,359
£	lgA mucus	Todos	-0,079	0,214	0,000	-0,091	-0,733*	0,167	-0,268	0,083	0,217	0,483	-0,333	-0,150	0,441	0,176
=	Ag ES Ad	CAN	-0,500	0000'0	-0,447	-0,600	*-	*	-0,400	-0,600	0,400	-0,200	-0,100	‡ -	0,447	-0,300
3 (CAP	0,800	0,500	0,335	0,700	*006,0-	-0,300	-0,103	0,800	0,700	*006'0	-0,200	0,700	0,632	*006,0
. =	lgA mucus	Todos	0,370	000'0	0,037	0,176	0,067	**008'0	0,544	-0,033	-0,033	0,383	-0,042	-0,117	0,487	0,164
3 0	Ag Som L3	CAN	0,100	-0,100	-0,224	-0,400	009'0-	009'0	-0,400	# Tr	0,400	0,200	000'0	009'0-	0,783	000'0
,		CAP	0,700	-0,500	0,112	0,300	0,100	0,700	0,821	0,700	0,500	0,600	0,200	0,300	0,000	0,400

Tabla 31b: Correlaciones entre niveles de inmunoglobulinas y recuentos celulares en mucosa del abomaso a los 28 dpi

									•							
			Eos.	Mast.	L.G.	CD4	CD8	78	WC1	CD45R	CD2	CD5	CD1	MHCII	Gal-15	Gal-14
	IgA sérica	Todos	-0,165	690'0-	0,333	-0,311	-0,329	-0,286	-0,171	-0,052	0,462	0,547*	0,196	-0,436	-0,154	-0,026
	Ag Som Ad	CAN	0,000	-0,268	7,000	-0,533	-0,083	-0,200	0,150	-0,218	0,517	0,571	000'0	-0,571	-0,220	-0,250
		CAP	-0,143	0,250	0,685	-0,029	-0,714	-0,714	-0,429	000'0	0,286	009'0	0,393	-0,143	-0,076	0,500
	IgA sérica	Todos	0,388	0,340	0,021	-0,189	-0,289	-0,075	0,335	-0,531*	0,135	0,512	0,250	0,111	008'0	0,247
-	Ag ES Ad	CAN	0,717*	0,402	-0,119	0000'0	-0,167	0,083	0,583	-0,787*	0,250	0,476	0,429	0,143	0,440	0,267
Б		CAP	-0,036	0,643	0,324	-0,486	-0,543	-0,429	-0,179	-0,464	-0,286	0,886*	0,143	0,000	-0,265	0,321
)	IgA sérica	Todos	-0,097	0,012	0,409	-0,075	-0,268	-0,057	0,062	-0,071	0,106	0,512	0,050	-0,125	-0,111	0,235
s	Ag Som L3	CAN	0,317	0,075	0,162	-0,117	0,200	0,283	0,500	-0,393	0,050	0,500	0,024	0,095	0,110	0,100
, o		CAP	-0,321	0,071	0,450	-0,029	-0,714	-0,714	-0,286	-0,214	0,036	0,429	0,071	-0,357	-0,416	0,286
_	lgG sérica	Todos	0,294	066,0	0,190	0,025	-0,389	-0,018	-0,097	-0,113	0,324	0,218	0,525*	-0,043	0,091	0,174
	Ag Som Ad	CAN	*799'0	0,736*	-0,341	-0,100	-0,617	0,217	0,250	-0,854**	0,083	0,214	0,476	-0,119	0,110	0,100
o		CAP	0,107	-0,071	0,829*	0,314	-0,429	-0,543	-0,429	0,357	0,357	0,429	0,464	-0,036	0,170	0,393
ø	lgG sérica	Todos	-0,282	0,205	0,088	-0,061	-0,482	0,118	-0,241	0,078	0,085	0,349	-0,093	-0,225	-0,225	0,062
s	Ag ES Ad	CAN	0,367	0,377	-0,247	-0,050	-0,100	0,533	0,483	-0,628	-0,267	0,310	-0,167	-0,095	0,055	0,100
		CAP	-0,286	0,000	0,667	-0,429	-1**	-0,771	-0,607	0,357	0,500	0,314	0,071	0,000	0,283	0,536
	lgG sérica	Todos	0,368	698'0	0,087	-0,143	-0,546*	0,114	-0,015	-0,038	0,179	0,169	0,357	0,154	0,208	0,215
	Ag Som L3	CAN	0,633	0,812**	-0,392	-0,133	-0,683*	0,267	0,183	-0,828**	-0,050	0,048	0,452	-0,071	0,110	290'0
		CAP	0,321	-0,286	0,918**	-0,029	-0,600	-0,143	-0,214	0,714	0,321	0,543	0,214	0,500	0,605	0,714
1.5	IgA mucus	Todos	*965,0	0,041	0,153	-0,459	0,284	-0,024	0,371	-0,155	0,054	0,242	0,279	0,503	0,670**	0,100
- 1	Ag Som Ad	CAN	0,233	-0,226	-0,034	-0,550	0,150	-0,383	0,317	-0,301	0,217	0,333	0,095	0000	0,358	-0,150
5		CAP	0,543	0,371	0,116	-0,100	0,700	0,800	0,086	0,257	-0,143	0,100	0,371	0,600	0,717	0,143
8	IgA mucus	Todos	0,661**	0,161	660'0	-0,371	0,270	-0,138	0,279	-0,229	0,050	0,214	0,407	0,437	0,703**	0,057
=	Ag ES Ad	CAN	0,400	-0,075	-0,145	-0,450	-0,033	-0,683*	-0,033	-0,268	0,283	0,214	0,357	-0,071	0,523	-0,250
3 (CAP	0,714	0,429	0,174	0,200	*006'0	*006,0	0,200	0,143	-0,257	0,200	0,543	0,543	0,598	0,086
) =	IgA mucus	Todos	0,524*	0,103	0,325	-0,378	-0,057	-0,022	0,223	-0,064	606,0	0,388	688'0	0,359	0,428	0,157
S	Ag Som L3	CAN	0,350	0,126	090'0	-0,550	-0,167	-0,250	0,167	-0,427	0,317	0,262	0,405	0,000	0,055	-0,133
Ñ.		CAP	0,543	-0,086	969'0	-0,100	-0,300	0,300	0,029	0,829*	0,257	0,500	0,371	0,886*	0,956**	0,771

siguientes antígenos (Ag) de H. contortus: somático de adulto (Som Ad), excretor-secretor de adulto (ES Ad) y somático de larvas Fablas 31 a y b: Coeficientes de correlación (r) de Spearman entre recuentos celulares e inmunoglobulinas en el suero y mucus de los ovinos Canarios (CAN) y Canarios de Pelo (CAP) a los 7 (a) y 28 (b) dpi. Las inmunoglobulinas reconocieron los 3 (Som L3). Eos.: eosinófilos; Mast.: mastocitos; L.G.: leucocitos globulares; Gal-15: grado de tinción del mucus con anticuerpos frente a galectina -15; **Gal-14**: galectina 14.El asterisco indica significación estadística (*: p ≤0,05; **: p≤0,01).

5.7. REGRESIÓN MÚLTIPLE DE LAS VARIABLES PARASITOLÓGICAS EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS Y LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (Figs. 39-43)

En anteriores capítulos se han podido determinar diferentes ecuaciones de regresión ($y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2...B_nx_n$) de las variables parasitológicas (longitud de los vermes, huevos en útero...) en función de los recuentos celulares en la mucosa gástrica y de los niveles de inmunoglobulinas en el mucus, tomando estas variables por separado. La combinación de estas variables en una misma función permite obtener ecuaciones que explican gran parte de la variación de las variables parasitológicas con una alta significación estadística, si bien los elementos de la función suelen variar según la raza.

5.7.1. Ovino Canario

El efecto conjunto de los linfocitos T CD4⁺ y de las IgA del mucus frente a antígeno somático de adulto explica en esta raza la variación en el número y longitud de los vermes adultos con un elevado coeficiente de regresión (R² = 0,77* y 0,71*, respectivamente) (Figuras 39 y 40). La introducción de otras variables inmunológicas en la ecuación no aumenta el coeficiente de regresión ni mejora su significación estadística.

En esta raza no ha sido posible, a nuestro juicio, establecer una modelo de regresión que explique de modo coherente, esto es, incluyendo diferentes variables inmunológicas, las variables parasitológicas "huevos en útero" y "recuento de huevos en heces a los 27 dpi".

5.7.2. Ovino Canario de Pelo

En los ovinos CAP, el modelo de regresión que incluye los linfocitos T WC1 $^+$ en la mucosa gástrica y los niveles de IgA frente a antígeno somático de adulto en el mucus es el que explica con más consistencia las "variables huevos en útero", "longitud de vermes adultos" y "recuento de huevos en heces a los 27 dpi" ($R^2 = 0.88*; 0.87* y 0.88*, respectivamente$) (Figuras 41-43). La introducción en el modelo de los recuentos de eosinófilos en mucosa, aumenta o iguala el coeficiente de regresión en los tres casos, aunque se pierde ligeramente la significación estadística (huevos en útero: $R^2 = 0.97; p = 0.053;$ longitud: $R^2 = 0.87; p = 0.19;$ recuento de huevos en heces 27 dpi: $R^2 = 0.91; p = 0.13$).

La ecuación de regresión que valoró el efecto de los linfocitos T CD4⁺ y los niveles de IgA frente a antígeno somático de adulto sobre la longitud de los vermes, mostró un elevado

coeficiente de regresión (Fig. 40), sin embargo, el modelo señaló una asociación positiva entre los linfocitos T CD4 y la longitud (B = 0,001). Por otra parte, el efecto conjunto de estas variables sobre el número de vermes adultos fue muy débil y alejado de la significación estadística (Fig. 39), en contraste con los ovinos CAN.

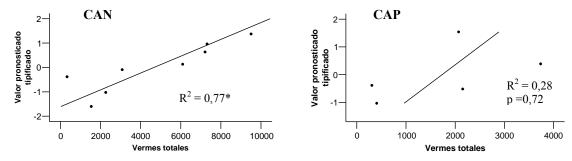


Figura 39: Análisis de regresión múltiple de variables parasitológicas en ovinos sacrificados 28 dpi. Recta de regresión del número de vermes frente al valor pronosticado según las ecuaciones: $y = 27.6 \text{ [CD4]} - 6663,3 \text{ [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus]} + 12232,9 (ovinos CAN) e y = 1,04 [CD4] - 6264,2 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] + 6970,4 (ovinos CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media = 0 y desviación típica = 1 (*: <math>p \le 0,05$).

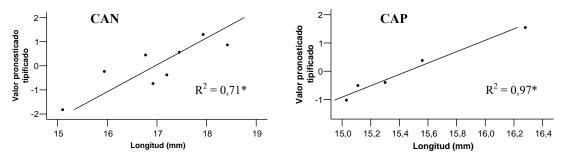
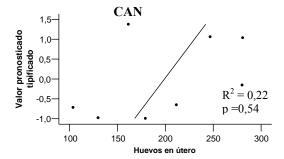


Figura 40: Análisis de regresión múltiple de variables parasitológicas en ovinos sacrificados 28 dpi. Recta de regresión de la longitud de los vermes adultos frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -0,009 [CD4] -0,955 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] +18,72 (ovinos CAN) e y = 0,001 [CD4] -4,17 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] +18,9 (ovinos CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media =0 y desviación típica =1 (*: $p \le 0,05$).



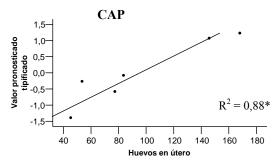
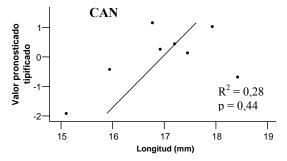


Figura 41: Análisis de regresión múltiple de variables parasitológicas en ovinos sacrificados 28 dpi. Recta de regresión del número de huevos en útero frente al valor pronosticado según las ecuaciones: -0.65 [WC1] -64.2 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] +298.3 (ovinos CAN) e y = -0.767 [WC1] -163.4 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] +306.4 (ovinos CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media =0 y desviación típica =1 (*: $p \le 0.05$).



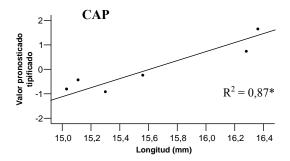
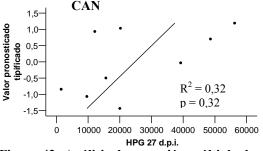


Figura 42: Análisis de regresión múltiple de variables parasitológicas en ovinos Canarios de Pelo sacrificados 28 dpi. Recta de regresión de la longitud de los vermes adultos frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -0.016 [WC1] + [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] + 17,94 (ovinos CAN) e y = -0.003 [WC1] – 2,305 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] + 17,72 (ovinos CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media = 0 y desviación típica = 1 (*, p \leq 0,05).



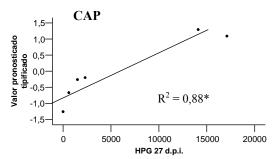
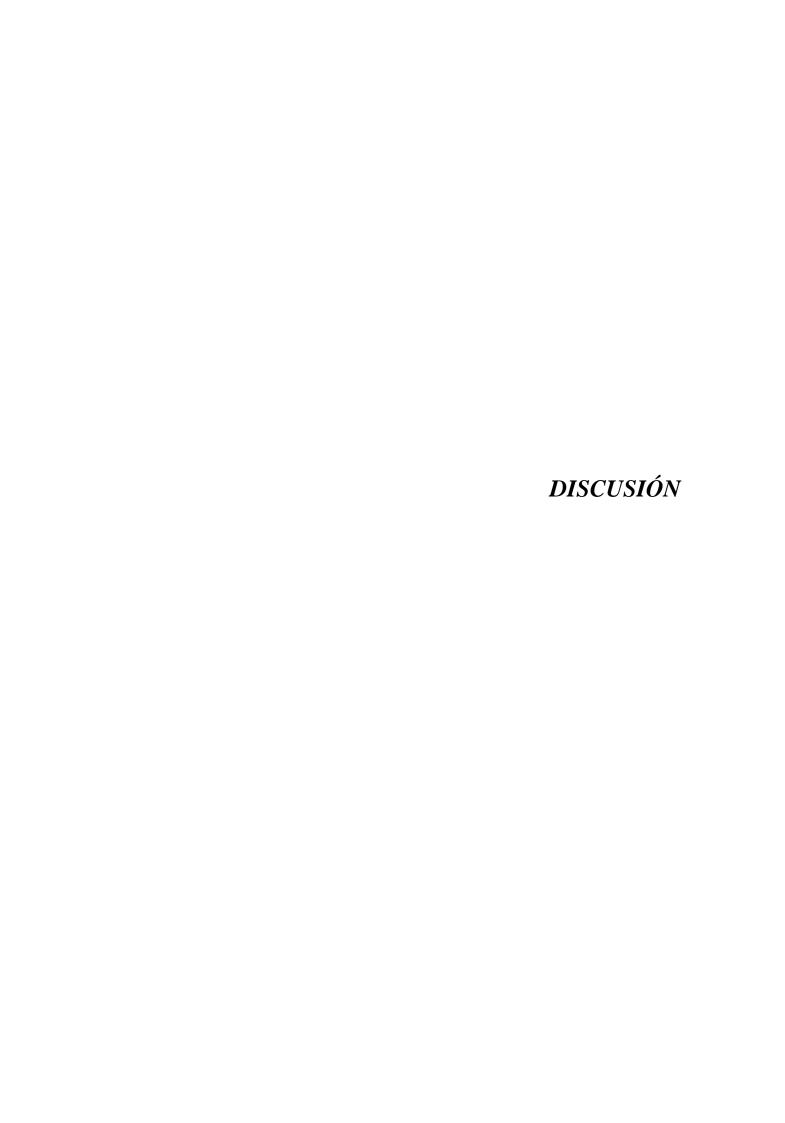


Figura 43: Análisis de regresión múltiple de variables parasitológicas en ovinos Canarios de Pelo sacrificados 28 dpi. Recta de regresión del recuento de huevos por g de heces (HPG) a los 27 dpi frente al valor pronosticado según las ecuaciones: y = -131,3 [WC1] – 41613 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] + 56317 (ovinos CAN) e y = -91,90 [WC1] – 27198 [IgA frente a Ag somático de adulto en mucus] + 37191 (ovinos CAP). El cálculo de la ecuación de regresión fue realizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados, estimándose su significación mediante el análisis de la varianza. Los valores pronosticados se presentan tipificados, ajustados a una distribución normal de media = 0 y desviación típica = 1 (*: $p \le 0,05$).



DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (GI), entre los que destaca la especie *H. contortus*, constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas para la producción de pequeños rumiantes en todo el mundo. Las gastroenteritis parasitarias causan descenso en la producción y muerte de los animales más susceptibles, sin olvidar el gasto asociado a tratamientos y profilaxis (Perry y Randolph, 1999; Newton y Meeusen 2003; Stear *et al.*, 2007).

En el mercado existen diferentes fármacos antihelmínticos cuya eficacia se ha visto limitada por la aparición de cepas resistentes de los distintos parásitos, tal y como se explicó en el apartado 2.5 de la Revisión Bibliográfica. Además, en los últimos años el consumidor demanda cada vez más disminuir la administración de sustancias artificiales en la producción animal, y es creciente el mercado de productos de tipo ecológico, en los que se excluye el uso de fármacos.

Todo esto ha propiciado la búsqueda de métodos alternativos o complementarios a la utilización de fármacos antihelmínticos, tales como el control biológico mediante hongos vermicidas, la modificación de la dieta, la administración de vacunas y la utilización de animales genéticamente resistentes (Sayers y Sweeney 2005; Stear et al., 2007). En este último caso, los animales pueden ser seleccionados dentro de cada raza, escogiendo como reproductores a los individuos más resistentes a los nematodos GI, o utilizar razas locales que presenten como característica propia la resistencia frente a estos parásitos.

La resistencia de algunas razas ovinas autóctonas frente a nematodos GI ha sido comprobada en unas pocas razas, tales como la Roja Africana (Preston y Allonby 1978, 1979), la Barbados de Barriga Negra (Yazwinski et al., 1980; Aumont et al., 2003), la Florida Native (Zajac et al., 1990; Amarante et al., 1999), la Criolla Lanuda (Bricarello et al., 2002, 2004), la Merinoland (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006), la Santa Inés (Amarante et al., 2004), o la Gulf Coast Native (Shakya et al., 2009). Estas razas, naturalmente resistentes a estos parásitos, despiertan un enorme interés en la comunidad científica internacional, dado que podrían permitir el estudio de los mecanismos implicados en la respuesta protectora frente a nematodos GI en modelos naturales de resistencia. La información genética que atesoran podría ser útil en

el diseño de vacunas, en la identificación de nuevas dianas farmacológicas y podría ofrecer nuevos marcadores genéticos asociados a esta resistencia (Raadsma y Tammen, 2005; Piedrafita et al., 2010).

Por otra parte, estas razas autóctonas son las mejor adaptadas a su propio medio natural, capaces de obtener un máximo rendimiento productivo de los recursos proporcionados por este, a la vez que soportan sus condiciones climáticas, orográficas, etc., mejor que otras razas de alta producción. En ocasiones las razas rústicas propias de una zona son las únicas explotables en esa área, o, al menos, se hace necesario cruzar las razas más productivas con las razas autóctonas, buscando una mejor adaptación de aquellas al medio que les rodea. Consciente de esta realidad, la FAO recomienda insistentemente la cría y conservación de razas autóctonas (FAO, 2002, 2004, 2007a,b).

Nuestro grupo de investigación acumulaba evidencias previas que sugerían diferencias en la resistencia/susceptibilidad a las infecciones por tricostrongílidos en dos de las tres razas ovinas reconocidas en las islas Canarias, el ovino Canario de Pelo (CAP) y el Canario (CAN), cuya elevada rusticidad y aceptable capacidad productiva son subrayadas por la legislación, a la vez que se alerta de su bajo censo y se sugiere tomar medidas especiales para su conservación (Órdenes de 13/8/2001 y 12/6/2006; Scherff, 2000; http://dad.fao.org). Durante años se realizaron análisis coprológicos en rebaños ovinos en los que convivían las dos razas, y sistemáticamente se observaron recuentos de huevos de nematodos GI sensiblemente mayores en las muestras procedentes de ovinos de raza Canaria.

Generalmente, cuando se plantea un estudio como el presente, en el que se pretende valorar la resistencia de una raza frente a un parásito, lo habitual es recurrir a razas comerciales de susceptibilidad reconocida como animales control. Sin embargo, el archipiélago canario está declarado libre de brucelosis en pequeños rumiantes, y esto provoca importantes restricciones en la importación de ovejas y cabras. Por ello, no se pudo incluir en la experiencia otra raza ovina reconocida como susceptible, y se realizó un estudio comparativo entre las dos razas autóctonas canarias. Para compensar esta situación, se decidió realizar una inoculación experimental única con 20000 L3, dosis capaz de generar haemonchosis clínica en cualquier raza comercial estudiada.

Otro posible factor que podría distorsionar los resultados es que, actualmente se desconoce la patogenicidad de las cepas locales de *H. contortus*. Por este motivo, en esta experiencia se utilizó una cepa parasitaria foránea, de reconocida patogenicidad. Así se pretendió reducir la

posibilidad de que tuvieran lugar respuestas relacionadas con la adaptación de los animales a una cepa local.

Nuestros resultados sugieren que el ovino Canario de Pelo es más resistente a la infección por *H. contortus* en comparación con el ovino Canario, y que esta resistencia se establece entre los días 7 y 28 pi, es decir, se desarrolla frente al estadio adulto, lo que resulta novedoso como modelo de resistencia a este tipo de parásitos en la especie ovina.

2. PARASITOLOGÍA

2.1. LA CARGA PARASITARIA FUE MENOR EN LOS OVINOS CANARIOS DE PELO QUE EN LOS OVINOS CANARIOS

La tasa de vermes que alcanzaron la fase adulta a los 28 dpi fue del 23% en el caso de los ovinos CAN, y del 10% para los ovinos CAP, habiendo sido utilizada una cepa de *H. contortus* que suele tener una tasa de establecimiento en torno al 25 %, cuando se inocula en animales de esta edad y pertenecientes a razas susceptibles (**Knox**, comunicación personal). Estos datos se pueden comparar con los obtenidos en inoculaciones primarias de razas ovinas susceptibles y resistentes con L3 de *H. contortus* en otros ensayos, aunque, evidentemente, podrían existir diferencias entre experiencias como consecuencia de diversos factores (cepa parásita, edad de los hospedadores, exposiciones previas al parásito...).

El establecimiento parasitario observado en los ovinos CAN sacrificados a los 28 dpi fue similar al señalado en otros experimentos con razas susceptibles como la INRA 401, (28 dpi) (Lacroux et al., 2006) o la Corriedale (84 dpi), (Bricarello et al., 2002), ambas en torno al 27%. Aumont et al., 2003, por su parte, observaron tasas de asentamiento algo más elevadas (52%), al inocular corderos INRA 401 y sacrificarlos a los 35 dpi. Finalmente, Redmond y Knox, 2004, utilizando la misma cepa empleada en nuestro estudio, obtuvieron tasas de asentamiento que oscilaron entre el 26 y el 52% en inoculaciones en corderos de raza Suffolk, sacrificados a los 34-36 dpi.

En el caso de los ovinos CAP, el porcentaje de larvas inoculadas que alcanzaron el estadio adulto fue algo menor que la observada por otras razas consideradas resistentes. Por ejemplo, en ovinos de raza Criolla Lanuda se han encontrado tasas de asentamiento del 15% en animales sacrificados a los 84 dpi (**Bricarello** *et al.*, 2002), y en otros estudios con la raza Barbados de

Barriga Negra, el 18% de las larvas de *H. contortus* inoculadas dieron lugar a adultos, en animales sacrificados a los 35 dpi (**Aumont** *et al.*, **2003**). Finalmente, animales de la raza Merinoland, cuya resistencia afecta a la fecundidad de los vermes sin alterar la carga parasitaria, mostraron tasas de asentamiento muy superiores, del 27 y 34%, cuando fueron inoculados con 5000 L3 de *H. contortus* y sacrificados entre 50 y 60 dpi (**Gauly** *et al.*, **2002**; **Hielscher** *et al.*, **2006**).

Si bien la cantidad de vermes adultos fue 2,4 veces mayor en los ovinos CAN que en los CAP a los 28 dpi, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p = 0,06). En cualquier caso, se observó una clara tendencia a la disminución de la carga parasitaria de vermes adultos en los ovinos CAP. Es probable que la variabilidad individual haya influido en la falta de significación. En un estudio similar realizado en tres razas ovinas (Florida Native, St. Croix y Dorset/Rambouillet) **Zajac** *et al.*, 1990 observaron también diferencias importantes en las cargas parasitarias de cada raza, sin llegar a ser tampoco estadísticamente significativas. Los autores asumieron la gran variabilidad intrarracial como la causa de esta situación. De hecho, las diferencias individuales en cuanto a susceptibilidad frente a nematodos GI han llevado a utilizar la resistencia individual como criterio de selección reproductiva, buscando mejorar la resistencia frente a estos nematodos en el rebaño (Woolaston y Baker, 1996; Sayers y Sweeney, 2005; Stear *et al.* 2007).

Es interesante reseñar que la pérdida de parásitos con respecto al total de vermes inoculados tuvo lugar en periodos distintos según la raza. En los ovinos CAN la disminución en la carga parasitaria se produjo fundamentalmente antes del día 7 pi, momento en el que se habían establecido un 29 % de las larvas inoculadas. Entre los 7 y 28 dpi se eliminaron tan sólo un 6% de los vermes inoculados. En el caso de los ovinos CAP sin embargo, aunque también existe una reducción importante antes del día 7 pi. (34 % de tasa de asentamiento larvario), la pérdida experimentada en las tres semanas siguientes en la población parásita (24 %) es sensiblemente mayor. Lacroux et al., 2006 en la raza susceptible INRA 401, y Terefe et al., 2007a, en la raza resistente Barbados de Barriga Negra, obtienen resultados similares a los observados en los ovinos Canarios, lo que remarca el carácter particular de la reducción en la carga parasitaria observada en los ovinos CAP después de los 7 dpi.

2.2. LOS OVINOS CANARIOS DE PELO PRESENTARON RECUENTOS FECALES DE HUEVOS Y FECUNDIDAD DE LOS VERMES MÁS BAJOS

Los ovinos CAN eliminaron muchos más huevos de *H. contortus* que los ovinos CAP a lo largo de toda la experiencia, con lo que potencialmente podrían jugar un papel más relevante a la hora

de contaminar los pastos con huevos del parásito cuando ambas razas comparten áreas de pastoreo.

Del mismo modo, la fecundidad de las hembras de *H. contortus* en los ovinos CAN, ya sea considerando los recuentos de huevos en útero, o el cociente entre recuento acumulado de huevos en heces y el número de vermes hembras, fue claramente superior a la observada en los ovinos CAP.

La disminución en la fecundidad de los parásitos es un hallazgo frecuentemente asociado a la resistencia frente a nematodos GI, y generalmente se acompaña de una reducción en el número de vermes adultos y en su longitud (Ractliffe y Le Jambre, 1971; Stear y Bishop, 1999; Stear et al., 1999; Lacroux et al., 2006). En algunos estudios, sin embargo, la fecundidad de los vermes disminuye en las razas o individuos resistentes sin diferencias cuantitativas en los vermes adultos. Así, por ejemplo, en estudios comparativos entre las razas Merinoland y Rhön, se observaron cargas parasitarias muy similares si bien, la primera mostró una menor fecundidad de los vermes (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006). Asimismo, Bisset et al., 1996, al comparar corderos Romney seleccionados por sus altos o bajos recuentos fecales de huevos, no encuentran diferencias en las cargas parasitarias entre los grupos.

Los recuentos de huevos en heces (hpg) y la carga parasitaria estuvieron fuerte y positivamente correlacionadas en los ovinos CAN, algo descrito recurrentemente en las infecciones por nematodos GI (Stear et al., 1999; Bricarello et al., 2004; Lacroux et al., 2006). En los ovinos CAP, sin embargo, esta relación fue mucho más débil y no significativa, siendo mucho más fuerte la asociación entre fecundidad de las hembras y excreción de huevos. Estos datos parecen sugerir que en la raza resistente (CAP) existe algún otro factor, además del control de la población de parásitos adultos, que permite reducir la liberación de huevos por parte del parásito. Esta aparente disociación entre población parásita y excreción de huevos se ha descrito ocasionalmente en algunas razas rústicas ovinas resistentes a los nematodos GI, como la Florida Native, la St. Croix (Zajac et al., 1990) o la Merinoland (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006).

2.3. LOS VERMES PRESENTES EN LOS OVINOS CANARIOS DE PELO TUVIERON MENOR LONGITUD QUE LOS PRESENTES EN LOS OVINOS CANARIOS

La longitud media de los vermes alojados en los ovinos CAP fue significativamente menor que la de los ovinos CAN. La reducción en la longitud de los vermes suele ser un hallazgo común una vez que los ovinos desarrollan una inmunidad adquirida frente a nematodos GI (**Coyne y**

Smith, 1992, Lacroux et al., 2006, Rowe et al., 2008), circunstancia que no tuvo lugar en nuestro caso, al tratarse de una infección primaria.

La longitud de los vermes se correlacionó positivamente con la carga parasitaria únicamente en los ovinos CAN, lo que sugiere que, en esta raza, la carga parasitaria no limitaría (como consecuencia de la competencia por los nutrientes u otros factores) el crecimiento o fecundidad de los vermes. En los ovinos CAP, sin embargo, no se observó esta asociación.

2.4. LA DISMINUCIÓN DE LA FECUNDIDAD DE LOS VERMES FUE LA CAUSA PRINCIPAL DE LOS MENORES RECUENTOS DE HUEVOS EN HECES DE LOS OVINOS CANARIOS DE PELO

El estudio de las correlaciones entre variables parasitológicas muestra que, en la raza ovina más susceptible (CAN), la cantidad de huevos liberados en las heces a los 27 dpi se correlaciona con la carga parasitaria, la longitud de los vermes o la interacción de ambos parámetros, pero no con su fecundidad. Esta, a su vez, fue dependiente de la carga parasitaria y de la longitud de los vermes. Estos datos sugieren que la fecundidad de los vermes albergados por los ovinos CAN variaría como consecuencia de la modificación de la carga parasitaria y la longitud de los vermes. Una reducción de la carga parasitaria y la longitud de los vermes en esta raza provocaría una menor contaminación del pasto, al disminuir indirectamente la fecundidad de las hembras del parásito.

Los resultados obtenidos en esta raza son habituales en estudios de resistencia frente a nematodos GI en rumiantes, en los que suele mostrarse una reducción en los recuentos fecales de huevos dependiente de la carga parasitaria y/o la fecundidad de las hembras (Balic et al., 2000b; Claerebout y Vercruysse, 2000). Así, la fecundidad de los vermes aparece frecuentemente relacionada con la longitud de los mismos en infecciones con nematodos gástricos como *T. circumcincta* (Stear y Bishop, 1999; Stear et al., 1999) y *H. contortus* (Ractliffe y Le Jambre, 1971; Lacroux et al., 2006; Rowe et al., 2008).

Sin embargo, estas observaciones no coinciden con las obtenidas en la raza Canaria de Pelo. La única variable parasitológica que se correlacionó individualmente con el recuento de huevos en las heces (27 dpi) fue la fecundidad de los vermes, si bien la longitud de los vermes manifestó una tendencia no significativa a la asociación. Además, el análisis de regresión múltiple indicó que tampoco el efecto conjunto de la carga parasitaria y la longitud de los vermes permiten explicar el recuento de huevos en las heces a los 27 dpi en esta raza.

A diferencia de la raza más susceptible, en los ovinos CAP la disminución de la fecundidad de los vermes no parece depender exclusivamente de la disminución de la carga parasitaria adulta y de la longitud de los vermes, según reflejaron la correlación individual entre estas variables y el análisis de regresión múltiple. Esto podría sugerir la existencia de otros mecanismos capaces de reducir la fecundidad de las hembras no descritos previamente. Otros autores, estudiando otras razas ovinas rústicas resistentes a nematodos GI, han observado también reducciones en la fecundidad de los vermes que no se explicaban simplemente por la disminución en la carga parasitaria, por ejemplo en la Indonesia de Cola Fina (Beriajaya y Copeman, 2006) y la Barbados Barriga Negra (Aumont *et al.*, 2003). Estos resultados podrían sugerir que algunas de estas razas locales pueden desarrollar mecanismos de resistencia a las infecciones por nematodos GI (por ejemplo reduciendo la fecundidad de las hembras) diferentes a los recogidos en la bibliografía, referidos generalmente a razas ovinas comerciales.

Por tanto, la reducción de los recuentos de huevos en heces en los ovinos CAP parece depender principalmente de la disminución directa de la fecundidad de los vermes, siendo más débil la contribución de la longitud y carga parasitaria en esa reducción que en otras razas ovinas susceptibles.

2.5. NO HUBO DIFERENCIAS CON RELACIÓN A LA CANTIDAD DE VERMES INMADUROS NI A SU LONGITUD EN AMBAS RAZAS

Los recuentos de vermes inmaduros en el abomaso de ambas razas no mostraron diferencias significativas entre ellas ni a los 7 ni a los 28 dpi. La suma de las larvas encontradas en la mucosa y en los lavados abomasales a los 7 dpi fue muy similar en las dos razas (34% en el caso de los ovinos CAP por 29% en el caso de los ovinos CAN), así como la longitud de los vermes inmaduros alojados en la cavidad. A su vez, el escaso número de larvas encontradas en la mucosa de los animales sacrificados a los 28 dpi indicó ausencia de hipobiosis.

Estos resultados parecen excluir un efecto directo, ya sea inmediato o retardado, de la respuesta inmune del hospedador frente a los estadios larvarios. Estos resultados también contribuyen a considerar la posibilidad de que las diferencias en los datos parasitológicos observados a los 28 dpi pudieran atribuirse a una respuesta frente a fases parasitarias más evolucionadas (L5 o adultos), fenómeno no descrito anteriormente. De hecho, la resistencia al establecimiento larvario se desarrolla generalmente tras varios contactos repetidos con las fases infectantes del parásito, y las formas inmaduras de los nematodos GI se consideran la diana de la respuesta inmunitaria protectora en ovinos en infecciones repetidas con *H. contortus* y de la mayor parte de los trichostrongílidos (**Balic** *et al.*, **2000b**).

2.6. LOS RESULTADOS PARASITOLÓGICOS SEÑALAN QUE LOS OVINOS CANARIOS DE PELO FUERON MÁS RESISTENTES QUE LOS OVINOS CANARIOS Y QUE ESTA RESISTENCIA SE MANIFESTÓ FRENTE A LOS VERMES ADULTOS

En general, se observa una tendencia a la resistencia innata en muchas razas autóctonas, aunque los mecanismos de protección no parecen ser comunes (Piedrafita et al., 2010). Así, la reducción en la implantación de las fases larvarias del parásito en comparación con las razas susceptibles es un hallazgo que caracteriza a algunas razas locales resistentes a *H. contortus*, como la Barbados de Barriga Negra (Aumont et al., 2003; Terefe et al., 2007a), la Roja Africana (Preston y Allonby, 1979) y la Santa Inés (Amarante et al., 2004), mecanismos que coinciden con los descritos en la bibliografía en razas comerciales (Barger et al., 1985; Gómez Muñoz et al., 1998), aunque se desarrollan más rápidamente, más eficientemente y parecen requerir menores niveles de exposición en las razas rústicas. Sin embargo, también existen algunas razas rústicas, tales como la Florida Native y la Sant Croix, capaces de reducir la eliminación de huevos de nematodos GI en las heces, pero no la carga parasitaria, en ambos casos, cuando se comparan con corderos susceptibles de cruce Dorset/Rambouillet (Zajac et al., 1990). Finalmente, las ovejas Merinoland reducen la producción de huevos de nematodos GI en comparación con la raza ovina más susceptible, Rhön, sin afectar las poblaciones de vermes adultos (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006).

En nuestro estudio, los ovinos CAP albergaron menos vermes adultos, de menor tamaño y fecundidad que los ovinos CAN; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre razas en las tasas de asentamiento larvario a los 7 dpi. Además, en la raza CAP la reducción en la eliminación de huevos en las heces parece estar regulada fundamentalmente por la disminución de la fecundidad de los vermes, con una menor influencia de la carga total de vermes adultos. Esta disociación entre carga parasitaria y eliminación de huevos ha sido observada en algunas otras razas locales resistentes a nematodos GI, como la Florida Native, la Sant Croix, la Merinoland y la Indonesia de Cola Fina (Zajac et al., 1990, Gauly et al., 2002, Hielscher et al., 2006; Beriajaya y Copeman, 2006). Ello parece indicar que en estas razas existen mecanismos de protección orientados a los vermes adultos, diferentes a los descritos en la bibliografía para la mayor parte de las razas ovinas estudiadas (Balic et al, 2000b), lo que las convierte en recursos genéticos singulares, de gran valor para la industria farmacéutica (nuevas dianas farmacológicas), para el diseño de vacunas y para la identificación de genes asociados a resistencia parasitaria (Piedrafita et al, 2010).

3. HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

3.1. LA PÉRDIDA DE SANGRE FUE MENOR EN LOS OVINOS CANARIOS DE PELO QUE EN LOS CANARIOS

Los valores basales de hematocrito y proteínas plasmáticas fueron calculados como la media de los valores observados durante las cuatro semanas previas a la inoculación, detectándose diferencias significativas entre ambas razas, siendo superiores ambos parámetros en los ovinos CAP. Como ocurrió en nuestro estudio, es frecuente encontrar diferencias entre razas en los niveles basales de hematocrito. Estos valores más elevados se han observado en algunas razas ovinas consideradas resistentes, como la Santa Inés en comparación con la Ile de France (Amarante et al., 2004), o la Gulf Coast Native con la Suffolk (Shakya et al., 2009), pero también se han observado tendencias contrarias, por ejemplo la raza resistente Barbados de Barriga Negra, al contar con niveles basales más bajos que la raza susceptible INRA 401 (Aumont et al., 2003).

El valor hematocrito disminuyó en ambas razas a partir de la segunda semana pi, momento en el que se desarrollan los estadios hematófagos del parásito. Esta disminución fue siempre mayor en los ovinos CAN que en los ovinos CAP, aumentando progresivamente la diferencia entre ambas razas, siendo máxima a las 4 semanas pi, momento en que los niveles de hematocrito en la raza más resistente parecen tender a recuperarse.

En el caso de las proteínas plasmáticas los niveles fueron siempre superiores en los ovinos CAP, comenzando a decaer a partir de la segunda semana pi, y recuperándose ligeramente en ambas razas en la cuarta semana post inoculación. Los ovinos CAP se mantuvieron siempre dentro de límites fisiológicos para este parámetro (**Jain, 1993**), dato que subraya la capacidad que tiene esta raza de tolerar la infección.

En general, los valores de hematocrito y proteínas plasmáticas de la misma semana estuvieron correlacionados entre sí, especialmente a partir de la aparición de formas hematófagas del parásito, lo que indica que ambos parámetros reflejaban la pérdida de sangre.

El hematocrito y las proteínas plasmáticas son parámetros utilizados frecuentemente para evaluar el grado de resiliencia o tolerancia a las infecciones por *H. contortus*. Los resultados observados indican que la raza CAP se comportó como otras razas resistentes a *H. contortus*, que muestran pérdidas de hematocrito y proteínas plasmáticas menores que las razas susceptibles, como ocurre en el caso de la St. Croix, Florida Native, Santa Inés, Roja Africana o

de la Criolla Lanuda (Zajac et al., 1990; Mugambi et al., 1996; Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2004), cuando se comparan con otras razas ovinas más susceptibles, lo que indica una mayor tolerancia a la infección por *H. contortus* en estas razas más rústicas.

4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

4.1. RECUENTOS DE LEUCOCITOS EN SANGRE

Los recuentos de eosinófilos en sangre periférica siguieron un patrón parecido en ambas razas, alcanzándose el pico característico de una primoinfección parasitaria (Balic et al., 2000b) en la primera semana pi en el caso del ovino CAN, y en la segunda semana pi en el caso del ovino CAP, retornando después a niveles basales en ambas razas. Los recuentos sanguíneos de eosinófilos fueron ligeramente superiores en la raza de pelo a lo largo de toda la experiencia (a excepción de la primera semana pi, donde los ovinos CAN experimentaron un pico), hallazgo similar al que detectaron otros autores al comparar estas células en razas locales resistentes tales como la Barbados de Barriga Negra, la Gulf Coast Native o la Criolla (Aumont et al., 2003; Shakya et al., 2009; Alba-Hurtado et al., 2010).

Son pocos los estudios que reflejen la evolución de linfocitos o neutrófilos en sangre en el curso de una infección por *H. contortus*, y no suelen encontrarse diferencias en los niveles de estas células entre individuos susceptibles y resistentes (**Rowe** *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo, los niveles de linfocitos sanguíneos siguieron una tendencia similar en ambas razas, con un incremento importante en la primera semana pi, recuperándose con posterioridad los valores basales. En este caso, al contrario que en los eosinófilos, estas células fueron habitualmente más numerosas en los ovinos CAN, aunque sin diferencias significativas. Por su parte, los niveles de neutrófilos en sangre mostraron un patrón diferente al de eosinófilos y linfocitos a lo largo de la infección, pues experimentaron un descenso claro en la primera semana pi y posteriormente recuperaron los niveles basales, en el caso de los ovinos CAP, o mostraron una clara elevación en la tercera semana pi, en los ovinos CAN.

4.2. RECUENTOS DE POBLACIONES CELULARES EN LA MUCOSA ABOMASAL

Se observaron pocas diferencias entre razas en el patrón seguido por las distintas poblaciones celulares a lo largo del estudio en las dos fechas de sacrifico. En general, los recuentos celulares a los 28 dpi fueron similares o ligeramente superiores a los realizados a los 7 dpi, con la

población de eosinófilos como excepción más relevante, lo que se discutirá pormenorizadamente en el siguiente apartado.

Es reseñable el aumento significativo de linfocitos T CD4⁺ entre los días 7 y 28 pi en ambas razas, así como de linfocitos T WC1⁺ en el caso de los ovinos CAP. En cambio, los mastocitos y los leucocitos globulares mostraron niveles bajos en ambas razas en los dos días de sacrificio, en concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios semejantes al nuestro, en los que se realizó una única inoculación con *H. contortus* (Balic *et al.*, 2000a; Lacroux *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007a).

Por otra parte, el simple recuento de un tipo celular puede no ser indicativo de su capacidad funcional (**Balic** *et al.*, **2000b**). De hecho, en un estudio realizado en cabritos que recibieron una inoculación única de 10 ó 20.000 L3 de *H. contortus*, se observó un incremento en el número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la mucosa gástrica de los animales sacrificados 10-13 dpi en comparación con los animales sacrificados 3-6 dpi y, sin embargo, estas diferencias no repercutieron en la eliminación de los vermes (**Pérez** *et al.*, **2008**). La correlación entre estos recuentos celulares y las variables parasitológicas y hematológicas debería proporcionar más información sobre el papel de las distintas poblaciones celulares en la respuesta inmune frente al parásito.

En general, existieron pocas diferencias cuantitativas entre razas en los recuentos celulares de la mucosa abomasal, y tan sólo los linfocitos CD2⁺ a los 7 dpi fueron significativamente más numerosos en los ovinos CAP que en los ovinos CAN.

4.2.1. Los eosinófilos de la pared abomasal mostraron patrones distintos en función de la raza

La población de eosinófilos en abomaso a los 7 y 28 dpi siguió patrones diferentes en las dos razas ovinas estudiadas.

En el caso de los ovinos CAN, se observaron más eosinófilos en los animales sacrificados a los 7 dpi. Este reclutamiento de eosinófilos en ovinos tras una única inoculación es un hallazgo común y responde a la presencia de estadios larvarios en la mucosa. Sin embargo, actualmente se considera que en estas circunstancias no son capaces de actuar sobre las larvas si no existe previamente una sensibilización. En este caso, tras los desafíos, la eosinofilia en sangre periférica se mantiene varias semanas (Balic et al., 2002, 2006). Distintos trabajos realizados tanto in vitro (Rainbird et al., 1998; Terefe et al., 2007b) como in vivo (Balic et al., 2006),

sugieren que los eosinófilos de animales sensibilizados serían capaces de acumularse en torno a las larvas y producirles lesiones, en un mecanismo dependiente de células T (Meeusen y Balic, 2000), complemento, inmunoglobulinas específicas e IL-5 (Rainbird *et al.*, 1998), y se ha vinculado a una eliminación retardada de las larvas (Balic *et al.*, 2002).

En los ovinos CAP, por su parte, los recuentos de eosinófilos en abomaso fueron prácticamente idénticos en la primera y cuarta semana pi. En esta última semana del estudio, además, la población de eosinófilos en los ovinos CAP duplicó la de los ovinos CAN. Los niveles elevados de eosinófilos en la mucosa abomasal durante la cuarta semana pi, y en sangre durante la segunda semana pi, cuando la mayoría de los parásitos se encuentran en la luz del abomaso, sugieren que la eosinofilia en los ovinos CAP esté estimulada por los estadios adultos del parásito. En cambio, en el caso de los ovinos CAN, los eosinófilos, tanto en sangre como en mucosa, aparecen en un número elevado durante la primera semana pi, probablemente en respuesta a la presencia de larvas del parásito.

Existen razas resistentes que muestran recuentos más elevados de eosinófilos en abomaso que otras razas susceptibles, como la Criolla Lanuda en comparación con la Corriedale (**Bricarello** *et al.*, 2004), la Barbados de Barriga Negra en comparación con la Columbia (**Muñoz Guzmán** *et al.*, 2006), o la Gulf Coast Native en comparación con la Suffolk (**Shakya** *et al.*, 2009). Pero, a diferencia de nuestro estudio, en estos tres trabajos los animales fueron infectados repetidamente, bien mediante inoculaciones seriadas, o bien mediante alimentación en pastos contaminados, asimismo, el sacrificio de los animales fue más tardío que el nuestro, entre 5 y 15 semanas pi.

Por el contrario, en otros estudios, las razas resistentes no muestran diferencias en los recuentos de eosinófilos en mucosa en comparación con las razas susceptibles. Es el caso de la Barbados de Barriga Negra cuando se comparó con la INRA 401 (**Terefe** *et al.*, 2007a), la Florida Native en comparación con la Merino Rambouillet (**Amarante** *et al.*, 1999), o la Santa Inés cuando se comparó con la Suffolk y la Ile de France (**Amarante** *et al.*, 2005). A veces los resultados de una misma raza son contradictorios, probablemente como consecuencia de diferencias en los diseños experimentales. En definitiva, no parece haber una respuesta común, en lo que concierne a los eosinófilos en sangre periférica y/o tejidos en las distintas razas locales resistentes a nematodos gastrointestinales, principalmente *H. contortus*.

4.2.2. La asociación entre las distintas células presentes en el abomaso parece variar según la raza

El estudio de la correlación entre distintos tipos celulares puede ayudar a comprender los mecanismos de respuesta inmune celular que intervienen en el hospedador e identificar diferencias entre razas.

A los 7 dpi, en los ovinos CAN se observó una fuerte correlación negativa entre los leucocitos globulares y los mastocitos que no se observó en los ovinos CAP. Para muchos autores los leucocitos globulares representan el último estadio de activación de los mastocitos, y se forman una vez que estos han liberado el contenido de sus gránulos (**Huntley** *et al.*, 1984; **Balic** *et al.*, 2000b; **Pérez** *et al.*, 2003). Esta correlación negativa sugiere que en esta raza se está produciendo una progresiva activación de los mastocitos, que no tendría lugar en los ovinos CAP. Este proceso podría estar mediado por linfocitos T CD4⁺, a tenor de la asociación positiva entre los linfocitos T CD4⁺ del tercio superior de la mucosa y los leucocitos globulares a los 7 dpi, detectada exclusivamente en los ovinos CAN.

El aumento de linfocitos T CD4⁺ activados en linfonódulos locales y mucosa es característico de la respuesta inmune adquirida frente a nematodos GI en el ovino, pero habitualmente ha sido relacionado con la activación de los eosinófilos en un proceso de expulsión tardía de las larvas (Balic *et al.*, 2002). Sin embargo, no habría que descartar que los linfocitos T CD4⁺ tengan también un papel en la activación de los mastocitos que, tras una sensibilización previa, provocan la expulsión inmediata de las larvas en el ovino (Balic *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004; Kemp *et al.*, 2009) o la expulsión de los vermes adultos en el caprino (Pérez *et al.*, 2001; 2003). De modo similar, según los resultados de nuestro estudio, los linfocitos T CD4⁺ podrían estar interviniendo en la activación de los mastocitos en los ovinos CAN. Sin embargo, a diferencia de lo sugerido por los trabajos anteriormente citados, esta asociación entre mastocitos y linfocitos T CD4⁺ se produciría pocos días después de una inoculación única, es decir, sin sensibilización previa.

A los 28 dpi se observaron diversas asociaciones entre células específicamente en los ovinos CAP. En concreto los eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ mostraron una fuerte correlación positiva. De modo similar, **Robinson** *et al.*, **2010** reseñaron la correlación entre estas dos células en los primeros momentos de la infección, asociada al desarrollo de resistencia frente a las fases larvarias. Tal y como sugieren estos autores, los linfocitos T $\gamma\delta^+$ podrían estar produciendo IL-5, citoquina de fuerte efecto quimiotáctico para los eosinófilos, lo que provocaría su aumento en la

mucosa gástrica. A su vez, los linfocitos T $\gamma \delta^+$ se correlacionaron positivamente con los WC1⁺, lo que refleja su grado de activación.

La galectina-14 es producida por los eosinófilos y puede ser un indicador de su actividad (**Dunphy** *et al.*, **2002**; **Meeusen** *et al.*, **2005**). En los ovinos CAP existió una fuerte correlación positiva entre los recuentos de eosinófilos y de células galectina-14⁺ a los 7 dpi, que fue más débil, aunque positiva, a los 28 dpi. En los ovinos CAN esta asociación fue siempre mucho más leve, lo que podría indicar para esta raza una menor eficiencia de los eosinófilos en la destrucción o alteración de los vermes.

Las diferencias entre razas en los recuentos celulares en el tejido y su correlación fueron sutiles, pero parecen reflejar la activación de mecanismos celulares distintos en cada raza, orientados a distintas dianas (estadios) del parásito.

4.3. ASOCIACIÓN ENTRE LOS RECUENTOS DE CÉLULAS EN SANGRE Y MUCOSA GÁSTRICA

Sería necesario un estudio más amplio para conocer con exactitud la cinética de los eosinófilos y linfocitos en el organismo del hospedador, con sacrificios seriados o biopsias que permitieran conocer los niveles de estas poblaciones celulares en la mucosa con un menor intervalo de tiempo (Robinson et al., 2010), y con estudios de citometría de flujo que dieran a conocer las distintas poblaciones en sangre (Yanming et al., 2007) y tejidos. Teniendo en cuenta estas limitaciones, es posible extraer algunas conclusiones del estudio realizado.

La eosinofilia sanguínea detectada en las primeras semanas pi en los ovinos de ambas razas se asoció positivamente con los recuentos de eosinófilos en la mucosa del abomaso a los 7 dpi. Esta asociación fue significativa en los ovinos CAN y bastante más débil en los ovinos CAP. Los recuentos de eosinófilos en la mucosa gástrica la cuarta semana pi también estuvieron positivamente correlacionados con los niveles de eosinófilos en sangre (de la cuarta semana pi en los ovinos CAP y de la tercera semana pi en los ovinos CAN). Los datos disponibles podrían sugerir que los niveles de eosinófilos en sangre serían un buen indicador de la presencia de estas células en el tejido, al menos en las dos razas estudiadas; sin embargo, esta hipótesis ha de ser tomada con cautela y se escapa de los objetivos de este trabajo. Otros autores también han encontrado asociaciones similares en estudios realizados con *T. circumcincta*, observando la máxima correlación entre la eosinofilia periférica nueve días antes del sacrificio y los recuentos de eosinófilos en mucosa (**Henderson y Stear, 2006**). En este trabajo, los eosinófilos en mucosa no se correlacionaron con los niveles de eosinófilos sanguíneos en días más cercanos al

sacrificio o en el momento del pico, y además se observaron correlaciones positivas entre eosinófilos en sangre y longitud de los vermes, por lo que los autores son prudentes a la hora de valorar la eosinofilia periférica como indicador del reclutamiento de estas células en la mucosa gástrica.

Las correlaciones entre los niveles de linfocitos en sangre y en mucosa abomasal fueron poco relevantes. Como se explicó en la Revisión Bibliográfica (3.4.1.1, "Teoría común de la mucosa"), actualmente se acepta la existencia de un flujo de linfocitos entre la mucosa y los linfonódulos locales, con escasa repercusión en los niveles sanguíneos de estas células. Los datos de nuestro trabajo no contradicen esta teoría.

5. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL

5.1. LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS NO MOSTRARON DIFERENCIAS ENTRE RAZAS

El hecho de que los animales estuvieran libres de parásitos varios meses antes de comenzar la experiencia tuvo su reflejo en los bajos niveles basales de inmunoglobulinas séricas específicas, tanto del isotipo IgA como del IgG (Amarante *et al.*, 2009).

Los niveles de IgA frente a los distintos antígenos mostraron patrones similares en ambas razas, con un pico en la segunda semana pi. Los niveles de IgG frente a antígeno somático larvario y ES (excretor-secretor) de adulto aumentaron progresivamente y se mantuvieron elevados durante varias semanas en ambas razas, mientras que los de IgG frente a antígeno somático de vermes adultos fueron prácticamente constantes a lo largo de toda la experiencia.

Nuestros resultados concuerdan en diversos aspectos con otros estudios similares de respuesta humoral frente a nematodos gastrointestinales. Como ocurrió en nuestro estudio, es frecuente que la elevación de IgA frente a antígenos larvarios tarde varias semanas en observarse, mientras que los niveles de IgG se incrementen desde el primer momento (Schallig et al., 1995; Gómez Muñoz et al., 1999). El aumento de los niveles de inmunoglobulinas frente a antígenos de vermes adultos no fue evidente hasta los 14 dpi, momento en que los adultos empiezan a estar presentes en el abomaso (Lacroux et al., 2006; Terefe et al, 2007a). Finalmente, la correlación observada entre las IgG frente a los diversos antígenos larvarios y adultos también fue descrita por Amarante et al., 2009 en la raza Santa Inés y sus cruces.

La principal conclusión que podría extraerse de la comparación de los niveles de inmunoglobulinas séricas en ambas razas es que estos no reflejaron las diferencias en resistencia y resiliencia observadas tras la inoculación primaria con *H. contortus*, y de hecho los niveles son habitualmente superiores en los ovinos CAN, raza más susceptible. Los escasos estudios comparativos de la respuesta humoral en diferentes razas han demostrado también cómo las diferencias cuantitativas en los niveles de inmunoglobulinas séricas tras la infección primaria son muy leves o inexistentes (Gómez Muñoz, 1996; Terefe *et al.*, 2007a; Amarante *et al.*, 2009; Shakya *et al.*, 2009).

5.2. DIFERENCIAS ENTRE RAZAS EN LOS NIVELES DE IGA EN MUCUS Y EN SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS

Se observaron mayores niveles de IgA en mucus a los 28 dpi en las dos razas ovinas estudiadas, siendo este incremento más notorio y significativo en la raza resistente CAP en todas las IgA específicas estudiadas (frente a antígenos somáticos larvarios y de adulto y ES de adulto).

Aunque se atribuye un papel importante a la IgA en el mucus en la resistencia frente a nematodos gastrointestinales (Stear et al., 1996; Strain y Stear, 2001; Martínez Valladares et al., 2005a; Lacroux et al., 2006), no siempre se encuentran diferencias cuantitativas entre razas en los niveles de esta inmunoglobulina cuando se comparan razas rústicas resistentes y otras comerciales más susceptibles (Amarante et al., 2005; Bricarello et al., 2005). En nuestro estudio, sin embargo, la resistencia de los ovinos Canarios de Pelo frente a H. contortus, además de caracterizarse por un particular aumento en sus niveles de los 7 a los 28 dpi, se vio acompañada de mayores niveles de IgA en mucus a los 28 dpi en comparación con los ovinos Canarios, aunque estas diferencias no fueran estadísticamente significativas.

Los niveles de IgA en suero y mucus aparecen ocasionalmente en la literatura como fuertemente correlacionados (Martínez Valladares et al., 2005a; Lacroux et al., 2006), aunque en otros estudios se muestran independientes (Schallig et al., 1995). En nuestro caso, esta correlación positiva tuvo lugar únicamente en los ovinos CAN, reflejando una vez más diferencias entre razas en la respuesta inmune frente a nematodos GI, y el carácter singular de la raza local de pelo a la hora de desarrollar sus mecanismos de protección. Así, la respuesta humoral en los ovinos CAP se caracterizó por un claro aumento de IgA en el mucus a los 28 dpi, con independencia de los niveles séricos de esta inmunoglobulina. En cambio, en los ovinos CAN, la elevación de los niveles de IgA en el mucus a los 28 dpi fue más leve, y estos niveles estuvieron correlacionados con los del suero.

6. CORRELACIONES Y REGRESIONES DE LAS DISTINTAS VARIABLES

6.1. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y HEMATOLÓGICAS

6.1.1. Los ovinos Canarios de Pelo mostraron una mayor resiliencia frente al parásito

La resiliencia es un concepto ecológico que se define como la capacidad que tiene un animal parasitado de mantener unos niveles aceptables de salud y producción (Riley y van Wyk, 2009). Los resultados obtenidos en esta experiencia sugieren que los ovinos CAP mostraron una mayor resiliencia frente a la infección por *H. contortus* en comparación con los ovinos CAN, disminuyendo no sólo la carga parasitaria (resistencia), sino también su efecto fisiopatológico. La fuerte correlación negativa entre hematocrito y las variables parasitológicas (tanto entre razas como en el estudio conjunto de ambas), especialmente en la cuarta semana pi, evidenció que la pérdida de sangre se debió fundamentalmente a la infección parasitaria (Shakya *et al.*, 2009). Por tanto, los hospedadores con menos vermes y más pequeños —es decir, con menor biomasa parasitaria— tuvieron menor pérdida de sangre, independientemente de la raza, lo que quedó reflejado en el análisis hematológico.

Las proteínas plasmáticas de la cuarta semana en los ovinos CAP estaban débilmente asociadas con las variables parasitológicas, probablemente como consecuencia de un incremento sérico de las inmunoglobulinas, por lo que los niveles de proteínas plasmáticas, sobre todo a medida que avanza la infección, son un indicador menos preciso de la pérdida de sangre debida al parasitismo que el valor hematocrito.

6.2. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y RECUENTOS CELULARES EN SANGRE Y TEJIDO

6.2.1. Los eosinófilos de sangre periférica no se relacionaron directamente con resistencia en ninguna de las razas

Los ovinos CAN mostraron un pico en los niveles de eosinófilos la primera semana pi, mientras que en los ovinos CAP se observó un pico similar la segunda semana pi. Sin embargo, en ninguna de las razas esta eosinofilia periférica pareció asociada directamente a resistencia ni a resiliencia, pues en modo alguno se correlacionó con los distintos parámetros parasitológicos o hematológicos, respectivamente. Tampoco parece que el pico de eosinófilos experimentado en

estas primeras semanas estuviera relacionado cambios en el curso de la infección, pues no se observaron diferencias en los recuentos de larvas y su longitud la primera semana pi en ambas razas. Sin embargo, tal y como se comentó anteriormente en este apartado, si existió una correlación positiva entre eosinófilos en sangre y tejidos, mucho más significativa en la raza CAN. Diversos autores han propuesto los incrementos de eosinófilos en sangre periférica como marcador de resistencia, porque suele aumentar su número en animales resistentes (Stear et al., 2002; Aumont et al., 2003, Amarante et al., 2009). No obstante, su uso es cuestionable, porque parece que es precisa la sensibilización previa de los animales (Dawkins et al., 1989; Buddle et al., 1992).

6.2.2. Los leucocitos sanguíneos no se asociaron con protección en ninguna de las dos razas

Los linfocitos en sangre no son señalados habitualmente entre los posibles marcadores fisiológicos de resistencia frente a nematodos GI (Sayers y Sweeney, 2005; Stear et al., 2007), si bien Rowe et al., 2008 señalaron la correlación negativa existente entre los linfocitos sanguíneos y la fecundidad de los vermes en animales de raza Merina inoculados con *H. contortus*.

En nuestro estudio, la asociación entre células sanguíneas y parámetros parasitológicos, tanto a los 7 como a los 28 dpi, fue muy variable y no permitió establecer ninguna relación entre niveles de leucocitos sanguíneos y resistencia. Por su parte, la fuerte correlación positiva entre los niveles de eosinófilos sanguíneos a los 14 dpi y los parámetros parasitológicos observada en los ovinos CAN podría sugerir que estas células constituirían un marcador de la intensidad de la parasitación en esta raza, pero hacen falta nuevos estudios que sustenten esta posibilidad.

6.2.3. Los mecanismos de resistencia frente a los parásitos adultos en los ovinos Canarios de Pelo implicaron a los eosinófilos y a los linfocitos T γδ/WC1⁺

En los ovinos CAP, los recuentos de eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ (en su conjunto y la subpoblación WC1⁺) presentes en la mucosa abomasal a los 28 dpi se correlacionaron negativamente con el número de huevos en útero y con el recuento de huevos en heces a los 27 dpi. Sin embargo, ninguna de estas células se correlacionó con la carga parasitaria ni con la longitud de los vermes, sugiriendo un papel novedoso para ellas en la protección de los ovinos frente a las infecciones por nematodos gastrointestinales (GI), relacionado con el control de la fecundidad de los vermes.

Actualmente se considera que la acción efectora de los eosinófilos se dirige fundamentalmente frente al estadio larvario y sólo tras infecciones sensibilizantes (Meeusen y Balic, 2000; Balic et al., 2006), mientras que las escasas referencias a su acción sobre vermes adultos son confusas (Amarante et al., 2005), y se suelen asociar a lesiones provocadas previamente en las fases larvarias (Meeusen y Balic, 2000; Lacroux et al., 2006). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias en el establecimiento ni en el desarrollo larvario (longitud), entre las dos razas ovinas, lo que sugiere que los eosinófilos actuaron directamente sobre los adultos en la raza CAP.

Los mecanismos que subyacen a esta particular protección generada por los eosinófilos sobre la fecundidad de los vermes adultos son desconocidos hoy en día. Robinson *et al.*, 2010 observaron un incremento de eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta$ en el tejido en los primeros momentos de la infección por *H. contortus*, asociado a resistencia frente a los estadios larvarios. Por ello sugieren que el papel de los eosinófilos podría estar relacionado con la destrucción directa de las larvas, a las que rodearían. Esta acción estaría mediada por anticuerpos y orquestada por las citoquinas liberadas por los linfocitos T $\gamma\delta^+$. En nuestro caso, es posible que los eosinófilos hayan tenido un papel similar sobre los vermes adultos, con un efecto directo en la fecundidad. En relación a la expulsión diferida de las larvas, algunos autores señalan que las moléculas liberadas por los eosinófilos no actúan únicamente en el tejido, sino también en la capa de mucus (Meeusen y Balic, 2000). De esta manera, los vermes adultos, presentes en la luz del abomaso, también serían afectados por el contenido de los gránulos eosinofilicos, aunque no estuvieran en contacto con el tejido.

Entre estas moléculas liberadas por los eosinófilos se encuentran mediadores de la inflamación como la galectina-14 (**Dunphy** *et al.*, 2000, 2002). Recientemente se ha demostrado que esta lectina se libera en el mucus de forma espontánea por parte de los eosinófilos presentes en la mucosa, y que es capaz de adherirse a glicoproteínas parasitarias favoreciendo su reconocimiento, estimular la infiltración celular y modificar la viscosidad del mucus (**Young** *et al.*, 2009). Todo ello podría dificultar la movilidad, nutrición y reproducción de los vermes, explicando así esta asociación entre eosinófilos y fecundidad. Alternativamente, los eosinófilos podrían liberar diversas citoquinas y leucotrienos que modularían las respuestas inflamatorias, de modo similar a como se ha sugerido en el asma humano (**Balic** *et al.*, 2000b; Fulkerson *et al.*, 2006; Holgate, 2008).

En los ovinos CAN, los eosinófilos contabilizados en la mucosa abomasal a los 7 y 28 dpi no se correlacionaron con los parámetros parasitológicos estudiados, lo que cuestiona su capacidad protectora en esta experiencia para esta raza, subrayándose, una vez más, el carácter exclusivo

de los mecanismos de respuesta inmune desarrollados por los ovinos Canarios de Pelo. Probablemente, en el caso de los ovinos Canarios los eosinófilos infiltrados en la mucosa abomasal tras una inoculación primaria no estén suficientemente activados y se requiera, tal y como se describe habitualmente, una activación mediada por los linfocitos T CD4⁺ y anticuerpos específicos, elementos propios de una respuesta secundaria (**Meeusen y Balic, 2000; Balic et al. 2002**).

6.2.4. Los niveles de linfocitos T CD4⁺ se relacionaron con resistencia en el ovino Canario

La correlación inversa observada, dentro de la raza ovino Canario (CAN), entre los linfocitos T CD4⁺ y la carga parasitaria y longitud de los vermes confirma la relevancia que otros estudios han sugerido para estas células en la respuesta inmune frente a nematodos GI (Gill *et al.*, 1993a, 2000; Peña *et al.*, 2006).

En cambio, en los ovinos CAP los linfocitos T CD4⁺ no parecen tener una especial asociación con protección frente al parásito, al menos tras una inoculación única. Dada la correlación observada entre linfocitos T $\gamma\delta/WC1^+$ y eosinófilos en esta raza, es posible que la estimulación de las células efectoras, habitualmente relacionada con la subpoblación CD4⁺, implique en los ovinos CAP a los linfocitos T $\gamma\delta/WC1^+$, células cuya actividad se suele asociar a la inmunidad innata. Sus funciones no son conocidas en profundidad, pero se les atribuye la mayoría de las funciones propias de los linfocitos T $\alpha\beta$, en procesos de respuesta rápida frente a agentes infecciosos y parasitarios (**Balic** *et al.*, 2000a; Cutuli, 2007; Pérez *et al.*, 2008).

6.2.5. Los mastocitos y los leucocitos globulares no parecieron desempeñar un papel protector en ninguna de las dos razas

No se observaron correlaciones significativas entre el resto de células efectoras contabilizadas en el abomaso en este estudio (mastocitos y leucocitos globulares) y las variables parasitológicas estudiadas a los 7 y 28 dpi. Los leucocitos globulares parecieron tender a asociarse negativamente con las larvas 4 luminares a los 7 dpi en los ovinos CAN (en los ovinos CAP esta asociación es positiva), y a los 28 dpi con los recuentos de vermes adultos y su longitud, aunque el grado de asociación fue muy débil. Estas células parecen estar implicadas de forma más decisiva en un rechazo larvario temprano tras el desarrollo de respuestas inmunitarias adquiridas (Miller et al., 1983; Balic et al., 2002). Probablemente, una exposición más prolongada a los vermes adultos provocaría un aumento más patente en los recuentos de mastocitos y leucocitos globulares en esta raza, como inicio de una respuesta protectora, tal y

como se ha observado en otros estudios de inoculación primaria con sacrificios más tardíos que en nuestra experiencia (Bricarello et al., 2002; Pérez et al., 2003).

6.3. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y NIVELES DE GALECTINAS-14 Y 15

Se observó una clara tendencia a la correlación negativa entre los niveles de galectinas y distintas variables parasitológicas relacionadas con vermes adultos e inmaduros. Si bien esta correlación no alcanzó en ocasiones la significación estadística al analizar ambas razas por separado, sí se logró al analizar conjuntamente todos los animales (probablemente al aumentar el tamaño muestral), lo que refleja una tendencia homogénea para ambas razas en este caso.

Con respecto a la galectina-15, es importante señalar que, a pesar de que su presencia en el mucus disminuyera significativamente en los ovinos CAN a los 28 dpi, siguió estando correlacionada negativamente con todos los parámetros parasitológicos, especialmente con la carga parasitaria y los recuentos de huevos en las heces, de modo semejante a los ovinos CAP, raza en que los niveles de esta molécula fueron similares en ambos días de sacrificio.

En nuestro estudio la galectina-14 sólo pudo observarse en el interior de los eosinófilos, mientras que en otros trabajos también también ha sido detectada en la capa de mucus sobre el epitelio gástrico (**Dunphy** *et al.*, **2002**; **Young** *et al.*, **2009**). Es posible que su liberación masiva requiera sucesivos contactos con el parásito, o un periodo más prolongado de infección. Su escasa presencia en el mucus podría explicar también que su grado de correlación con las variables parasitarias no fuera significativo estadísticamente, siempre más débil que el de la galectina-15.

El papel de ambas lectinas se ha relacionado principalmente con el reconocimiento del parásito y con la modificación de las características del mucus, lo que dificulta la movilidad de los vermes y con ello su alimentación y reproducción (Young y Meeusen, 2004; Young et al., 2009). En los escasos estudios realizados hasta el momento sobre su papel en la repuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales, se ha señalado que sus niveles aparecen especialmente aumentados en animales que han sido infectados repetidamente, tanto con H. contortus (Dunphy et al., 2000; Meeusen et al., 2005; Kemp et al., 2009), como con T. circumcincta (Athanasiadou et al., 2008), lo que no es posible contrastar con los resultados de nuestro estudio, por tratarse de una inoculación única. En cualquier caso, ambas moléculas parecieron tener una función en la eliminación de los vermes que afectó al parásito desde las

fases larvarias, lo que podría tratarse de un mecanismo habitual en el ovino, independiente de la raza.

El estudio de la capacidad inhibidora de la motilidad larvaria del mucus y la cuantificación de los niveles de ambas galectinas mediante PCR a tiempo real y/o electroinmunotransferencia, ayudarían a valorar con mayor precisión la importancia de estas moléculas en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales.

6.4. CORRELACIONES ENTRE VARIABLES PARASITOLÓGICAS Y NIVELES DE INMUNOGOBULINAS EN SUERO Y MUCUS

6.4.1. Los niveles de inmunoglobulinas séricas no se relacionaron con protección en ninguna de las razas

No existieron correlaciones inversas entre ningún parámetro parasitológico y los niveles de inmunoglobulinas séricas en ninguna de las dos razas. En el caso de la IgG se han relacionado sus niveles séricos con protección frente a nematodos GI, pero únicamente en la respuesta secundaria, nunca en infecciones primarias (Schallig et al., 1995; Gómez Muñoz et al., 1999; Lacroux et al., 2006; Pernthaner et al., 2006). La correlación positiva entre los niveles de IgG séricos y algunos parámetros relacionados con los vermes adultos en los ovinos CAN señalan la escasa importancia que puedan tener los niveles de IgG séricas en la respuesta inmune tras una inoculación única, para esta raza.

En ninguna de las dos razas estudiadas los niveles de IgA en suero parecen ser un reflejo de la actividad de esta inmunoglobulina en el mucus. Aunque los niveles de IgA en suero y mucus se correlacionaran positivamente en la raza CAN, los niveles de IgA sérica no se correlacionaron con los parámetros parasitológicos.

6.4.2. Las IgA específicas del mucus tuvieron una función protectora diferente según la raza

En los ovinos Canarios (CAN) se observó una asociación entre los niveles de IgA específica del mucus y protección, relacionada en este caso con las fases larvarias del parásito a los 7 dpi, encontrándose correlaciones negativas entre las tres IgA específicas del mucus estudiadas y la longitud de las larvas. Especialmente relevante en la protección resultó ser la IgA de mucus frente a antígenos larvarios, pues en este caso también se asoció negativamente con las cargas parasitarias a los 7 días pi. Sin embargo, a los 28 dpi no se observaron correlaciones entre los

niveles de las distintas IgA específicas del mucus y las variables parasitológicas relacionadas con los vermes adultos.

Las IgA frente a antígenos de vermes adultos (somáticos y ES) se correlacionaron negativamente con todos las variables relacionadas con los vermes adultos en los ovinos Canarios de Pelo (CAP), alcanzándose significación estadística en el caso de la longitud de los vermes y de los recuentos fecales de huevos. A la vez, los niveles de estas IgA no tuvo repercusión sobre los parámetros larvarios, ni los niveles de IgA frente a antígenos larvarios tuvieron influencia estadísticamente significativa sobre las variables relacionadas con vermes adultos.

El papel de la IgA en la reducción de la longitud de los vermes es un hecho ampliamente reseñado en la literatura, especialmente en el caso de *T. circumcincta* (Smith et al., 1985b; Martínez Valladares et al., 2005a; Henderson y Stear, 2006). En relación a esta especie, Stear et al., 1996, 1999 señalan que un mecanismo fundamental de control de la fecundidad de los vermes en los corderos es la reducción de la longitud de los mismos, asociada a la producción de IgA frente a larvas 4 (L4) del parásito. Estudios realizados posteriormente en corderos infectados con *H. contortus* revelaron que la IgA, en este caso frente a L3 del parásito, podría ser también uno de los mecanismos principales de control de la longitud de los vermes y, como consecuencia de ello, de su fecundidad también en esta especie (Strain y Stear, 2001; Lacroux et al., 2006). Finalmente, trabajos realizados en la raza Santa Inés han demostrado que los niveles de IgA frente a L3 y L5 en el mucus son un componente clave en la resistencia de esta raza frente a *H. contortus* (Amarante et al., 2005). En todos estos trabajos los animales estaban previamente sensibilizados al parásito.

Aunque en nuestra experiencia los animales recibieron una inoculación única, los resultados obtenidos en los ovinos CAN a los 7 dpi parecen sugerir que en esta raza la IgA en mucus tiene como diana las fases inmaduras del parásito. Es posible que la falta de relación entre los niveles de IgA en mucus y la longitud de los vermes a los 28 dpi refleje la falta de sensibilización de los animales al nematodo. Evidentemente, sería precisa una nueva experiencia con inoculaciones seriadas para confirmar esta hipótesis.

En cambio, los resultados obtenidos en los ovinos CAP establecieron una asociación directa entre las IgA del mucus frente a antígenos de adultos (somático y larvario) y la longitud y fecundidad de los vermes adultos, independiente de su acción sobre estadios larvarios, lo que de nuevo aleja claramente esta raza de pelo de los mecanismos protectores descritos en la

bibliografía. Estos últimos datos parecen sugerir de nuevo que los vermes adultos son la diana de la respuesta protectora desarrollada por el ovino CAP.

6.5. LOS COMPONENTES DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA SE CORRELACIONARON POSITIVAMENTE CON EL HEMATOCRITO Y LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Como consecuencia de la fuerte correlación entre el grado de parasitación y la pérdida de sangre, aquellos mecanismos celulares y moleculares relacionados con la reducción del número y/o tamaño de los vermes también se asociaron con una disminución de la anemia. De hecho, algunos componentes de la respuesta inmune cuyo papel protector en términos de resistencia fue un poco confuso al analizar únicamente su correlación con las variables parasitológicas, manifestaron más claramente su relevancia cuando se valoró su influencia sobre el efecto patológico de los vermes (resiliencia).

En los ovinos Canarios (CAN) los linfocitos T CD4⁺, fuertemente correlacionados con la longitud de los vermes y su número, mostraron una clara influencia positiva en la concentración de proteínas plasmáticas.

Por otra parte, en esta raza los recuentos de células galectina-14⁺ y los niveles de IgA en mucus frente a antígenos ES de vermes adultos y somáticos larvarios se correlacionaron directamente con las proteínas plasmáticas y el hematocrito a las 4 semanas pi, respectivamente. De esta manera, aunque su papel protector no tenga un efecto claro sobre el desarrollo de los parásitos (resistencia), si podría ser valorado teniendo en cuenta la reducción observada del efecto patológico de los vermes, en este caso, la anemia y la hipoproteinemia (resiliencia). Serán necesarios estudios posteriores para poder contrastar estos resultados.

En los ovinos Canarios de Pelo (CAP) los eosinófilos contabilizados en el tejido se correlacionaron directamente con el valor hematocrito en esta raza, resultado similar al encontrado por algunos autores en ovinos de la raza resistente Criolla Lanuda en animales infectados con H. contortus a lo largo de 9 semanas (**Bricarello** et al., 2004). También los linfocitos T $\gamma\delta^+$ estuvieron correlacionados directamente con el valor hematocrito, aunque al igual que ocurrió con los eosinófilos, no se alcanzó significación estadística. Ello pudo ser debido a que estas dos poblaciones celulares influyeron sobre todo en la fecundidad de los vermes, y su repercusión en el número y tamaño de los mismos fue bastante menor.

En esta raza el efecto protector de las IgA del mucus frente a antígenos de vermes adultos quedó reflejado en la fuerte correlación observada entre sus niveles y el valor hematocrito a las 4 semanas pi, subrayándose así que la disminución de la longitud de los vermes y la carga parasitaria adulta (biomasa parasitaria) repercutieron ostensiblemente en la disminución de la anemia, principal efecto patógeno del parásito.

Un hecho similar ocurrió con los niveles de galectina-15 a los 28 dpi. Si bien su correlación con la carga parasitaria adulta (resistencia), fuertemente negativa, no alcanzó significación estadística, esta sí pudo ser observada en su correlación positiva con el valor hematocrito (resiliencia), confirmándose de esta manera su papel protector en esta raza. De modo semejante, los recuentos de células galectina-14⁺ se correlacionaron positiva y significativamente en esta raza con los niveles de proteínas plasmáticas a los 28 dpi, sin que su correlación con las distintas variables parasitológicas a los 28 dpi alcanzase esta significación.

6.6. CORRELACIÓN ENTRE RECUENTOS CELULARES Y NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS

6.6.1. Los recuentos de linfocitos en sangre y CD45r⁺ en mucosa no se correlacionaron con los de inmunoglobulinas

El estudio de la correlación entre los recuentos de linfocitos en sangre y células B en abomaso y los niveles de inmunoglobulinas en suero no manifestó ninguna tendencia clara en ninguna de las razas. Del mismo modo, tampoco pudo establecerse ninguna asociación entre los niveles de IgA en el mucus y los recuentos de células productoras de inmunoglobulinas (CD45R⁺) en la mucosa abomasal y linfocitos sanguíneos. Sería interesante completar en el futuro estos estudios contabilizando las poblaciones de linfocitos B de los linfonódulos locales, así como analizar la producción específica de inmunoglobulinas en los linfonódulos locales (**Meeusen y Brandon**, 1994).

6.6.2. Interacción entre eosinófilos tisulares, linfocitos T $\gamma\delta^+$ e IgA específica en el mucus en ovinos de raza Canaria de Pelo

Al estudiar las correlaciones entre recuentos celulares en mucosa y los niveles de IgA en el mucus fueron notables las diferencias entre ambas razas. Mientras que en los ovinos CAN no existió ninguna asociación clara entre recuentos celulares y niveles de IgA, en los ovinos CAP las variables implicadas en protección se correlacionaron positivamente entre sí. Así, eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ se mostraron correlacionados con los niveles de IgA frente a antígenos de

vermes adultos, en contraste con los ovinos CAN, en que la asociación entre linfocitos T $\gamma\delta^+$ y estas IgA específicas fueron negativas.

Hay pocos trabajos que vinculen respuestas celulares e inmunoglobulinas locales y/o séricas en las infecciones por nematodos gastrointestinales. En *H. contortus* está descrita la interacción entre inmunoglobulinas del mucus y eosinófilos, referida habitualmente a la destrucción de las L3 tras infecciones repetidas (**Meeusen y Balic, 2000**), tal y como se ha señalado anteriormente. También se han descrito correlaciones positivas entre IgA del mucus (frente a L3 y L5) y eosinófilos del tejido en la raza resistente Santa Inés (**Amarante** *et al.*, **2005**). Sin embargo, resulta difícil comparar este último resultado con los obtenidos en nuestro estudio porque los protocolos experimentales son muy diferentes. Así, estos autores emplearon animales con infección natural en el pasto durante diez meses y desparasitados seis meses antes del sacrificio.

Por otra parte, en corderos Suffolk inoculados con *T. circumcincta*, **Henderson y Stear, 2006** observaron que tanto los eosinófilos como la IgA específica frente a L3 en sangre tenían cinéticas similares. Además, ambas variables se correlacionaban inversamente con la longitud de los vermes adultos. Sin embargo, la relación que encontraron entre eosinófilos sanguíneos y tisulares (en abomaso) fue negativa, de modo que, sorprendentemente, la relación con la longitud de los vermes con los eosinófilos tisulares era la opuesta a la encontrada con los sanguíneos. Por este motivo, los propios autores se mostraron muy cautos a la hora de valorar estos resultados.

En la bibliografía, no está descrita sin embargo la correlación positiva entre linfocitos T $\gamma\delta^+$ e IgA, que en nuestro estudio fue muy fuerte en los ovinos CAP, contrariamente a lo observado en los ovinos CAN.

Sin que estos resultados puedan considerarse definitivos, esta asociación podría estar reflejando un mecanismo conjunto en el que intervinieran estos tres elementos: las IgA específicas en el reconocimiento del antígeno, los linfocitos T $\gamma\delta/WC1^+$ como activadores y reguladores de la respuesta inmune y los eosinófilos como célula efectora. De hecho, la elaboración de un modelo de regresión integrando estos tres elementos, o únicamente las IgA y linfocitos T $WC1^+$, permitió explicar gran parte de la variación de diferentes parámetros parasitológicos, tal y como se describió pormenorizadamente en el capítulo de Resultados.

6.6.3. El efecto conjunto de las IgA frente a vermes adultos y los linfocitos T CD4⁺ se relaciona con la resistencia individual en los ovinos Canarios

En la raza CAN, como se indicó en el capítulo de Resultados, la integración de los linfocitos T CD4⁺ y la IgA frente a antígenos de vermes adultos en un modelo de regresión múltiple permite explicar gran parte de la variación en la carga parasitaria y la longitud de los vermes adultos. Este tipo de respuesta estaría conforme con los resultados habitualmente descritos en ganado ovino, que resaltan el papel de los linfocitos T CD4⁺ (Gill *et al.*, 1993a, 2000; Peña *et al.*, 2006).

En esta raza la relación entre linfocitos T CD4⁺ y producción de IgA específicas podría derivarse del reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4⁺ de antígenos de verme adulto, presentados en el contexto del MHC II. Estos linfocitos, activados por el contacto con el antígeno, estimularían la proliferación de células plasmáticas y la producción de IgA, mediante la liberación de citoquinas y uniones directas intercelulares (Gill *et al.*, 2000; Miller y Horohoy, 2006).

En cambio, en los ovinos CAP los linfocitos T CD4⁺ no parecieron desarrollar una función protectora conjunta con las IgA frente a antígenos de vermes adultos, papel que parece jugar en esta raza la subpoblación T $\gamma\delta^+$, como fue señalado anteriormente.

6.7. ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE GALECTINAS E IGA DEL MUCUS

A los 28 dpi los niveles de galectina-15 en la mucosa se correlacionaron positivamente con los de IgA en el mucus frente a los diversos antígenos, especialmente en los ovinos CAP. Además, esta asociación se observó también a los 7 dpi con las IgA frente a antígenos larvarios únicamente en la raza CAN, en la que estas inmunoglobulinas cumplían un papel protector (ver capítulo 6.4.2. de esta sección).

También los niveles de galectina-14 se correlacionaron positivamente con los de IgA frente a antígenos larvarios en los ovinos CAP, aunque este resultado es más difícil de interpretar, porque esta inmunoglobulina no estaba aparentemente implicada en la protección en esta raza.

Esta secreción conjunta de componentes del mucus relacionados, entre otras funciones, con el reconocimiento de antígenos (proteicos en el caso de las IgA, glucídicos en el caso de las lectinas), y con la modificación de las características del mucus, ya ha sido observada en el mucus de ovejas que han adquirido resistencia frente a *T. circumcincta*, en comparación con

aquellas que no han estado en contacto con el parásito (Athanasiadou et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento el papel del mucus en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales ha sido relacionado habitualmente con la exclusión larvaria, impidiendo su asentamiento en la mucosa, y no con la limitación del desarrollo y actividad de los adultos (Douch et al., 1983; Jones et al., 1994; Kemp et al., 2009), tal y como parece suceder en el ovino CAP.

Es difícil establecer una conexión entre ambas moléculas (IgA y galectinas, pues tienen funciones específicas independientes, aunque no habría que descartar una función combinada, dado que, al menos en ratones, se ha descrito la unión entre la IgA y diversas galectinas de la membrana de células mieloides, en un proceso de activación celular (Yanming et al., 2007).

En cualquier caso, la presencia conjunta en el mucus de galectinas e inmunoglobulinas, y su relación con resistencia en los animales de nuestro estudio, confirma la importancia que se atribuye al mucus en la protección frente a nematodos gastrointestinales (Miller et al., 1983; Balic et al., 2000b), y una vez más resalta la necesidad de realizar nuevos trabajos que proporcionen respuestas en este sentido.

7. ORIENTACIÓN DE ESTUDIOS POSTERIORES

Este trabajo demuestra que el ovino CAP es más resistente que el ovino CAN a la infección por *H. contortus*, y que los mecanismos inmunológicos implicados en la resistencia, a diferencia de lo descrito hasta la fecha en la bibliografía, parecen orientarse hacia el estadio parasitario adulto en vez de las larvas. Esta singularidad lo convierte en un modelo ideal, y único en el mundo, para estudiar la inmunidad del hospedador (ovino) frente a los vermes adultos, con todas las implicaciones que esto puede tener en la industria farmacéutica, en el diseño de vacunas y en la búsqueda de genes asociados a protección.

Sin que este estudio sea determinante en la evaluación de las causas de la resistencia del ovino CAP frente a *H. contortus*, sí que aparecen claras diferencias en la respuesta protectora en ambas razas, que deberían ser analizadas en profundidad. Se puede destacar la asociación de los eosinófilos y linfocitos T $\gamma\delta^+$ con la resistencia en esta raza, y en particular con la reducción de la fecundidad de los vermes, constituyendo un punto de partida para posteriores trabajos que estudien la actividad de estas células.

Por otra parte, también se ha manifestado el importante papel desempeñado por diversas moléculas presentes en el mucus gástrico, como son las IgA y las galectinas-14 y 15, en la protección desarrollada por esta raza. Conviene recordar que el mucus está considerado como un elemento importante en la protección, pero hasta ahora vinculado principalmente con efectos sobre estadios larvarios, no sobre adultos. Sería muy interesante comparar el efecto del mucus de ambas razas en la viabilidad y motilidad de las larvas del parásito, tras inoculaciones sencillas como las llevadas a cabo en este trabajo, así como un estudio más amplio de las moléculas presentes en él (Claerebout et al., 1999b; Athanasiadou et al. 2008). A su vez, una caracterización pormenorizada de los antígenos del parásito que están siendo reconocidos por los animales de cada raza podría sugerir nuevas dianas vacunales (Cuquerella et al., 1993; Schallig et al. 1995).

El estudio realizado se limitó a una inoculación única con dos momentos de sacrificio. Para conocer con precisión la cinética de la respuesta inmune en estas razas sería necesario un ensayo con sacrificios seriados entre los 7 y los 28 dpi. A la vez, la valoración de la resistencia frente al parásito tras varias inoculaciones repetidas sería uno de los siguientes objetivos, al estar descrito que algunas razas manifiestan su resistencia más claramente tras la reinoculación (**Gómez Muñoz, 1996; Terefe** *et al.*, **2007a**).

Por otra parte, a pesar de que la resistencia frente a *H. contortus* en el ovino CAP parece tener una base inmune, no hay que descartar la relevancia que puedan tener las particularidades anatómicas o fisiológicas de la raza, o la influencia que en ella puedan tener factores como la edad o la nutrición (**Bricarello** *et al.*, 2005). Junto a ello, sería necesario un estudio comparativo entre ambas razas en explotaciones comerciales, que evalúe esta resistencia en condiciones de campo, analizando a la vez una posible resistencia frente a otras especies, dado que habitualmente las infecciones son mixtas.

Finalmente, sería de gran interés el estudio de los genes implicados en los mecanismos de resistencia, y su posible utilización en la selección ganadera (Dominik, 2005; Crawford et al., 2006; Raadsma et al., 2008; Gutiérrez Gil et al., 2009).



CONCLUSIONES

- 1. Ante una infección experimental con L3 de *H. contortus*, los ovinos Canarios de Pelo albergaron una menor carga parasitaria, con adultos de menor longitud y fecundidad, generando menores recuentos de huevos en heces que los ovinos Canarios. Estos datos indican una mayor resistencia del ovino Canario de Pelo frente a *Haemonchus contortus*.
- 2. Los recuentos fecales de huevos en la raza más resistente (ovino Canario de Pelo) no mostraron una relación clara con la carga parasitaria ni con la longitud de los vermes, a diferencia de las observaciones realizadas en los ovinos Canarios, y a como habitualmente sucede en esta especie. Estos resultados sugieren que los mecanismos de defensa desarrollados frente al parásito podrían ser diferentes en las dos razas.
- 3. Tras la inoculación experimental, no se observaron diferencias entre razas en el asentamiento larvario ni en la longitud de estas larvas a los 7 dpi. Este dato parece indicar, a diferencia de lo observado habitualmente en ovinos, que los estadios adultos podrían ser la diana de la respuesta protectora en los ovinos Canarios de Pelo, a la vez que abren la posibilidad de que esta raza contribuya como modelo en el estudio de la respuesta protectora frente a vermes adultos.
- 4. En relación con los niveles basales, la anemia e hipoproteinemia provocadas por la infección experimental fueron menores en los ovinos Canarios de Pelo. Estas diferencias indicarían una mayor tolerancia de esta raza a la infección con *Haemonchus contortus*.
- 5. Los mecanismos inmunológicos de resistencia desarrollados por ambas razas implicaron diferentes tipos celulares e inmunoglobulinas. Los mecanismos presentes en los ovinos Canarios de Pelo, más efectivos que los desarrollados por los ovinos Canarios, estuvieron especialmente orientados a la alteración y eliminación de vermes adultos. Esto confirma la importancia de preservar las razas autóctonas con el fin de conservar la biodiversidad y mantener genes asociados a la resistencia a enfermedades parasitarias.
- 6. Los recuentos de eosinófilos y linfocitos T γδ-WC1⁺ de la pared abomasal mostraron una fuerte correlación inversa con la fecundidad de los vermes en el caso de la raza más resistente a los 28 dpi. Esta asociación negativa sugiere un papel novedoso en el desarrollo de dicha resistencia en esta raza, de tal modo que estas células estarían cumpliendo una

función protectora relacionada con la fecundidad de los vermes adultos no descrita hasta ahora.

- 7. Los linfocitos T CD4⁺ de la mucosa gástrica fueron las células más claramente asociadas con resistencia dentro de la raza ovino Canario, en concordancia con el modelo habitualmente descrito para la especie ovina. Sin embargo, en la raza resistente no se correlacionaron con los datos parasitológicos.
- 8. Los recuentos leucocitarios en sangre y los niveles de inmunoglobulinas en suero no mostraron diferencias entre razas ni estuvieron relacionados con protección en esta experiencia, dado que no se correlacionaron inversamente con las variables parasitológicas.
- 9. Las IgA específicas presentes en el mucus intervinieron en la respuesta inmune frente al parásito en ambas razas. Su papel en los ovinos Canarios estuvo relacionado con las fases larvarias del parásito, ya que sus niveles frente a antígenos somáticos de L3 se correlacionaron inversamente con el recuento y longitud de las larvas.
- 10. En los ovinos Canarios de Pelo, el papel protector de las IgA del mucus estuvo relacionado con los vermes adultos. En esta raza, las IgA específicas frente a antígenos somático y ES de adulto se correlacionaron inversamente con diversos parámetros parasitológicos, como la longitud de los vermes o los recuentos fecales de huevos.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams D.B. (1988): The effect of dexamethasone on a single and a superimposed infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int J Parasitol*. 18, 575-9
- Adams D.B. (1989): A preliminary evaluation of factors affecting an experimental system for vaccination-and-challenge with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int J Parasitol*. 19, 169-75
- Adams D.B., Colditz I.G. (1991): Immunity to *Haemonchus contortus* and the cellular response to helminth antigens in the mammary gland of non-lactating sheep. *Int J Parasitol*. 21, 631-9
- Akesson C.P., Mcl Press C., Espenes A., Aleksandersen M. (2008): Phenotypic characterisation of intestinal dendritic cells in sheep. *Dev Comp Immunol.* 32, 837-849
- Alba-Hurtado F., Romero-Escobedo E., Muñoz-Guzmán M.A., Torres-Hernández G., Becerril-Pérez C.M. (2010): Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus. Vet Parasitol.* 172, 277–282
- Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89
- Almería S., Canals A., Zarlenga D.S., 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, 87–98
- Almería S., Canals A., Zarlenga D.S., Gasbarre L.C. (1997b): Quantification of cytokine gene expression in lamina propria lymphocytes of cattle following infection with *Ostertagia ostertagi*. *J Parasitol*. 83, 1051–1055
- Álvarez-Sánchez M.A., Pérez-García J., Cruz-Rojo M.A., Rojo-Vázquez F.A. (2006): Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitol Res.* 99, 78-83
- Amarante A.F.T., Craig T.M., Ramsey W.S., Davis S.K., Bazerc F.W. (1999): Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbreed lambs. *Vet Parasitol.* 80, 311-324
- Amarante A.F.T., Bricarello P.A., Rocha R.A., Gennar S.M. (2004): Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet Parasitol*. 120, 91–106
- Amarante A.F.T., Bricarello P.A., Huntley J.F., Mazzolin L.P., Gomes J.C. (2005): Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol.* 128, 99-107
- Amarante A.F., Susin I., Rocha R.A., Silva M.B., Mendes C.Q., Pires A.V. (2009): Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet Parasitol*. 165, 273-80
- Anderson R.C. (1992): Nematode parasites of vertebrates. Wallingford, UK. *CAB International*

- 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(7), 839-46
- Anonymous (1959): A vaccine against Dictyocaulus viviparus. Vet Rec. 71, 153-4
- Anónimo (2005): Descendientes de la oveja aborigen. Canarias Agraria y Pesquera. Revista de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias 74-75
- Anthony R.M., Rutitzky L.I., Urban Jr. J.F., Stadecker M.J., Gause W.C. (2007): Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 7, 975–987
- **Aparicio P. (2007):** Respuesta inmune de base celular y mecanismos de activación celular. En: Gómez-Lucía E., *et al.* Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- Arinobu Y., Iwasaki H., Gurish M.F., Mizuno S., Shigematsu H., Ozawa H., Tenen D.G., Austen K.F., Akashi K. (2005): Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 18105-10
- Arjona A. (2007): Células implicadas en la respuesta inmune. En: Gómez-Lucía E., et al. (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- Asanji M.F. (1988): Haemonchosis in sheep and goats in Sierra Leone. *J Helminthol.* 62, 243-9
- Athanasiadou S., Huntley J.F. (2008): Emerging technologies and their applications in interactions between nutrition and immunity to gastrointestinal parasites in sheep. *Parasite Immunol.* 30, 101-11
- Athanasiadou S., Pemberton A., Jackson F., Inglis N., Miller H.R., Thévenod F., Mackellar A., Huntley J.F. (2008): Proteomic approach to identify candidate effector molecules during the in vitro immune exclusion of infective *Teladorsagia circumcincta* in the abomasum of sheep. *Vet Res.* 39, 58
- Aumont G., Gruner L., Hostache G. (2003): Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Vet Parasitol*. 116, 139–150
- Bahirathan M., Miller J.E., Barras S.R., Kearney M.T. (1996): Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infections. *Vet Parasitol.* 65, 259–268
- Baker D.G., Gershwin L.J. (1992): Seasonal patterns of total and *Ostertagia*-specific IgE in grazing cattle. *Vet Parasitol*. 44, 211-221
- Baker D.G., Gershwin L.J. (1993): Inverse relationship between IgE and worm burdens in cattle infected with *Ostertagia ostertagi*. *Vet Parasitol*. 47, 87-97
- Baker R.L., Gray G.D. (2004): Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics. En: Sani R.A., Gray G.D., Baker R.L. (Eds.), Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia. Canberra, Australia. *ACIAR Monograph*
- Baldwin C.L., Morrison W.I., Naessens J. (1988): Differentation antigens and functional characteristics of bovine leukocytes. En: Differentation antigens in Lymphohemopoietic Tissues. Mysayaka, M. y Trnka B., Eds. New York. *Marcel Dekker*
- Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N. (2000a): Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* 75, 109-20

- Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N. (2000b): The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in sheep. *Adv Parasitol.* 45, 182-241
- Balic A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T. (2002): Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol*. 24, 39-46
- Balic A., Bowles V.M., Liu Y.S., Meeusen E.N. (2003): Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol*. 25, 375–381
- Balic A., Cunningham C.P., Meeusen E.N. (2006): Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107-15
- Barger I.A. (1993): Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int J Parasitol.* 23, 463-9
- Barger I.A., Le Jambre L.F., Georgi J.R., Davies H.I. (1985): Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. *Int J Parasitol* 15, 529-33
- Barnes E.H., Dobson R.J. (1990): Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: mathematical model of worm fecundity. *Int J Parasitol*. 20, 375-80
- Barnes E.H., Dobson R.J. (1993): Persistance of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *Int J Parasitol.* 20, 365-73
- Barrett M., Jackson F., Huntley J.F. (1998): Pathogenicity and immunogenicity of different isolates of *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Parasitol*. 76, 95-104
- Beetz S., Wesch1 D., Marischen L., Welte S., Oberg H.H., Kabelitz D. (2008): Innate immune functions of human γδ T cells. *Immunobiology* 213, 173-82
- Beh K.J., Hulme D.J., Callaghan M.J., Leish Z., Lenane I., Windon R.G., Maddox J.F (2002): A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Anim Genet*. 33, 97–106
- Behnke J.M., Barnard C.J., Wakelin D. (1992): Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *Int J Parasitol.* 22, 861-907
- Behnke J.M., Lowe A., Clifford S., Wakelin D. (2003): Cellular and serological responses in resistant and susceptible mice exposed to repeated infection with *Heligmosomoides* polygyrus bakeri. Parasite Immunol. 25, 333–340
- **Belkaid Y., Oldenhove G. (2008):** Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29, 362-71
- Beriajaya, Copeman D.B. (2006): Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis in pen-trials with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. Vet. Parasitol. 135, 315-323
- Biffa D., Jobre Y., Chakka H. (2007): Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Anim Health Res Rev.* 7, 107–118
- **Bishop S.C., Morris C.A. (2007):** Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Rum Res.* 70, 48-59
- Bisset S.A., Vlassoff A., Douch P.G., Jonas W.E., West C.J., 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, 249-63

- Blitz N.M., Gibbs H.C. (1971): An observation on the maturation of arrested *Haemonchus contortus* larvae in sheep. *Can J Comp Med.* 35, 178-80
- Bonfoh B., Zinsstag J., Ankers P., Pangui L.J., Pfister K. (1995): Epidemiology of gastrointestinal nematodes in small ruminants in the plateau areas in Togo. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 48, 321-6
- Bowman D.D. (2004): Georgis Parasitología para Veterinarios. Madrid, Elsevier
- Brandtzaeg P., Fjellanger I., Gjeruldsen S.T. (1968): Immunoglobulin M: local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 160, 789–91
- **Brandtzaeg P. (1974):** Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. *J Immunol.* 112, 1553-9
- **Brandtzaeg P. (2009):** Mucosal Immunity: Induction, Dissemination and Effector functions. *Scand J Immunol.* 70, 505-15
- Bricarello P.A., Gennari S.M., Oliveira-Sequeira T.C. Vaz C.M., Gonçalves de Gonçalves I., Echevarria F.A. (2002): Response of Corriedale and Crioula Lanada sheep to artificial primary infection with *Haemonchus contortus*. Vet Res Commun. 26, 447-57.
- Bricarello P.A, Gennari S.M., Oliveira-Sequeira T.C.G., Vaz C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves I., Echevarria F.A.M. (2004): Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small Rumin Res. 51, 75–83.
- Bricarello P.A., Amarante A.F.T., Rocha R.A., Cabral Filho S.L., Huntley J.F., Houdijk J.G.M., Abdalla A.L., Gennari S.M. (2005): Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet Parasitol.* 134, 99–109.
- Brown W.C., Rice-Ficht A.C., Estes D.M. (1998): Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 63, 45–55.
- Buddle B.M., Jowett G., Green R.S., Douch P.G., Risdon P.L. (1992): Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int J Parasitol.* 22, 955-60
- Buitkamp J.F.P., Stear M.J., Epplen J.T. (1996): Class I and class II major histocompatibility complex alleles are associated with faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitol Res.* 82, 693–696
- Burke J.M., Miller J.E. (2004): Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper, Katahdin, and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United Status. *Small Rumin Res.* 54, 43-51
- Butterworth A.E., Thorne J.I. (1993): Eosinophils and parasitic deseases. In: Immunopharmacology of eosinophils (H. Smith and R.M. Cook, eds.). London, *Academic Press Ltd.*
- Camacho A., Bermejo L.A., Mata J. (2007): Análisis del potencial productivo del Ovino Canario de Pelo. *Archivos de Zootecnia* 56, 507-510
- Canals A., 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., Gasbarre L.C. (1997): Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet Immunol. and Immunopathol.* 58, 63–75

- Capitini L.A., McClure K.E., Herd R.P. (1990): Effect of environmental stimuli on preinfective and infective stages of *Haemonchus contortus* in the northern United States for the induction of hypobiosis. *Vet Parasitol.* 35, 281-93
- Carmichael I., Visser R., Schneider D., Soll M. (1987): Haemonchus contortus resistance to ivermectin. J S Afr Vet Assoc. 58, 93
- Ceuppens J.L., Baroja M.L. (1986): Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol* 137, 1816–1821
- Chiejina S.N., Sewell N.N. (1974): Worm burdens, acquired resistance and live weight gains in lambs during prologed daily infections with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitology* 69, 315-327
- Claerebout E. (2002): The effects of chemoprophylaxis on acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle. *Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* 64, 137-49
- Claerebout E., Vercruysse J. (2000): The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology*. 120, 25-42
- Claerebout E., Hilderson H., Meeus P., De Marez T., Behnke J., Huntley J., Vercruysse 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., Vercruysse J., Dorny P., Demeulenaere D., Dereu A. (1998a): The effect of different infection levels on acquired resistance to gastrointestinal nematodes in artificially infected cattle. *Vet Parasitol*. 75, 153-67
- Claerebout E., Dorny P., Vercruysse J., Agneessens J., Demeulenaere D. (1998b): Effects of preventive anthelmintic treatment on acquired resistance to gastrointestinal nematodes in naturally infected cattle. *Vet Parasitol*. 76, 287-303
- Claerebout E., Dorny P., Agneessens J., Demeulenaere D., Vercruysse J. (1999a): The effect of first season chemoprophylaxis in calves on second season pasture contamination and acquired resistance and resilience to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 80, 289-301
- Claerebout E., Agneessens J., Shaw DJ, Vercruysse J. (1999b): Larval migration inhibition activity in abomasal mucus and serum from calves infected with *Ostertagia ostertagi. Res Vet Sci.* 66, 253-7
- Colditz I.G. (2008): Six costs of immunity to gastrointestinal nematode infections. *Parasite Immunol.* 30, 63-70
- Coltman D.W., Wilson K., Pilkington J.G., Stear M.J., Pemberton J.M. (2001): A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology* 122, 571–582
- Conway D.P. (1964): Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am J Vet Res.* 25, 844-6
- Coop R.L., Kyriazakis I. (2001): Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17, 325-30.
- Costa J.J., Weller P.F., Galli S.J. (1997): The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. *J Am Med Assoc*. 278, 1815-22

- Coyne M.J., Smith G. (1992): The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naive and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *Int J Parasitol.* 22, 315-25.
- Coyne M.J., Smith G., Johnstone C. (1991): A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. *Int J Parasitol*. 21, 847-53
- Craig T.H. (2006): Anthelminthic resistance and alternative control methods. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 22, 567-81
- Crawford A.M., Paterson K.A., Dodds K.G., Díez Tascón C., Williamson P.A., Roberts Thomson M., Bisset S.A., Beattie A.E., Greer G.J., Green R.S., Wheeler R., Shaw R.J., Knowler K., McEwan J.C. (2006): Discovery of quantitative trait loci for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC Genomics* 7, 178-87
- Cutuli M.T. (2007): Inmunidad innata. En: Gómez-Lucía E., et al. (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- Dahlman-Höglund A., Ahlstedt S., Hanson L.A., Dahlgren U., 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 an OA-producing *Escherichia coli*. Clin Exp Immunol. 106, 534-40
- **Dalloul A. (2009):** CD5: A safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun Rev.* 8, 349-353
- Dawkins H.J., Windon R.G., Eagleson G.K. (1989): Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*. 19, 199-205
- de Marez T., Cox E., Claerebout E., Vercruysse J., Goddeeris B.M. (1997): Induction and suppression of lymphocyte proliferation by antigen extracts of *Ostertagia ostertagi*. Vet Immunol Immunopathol. 57, 69-77
- de Veer M.J, Kemp J.M., Meeusen E.N.T. (2007): The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunol*. 29, 1–9
- **Denham D.A.** (1969): The development of *Ostertagia circumcincta* in lambs. *J Helminthol*. 43, 299-310
- **Diebold S.S. (2008):** Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 86, 389-97
- Díez-Baños P., Pedreira J., Sánchez-Andrade R., Francisco I., Suárez J.L., Díaz P., Panadero R., Arias M., Painceira A., Paz-Silva A., Morrondo P. (2008): Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by in vitro and in vivo assays. *J Parasitol.* 94, 925-8
- **Dineen J.K., Wagland B.M. (1966):** The dynamics of the host-parasite relationship. IV. The response of sheep to graded and to repeated infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 56, 639-50
- Dineen J.K., Gregg P., Windon R.G., Donald A.D., 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

- **Dobson R.J., Waller P.J., Donald A.D. (1990a):** 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., Donald A.D., Barnes E.H., Waller P.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, 365-73
- **Dominik S. (2005):** Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep: a review. *Genetics, selection, evolution* 37, 83-96
- Dorny P., Symoens C., Jalila A., Vercruysse J., Sani R. (1995): Strongyle infections in sheep and goats under the traditional husbandry system in peninsular Malaysia. *Vet Parasitol*. 56(1-3), 121-36
- **Douch P.G.** (1988): The response of young Romney lambs to immunization with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int J Parasitol*. 18, 1035-8
- Douch P.G., Harrison G.B., Buchanan L.L., Greer K.S. (1983): In vitro bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol*. 13, 207-212
- Douch P.G., Harrison G.B., Elliott D.C., Buchanan L.L., Greer K.S. (1986): Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. *Vet Parasitol*. 20, 315-31
- Douch P.G.C., Green R.S., Morris C.A., McEwan J.C., Windon R.G. (1996): Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol.* 26, 899–911
- Dunphy J.L., Balic A., Barcham G.J., Horvath A.J., Nash A.D., Meeusen E.N.T. (2000): Isolation and Characterization of a Novel Inducible Mammalian Galectin. *J Biol Chem.* 275, 32106-13
- Dunphy J.L., Barcham G.J., Bischof R.J., Young A.R., Nash A., Meeusen E.N. (2002): Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem.* 277, 14916-24
- **Dunsmore J.D. (1960):** Retarded development of *Ostertagia spp.* in sheep. *Nature* 186, 986-7
- **Dunsmore J.D.** (1963): Effect of removal of an adult population from sheep on concurrently existing arrested larvae. *Aust Vet J.* 39, 459-63
- Dynes R.A., Poppi D.P., Barrell G.K., Sykes A.R. (1998): Elevation of feed intake in parasite-infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. *Br J Nutr.* 79, 47–54
- Eiler H., Baber W., Lyke W.A., Scholtens R. (1983): Inhibition of gastric hydrochloric acid secretions in the rat given *Ostertagia ostertagi* (a gastric parasite of cattle) extract. *Am J Vet Res.* 42, 498-502
- Emery D.L., McClure S.J., Wagland B.M., Jones W.O. (1992): Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: immunization with adult parasites. *Int J Parasitol*. 22, 221-5
- Emery, D.L., Wagland, B.M., McClure, S.J., (1993) Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*. 23, 841–846
- Escobedo G., Roberts C.W., Carrero J.C, Morales-Montor J. (2005): Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21, 588-93

- Esteban, C. (2003): Razas Ganaderas Españolas Ovinas. Madrid. MAPA.
- Eysker M. (1997): Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. *Vet Parasitol.* 265-283
- Eysker M., Ploeger H.W. (2000): Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology* 120, 109-19
- Falcone F.H., Pritchard D.I. (2005): Parasite role reversal: worms on trial. *Trends Parasitol.* 21, 157-60
- Falconer D.S. (1989): Introduction to Quantitative Genetics. Essex. Ed. Longman Scientifical & Technichal
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Animal Production and Health Division. Agriculture Department. (2002): Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. Roma. FAO
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Animal Production and Health Division. Agriculture Department. (2004): Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Roma. FAO
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2007a): Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration. Roma. FAO.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2007b): The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma. Ed. Rischkowsky & D. Pilling
- Fawcett D.W. (1991): Tratado de Histología. Madrid, Ed. McGraw-Hill Interamericana
- Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Morris S.C., Gildea L., Strait R., Madden K.B., Schopf L., Urban J.F. Jr. (2004): Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev.* 201,139-55
- Fleming M.W. (1993): Acute or chronic administration of prolactin alters ovine infections of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 50, 109-15.
- Fleming M.W. (1997): Cortisol as an indicator of severity of parasitic infections of *Haemonchus contortus* in lambs (*Ovis aries*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 116, 41-4
- Fox M.T., Gerrelli D., Pitt S.R., Jacobs D.E., Gill M., Gale D.L. (1989a): Ostertagia ostertagi infection in the calf: effects of a trickle challenge on appetite, digestibility, rate of passage of digesta and liveweight gain. Res Vet Sci. 47, 294–8
- Fox, M. T., Gerrelli, D., Shivalkar, P. & Jacobs, D. E. (1989b). Effect of omeprazole treatment on feed intake and blood gastrin and pepsinogen levels in the calf. *Res Vet Sci.* 46, 280–2
- Fox M.T., Reynolds G.W., Scott I., Simcock D.C., Simpson H.V. (2006): Vagal and splanchnic afferent nerves are not essential for anorexia associated with abomasal parasitism in sheep. *Vet Parasitol* 135, 287-295
- Frankena K. (1987): The interaction between *Cooperia spp.* and *Ostertagia spp.* (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle. Tesis Doctoral. Agricultural University, Wageningen, (Holanda)
- Fritsche T, Kaufmann J, Pfister K. (1993): Parasite spectrum and seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes of small ruminants in The Gambia. *Vet Parasitol*. 49, 271-83

- Fulkerson P.C., Fischetti C.A., McBride M.L., Hassman L.M., Hogan S.P., Rothenberg M.E. (2006): A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31, 16418-23
- Gamble R.H., Zajac A.M. (1992): Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet Parasitol.* 41, 211–225
- García J.A. (2007): Citoquinas. En: Gómez-Lucía E., et al. (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- García-Coiradas L., Angulo-Cubillán F., Valladares B., Martínez E., de la Fuente C., Alunda J.M., Cuquerella M. (2010): Immunization against Lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Vet Med Int.* 2010, 852146
- Gasbarre L. C. (1997): Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Vet Parasitol.* 72, 327-343
- Gauly M., Kraus M., Vervelde L., van Leeuwen M.A., Erhardt G. (2002): Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol*. 106, 55-67
- Gauly M., Schackert M., Hoffmann B., Erhardt G. (2006): Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 113, 178-81
- Geldhof P., Claerebout E., Knox D.P., Jagneessens J., Vercruysse J. (2000): Proteinases released in vitro by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology* 12, 639-47.
- Gibbs H.C. (1986): Hypobiosis and the periparturient rise in sheep. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 2(2), 345-53
- Gibson T.E., Parfitt J.W. (1973): The development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* by lambs under conditions of continuous infection. *Res Vet Sci.* 15, 220-3
- Gill H.S., Watson D.L., Brandon M.R. (1993a): Monoclonal antibody to CD4- T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 78, 43-49
- Gill H.S., Gray G.D., Watson D.L., Husband A.J. (1993b): Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol*. 15, 61-67
- Gill H.S., Altmann K., Cross M.L., Husband, A.J. (2000): Induction of Th1 and Th2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99, 458-63
- Gobierno C.A. de Canarias (2009): "Canarias presenta un estudio genético pionero en todo el mundo sobre el ganado ovino de pelo." En www.seoc.eu, 24 de Julio de 2009
- **Gómez Muñoz M.T. (1996):** Respuesta inmunitaria de algunas razas ovinas españolas a *Haemonchus contortus*. Purificación y evaluación de un antígeno diagnóstico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Gómez-Muñoz M.T., Cuquerella M., de la Fuente C., Gómez-Iglesias L.A., Alunda J.M. (1998): Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in merino and manchego sheep. Relationship to serum antibody response. *Zentralbl Veterinarmed B.* 45, 449-59
- Gómez-Muñoz M.T., Cuquerella M., Gómez-Iglesias L.A., Méndez S., Fernández-Pérez F.J., de la Fuente C., Alunda J.M. (1999): Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. *Vet Parasitol.* 81, 281-93

- González J.F. (2002): Respuesta inmune celular y humoral en la ostertagiosis experimental caprina. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
- González J.F., Molina J.M., Ruiz A., Conde de Felipe M.M., Rodríguez Ponce E. (2003):
 The immune response against gastrointestinal nematodes in rumunants: A review. Research and Reviews in Parasitology 63, 97-115
- Gorrell M.D., Willis G., Brandon M.R., Lascelles A.K., (1988): Lymphocyte phenotypes in the intestinal mucosa of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. Clin Exp Immunol. 72, 274
- Gray C.A., Adelson D.L., Bazer F.W., Burghardt R.C., Meeusen E.N., Spencer T.E. (2004): Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 7982-7
- Greer A.W., Huntley J.F., Mackellar A., McAnulty R.W., Jay N.P., Green R.S., Stankiewicz M., Sykes A.R. (2008): The effect of corticosteroid treatment on local immune responses, intake and performance in lambs infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 38, 1717-28
- **Grovum WL, Phillips GD. (1978):** Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 1. The role of distension, flow-rate of digesta and propulsive motility in the intestines. *Br J Nutr.* 40, 323-36
- Gruner L., Aumont G., Getachew T., Brunel J.C., Pery C., Cognié Y., Guérin Y. (2003): Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Vet Parasitol.* 116, 239-49
- Gruner L., Bouix J., Brunel J.C. (2004): High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Vet Parasitol.* 119, 51-8
- Gulbahar M.Y, Davis W.C., Yarim M., Guvenc T., Umur S., Kabak Y.B., Karayigit M.O., Beyhan Y.E. (2009): Characterization of local immune response against lungworms in naturally infected sheep. *Vet Parasitol*. 160, 272-278
- Gupta V.K., McConnell I., Hopkins J. (1993): Reactivity of the CD11/CD18 workshop monoclonal antibodies in the sheep. *Vet Immunol Immunopathol*. 39, 93–102
- Gutiérrez C.B. (2007): Inmunoglobulinas. En: Gómez-Lucía E., et al. (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid, *Pearson Educación*
- Gutiérrez-Gil B., Pérez J., Álvarez L., Martínez-Valladares M., de la Fuente L.F., Bayón Y., Meana A., San Primitivo F., Rojo-Vázquez F.A., Arranz J.J. (2009): Quantitative trait loci for resistance to trichostrongylid infection in Spanish Churra sheep. *Genet Sel Evol.* 28, 41-46
- Haag E. (1995): The effect of *Haemonchus contortus* excretory/secretory products on abomasal secretion. Tesis Doctoral. Universidad de Hannover
- Haig D.M. Thomson J., Dawson A. (1991): Reactivity of the workshop monoclonal antibodies with ovine bone marrow cells and bone marrow derived monocyte/macrophage and mast cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*. 27, 135
- Halliday A.M., Routledge C.M., Smith S.K., Matthews J.B., Smith W.D. (2007): Parasite loss and inhibited development of *Teladorsagia circumcincta* in relation to the kinetics of the local IgA response in sheep. *Parasite Immunol.*, 29, 425-434
- Harrison G.B., Pulford H.D., Doolin E.E., Pernthaner A., Shoemaker C.B., Hein W.R. (2008): Antibodies to surface epitopes of the carbohydrate larval antigen CarLA are

- associated with passive protection in strongylid nematode challenge infections. *Parasite Immunol.* 30, 577-84
- Hein W.R., Harrison G.B.L. (2005): Vaccines against veterinary helmints. *Vet Parasitol*. 132, 217-22
- Henderson N.G., Stear M.J. (2006): Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunol Immunopahol*. 112, 62-66
- Hertzberg H., Kohler L., Deplazes P., Häcki W.H., Eckert J. (1995): Pathophysiological studies of sheep during the build-up of immunity against *Ostertagia leptospicularis* and after a challenge infection. *Res Vet Sci.* 58, 14-9
- Hewitson J.P., Grainger J.R. Maizels R.M. (2009): Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*. 167, 1-11
- Hielscher A., Brandt H., Erhardt G., Gauly M. (2006): Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhoen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. *Vet Parasitol*. 141, 279-84
- Hilderson H., De Graaf D.C., Vercruysse J., Berghen P. (1993): Characterisation of *Ostertagia ostertagi* antigens by the different bovine immunoglobulin isotypes. *Res Vet Sci.* 55, 203–208
- Holgate S.T. (2008): Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy. 38, 872-97
- Honde C., Bueno L. (1982): *Haemonchus contortus*: egg laying influenced by abomasal pH in lambs. *Exp Parasitol*. 54, 371–8
- Hoste H., Torres Acosta J.F.J., Aguilar Caballero A.J. (2008): Nutrition—parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunol.* 30, 79-88
- Howard C.J., Morrison W.I. (1994): The leukocytes: markers, tissue distribution, and functional characteriazation. En: Goddeeris B.M.L., Morrison W.I. (Eds.). Cell-mediated immunity in ruminants. Boca Raton. *CRC Press*
- Huntley J.F., Newlands G.F., Miller H.R. (1984): The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6, 374-90
- Huntley J.F., Gibson S., Brown D., Smith W.D., Jackson F., Miller H.R. (1987): Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* 9, 603-14
- Huntley J.F., Newlands G.F., Jackson F., Miller H.R. (1992): 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, 429-40
- Huntley J.F., Patterson M., Mackellar A., Jackson F., Stevenson L.M., Coop R.L. (1995): A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. *Res Vet Sci.* 58, 5-10
- Huntley J.F., Schallig H.D.F.H., Kooyman F.N.J., Mackellar A., Jackson F., W.D. 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
- Ishikawa N., Wakelin D., Mahida Y.R. (1997): Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 113, 542-549

- Jackson F., Miller H.R., Newlands G.F., Wright SE., 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, 320-3
- Jackson F., Greer A.W., Huntley J., McAnulty R.W., Bartley D.J., Stanley A., Stenhouse L., Stankiewicz M., Sykes A.R. (2004): Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an in vitro direct challenge method using abomasal tissue explants. *Vet Parasitol.* 124, 73-89
- Jackson J.A., Turner J.D., Kamal M., Wright V., Bickle Q., Else K.J., Ramsan M., Bradley J.E. (2006): Gastrointestinal nematode infection is associated with variation in innate immune responsiveness. *Microbes Infect*. 8, 487-92
- Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashman K, Meeusen EN. (1999): Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-8
- Jain N.C. (1993): Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia. Lea & Febirgen
- Jarret E.E.E., Miller H.R.P. (1982): Production and activities of IgE in helmints infection. *Prog Allergy.* 31, 178-233
- Jarrett W.F.H., Jennings F.W., Mcintyre W.I.M., Mulligan W., Urquhart G.M. (1960): Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection. Immunity produced by the administration of irradiated larvae. *Immunology* 3, 145
- Jeffcoate I.A., Fishwick G., Bairden K., Armour J., Holmes P.H. (1990): Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. *Res Vet Sci.* 48, 295-300
- Jones W.O., Window R.G., Steel J.W., Outteridge 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, 1075-9
- Jones W.O., Emery D.L., McClure S.J., 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
- Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Weber S.S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A., Mäser P. (2008): A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176-180
- Kanaya T., Aso H., Miyazawa K., Kido T., Minashima T., Watanabe K., Ohwada S., Kitazawa H., Rose M.T., Yamaguchi T. (2007): Staining patterns for actin and villin distinguish M cells in bovine follicle-associated epithelium. *Res Vet Sci.* 82, 141-9
- Karanu F.N., McGuire T.C., Davis W.C., Besser T.E., Jasmer D. P. (1997): CD4-T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19, 435-445
- Kassai T. (1999): Veterinary Helminthology. Oxford. Butterworth-Heinemann
- Kelly J.D., Whitlock H.V., Thompson H.G., Hall C.A., Martin I.C., Le Jambre L.F. (1978): Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. *Res Vet Sci.* 25, 376-85

- Kemp J.M., Robinson N.A., Meeusen E.N., Piedrafita D.M. (2009): The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. *Int J Parasitol*.39, 1589-94
- Khan W.I., Abe T., Ishikawa N., Nawa Y., 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 Immunol.* 17, 485-91
- Khan W.I., Collins S.M. (2004): Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol.* 26, 319-26
- Khan, W.I., Collins S.M. (2006): Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol* 143, 389-97
- Klion A.D., Nutman T.B. (2004): The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113, 30-37
- Knox M.R., Steel J.W. (1999): The effects of urea supplementation on production and parasitological responses of sheep infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol*. 83, 123–135
- Knox D.P., Smith W.D. (2001): Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet Parasitol.* 100, 21-32
- Knox D.P., Redmond D.L., Newlands G.F., Skuce P.J., Pettit D., Smith W. D. (2003): The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int J Parasitol*. 33, 1129–1137
- Kobayashi K., Hamada Y., Blaser M.J., 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
- Kooyman F.N.J., Van Kooten P.J.S., Huntley J. F., Mackellar Q.A., Cornelissen A.W.C.A., Schallig H.D.F.H. (1997): Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology* 114, 395-406
- Koyama K., Tamauchi H., Ito Y. (1995): The role of CD4- and CD8- T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunol*. 17, 161-165
- Kuijk L.M., van Die I. (2010): Worms to the rescue: can worm glycans protect from autoimmune diseases? *IUBMB Life*, 62, 303-12
- Kulka M., Alexopoulou L., Flavell R.A., Metcalfe D.D. (2004): Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through toll-like receptor-3 (TLR-3). *J Allergy Clin Immunol.* 114, 174–182
- Lacroux C. (2006): Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly. Tesis Doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse
- Lacroux C., Nguyen T.H., Andreoletti O., Prevot F., Grisez C., Bergeaud J.P., Gruner L., Brunel J.C., Francois D., Dorchies P., Jacquiet P. (2006): *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res.* 37, 607-22
- Langrová I., Makovcová K., Vadlejch J., Jankovská I., Petrtýl M., Fechtner J., Keil P., Lytvynets A., Borkovcová M. (2008): Arrested development of sheep strongyles: onset and resumption under field conditions of Central Europe. *Parasitol Res.* 103, 387-92

- Lantz C.S., Boesiger J., Song C.H., Mach N., Kobayashi T., Mulligan R.C., Nawa Y., Drnoff G., Galli S.J. (1998): Role for interleukin-3 in mast-cell and basophile development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90-3
- Lawton D. E. B., Reynolds G. W., Hodgkinson S. M., Pomroy W. E., Simpson H. V. (1996): Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: effects on abomasal pH and serum gastrin and pepsinogen. *Int J Parasitol* 26, 1063–1074
- Le Jambre L.F., Southcott W.H., Dash K.M. (1976): Resistance of selected lines of *Haemonchus contortus* to thiabendazole, morantel tartrate and levamisole. *Int J Parasitol*. 6, 217-22
- Lee D.L. y Martin J., (1976): Changes in *Nematodirus battus* associated with the development of immunity to this nematode in lambs. En: H. Van den Bosche (Ed.). Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships. Amsterdam. *Elsevier North Holland*
- Li Y., Miller J.E., Franke D.E. (2001): Epidemiological observations and heterosis analysis of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk, Gulf Coast Native, and crossbred lambs. *Vet Parasitol.* 98, 273-83
- Lindqvist A., Ljungström B.L., Nilsson O., Waller P.J. (2001): The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Vet Scand.* 42, 377-89
- Maclean J.M., Lewis D., Holmes P.H. (1987): Studies on the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Pathol.* 97, 645-52
- MacKinnon K.M., Burton J.L., Zajac A.M., Notter D.R. (2009): Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 130, 210-20
- MacKinnon K.M., Zajac A.M., Kooyman F.N., Notter D.R. (2010): Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. *Parasite Immunol.* 32, 484-93
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1989): Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. London. H. M. S. O.
- Mahieu M., Aumont G. (2009): Effects of sheep and cattle alternate grazing on sheep parasitism and production. *Trop Anim Health Prod.* 41, 229-39
- Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. (2004): Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev.* 201, 89-116
- Mandonnet N., Ducrocq V., Arquet R., Aumont G. (2003): Mortality of Creole kids during infection with gastrointestinal strongyles: a survival analysis. *J Anim Sci.* 81, 2401-8
- Marshall K., Maddox J.F., Lee S.H., Zhang Y., Kahn L., Graser H.U., Gondro C., Walkden-Brown S.W., van der Werf J.H. (2009): Genetic mapping of quantitative trait loci for resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Anim Genet.* 40, 262-72
- Martínez-González B., Diez-Baños N., Rojo-Vázquez (1998): An epidemiological study of gastrointestinal parasitism in dairy sheep flocks in León (NW Spain). *Small Rumin Res.* 27, 25-30
- Martínez Valladares M., Vara del Río M.P., Cruz Rojo M.A., Rojo Vázquez F.J. (2005a): Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Inmunol*. 27, 213-18

- Martínez Valladares M., Vara del Río M.P., Cruz Rojo M.A., Rojo Vázquez F.J. (2005b): Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcineta*. 27, 219-25
- Matika O., Nyoni S., van Wyk J.B., Erasmus G.J., Baker R.L. (2003): Resistance of Sabi and Dorper ewes to gastro-intestinal nematode infections in an African semi-arid environment. *Small Rumin Res.* 47, 95-102
- McClure S.J., Emery D.L. (1994): Cell-mediated responses against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. En: Goddeeris B.M.L., Morrison W.I. (Eds.). Cell-mediated immunity in ruminants. Boca Raton. *CRC Press*
- McClure S.J., Emery D.L., Wagland B.M., Jones W.O. (1992): A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int J Parasitol.* 22, 227-234
- McClure S.J., Davey R.L., Emery D.L., Colditz I.G., Lloyd J.B. (1996): In vivo depletion of T-cells and cytokines during primary exposure of sheep to parasites. *Vet Immunol Immunopathol*. 54, 83-90
- McClure S.J. (2009): Mucosal delivery of native and recombinant protein vaccines against *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*. 39, 599-606
- McCririe L., Bairden K., Britton C., Buitkamp J., McKeand J.B., Stear M.J. (1997): Heterogeneity in the recognition of *Ostertagia circumcincta* antigens by serum antibody from mature, infected sheep. *Parasite Immunol.* 19, 235–242
- McKay D.M., Bienenstock J. (1994): The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today*. 15, 533-8
- McKenzie G.J., Bancroft A., Grencis R.K., McKenzie A.N. (1998): A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Curr Biol.* 8, 339-42
- McLeod R.S. (2004): Economic impact of worm infections in small ruminants in South East Asia, India and Australia. En: Sani R.A., Gray G.D., Baker R.L. (Eds.). Worm Control of Small Ruminants in Tropical Asia. ACIAR Monograph
- McNeilly T.N., Brown J.K., Harkiss G. (2006): Differential Expression of Cell Surface Markers by Ovine Respiratory Tract Dendritic Cells. *J Histochem Cytochem*. 54, 1021-1030
- McNeilly T.N., Devaney E., Matthews J.B. (2009): *Teladorsagia circumcincta* in the sheep abomasums: defining the role of dendritic cells in T cell regulation and protective immunity. *Parasite Immunol.* 31, 347-356
- Meana A., Rojo F.A. (1999): Parasitosis de los rumiantes. Tricostrongilidosis y otras nematodosis. En: Cordero del Campillo M. et al. (Eds.). Parasitología Veterinaria. Madrid. Ed. McGraw-Hill Interamericana
- Medzhitov R., Janeway Jr. C.A. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–298
- Meeusen E.N.T., Balic A. (2000): Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? *Parasitol Today*. 16, 95-101
- Meeusen E.N.T., Brandon M.R. (1994): Antibody secreting cells as specific probes for antigen identification. *J Immunol Methods*. 172, 71-6
- Meeusen E.N.T., Piedrafita D. (2003): Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int J Parasitol*. 33, 1285–1290

- Meeusen E.N.T., Gorrell M.D. Rickard M.D., Brandon M.R. (1989): Lymphocyte subpopulations of sheep in protective immunity to *Taenia hydatigena*. *Parasite Immunol*. 11, 169-181
- Meeusen E.N.T., Balic A., Bowles V. (2005): Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol*. 108, 121-5
- Menzies M, Ingham A. (2006): Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol*. 109, 23-30
- Metcalfe D. D. (2008): Mast cells and mastocytosis. Blood 112, 946-56
- 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. (1973): Acquired resistance to Ostertagia infection. Proc R Soc Med. 66, 778
- Michel J.F., Lancaster M.B., Hong C. (1973): Host induced effects on the vulval flap of Ostertagia ostertagi. Int J Parasitol. 2, 305-17
- Miller H.R., Jackson, F., Newlands G., Appleyard W.T. (1983): Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode *H. Contortus. Res Vet Sci.* 35, 357-363.
- Miller H.R.P. (1984): The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet Immunol Immunopathol.* 6, 167-259
- Miller H.R.P. (1987): Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94, 77-100.
- Miller H.R.P. (1996): Mucosal mast cells and allergic response against nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol.* 54, 331-6
- Miller J.E., Bahirathan M., Lemarie S.L., Hembry F.G., Kearney M.T., Barras S.R. (1998): Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol.* 74, 55–74
- Miller J.E., Horohov D.W. (2006): Immunological aspects of nematode control in sheep. *J Anim Sci.* 84 (E sup.), E124-E132
- Molina J.M., Hernández Y., Ruiz A., González J.F., Argüello A., Ferrer O., Forbes A.B. (2009): Preliminary study on the use of a *Teladorsagia circumcincta* bulk milk ELISA test in dairy goats under experimental conditions. *Vet Parasitol*. 166, 228-34
- Mugambi J.M., Wanyangu S.W., Bain RK., Owango M.O., Duncan J.L., Stear M.J. (1996): Response of Dorper and red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Res Vet Sci.* 61, 218-21
- Mugambi J.M., Audho J.O., Njomo S., Baker R.L. (2005): Evaluation of the phenotypic performance of a Red Maasai and Dorper double backcross resource population: indoor trickle challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 127, 263-75
- Muñoz-Guzmán M.A., Cuéllar-Ordaz J.A., Valdivia-Anda A.G. Buendía-Jiménez J.A., Alba-Hurtado F. (2006): Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. *Can J Anim Sci.* 86, 363-71
- Nawa Y., Ishikawa N., Tsuchiya K., Horii Y., Abe T., Khan A.I., Bing-Shi, Itoh H., Ide H., Uchiyama F. (1994): Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite Immunol.* 16, 333-8

- Newton S.E., Meeusen E.N.T. (2003): Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites in sheep. *Parasite Immunol.* 25, 283-96
- Ng'ang'a C.J., Maingi N., Munyua W.K., Kanyari P.W. (2004): Epidemiology of gastrointestinal helminths infections in Dorper sheep in a semi-arid area of Kenya. *Onderstepoort J Vet Res.* 71, 219-26
- Nicholas, F. W. (1987): Veterinary Genetics. Oxford. Oxford University Press
- Nicoletti C. (2000): Unsolved mysteries of intestinal M cells. Gut 47, 735-9
- Nimbkar C., P. M. Ghalsasi P.M., Swan A.A., Walkden-Brown .S.W., Kahn L.P. (2003): Evaluation of growth rates and resistance to nematodes of Deccani and Bannur lambs and their crosses with Garole. *Anim. Sci.* 76, 503-15
- Orden de 13 de agosto de 2001, por la que se regulan determinados aspectos en materia de Libros Genealógicos. Gobierno de Canarias. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.
- Orden de 21 de mayo de 2003, por la que se aprueban las reglamentaciones específicas de los libros genealógicos de las razas bovina canaria y ovina palmera. Gobierno de Canarias. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
- Orden de 12 de junio de 2006, por la que se aprueba la Reglamentación Específica del Libro Genealógico de la Raza Ovina Canaria. Gobierno de Canarias. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
- Owen R.L. (1999): Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches. A personal and historical perspective. *Semin Immunol.* 11, 157-63
- Paterson K.A., McEwan J.C., Dodds K.G., Morris C.A., Crawford A.M. (2001): Fine Mapping a locus affecting host resistance to internal parasites in sheep. *Proceedings of the Association for Advancement in Animal Breeding and Genetics*, 30 July–2 August, 2001, Queenstown, NewZealand. Vol. 13, 91–94
- **Peña M.T., Miller J.E., Horohov D.W. (2004):** Effect of dexamethasone treatment on the immune response of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol.* 119, 223–235
- **Peña M.T., Miller J.E., Horohov D.W. (2006):** Effect of CD4⁺ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol*. 138, 240-6
- Pérez J., García P.M., Hernández S., Martínez-Moreno A., Cámara S. (2001): Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in gotas experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Res. 32, 463-73
- Pérez J., García P.M., Hernández S., Mozos E., Cámara S., Martínez-Moreno A. (2003): Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Vet Parasitol.* 111, 333-42
- Pérez J., Zafra R., Buffoni L., Hernández S., Cámara S., Martínez-Moreno A. (2008): Cellular Phenotypes in the Abomasal Mucosa and Abomasal Lymph Nodes of Goats Infected with *Haemonchus contortus*. *J Comp Pathol*. 138, 102-7
- **Pernthaner A., Vlassoff A., Douch P.G., Maass D.R. (1997):** Cytokine mRNA and IFN-γ production in nematode resistant and susceptible line lambs artificially infected with gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitol.* 42, 55–61

- Pernthaner A., Cole S.A., Morrison L., Hein W.R. (2005): Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alphagenes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect Immun.* 73, 2175–2183
- Pernthaner A., Cole S.-A., Morrison L., Green R., Shaw R.J., Hein W.R. (2006): Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 114, 135-148
- Perry B.D., Randolph T.F. (1999): Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Vet Parasitol.* 84, 145-68
- Pfeffer A., Douch P.G., Shaw R.J., Gatehouse T.K., Rabel B., Green R.S., Shirer C.L., Jonas W.E., Bisset S. (1996): Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. *Int J Parasitol*. 26, 765-773
- Piedrafita D., González J.F., Estuningsih E., Spithill T.W., Meeusen E.N.T., Raadsma H.W. (2008): Parasite disease resistance: can we exploit ovine breeds for parasite protective genes? *X European Multicolloquium of Parasitology*. París
- Piedrafita, D.; González, J.F.; Raadsma, H.W.R.; Meeusen, E.N.T. (2010): Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? *Trends Parasitol.* 26, 568-73
- Ploeger H.W., Kloosterman A., Borgsteede F.H., Eysker M. (1990): 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
- Pomroy W.E., Charleston W.A. (1989): Development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Vet Parasitol.* 33, 283-8
- Preston J.M., Allonby E.W. (1978): The influence of breed on the susceptibility of sheep and goats to a single experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Vet Rec*. 103, 509-512
- Preston J.M., Allonby E.W. (1979): The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infections. *Res Vet Sci.* 26, 134-139
- **Pritchard D.I.** (1993): Immunity to helminths: is too much IgE parasite- rather than host-protective? *Parasite Immunol.* 15, 5-9
- Raadsma H.W., Tammen I., (2005): Biotechnologies and their potential impact on animal breeding and production: a review. *Aust J Exp Agric*. 45, 1021-32
- Raadsma H.W., Maragawati E.T., Piedrafita D., Estuningsih E., Widjajanti S., Beriajaya, Subnadryio, Thompson P., Spitthill T.S. (2002): Towards molecular genetic characterisation of high resistance to internal parasites in Indonesian thin tail sheep. *Proc. 7thWorld Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, 19–23 August, 2002, Inra, Castanet-Tolosan, France, Communication 13-19*
- Raadsma H.W., Fullard K.J., Kingsford N.M., Margawati E.T., Estuningsih E., Widjayanti S., Subandriyo, Clairoux N., Spithill T.W., Piedrafita D. (2008): Ovine Disease Resistance: Integrating Comparative and Functional Genomics Approaches in a Genome Information-Poor Species. En: Gustafson et al. (Eds.): Genomics of Disease. Springer Science+Business Media, LLC
- Ractliffe L.H., Le Jambre L.F., (1971): Increase of rate of egg production with growth in some intestinal nematodes of sheep and horses. *Int J Parasitol*. 1, 153-156

- Radhakrishnan C.V., Bradley R.E. Sr, Loggins P.E. (1972): Host responses of worm-free Florida native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Am J Vet Res.* 33, 817-23
- Rainbird M.A., Macmillan D., Meeusen E.N. (1998): Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* 20, 93-103
- RD 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- Redmond D.L., Knox D.P. (2004): Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252-61
- Requejo-Fernández J.A., Martínez A., Meana A., Rojo-Vázquez F.A., Osoro K., Ortega-Mora L.M. (1997): Anthelmintic resistance in nematode parasites from goats in Spain. Vet Parasitol. 73, 83-8
- Riley D.G., van Wyk J.A. (2009): Genetic parameters for FAMACHA® score and related traits for host resistance/resilience and production at differing severities of worm challenge in a Merino flock in South Africa. *Vet Parasitol*. 164, 44-52
- Roberts F.H.S. (1957): Reactions of calves to infestation with the stomach worm *Haemonchus placei*. Aust J Agric Res. 8, 740-747
- Robinson N., Piedrafita D., Snibson K.K., Harrison P., Meeusen E.N. (2010): Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunisation and challenge with *H. contortus. Vet Res.* 41, 37
- Robinson N., Pleasance J., Piedrafita D., Meeusen E.N. (2011): The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*. 41, 487-493
- Romjali E., Pandey V.S., Batubara A., Gatenby R.M., Verhulst A. (1996): Comparison of resistance of four genotypes of rams to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 65, 127-137
- Roos M.H., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra J.G., Lenstra J.A.. (2004): Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*. 34, 109-15
- Rothenberg M.E., Hogan S.P. (2006): The Eosinophil. Annu Rev Immunol. 24, 147-74
- **Rothwell T.L.W. (1989):** Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int J. Parasitol.* 19, 139-168
- Rotman H.L., Schnyder-Candrian S., Scott P., Nolan T.J., Schad G.A., Abraham D. (1997): IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval Strongyloides stercoralis. Parasite Immunol. 19, 29-39
- Rowe A., McMaster K., Emery D., Sangster N. (2008): *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet Parasitol.* 153, 285-93
- Ryan S., Tiley L., McConnell I., Blacklaws B. (2000): Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus, *J Virol* 74, 10096–10103
- Sackett D., Holmes P., Abbott K., Jephcott S. and M. Barber M. (2006): Assessing the economic cost of endemic disease on profitability of Australian beef cattle and sheep producers (final report). Sydney. *Meat and Livestock Australia*

- Saddiqi H.A., Iqbal Z., Khan M.N., Sarwar M., Muhammad G., Yaseen M., Jabbar A. (2010): Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 168, 141-5
- Salma S.K., Duncan J.L. (1984): The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 16, 43-54
- Salinas J. (2007): Inmunidad frente a agentes eucariotas patógenos. En: Gómez-Lucía E., *et al.* Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- Sangster, N. (2009): Managing novel anthelmintics. *Pfizer Symposium*. 22nd international Conference of the World Association in Advances in Parasitology. Calgary. Canadá
- Sayers G., Sweeney T. (2005): Gastrointestinal nematode infection in sheep-a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim Health Res Rev.* 6, 159-71
- **Schallig H.D.F.H.** (2000): Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120, S63-72
- Schallig H.D.F.H., van Leeuwen M.A.W., Hendrikx W.M.L. (1994): Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 108, 351–357
- Schallig H.D.F.H., van Leeuwen M.A.W., Hendrikx W.M.L. (1995): Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol*. 56 149-162
- Scherf B.D. (2000): World watch list for domestic animal diversity, 3rd Ed. Roma. FAO
- Schwaiger F.W., Gostomski D., Stear M.J., Duncan J.L., McKellar Q.A., Epplen J.T., Buitkamp J. (1995): An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int J Parasitol*. 25, 815–822
- Scott I., Hodgkinson S.M., Khalaf S., Lawton D.E.B., Collett M.G., Reynolds G.W., Pomroy, W.E. Simpson, H.V. (1998a). Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *Int J Parasitol* 28, 1383–92
- Scott I., Stear M.J., Irvine J., Dick A., Wallace D. S., Mckellar Q.A. (1998b): Changes in the zymogenic cell populations of the abomasa of sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 116, 569–77
- Seaton D.S., Jackson F., Smith W.D., Angus K.W (1989a): Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with *Ostertagia circumcincta*. *Res Vet Sci.* 46, 241-6
- Seaton D.S., Jackson F., Smith W.D., Angus K.W (1989b): Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with *Trichostrongylus vitrinus*. *Res Vet Sci.* 46, 22-6
- Sedgmen B.J., Meeusen E.N., Lofthouse S.A. (2004): Alternative routes of mucosal immunization in large animals. *Immunol Cell Biol.* 82, 10-6
- **Serrano E., Uceda A. (2007):** Hipersensibilidad. En: Gómez-Lucía E., *et al.* (Eds.). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. *Pearson Educación*
- Shakya K.P., Miller J.E., Horohov D.W. (2009): A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet Parasitol*. 163, 57-66

- Shaw R., Pfeffer A., Bischof R. (2009): Ovine IgE and its role in immunological protection and disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 132, 131-40
- Shelton G.C., Griffiths H.J. (1967): *Oesophagostomum columbianum:* experimental infections in lambs. Effects of different types of exposure on the intestinal lesions. *Pathol Vet.* 4, 413-34
- **Simpson H.V. (2000):** Pathophisiology of abomasal parasitism: Is the host or the parasite responsible? *Vet J.* 160, 177-91
- Simpson H.V., Lawton, D.E.B., Simcock D.C., Reynolds G.W., Pomroy W. E. (1997): Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *Int J Parasitol*. 27, 825–31
- Smith D., Taylor S. (2009): Twist and turns en route to vaccine for *Haemonchus contortus*. 22nd International Conference of the World Association in Advances in Veterinary Parasitology. Calgary. Canadá
- Smith W.D., Christie M.G. (1979): *Haemonchus contortus*: some factors influencing the degree of resistance of sheep immunized with attenuated larvae. *J Comp Pathol.* 89, 141-150
- Smith W.D., Jackson F., Jackson E., Williams J., Willadsen S.M., Fehilly C.B. (1984): Resistance to *Haemonchus contortus* transferred between genetically histocompatible sheep by immune lymphocytes. *Res Vet Sci.* 37, 199-204
- Smith W.D., Jackson F., Jackson E., Williams J. (1985a): Ovine ostertagiasis: a natural host parasite interaction for studying protective local immune responses in the gut. En: Morris B. y Miyasaca M. (Eds.) Immunology of the sheep. Basilea. *Editiones Roche*
- Smith W.D., Jackson F., Jackson E., Williams J. (1985b): Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the immune local responses of 4 1/2 and 10-month old lambs. *J Comp Pathol.* 95, 235-45
- Smith W.D., Jackson F., Jackson E, Graham R., Williams J. (1986): Transfer of immunity to *Ostertagia circumcincta* and IgA memory between identical sheep by lymphocytes collected from gastric lymph. *Res Vet Sci.* 41, 300-306
- Sopp P., Howard C.J., Parsons K.R. (1991): Investigating monoclonal antibodies to "null" cell antigens using two-colour immunofluorescence. *Vet Immunol Immunopathol.* 27, 163
- Soulsby E.J.L. (1987): Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México D.F. *McGraw Hill Interamericana*
- Stankiewicz M., Jonas W.E., Douch P.C.G., Rabel B., Bisset S., Cabaj W. (1993): Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J Parasitol.* 79, 940–945.
- Stear M.J., Bishop S.C. (1999): The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol*. 29, 777-80
- Stear M.J., Bairden K., Duncan J.L., Murray M. (1995a): 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., Doligalska M., Duncan J.L., Holmes P.H., Irvine J., McCririe L., McKellar Q.A., Sinski E., Murray M. (1995b): Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol*. 17, 643-52
- Stear M.J., Bairden K., Duncan J.L., Gettinby G., Mckellar Q.A., Murray M., Wallace D. (1995c): The distribution of fecal nematode egg counts in Scottish Blackface lambs

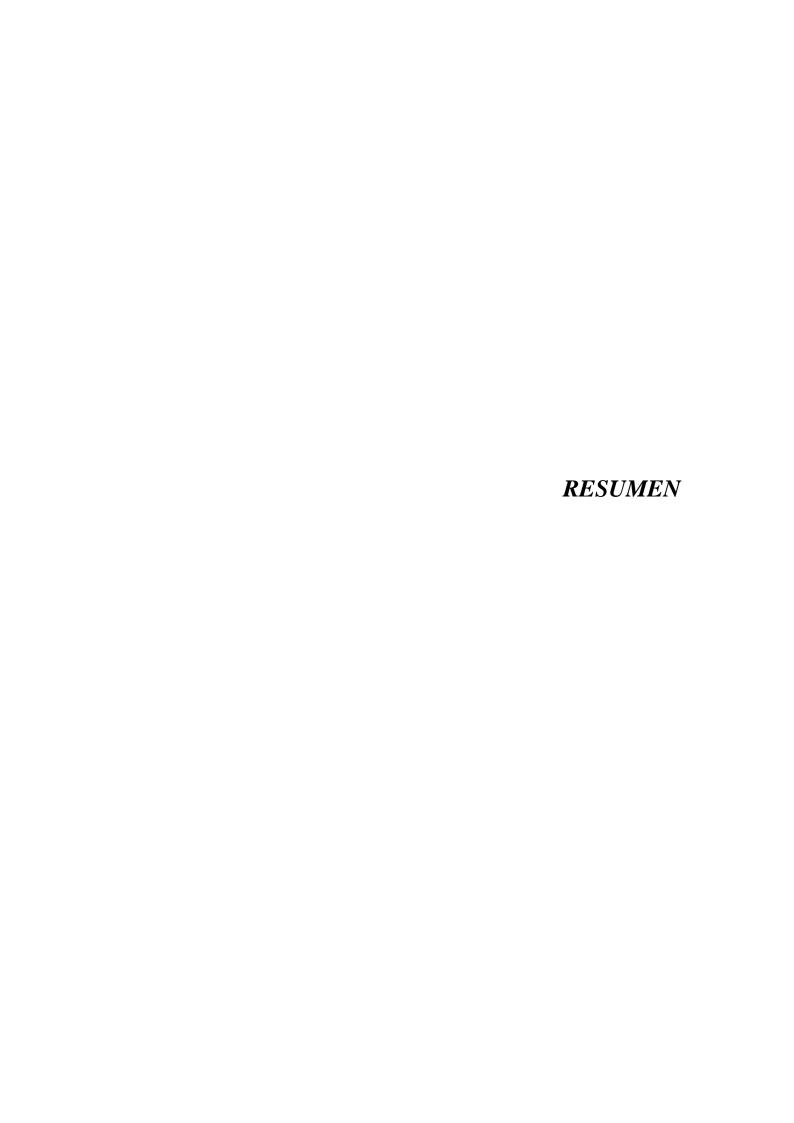
- following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology* 110, 173-581
- Stear M.J., Park M., Bishop S.C. (1996): The key components of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Parasitol Today*. 12, 438–441
- Stear M.J., Bairden K., Bishop S,C., Gettinby G., Mckellar Q.A., Park M., Strain S., Wallace D.S. (1998): The processes influencing the distribution of parasitic nematodes among naturally infected lambs. *Parasitology* 117, 165-171
- Stear M.J., Strain, S.A.J., Bishop S.C. (1999): Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *Int J Parasitol*. 29, 51–56
- Stear M.J, Mitchell S., Strain S., Bishop S.C., McKellar Q.A. (2000a): The influence of age on the variation among sheep in susceptibility to natural nematode infection. *Vet Parasitol*. 89, 31-6
- Stear M.J., Bairden K., Duncan J.L., Eckersall P.D., Fishwick G., Graham P.A., Holmes P.H., McKellar Q.A., Mitchell S., Murray M., Parkins J.J., Wallace D.S. (2000b): The influence of relative resistance and urea-supplementation on deliberate infection with *Teladorsagia circumcincta* during winter. *Vet Parasitol.* 94, 45–54
- Stear M.J., Bishop S.C., Mallard B.A., Raadsma H. (2001): The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res Vet Sci.* 71, 1-7
- Stear M.J., Henderson N.G., Kerr A., McKellar Q.A., Mitchell S., Seeley C., Bishop S.C. (2002): Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish Blackface lambs. *Parasitology*, 124, 553-60
- Stear M.J., Innocent G.T., Buitkamp J. (2005): The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex. *Vet Immunol Immunopathol*. 108, 53–57
- Stear M.J., Doligalska M., Donskow-Schmelter K. (2007): Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134, 139-151
- Steel J.W., Jones W.O., 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, 1067-73
- Stevenson L.M., Huntley J.F., Smith W.D., Jones D.G. (1994): Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections of lambs. FEMS Immunol Med Microbiol. 8, 167-73
- Strain S.A.J., Stear M.J. (2001): The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol*. 23, 527-31
- Strain S.A.J., Bishop S.C., Henderson N.G., Kerr A., McKellar Q.A., Mitchell S., Stear M.J. (2002): The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 124, 545–552
- Subandriyo (2002): Indonesian thin tail sheep performances on production, reproduction, their resistance to internal parasites, and the efforts to improve their productivity. En: Workshop on Sustainable Parasite Control and Anhelmintic Resistance. Research Institute of Veterinary Sciences. Bogor, Indonesia, 9–10 September 2002
- Sykes A.R., 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 Res.* 88, 671–7

- Taberlet P., Valentini A., Rezaei H.R., Naderi S., Pompanon F., Negrini R., Ajmone-Marsan P. (2008): Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol Ecol.* 17, 275-84
- Tapio I., Arv S.V., Bennewitz J., Maleviciute J., Fimland E., Grislis Z., Meuwissen T.H.E., Miceikiene I., Olsaker I., Viinalass H., Vilkki J., Kantanen J. (2006): Prioritization for conservation of northern european cattle breeds based on analysis of microsatellite data. Conserv Biol. 20, 1769-79
- Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L. (2007): Veterinary Parasitology. Oxford. *Blackwell Publishing*
- Terefe G., Lacroux C., Andreoletti O., Grisez C, Prevot F, Bergeaud J.P., Penicaud J, Rouillon V., Gruner L., Brunel J.C., Francois D., Bouix J., Dorchies P., Jacquiet P. (2007a): Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol.* 29, 415-24
- Terefe G., Grisez C., Prevot F., Bergeaud J.P., Dorchies P., Brunel J.C., François D., Fourquaux I., Jacquiet P. (2007b): *In vitro* pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Vet Res.*, 38, 647-54
- Terefe G., Lacroux C., Prévot F., Grisez C., Bergeaud J.P., Bleuart C., Dorchies P., Foucras G., Jacquiet P. (2009): Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. *Vet Parasitol.* 165, 1-4
- Thatcher E.F., Gershwin L.J., Baker N.F. (1989): Levels of serum IgE in response to gastro-intestinal nematodes in cattle. *Vet Parasitol*.32, 153-61Tizard I. (2000): Inmunología veterinaria. México D.F. *Mcgraw Hill*
- Turner D.G., Wildblood L.A., Inglis N.F., Jones D.G. (2008): Characterization of a galectin-like activity from the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, which modulates ovine eosinophil migration in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*. 122, 138-45
- Urban J.J.Jr., Katona, I.M., Finkelman, F.D. (1991): *Heligmosomoides polygyrus*: CD4-but not CD8- T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. *Exp Parasitol*. 73, 500-511
- Urban J.F. Jr., Madden K.B., Svetic A., Cheever A., Trotta P.P., Gause W.C., Katona I.M., Finkelman F.D. (1992): The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev.* 127, 205–220
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1996): Veterinary Parasitology. Oxford. *Blackwell Science Ltd*.
- Valcárcel F., Cerdeño A., Mateos J.J., Martín P., Muñoz T., Olmeda A.S., Rojo Vázquez F.A. (2005): ¿Damos la suficiente importancia a los nematodos gastrointestinales en las explotaciones ovinas? *XI Jornadas sobre Produccion Animal*. Zaragoza, 11-12 Mayo, 2005. p 870-872
- Valderrábano J., Gómez-Rincón C., Uriarte J. (2006): Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Vet Parasitol*. 141, 122-31
- Vallance B.A., Blennerhassett P.A., Collins S.M. (1997): Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode infected mice. *Am J Physiol.* 272, 321–327
- Vallance B.A., Croitoru K., Collins S.M. (1998): T lymphocyte-dependent and independent intestinal smooth muscle dysfunction in the *T. spiralis*-infected mouse. *Am J Physiol.* 275, 1157-1165

- Vallance B.A., Matthaei Y., Young S.M. Blennerhassett K. I. Deng I.G. Collins P. A. (1999): IL-5 contributes to worm expulsion and muscle hypercontractility in a primary *T. spiralis* infection. *Am J Physiol*. 277, 400-8
- van der Waaij E.H., van Arendonk J.A.M. (1999): Introgression of genes responsible for disease resistance in a cattle population selected for production: genetic and economic consequences. *Anim. Sci.* 70, 207–220
- van Wyk J.A. (2001) Refugia overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res.* 68, 55-67
- van Wyk J.A., Hoste H., Kaplan R. M., Besier R.B. (2006): Targeted selective treatment for worm management—How do we sell rational programs to farmers? *Vet Parasitol*. 139, 336-46
- Vanhoutte F., Breuilh L., Fontaine J., Zouain C.S., Mallevaey T., Vasseur V., Capron M., Goriely S., Faveeuw C., Ryffel B, Trottein F. (2007): Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control Schistosoma mansoni infection and pathology. Microbes Infect. 9, 1606-13
- Vanimisetti H.B., Andrew S.L., Zajac A.M., Notter D.R. (2004a): Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *J Anim Sci* 82, 1602-1611
- Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004b): Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to *Haemonchus contortus*. *J Anim Sci.* 82, 595-604
- Veglia F. (1915): The Anatomy and Life History of Haemonchus contortus (Rud.), 3rd and 4th Reports of the Director of Vet Res., pp. 347-500. South Africa. Department of Agriculture
- Vervelde L., Van Leeuwen M.A., Kruidenier M., Kooyman F.N., Huntley J.F., Van Die I., Cornelissen A.W. (2002): Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol*. 24, 189-201
- Vlassoff A., Leathwick D.M., Heath A.C. (2001): The epidemiology of nematode infections of sheep. N Z Vet J. 49, 213-21.
- Voigt G.L. (2003): Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. Zaragoza. *Ed. Acribia*
- Von Sammson-Himmelstjerna G., Harder A., Sangster N.C., Coles G.C. (2005): Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology* 130, 243-7
- Waller P.J. (1997): Anthelmintic resistance. Vet Parasitol. 72, 391-412
- Waller P.J. (1997b): Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet Parasitol*. 71, 195-207
- Waller P.J., Schwan O., Ljungström B.L., Rydzik A., Yeates G.W. (2004): Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Vet Parasitol*. 126, 299–315
- Waller P.J., Chandrawathani P. (2005): *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics Polar Circle. Problems and prospects for controlbased on epidemiology. *Trop Biomed*. 22, 131–137
- Wang C.R., Qiu J.H., Zhu X.Q., Han X.H., Ni H.B., Zhao J.P., Zhou Q.M., Zhang H.W., Lun Z.R. (2006): Survey of helminths in adult sheep in Heilongjiang Province, People's Republic of China. *Vet Parasitol*. 140, 378–382

- Wang H.W., Tedla N., Lloyd A.R., Wakefield D., Mcneil P.H. (1998): Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest*. 102, 1132-41
- Weller P.F. (1997): Human eosinophils. *J All Cli Immunol*. 100, 283-287
- Werling D., Piercy J., Coffey T.J. (2006): Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Vet Immunol Immunopathol*. 112, 2-11
- Wiggin C.J., Gibbs H.C. (1990): Adverse immune reactions and the pathogenesis of *Ostertagia ostertagi* infections in calves. *Am J Vet Res.* 51, 825-32
- Wildblood L.A., Kerr K., Clark D.A.S., CameronA., Turner D.G., Douglas Jones D.G. (2005): Production of eosinophil chemoattractant activity by ovine gastrointestinal nematodes. *Vet Immunol Immunopathol.* 107 57–65
- Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben T.Y., Karp C.L., Donaldson D.D. (1998): Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 282, 2258-61
- Winter M.D., Wright C., Lee D.L. (1997): The mast cell and eosinophil response to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitology* 114, 189-93
- Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M., Vercruysse J. (1995): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol.* 58, 181-213
- Woolaston R.R., Baker R.L. (1996): Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int J Parasitol.* 26, 845-55
- Woolaston R.R., Piper L.R. (1996): Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus:* genetic variation. *Anim Sci.* 62, 451–460
- Woolaston R. R., Windon R. G. (2001): Selection of sheep for response to *Trichostrongylus colubriformis* larvae: genetic parameters. *Anim Sci.* 73:41–48
- Yanming S., Ruofeng Y., Muleke C.I., Guangwei Z., Lixin X., Xiangrui L. (2007): Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29, 319-26
- Yatsuda A.P., Krijgsveld J., Cornelissen A.W.C.A., Heck A.J.R., de Vries E. (2003): Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem.* 278, 16941–16951
- Yazwinski T.A., Goode L., Moncol D.J., Morgan G.W., Linnerud A.C. (1980): *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. *J Anim Sci.* 51, 279-84
- Yong W.K., Saunders M.J., Morton R. E., Hermon M. Mcgillivery D.J., Hooper I.J., Morgan P., Riffkin G.G., Cummins L.J., Thompson R.M. (1991). Immunology of *Ostertagia* resistance. En: Gray, G. D. & Woolaston, R. R. (Eds.). Breeding for Disease Resistance. Melbourne. *Australian Wool Corporation*
- Young A.R, Meeusen E.N. (2004): Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J.* 19, 601-6

- Young A.R., Barcham G.J., Kemp J.M., Dunphy J.L., Nash A., Meeusen E.N.T. (2009): Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconj*. 26, 423-432
- Yoshida T., Ikuta K., Sugaya H., Maki K., Takagi M., Kanazawa H., Sunaga S., Kinashi T., Yoshimura K., Miyazaki J., Takaki S., Takatsu K. (1996): Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R alphadeficient mice. *Immunity* 4, 483-94
- Zajac A.M., Krakowka S., Herd R.P., McClure K.E. (1990): Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol*. 36, 221-235
- Zhao A., McDermott J., Urban J.F., Gause W., Madden K.B., Yeung K.A., Morris S.C., Finkelman F.D., Shea-Donohue T. (2003): Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol.* 171, 948–954



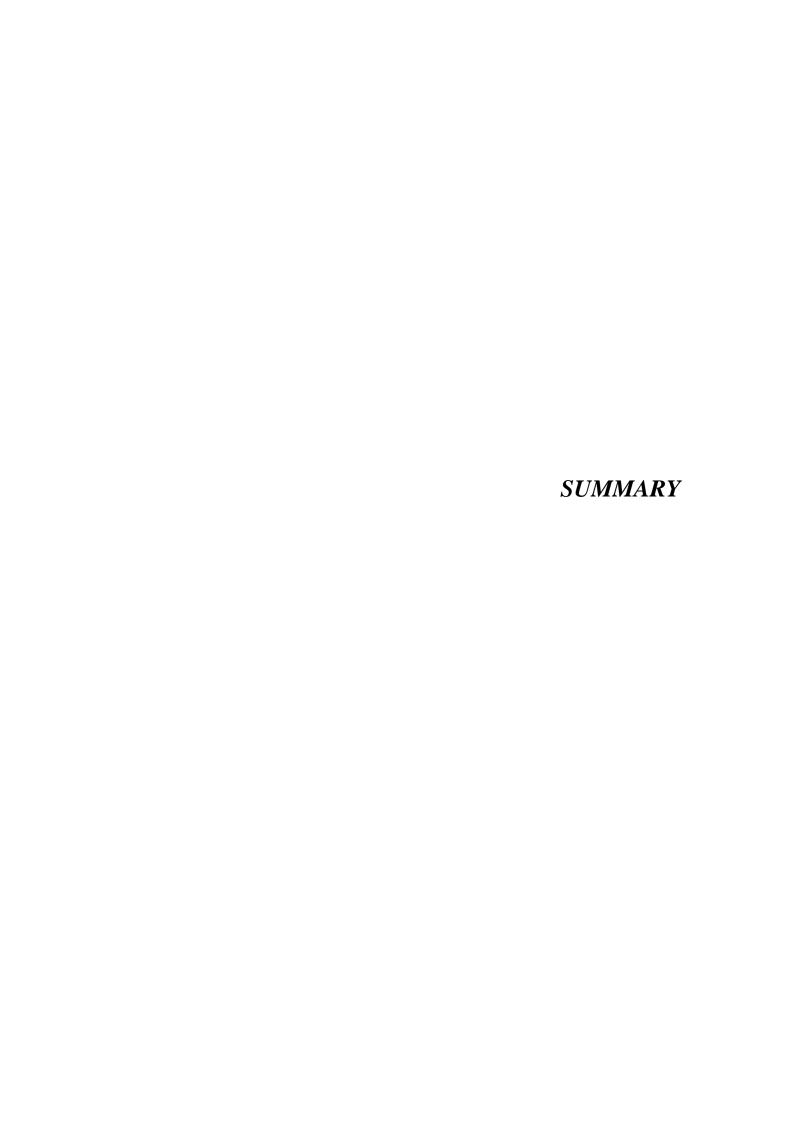
RESUMEN

Los nematodos gastrointestinales (GI) pertenecientes a la familia Trichostrongylidae son uno de los mayores obstáculos para la rentabilidad de la ganadería ovina en todo el mundo. Hasta hoy, el control de estos parásitos se ha basado en el uso de fármacos antihelmínticos de probada eficacia. Sin embargo, diversos factores, entre los que destaca la aparición de cepas del parásito resistentes a los distintos fármacos, hacen necesaria la búsqueda de nuevos métodos de control complementarios y/o alternativos. En este ámbito se encuadra el estudio de la respuesta protectora desarrollada por determinadas razas ovinas, que han sido identificadas como resistentes a estos agentes parasitarios

La Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria tenía algunos datos que sugerían que el ovino Canario de Pelo (CAP) podría ser más resistente a los nematodos GI que el ovino Canario (CAN). Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo una experiencia en la que se utilizaron catorce corderos de cada raza, de aproximadamente ocho meses de edad, a los que se inoculó por vía intrarruminal con 20000 L3 de *Haemonchus contortus*. Distintas variables hematológicas, serológicas y parasitológicas fueron analizadas secuencialmente. Los animales se sacrificaron a los 7 y 28 días postinoculación y se obtuvo el contenido abomasal, raspados de su mucosa y muestras de tejido fijadas en formol o por congelación, para el análisis de los vermes adultos, las fases larvarias, los cambios histológicos y los resultados inmunohistoquímicos. Los datos recogidos no sólo fueron expuestos de modo descriptivo, sino que también se analizaron estadísticamente en profundidad. Por un lado, se evaluó la significación estadística de las diferencias observadas en las medias de los diferentes parámetros para ambas razas. Asimismo, las diferentes variables fueron correlacionadas entre sí, intentando establecer una asociación entre ellas.

Los resultados mostraron diferencias significativas en los recuentos fecales de huevos y en el número, longitud y fecundidad de los vermes adultos, siendo menores en la raza CAP, lo que parece confirmar que es una raza más resistente a este nematodo abomasal. A diferencia de lo descrito habitualmente en la bibliografía en otras razas o individuos resistentes, no se detectaron diferencias en el establecimiento y desarrollo larvario, lo que sugiere que la diana de la respuesta protectora es el estadio adulto. Aunque no se observaran diferencias cuantitativas en la mayoría de los parámetros inmunológicos analizados en las dos razas ovinas, las relaciones entre estos y las variables parasitológicas (resistencia) y hematológicas (resiliencia) difieren en las dos razas. En los ovinos CAN, la diana de los mecanismos inmunitarios estudiados parecen

ser las larvas, coincidiendo también las células e inmunoglobulinas implicadas con lo descrito en la bibliografía. Sin embargo, en el ovino CAP, los eosinófilos, linfocitos Τγδ e IgA específicas de antígenos de vermes adultos, parecieron jugar un papel novedoso en la protección, actuando directamente sobre los vermes adultos a través de la alteración de la fecundidad de los mismos. Estos resultados sugieren que el ovino CAP podría utilizarse como un modelo único para el estudio de la resistencia natural frente a estadios adultos de *H. contortus*. Profundizar en los mecanismos intrínsecos funcionales, moleculares o genéticos responsables de esta protección singular podría ser de gran relevancia en el diseño de vacunas y en la identificación de nuevas dianas farmacológicas y genes asociados a la resistencia parasitaria en un futuro próximo.



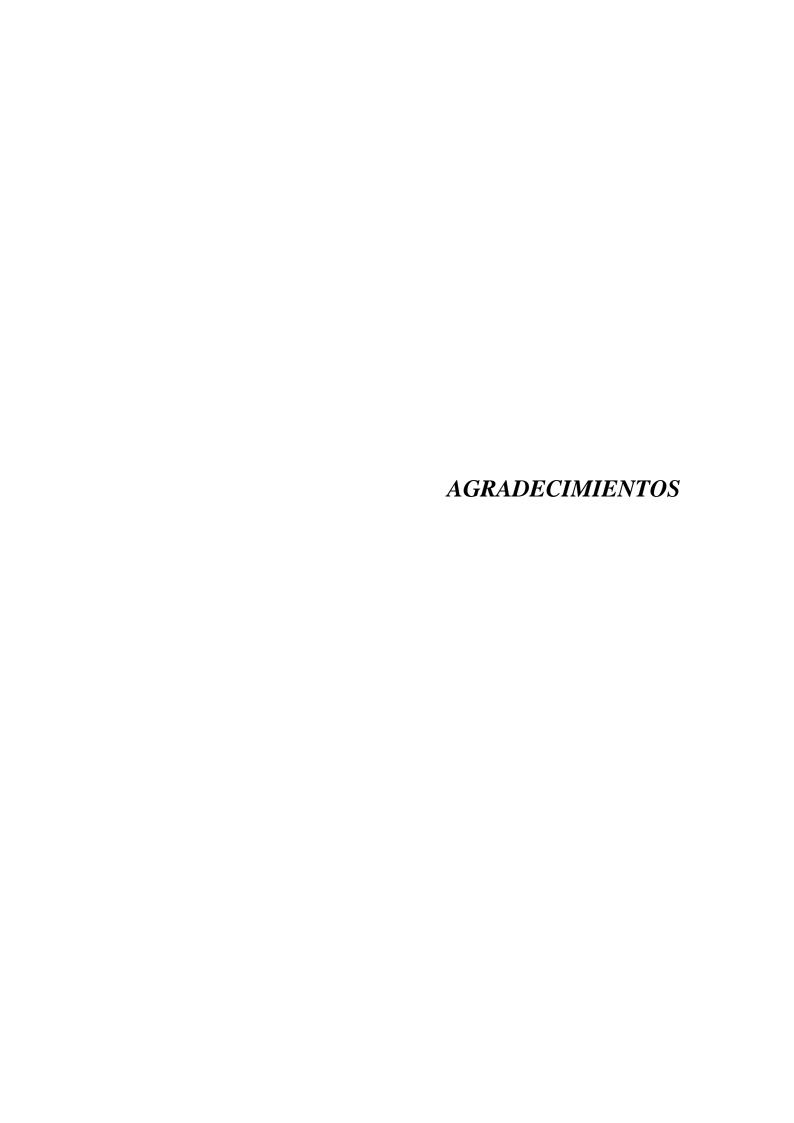
SUMMARY

Gastrointestinal (GI) nematodes belonging to the family Trichostrogylidae are one of the main constraints for the profitability of sheep production worldwide. At present, the control of these parasites has relied on the use of anthelmintic drugs of proven effectiveness. However, different factors, among them we could highlight the appearance of parasite strains resistant to different anthelmintics, make necessary the search of new complementary/alternative control strategies. In this field is placed the study of the protective response developed by some sheep breeds, which have been identified as resistant to these parasites.

The Parasitology Unit of the Veterinary Faculty of the University of Las Palmas de Gran Canaria had some preliminary data that suggested that Canaria Hair Breed (CHB) sheep could be more resistant to GI nematodes than Canaria sheep (CS). This experience was carried out to prove this hypothesis, using fourteen lambs from both breeds, that were infected directly into the rumen with 20000 larvae of *Haemonchus contortus*, GI nematode of high pathogenicity and economical importance worldwide. Different haematological, serological and parasitological parameters were sequencially analyzed. Animals were slaughtered at 7 or 28 days after drenching, and abomasal content, mucosal scrapings and abomasal tissue samples (formol fixed or frozen) were obtained, to analyse adult and larval stages, histochemical changes and immunohistochemical results. Data were not only descriptively exposed, but also were deeply statistically analyzed. By the one hand, statistical significance was evaluated, of the differences found in the means of the variables for both breeds. The variables were correlated, as well, trying to find an association among them.

Results showed significant differences in faecal egg counts, adult worm burden, length, and fecundity, being fewer in CHB sheep, that seems to confirm that this one is a more resistant breed to this abomasal nematode. Contrary to that is commonly reported in the bibliography for another resistant breeds or individuals, differences in larval establishment or development were not detected, suggesting that the target of the protective response is the adult stage. Although quantitative differences were not observed in most of immunological parameters analyzed in both breeds, relationships among them and parasitological (resistance) and haematological (resilience) variables differed in both breeds. In CS, larvae seem to be the target of the protective mechanisms, and cells and immunoglobulins that were implied, also agree with those referred in literature. Conversely, in CHB sheep, eosinophils, $\gamma\delta$ T lymphocytes and adult worm antigens-specific IgA, seem to play a novel role in protection, acting directly against adult

worms, through alteration of their fecundity. These results suggest that CHB sheep could be used as a unique model for the assessment of natural resistance against adult stages of *H. contortus*. To study in depth the functional, genetic or molecular intrinsic mechanisms responsible for these singular protection, could be crucial for vaccine design and identification of new pharmacological targets and genes related with parasite resistance in a near future.



AGRADECIMIENTOS

Sé que habitualmente el capítulo de Agradecimientos es leído por todo aquel que tiene en sus manos una Tesis Doctoral, dándole prioridad frente a otros apartados académicamente más importantes. Esto podría ser comprensible en trabajos abstrusos, ininteligibles para profanos en la materia, pero sucede así siempre, independientemente de la condición de la Tesis y del lector. Y me parece lógico que así sea. Detrás de cualquier trabajo científico, y este no es una excepción, hay seres humanos que colaboran unos con otros, dedicando su tiempo, su esfuerzo e ilusión, que ayudan y son ayudados, y eso no puede reflejarlo ninguna gráfica, tabla o cita de una revista, por muy alto índice de impacto que tenga.

En cambio, en la relación de nombres que expongo a continuación intento que quede patente que, en los cinco años transcurridos desde que comencé con este trabajo de Tesis Doctoral, son muchos los que han prestado su colaboración, y que sin su ayuda esta Tesis no hubiera podido llegar a su final.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi Director de Tesis, el Dr. Jorge González. Durante este tiempo hemos compartido muchas experiencias, tanto profesionales como personales, y se ha ganado mi respeto y amistad.

A los Drs. José Manuel Molina y Francisco Rdguez. Guisado, Codirectores de esta Tesis, les agradezco la ayuda prestada en todo momento, desde su experiencia.

Los Drs. Antonio Ruiz y Eligia Rodríguez Ponce, sin intervenir directamente en el trabajo, se merecen ser mencionados, por supuesto. Han sido muchos los ratos pasados con ellos y han hecho que todo se hiciera más llevadero.

Hay tres Profesores de esta Facultad que me han prestado una ayuda fundamental en momentos muy concretos, a los que estoy muy agradecido. Son los Drs. Fernando Glez. Valle, Antonio Fernández y José Raduán Jaber.

Yeray Hernández y Sergio Martín, becarios de Parasitología, compartieron conmigo horas y horas de laboratorio y corrales. Ellos me han enseñado mucho, sin desperdiciar ninguna oportunidad de "darme caña", pues sabían que yo tampoco lo iba a hacer, como corresponde a

un grupo de trabajo en el que hay buen ambiente. En los últimos dos años de trabajo les he echado de menos, y eso que anteriormente a veces les echaba "de más"...

En los últimos tiempos una verdadera legión de becarias ha hecho su entrada en la Unidad de Parasitología: Lorena, Davinia, Jéssica, Leire, Julia, Adassa y Aránzazu. La ilusión que han puesto en sus trabajos me ha servido de estímulo, porque desde el primer día han puesto el nivel muy alto y yo no podía quedarme atrás. Además me han pedido consejo, lo que siempre anima, y han mantenido la despensa llena todos los días. Les deseo lo mejor.

Al Ledo. Alejandro Benito Rodríguez Rivero le agradezco sus consejos prácticos de veterinario y ganadero, que han sido soluciones para muchos problemas.

Algunos compañeros del Departamento de Morfología me han ayudado con la histología y la inmunohistoquímica, en las que era bastante ignorante. A Pedro, Alejandro, Mariña, Óscar y Águeda les agradezco su aportación a esta Tesis.

Los doctores David Bartley y David Knox (Moredun Research Institute, Escocia) cedieron generosamente las larvas utilizadas en el estudio, mientras que los Drs. Els Meeusen y David Piedrafita (Monash University, Australia) hicieron lo propio con los anticuerpos necesarios para la inmunohistoquímica. A estos dos últimos les agradezco también la fenomenal acogida que me dispensaron durante la estancia que realicé en Melbourne, allá por 2009.

A Tata y Lita, Catedráticas de la Sonrisa, la Mopa y la Ropa Vieja, les agradezco el haber limpiado mi lugar de trabajo todos los días, siempre con alegría y enfadándose poco cuando pisaba lo recién fregado. Perdón por ello y que sigan así muchos años.

A Irene, Mayeya y Esther les estoy muy agradecido por la colaboración prestada en innumerables flotaciones y Mcmaster, y a Santiago por haberse ocupado de los animales, que no siempre tenían ganas de cooperar con la ciencia.

Al personal del Matadero Insular de Gran Canaria, veterinarios y matarifes, les agradezco haber colaborado con este trabajo, permitiéndome asistir al sacrificio de los animales y facilitándome la recogida de muestras.

Quiero agradecer a mis padres y hermanos el apoyo que me han prestado desde la lejanía. Con esa pregunta ("¿Qué tal la Tesis?"), repetida incansablemente y con cariño, me recordaban que lo que era importante para mí lo era también para ellos.

Agradecimientos

A la vez, muchos miembros del Club Guayre han sido testigos de la evolución de esta Tesis, a veces un poco incrédulos cuando les explicaba en qué consistía mi trabajo. Gracias por tantas risas y buenos momentos. Especialmente a Robbie, le agradezco su increíble diseño de portada.

Finalmente, quisiera agradecer al Cabildo de Gran Canaria y a la Fundación Universitaria de Las Palmas la concesión de las becas que me han permitido sostenerme económicamente durante estos años de investigación.

Seguro que me dejo a muchos en el tintero. Son aquellos que me han ayudado de forma tan callada que ni yo mismo me he dado cuenta. Gracias a todos.

Álvaro Hernández Abril 2011

ANEXO I

Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands







veterinary parasitology

Veterinary Parasitology 153 (2008) 374-378

www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands

Jorge F. González ^{a,*}, Álvaro Hernández ^{a,b}, José M. Molina ^a, Antonio Fernández ^b, Herman W. Raadsma ^c, Els N.T. Meeusen ^d, David Piedrafita ^d

a Departamento de Patología Animal, Unidad de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain
 b Departamento de Morfología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain
 c Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction-ReproGen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, PM3, Camden NSW 2570
 d Department of Physiology, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia
 Received 19 November 2007; received in revised form 8 February 2008; accepted 21 February 2008

Abstract

This study compares the susceptibility to *Haemonchus contortus* infection in two breeds of sheep endemic to the Canary Islands, the Canaria Hair Breed sheep and the Canaria sheep. Sheep were experimentally infected with 20,000 larvae of *H. contortus* and animals killed on days 7 and 28 post-infection. No difference between sheep breeds were detected in immature worm counts at days 7 or 28 post-infection. However, in comparison to the Canaria sheep breed, the Canaria Hair Breed sheep showed lower mean faecal egg counts, lower adult worm counts, lower number of eggs *in utero* and female worm stunting. Overall, these data suggest that the Canaria Hair Breed sheep has a greater resistance to *H. contortus* infection than Canaria sheep, and that this resistance may act at the level of the adult parasite.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sheep-nematoda; Resistance; Canaria; Haemonchus contortus

1. Introduction

Infection with the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, is one of the major constraints in small ruminant production worldwide (Gauly et al., 2002). Control is largely based on regular anthelmintic treatment, however, the emergence of increasing drug resistance makes this method of production unsustain-

E-mail address: jfgonzalez@dpat.ulpgc.es (J.F. González).

able over the short to long term and new strategies of control are needed. Identification and selective breeding of animals with higher genetic resistance to gastro-intestinal nematodes is an attractive alternative (Matika et al., 2003; Raadsma and Tammen, 2005). The use of genetically resistant animals may also optimize the efficacy of anthelmintic use by delaying the development of parasite resistant populations and extending the useful life of anthelmintics. Several sheep breeds have shown a natural resistance to gastrointestinal nematodes and many are currently being studied to develop their selective breeding and potential commercial production traits (Gamble and Zajac, 1992; Goossens et al., 1997; Li et al., 2001; Raadsma et al., 2002; Aumont et al., 2003;

^{*} Corresponding author at: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal, Parasitología, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain. Tel.: +34 928 457242; fax: +34 928 454341.

Matika et al., 2003; Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2004; Mugambi et al., 2005).

The topographical and climatic characteristics of the Canary Islands have been an obstacle for the rearing of highly productive sheep breeds leading to almost exclusive exploitation of indigenous sheep breeds by local farmers for centuries. The two major Canarian sheep breeds are the Canaria Hair Breed (CHB) sheep and the Canaria sheep. The CHB sheep are a short haired breed sheep predominately reared for meat production, while the Canaria sheep are predominately utilised for milk production (Muñoz, 2003). Differences in trichostrongylid egg counts in faeces between the breeds have been consistently observed, even though animals of both breeds often co-habit the same grazing areas (Gonzalez et al., unpublished observations). In this study, a direct comparative experiment was carried out to determine whether these sheep breeds demonstrate differential resistance to H. contortus infection under standardised conditions.

2. Material and methods

Eight-month-old CHB sheep (n = 13) and Canaria sheep (n = 14) were purchased from local farms on Gran Canaria. Animals were housed in pens at the Faculty of Veterinary Science, University of Las Palmas de Gran Canaria (Spain). Animals were fed with a commercial pelleted sheep ration and water *ad libitum* throughout the total experimental period. Animals were drenched on arrival and 2 weeks before infection with levamisole (Cyver[®], Fort Dodge, Spain) with the recommended dosage (1 ml/10 kg b.w.). Absence of eggs in faeces following drenching of animals was confirmed by coprological examination.

H. contortus parasites used in the experiment were kindly supplied as third-stage larvae by Dr. David Knox and Dr. David Bartley from the Moredun Research Institute, Edinburgh, Scotland, UK (Redmond and Knox, 2004). Animals were inoculated with 20,000 L3 *H. contortus*. Five CHB and five Canaria sheep were slaughtered on day 7 post-infection (p.i.). All other animals (8 CHB and 9 Canaria sheep) were killed on day 28 p.i.

Commencing on day 13 p.i., eggs per gram (EPG) were determined using a McMaster technique (MAFF, 1989). At days 7 and 28 p.i., animals were killed and their abomasums were removed. The abomasums were opened along the greater curvature and the contents placed in graduated test tubes. Each abomasum was then thoroughly washed and the washings added to the respective animal's abomasal contents. Samples were preserved in 5% formalin for total adult worm counts.

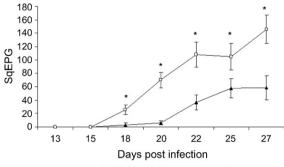
Subsequently, the mucosa of each abomasum was collected (mucosal scrapings) and stored at $-20\,^{\circ}\text{C}$ for the determination of larval counts. Adult parasites were recovered from abomasal washings and thirty adult female worms from each sheep were measured with a calibrated ocular scale. Each female was then crushed on a slide for *in utero* egg determination. Larval numbers from the mucosal scrapings were determined by digestion of mucosa with pepsin-HCl according to a publication by the Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF, 1989). Digestion was stopped with formalin and 10 ml aliquots were examined for immature worms.

All animals were bled weekly from the jugular vein commencing 3 weeks before parasite challenge using EDTA (7.5%) as an anticoagulant. Packed cell volume (PCV) was determined using a microhaematocrit, and plasma protein (PP) levels were estimated with a refractometer (FG-301, Protein, Comecta S.A.). Total leucocyte counts were performed using a Neubauer haemocytometer after red blood cells were lysed with Turks solution (1:20). Differential leucocyte counts of blood smears were determined using Fast Staining (Panreac[®], Spain) solution.

All statistical analyses were conducted using SPSS Version 13.0 (SPSS Inc., 2000). The data relative to EPG and eosinophil counts in blood were subjected to square root transformation prior to statistical studies to normalize the residual variances. Parameters measured multiple times during the trial (EPG, cell blood counts, total PP and PCV) were analysed by general linear models using the repeated measures option. These data were analysed considering the effects of breed and day p.i. and the interaction between these effects. Significant differences between breeds in parameters taken at a single day such as adult and immature worm counts, female worm lengths and number of eggs in utero were determined using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. Probabilities of p < 0.05 were considered significant. A multivariate analysis of variance was adopted for analysing the parasitological traits of worm burden, faecal egg count, female worm fecundity and worm development (length) since these traits had shown interdependency and collectively best described host resistance to parasite challenge.

3. Results

CHB animals showed lower EPG counts than Canaria sheep (p < 0.001) throughout the experiment (Fig. 1). The mean EPG observed in Canaria sheep (24,778) was almost 5-fold higher compared to the



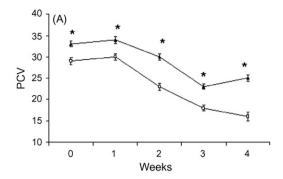
-- Canaria Hair Breed sheep -- Canaria sheep

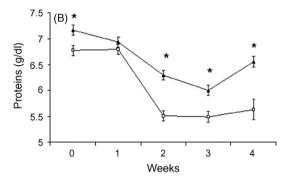
Fig. 1. Mean squared root transformed EPG (sqEPG) in Canaria Hair Breed (CHB) sheep and Canaria sheep infected with 20,000 L3 of H. contortus. Each single data represents means from n = 8 CHB sheep (black triangle) and n = 9 Canaria sheep (white square) \pm S.E.M. *Represents significant differences, p < 0.05.

mean EPG in CHB sheep (5443) by day 27 p.i. The mean worm number in the Canaria sheep (4666 \pm 3293 worms) was 2.4-fold higher than in the CHB sheep (1926 ± 1696) and approached statistical significance (p = 0.06). The mean female worm length also differed significantly (p < 0.001) between the breeds, with female parasites on average being longer in Canaria sheep $(17.03 \pm 01.79 \text{ mm})$ than in CHB sheep $(15.34 \pm 01.87 \text{ mm})$ when recovered at day 28 p.i. Female worms also had significantly fewer mean number of eggs in utero (98.78 \pm 81) in CHB when compared to Canaria sheep animals (205 ± 128) (p < 0.001). In combination through use of the multivariate analysis of variance, the four parasitological parameters (worm burden, faecal egg count, female worm fecundity and worm length) demonstrated a significant difference between the two breed groups (p < 0.01, data not shown).

No significant differences were found between breeds in the recovery of immature worm counts from the mucosal digestion at either 7 (CHB: 22.3 ± 5.5 Canaria sheep: 25.2 ± 9.1 larvae per gram) or 28 days p.i. (CHB: 0.25 ± 0.4 ; Canaria sheep: 0.57 ± 0.9 larvae per gram).

CHB sheep had a significantly (p < 0.001) higher mean PCV than Canaria sheep when assessed at weekly intervals for 3 weeks prior to infection and following infection (p < 0.05, Fig. 2A). The PP values were significantly lower in Canaria sheep than in CHB sheep throughout the experiment (Fig. 2B). Significant differences in mean blood eosinophil counts were found between breeds on weeks 0 and 2 p.i. A trend for higher peripheral eosinophil numbers was evident in CHB sheep (Fig. 2C).





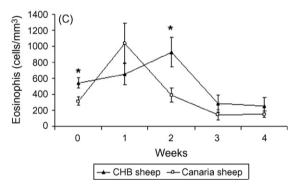


Fig. 2. Mean packed cell volume (A), mean plasma proteins (PP) amount (g/dl) (B) and mean blood eosinophil counts (cells/mm³) (C) of CHB and Canaria sheep during an experimental infection with 20,000 L3 of *H. contortus*. A greater decline in the mean PCV and PP values were observed in Canaria sheep compared to CHB sheep. *Represents significant differences, p < 0.05.

4. Discussion

Several studies have demonstrated that some sheep breeds have a natural resistance to gastrointestinal nematodes (Gamble and Zajac, 1992; Goossens et al., 1997; Li et al., 2001; Raadsma et al., 2002; Aumont et al., 2003; Matika et al., 2003; Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2004; Mugambi et al., 2005). These local breeds are increasingly recognised as an underutilised and a valuable genetic resource for the study of mechanisms involved in protection against gastrointestinal nematodes, development of vaccines and the

identification of genetic markers for selective breeding programs for parasite resistance (Raadsma and Tammen, 2005). Our anecdotal evidence suggested that differences existed in gastrointestinal parasite establishment in Canarian sheep breeds. It was, therefore, of interest to examine whether the CHB sheep were resistant to *H. contortus* infection and might be a potential valuable genetic resource.

Discerning whether animal breeds demonstrate resistance to nematode infection requires the availability of a comparative susceptible breed of animal. However, government regulations on the importation of ruminants are highly restrictive and no commercially recognisable or documented susceptible breeds of sheep are located on the Canary Islands. As a result, we were only able to do a comparative analysis of the two breeds located within the islands which had co-existed for several centuries. In order to determine whether there was sheep breed differences, we used a well-documented virulent strain of H. contortus larvae and gave these breeds a high bolus infection of 20K L3 larvae. This same batch of larvae, when routinely used in susceptible breeds, gave a mean establishment rate of 25% (Knox, personal communication), compared to a 9.6% and 23.3% establishment rate in CHB and Canaria sheep, respectively, in this study.

A number of significant parasitological differences were observed between the CHB and Canaria sheep breeds. Mean EPG and number of eggs in female worms in utero were significantly lower in CHB sheep than in the Canaria sheep. In addition, female worms were significantly shorter in the CHB sheep than in the Canaria sheep. There was also a clear trend for a reduction in mean adult worm burdens. Mean worm counts in CHB sheep were 50% lower when compared to the mean worm counts of Canaria sheep, although the difference was not statistically significant (p = 0.06). This was likely to be due to the high intra-breed variability, as found previously in other sheep breeds (Zajac et al., 1990). Taken together with the other parasitological parameters, it is likely that increased group numbers would yield significant differences in worm burdens. In addition, it is possible that Canaria sheep are parasite resistant to some degree, so that differences between breeds were not as apparent if the comparison had been between to a well-documented susceptible breed. Other recognised designated resistant sheep breeds have also shown significant reductions in EPG, eggs in utero and worm length, but unlike the present study, this was in the absence of a trend for reduced worm burdens (Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006).

A number of parameters were measured to determine whether the differences in parasitological parameters between the sheep breeds manifested into differences in clinical disease in a short term infection. Animals of both breeds showed a significant decline in mean PCV values from 2 weeks p.i. onwards (p < 0.001). However, the percentage of change was higher in Canaria sheep than in CHB and significant differences were detected (p < 0.05) post-infection. Similarly, reduction in PP values from week 2 post-infection onwards in both breeds were observed but were significantly higher in the Canaria sheep. Other authors found similar results when they compared plasma proteins in resistant sheep breeds such as Florida Native, St. Croix, Red Massai, Gulf Coast Native and Crioulla with susceptible breeds (Zajac et al., 1990; Mugambi et al., 1996; Amarante et al., 1999, 2004; Li et al., 2001; Bricarello et al., 2004). Overall, these data suggests a greater resilience against infection in CHB sheep in comparison to Canaria sheep breeds.

Shorter mean female worm length has been found in sheep as a manifestation of acquired immunity against Teladorsagia circumcincta (Stear et al., 1999; Sutherland et al., 1999) and H. contortus (Coyne and Smith, 1992; Balic et al., 2000). At present, the mechanism responsible for the differential parasitological parameters observed in this study between the two Canarian sheep breeds is unclear. Resistance in sheep to gastrointestinal nematodes is generally characterized by greater peripheral blood eosinophil responses (Zajac et al., 1990; Meeusen and Balic, 2000; Gauly et al., 2002) but no clear trends or correlations were observed in this study between the breeds although there was a trend for increased eosinophil counts in CHB sheep. Several parasite stage-specific mechanisms have been associated with resistance against gastrointestinal nematodes in sheep, generally to tissue associated larvae (Balic et al., 2002). Interestingly, no differences between the Canarian breeds were found between tissue associated immature worm counts at 7 or 28 days postinoculation. These results indicate that the resistant mechanism in the CHB sheep is directed against adult parasites.

In conclusion, we suggest that the CHB sheep have comparative resistance to gastrointestinal nematode infections and may be a potential resource for breeding programs. In order to accommodate differences in rearing backgrounds and a more comprehensive sampling of the genetic variation within breed, future studies will screen larger contemporary groups under field conditions to better characterise the resistance of the CHB. In addition, we propose controlled experiments to

determine the immunological, physiological and genetic basis for parasitic resistance in this sheep breed.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. David Knox and Dr. David Bartley for their kind donation of the *H. contortus* L3 used for infection of sheep in these studies. These studies were supported by Fundación Universitaria de Las Palmas (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) and Haricana by the Programa Innova (2006) through sponsoring Álvaro Hernández. We thank Ms. Kemperly Dynon for her assistance in the preparation of this manuscript.

References

- Amarante, A.F.T., Craig, T.M., Ramsey, W.S., Davis, S.K., 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, 311–324.
- Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M., 2004.Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. Vet. Parasitol. 120, 91–106.
- Aumont, G., Gruner, L., Hostache, G., 2003. Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus* contortus of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 402 sheep in France. Vet. Parasitol. 116, 139–150.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meesuen, E.N.T., 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. Adv. Parasitol. 45, 181–241.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunol. 24, 39–46.
- Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Vaz, C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves, I., Echeverria, F.A.M., 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small Ruminant Res. 51, 75–83.
- Coyne, M.J., Smith, G., 1992. The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naive and parasite-exposed sheep following single experimental infections. Int. J. Parasitol. 22, 315–325.
- Gamble, R.H., Zajac, A.M., 1992. Resistance of St. Croix to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. Vet. Parasitol. 41, 211–225.
- Gauly, M., Kraus, M., Vervelde, L., van Leewen, M.A.W., Erhardt, G., 2002. Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus con*tortus infection. Vet. Parasitol. 106, 55–67.

- Goossens, B., Osaer, S., Kora, S., Jaitner, J., Ndao, M., Geerts, S., 1997. The interaction of *Trypanosoma congolense* and *Hae-monchus contortus* in Djallonke sheep. Int. J. Parasitol. 27, 1579–1584.
- Hielscher, A., Brandt, H., Erhardt, G., Gauly, M., 2006. Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhoen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. Vet. Parasitol. 141, 279–284.
- Li, Y., Miller, J.E., Franke, D.E., 2001. Epidemiological observations and heterosis analysis of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk, Gulf Coast Native, and crossbred lambs. Vet. Parasitol. 98, 273–283.
- MAFF, 1989. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Diagnostic Techniques, third ed. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Matika, O., Nyoni, S., Wyk van, J.B., Erasmus, G.J., Baker, R.L., 2003. Resistance of Sabi and Dorper ewes to gastro-intestinal nematode infections in an African semi-arid environment. Small Ruminant Res. 47, 95–102.
- Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? Parasitol. Today. 16, 95–101.
- Mugambi, J.M., Wanyangu, S.W., Bain, R.K., Owango, M.O., Duncan, J.L., Stear, M.J., 1996. Response of Dorper and Red Massai to trickle *Haemonchus contortus* infections. Res. Vet. Sci. 61, 218–221.
- Mugambi, J.M., Audho, J.O., Baker, R.L., 2005. Evaluation of the phenotypic performance of a Red Maasai and Dorper double backcross resource population: natural pasture challenge with gastro-intestinal nematode parasites. Small Ruminant Res. 56, 239–251.
- Muñoz, C.E. (Ed.), 2003. Razas Ganaderas Españolas Ovinas. Federación Española de Asociaciones Ganaderas (FEAGA) and Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), Madrid, 470 pp.
- Raadsma, H.W., Tammen, I., 2005. Biotechnologies and their potential impact on animal breeding and production: a review. Aust. J. Exp. Agric. 45, 1021–1032.
- Raadsma, H.W., Margawati, E.T., Piedrafita, D., Estuningsih, E., Widjayanti, S., Beriajaja, Subandriyo, Thomson, P., Spithill, T., 2002. Towards molecular genetic characterization of high resistance to internal parasites in Indonesian Thin Tail sheep. In: Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France INRA, pp. 13–19.
- Redmond, D.L., Knox, D.P., 2004. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. Vaccine 22, 4252–4261.
- Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. Int. J. Parasitol. 29, 51–56.
- Sutherland, I.A., Brown, A.E., Green, R.S., Miller, C.M., Leathwick, D.M., 1999. The immune response of sheep to larval challenge with *Ostertagia circumcincta* and *Ostertagia ostertagi*. Vet. Parasitol. 84, 125–135.
- Zajac, A.M., Krakowka, S., Herd, R.P., McClure, K.E., 1990. Experimental *Haemonchus contortus* infection in three Breeds of Sheep. Vet. Parasitol. 36, 221–235.

ANEXO II

Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissuee osinophils and gamma-delta

T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep

G Model VETPAR-5658; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Fecundity in adult Haemonchus contortus parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep

Jorge F. González^{a,*}, Álvaro Hernández^{a,b}, Els N.T. Meeusen^c, Francisco Rodríguez^b, José M. Molina^a, José R. Jaber^b, Herman W. Raadsma^d, David Piedrafita^c

- a Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, Arucas, Las Palmas 35413, Spain
- ^b Departamento de Morfología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Las Palmas 35413, Spain
- ^c School of Biomedical Sciences, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia
- ^d Reprogen-Animal Bioscience, Faculty of Veterinary Science, Sydney University, PM3, Camden, NSW 2570, Australia

ARTICLE INFO

Article history: Received 10 August 2010 Received in revised form 21 December 2010 Accepted 10 January 2011

Key words:
Sheep-nematoda
Resistance
Haemonchus contortus
Canaria Hair Breed
Breed-effect

ABSTRACT

Canaria Hair Breed (CHB) sheep are more resistant than Canaria sheep (CS) to experimental Haemonchus contortus infection. Protective responses appear effective against the adult stage of the parasite, not as commonly reported in other breeds against the larval stages. In this study we have quantified several abomasal immune cells and correlated these with parasitological variables for each breed. A significant negative correlation between CD4+T cell numbers and worm burden or length at 28 dpi was seen only in CS sheep. Significant negative correlations for both abomasal eosinophils and $\gamma\delta/WC1+T$ cells, and fecundity of the adult worms were observed only in the resistant CHB sheep breed. Tissue eosinophils and $\gamma\delta/WC1+T$ cells were positively correlated in CHB sheep. We suggest that the two sheep breeds have disparate immune responses following infection with the parasite and that $\gamma\delta+T$ cells in association with eosinophils may play a hitherto unrecognised role in modulating fecundity in H. contortus adult female parasites.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Haemonchus contortus is a blood-feeding gastrointestinal nematode (GIN) that dwells in the abomasum of small ruminants (goats and sheep) particularly in humid temperate and subtropical climates (Amarante et al., 2005). This parasite can cause severe production losses in these animals. The development of multi-drug resistance by *H. contortus* parasites has driven research into alternative control measures, including selection of sheep genetically resistant to GIN infection. Genetically resistant sheep (either through breeding selection, or use of local

0304-4017/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

indigenous breeds) are increasingly considered as viable alternatives to increase animal production (Amarante et al., 2009) and to learn novel mechanisms of resistance not described in commercial breeds (Piedrafita et al., 2010). Importantly, GIN parasites may not adapt to these resistance mechanisms in such selected sheep (Kemper et al., 2009). However, to date the mechanisms underlying the genetic resistance of sheep to GIN infections are largely unknown.

Protective responses are often associated with effective immunity against the larval stages of the parasite (Balic et al., 2000a). CD4+ T cells seem to play a crucial role in this protection (Gill et al., 1993; Peña et al., 2006) and elevated type 2 immune responses (Th2) defined by increased production of the cytokines IL-4, -5 and -13 and increased tissue eosinophil, mast cell and globule leucocyte numbers

Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

Corresponding author. Tel.: +34 928 457242, fax: +34 928 451142. E-mail address: jfgonzalez@dpat.ulpgc.es (J.F. González).

J.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

are often associated with greater resistance to infection (Balic et al., 2000a, 2006; Lacroux et al., 2006; Kemp et al., 2009). Larval stages have been demonstrated to be susceptible to *in vitro* killing by eosinophils and closely associated with larvae in resistant animals *in vivo* (Rainbird et al., 1998; Balic et al., 2006; Terefe et al., 2007).

Recently, we have shown disparate resistance to *H. contortus* infection between two indigenous breeds of sheep native to the Canary Islands, a relatively resistant Canaria Hair Breed (CHB sheep) and a more susceptible Canaria sheep (CS breed) (González et al., 2008). Here, we extend our earlier findings by investigating the local abomasal cellular response during GIN infection of these two sheep breeds, and reveal different immune correlations between the two breeds with respect to worm burden (CS breed) and worm fecundity (CHB sheep).

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

The experimental protocol has been explained in detail previously (González et al., 2008). Briefly, 13 CHB sheep and 14 CS breed 8-month-old males were purchased, drenched and kept worm-free for several months. Animals were then inoculated with 20,000 L3 of an H. contortus strain donated by Dr. Knox and Dr. Bartley (Moredum Research Institute, Edinburgh, Scotland) (Redmond and Knox, 2004). Five animals of each breed were slaughtered at 7 and the remainder at 28 days post-infection (dpi). Faecal counts were estimated using the McMaster method (MAFF, 1989). Abomasums were isolated following slaughter and opened by cutting along the greater curvature and larval and adult parasites recovered as previously described (González et al., 2008). Thirty larvae (L4-early L5) and 30 adult female worms were randomly recovered from each abomasum and measured (a calibrated ocular scale for adult females and a digital photo camera (ProgRes C12PLUS) on an inverted microscope (Olympus CKX41) for larval measurements). Eggs in utero in these adult female worms were counted after disruption of the parasite tissues to release the eggs using a cover slide.

2.2. Histochemistry and morphometric analysis

Tissue samples (approximately $2\,\mathrm{cm} \times 2\,\mathrm{cm}$) were collected at necropsy and before parasite recovery from abomasal folds of the fundic region, for histological studies. Samples were preserved in 4% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin-wax. Tissue sections were cut (5 μ m thick) and stained with haematoxylin and eosin for eosinophil and globule leucocyte (GL) counting. Toluidine blue staining was used to determine mast cell numbers. For each tissue sample, cells were counted in at least 20 randomly selected fields of 0.25 mm \times 0.18 mm at 500 \times magnification with an optic microscope (Leite Laborlux S) (Balic et al., 2002).

Similarly, tissue samples were also collected to perform immunohistochemistry. Samples were placed on plastic molds (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands) and embedded in OCTTM solution

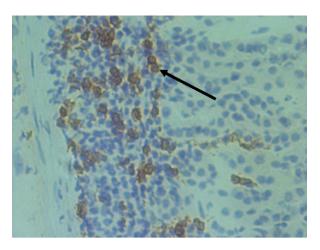


Fig. 1. Immunohistochemical staining of a tissue section of the abomasal mucosa showing gammadelta positive T cells (\times 400 magnification). Some of these positive staining cells are indicated by the arrow.

(Optimal Cutting Temperature, Tissue Tek, Sakura Finetek, Europe B.V. Zoeterwoude, The Netherlands) followed by immersion in 2-methilbutane (Merk, Darmstadt, Germany) at −80°C until processed. Tissue sections, 4 µm thick, were cut with a cryostat (Reichert-Jung, 2800 Frigocut N, Germany) at -20° C and transferred to poly-L-lysine hydrobromide (Sigma) covered slides. Samples were fixed with 100 ml of 100% ethanol at 4°C for 10-20 min and H₂O₂ was added to block endogenous peroxidase activity. Primary antibodies against the following sheep markers were used to stain the tissue sections: CD4 (T4 pool), CD8 (38-65), CD45R (20-96), WC1 (19-19) and $\gamma\delta$ TCR (86D) (Balic et al., 2000b). Each section was covered with 200 µl of appropriate dilutions of monoclonal antibodies (ranging 1:5-1:50 in PBS) and incubated in a humidity box for 1-2h at room temperature. Sections were rinsed three times with PBS and then were incubated with biotinylated polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dakocytomation) for 30 min. Finally, slides were reacted with 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) 0.035% containing hydrogen peroxide 0.1%, counterstained with Harris's haematoxylin and mounted under DPX mountant (BDH Laboratory Supplies, Poole, England). Cells were counted in 20 fields located in upper and lower third of the mucosa as described above. Positive staining was seen as a brown pigmentation of cells (Fig. 1).

2.3. Statistical analysis

PASW version 18.0 software was used for statistical analysis. Breed comparisons in adult and larval worm burdens and cell counts were done using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Length and eggs *in utero* were compared using the student *t*-test and eggs per gram (epg) through the general linear model of repeated measures. Values were transformed, prior to statistical analysis, in order to normalize the variance. Spearmann correlations coefficients and regression analysis were performed to identify the relationship between immunological and

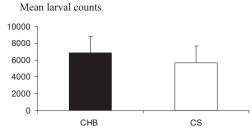
Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

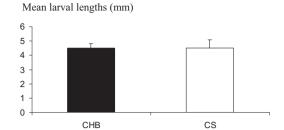
_

J.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

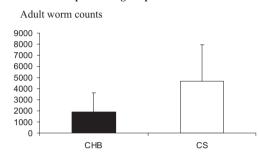
-

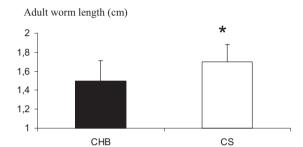


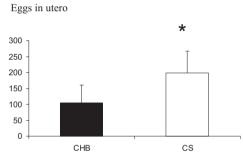




B Adult parasitological parameters







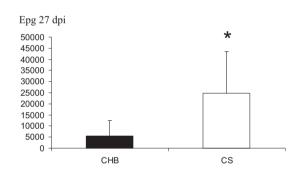


Fig. 2. Mean larval counts (5 CHB sheep and 5 CS breed), larval lengths (mm) (150 larvae per breed), adult worm counts (8 CHB sheep and 9 CS breed), adult worm length (cm) (241 worm per breed), eggs *in utero* (237 worms in CHB sheep and 231 worms in CS breed), and epg at 27 dpi (8 CHB sheep and 9 CS breed) in Canaria Hair (CHB sheep) and Canaria Sheep (CS breed) breeds infected with 20,000 L3 of *Haemonchus contortus*. Results are mean ± standard deviation. * shows differences between breeds (p < 0.05).

parasitological variables. Probabilities of p < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Parasitological data

There were no significative differences between breeds in larval counts and length at 7 dpi (Fig. 2A). Most of the larvae collected by 7 dpi were found in the lumen in both CHB sheep (4851 ± 2219 larvae; 70%) and CS breed (3393 ± 671 larvae; 60%). Few larvae were found at 28 dpi in CHB sheep (7 ± 11) and CS breed (19 ± 32). A fifty percent reduction in adult worm burden (Fig. 2B) was observed in CHB sheep compared to CS breed, and these worms were significantly shorter in this resistant breed (Fig. 2B). A significant reduction in egg counts, both *in utero* and faeces at 27 dpi, was also observed in CHB sheep compared to CS breed (Fig. 2B). No difference in female to

male worm ratios was observed between breeds (data not shown).

In CS sheep, at 28 dpi, there was a significant positive correlation between worm burden and worm length (Fig. 3A), as well as between eggs *in utero* and worm length (Fig. 3B). In CS, epg at 27 dpi were strongly associated with worm burden (Fig. 3C). However in CHB at 28 dpi, no significant correlations were found between worm length and worm burden (Fig. 3A), worm length and eggs *in utero* (Fig. 3B), or epg (27 dpi) and worm burden (Fig. 3C).

3.2. Cell populations in the abomasal wall

Immune cells in the abomasal wall were counted in both breeds of sheep and no obvious differences were found in their populations except for a reduction in eosinophil numbers at 28 dpi in the CS breed, while eosinophil counts remained elevated in the CHB sheep (Fig. 4A and B). Eosinophil populations were a mean 2-fold higher

Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

J.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

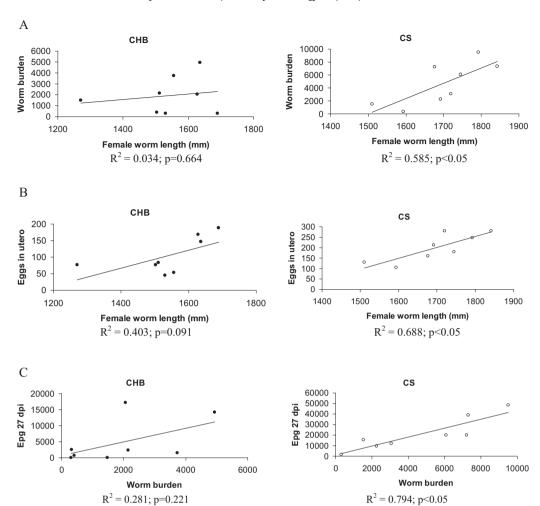


Fig. 3. Relationship between parasitological variables in CHB sheep and CS breed at 28 dpi. (A) Female worm length was positively associated with worm burden in CS breed (p < 0.05) but not in CHB sheep. (B) Female worm length was positively related with eggs *in utero* in CS breed but not so clearly in CHB sheep. (C) Worm burden and epg at 27 dpi were positively correlated in CS breed but not in CHB sheep.

in the resistant sheep at 28 dpi in comparison with CS breed (Fig. 4A), although it was no significant. Significantly greater CD4+ cells were observed at 28 dpi in comparison with 7 dpi in both breeds (Fig. 4B). A significant increase in WC1+ $\gamma\delta$ -T cells at 28 dpi were observed only in the resistant CHB sheep (Fig. 4B).

3.3. Correlations between abomasal cell populations and parasitological variables

Correlation analysis between parasitological data and immune cell counts in the abomasal wall was performed at 28 dpi (Table 1). A significant negative correlation was found between CD4+ T cells and worm burden and worm length in CS breed but not in CHB sheep. In contrast to CS breed, eosinophils and $\gamma\delta$ T cells were negatively correlated with eggs *in utero* and epg at 27 dpi only in the resistant CHB sheep (Table 1). WC1+ cells were also significantly and negatively associated with eggs *in utero* in the resistant CHB sheep (Table 1).

Several significant correlations were observed between the various cellular parameters. In particular, eosinophils and $\gamma\delta T$ cells located in the upper third of the abomasal mucosa were positively correlated (r=0.89; p=0.019) in the resistant CHB sheep but not in CS breed (r=-0.492; p=0.179). On the other hand, in the susceptible CS breed, there were significant correlations between mast cells and globule leucocytes (r=-0.7; p=0.085) which were not found in resistant CHB sheep (r=-0.036; p=0.939).

4. Discussion

Resistance in ruminants to GIN infections is generally characterised by lower worm burdens and lower faecal egg counts. A reduction in faecal egg counts can be a consequence of reduced female worm burdens and/or reduced egg production in utero (Balic et al., 2000a; Claerebout and Vercruysse, 2000). In this study, resistance in Canaria Hair Breed (CHB) sheep was characterized by a mean 50% reduction in adult worm burden and a significant reduction in egg

Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

VETPAR-5658; No. of Pages 7

I.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

Table 1Spearman correlations coefficient between parasitological data and cellular responses in CHB and CS at 28 dpi.

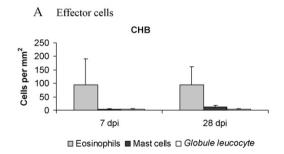
Cells	Worm burden		Length		Epg 27 dpi		Eggs in utero	
	СНВ	CS	СНВ	CS	СНВ	CS	СНВ	CS
Eosinophils	-0.143	-0.286	-0.595	-0.095	-0.893**	-0.567	-0.857**	0.262
Mast cells	-0.333	0.685	-0.357	0.432	-0.214	0.595	-0.31	0.577
GL	0.018	-0.565	-0.036	-0.54	-0.144	-0.332	-0.126	-0.491
CD4+	-0.371	-0.786^{*}	0.429	-0.738^{*}	-0.371	-0.283	-0.486	-0.262
CD8+	-0.429	-0.357	-0.371	-0.548	-0.771	-0.033	-0.6	-0.571
γδ Τ	-0.314	-0.048	-0.657	-0.143	-1**	0.417	-0.886^{*}	-0.31
WC1+	0.143	-0.476	-0.286	-0.19	-0.536	-0.317	-0.786^{*}	-0.286
CD45R+	-0.286	-0.132	0.179	-0.395	-0.25	0.251	0.036	-0.515

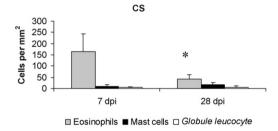
Significant correlation are shown in bold.

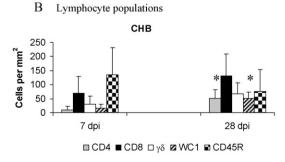
production expressed as both faecal output and *in utero* egg counts, compared to susceptible Canarian sheep (CS). Parasites were also significantly shorter in the resistant breed.

Fecundity (faecal egg counts and eggs *in utero*) has been shown to correlate positively with worm burdens and worm length, in both *Teladorsagia circumcincta* (Ractliffle and Le Jambre, 1971; Stear and Bishop, 1999; Stear et al., 1999) and *H. contortus* (Lacroux et al., 2006) infections. These significant correlations between parasitological parameters are often reported in studies where the early parasitic larval stages are proposed as the target of immunity (Balic et al., 2000b, 2002) and little direct effect is seen on the surviving adult populations. In CS breed, significant correlations were also seen between variations in worm length/burdens and fecundity as previously described in other studies (Ractliffle and Le Jambre, 1971; Stear and Bishop, 1999; Stear et al., 1999; Lacroux et al.,

2006). However, no such correlations were seen between parasitological parameters in resistant CHB sheep, suggesting resistance mechanisms in this sheep breed may be different to those previously studied. In agreement with this finding, no difference in luminal and tissue larval counts or larval length was found between the breeds at 7 or 28 dpi which suggested that protective mechanism(s) in CHB sheep were mainly directed against the adult parasite (González et al., 2008). Reductions in adult worm burdens independent of larval establishment have also been observed in other indigenous breeds (Aumont et al., 2003; Beriaiava and Copeman, 2006) and differences in parasite fecundity between breeds without corresponding differences in worm burden have been reported in some of these breeds (Zajac et al., 1990; Gauly et al., 2002; Hielscher et al., 2006). The mechanism responsible for these effects on the established adult worm population is currently unknown,







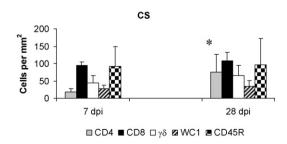


Fig. 4. Abomasal effector cell (A) and lymphocyte population (B) counts at 7 and 28 dpi in abomasal tissue of CHB sheep and CS breed. Results are mean ± standard deviation of 5 CHB sheep and 5 CS breed at 7 dpi and 8 CHB sheep and 9 CS breed at 28 dpi. No significant differences were observed in cell populations between breeds. * shows significant differences (p < 0.05) within breeds between 7 and 28 dpi.

Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

E

^{*} p < 0.05.

^{**} p < 0.01.

J.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

although could intriguingly suggest that resistant mechanisms in these sheep breeds varies to those in previous studies using the more prevalent commercial breeds.

Several immune cell populations were quantified in the abomasal wall of these two sheep breeds, to determine if the observed differences in the parasitological parameters were associated with differences in the local immune responses at 7 and 28 dpi. Surprisingly, no large disparate differences between these breeds were observed in the various immune effector cells and lymphocyte cell subsets. However, a significant reduction in eosinophil numbers at 28 dpi compared with 7 dpi was only observed in the CS breed. No such decrease was observed in the resistant CHB sheep, and abomasal eosinophil numbers were twofold higher in CHB sheep than in CS breed at 28 dpi. This finding, in addition to the eosinophilia detected in CHB sheep (González et al., 2008), suggests that CHB sheep have increased recruitment of eosinophils in the blood circulation and locally, in abomasal tissues, when adult parasites are present. Eosinophils have been demonstrated to surround larvae in vivo and are likely to mediate damage and elimination of the larval parasite (Rainbird et al., 1998; Meeusen and Balic, 2000; Balic et al., 2006). The evidence for a role of eosinophils in modulating parasite resistance against the adult stage is however equivocal.

The enumeration of cells by histological examination does not allow assessment of the functional activity of these cells. Although such assays are beyond the scope of this study, further correlative analysis can give an insight into the relationship between such cell populations and adult parasitological parameters indicating a resistant phenotype. CD4+ lymphocytes responses have shown to be critical in protection against GIN infection (Gill et al., 1993; Peña et al., 2006). A significant negative correlation between CD4+ T cells with worm burden and length was seen in the CS breed and confirmed, as in other conventional studies, suggesting that CD4+T cell populations may be important in modulating parasite establishment (Gill et al., 1993; Peña et al., 2006). A significant correlation was also found between mast cells and globule leucocytes in CS breed. However, no such significant correlative responses were seen in the CHB sheep, confirming that these two sheep breeds show disparate immune responses to H. contortus infection. In contrast to CS breed, eosinophils and $\gamma\delta$ T cell populations (both total $\gamma\delta$ T cells and the WC1+ subpopulation) were negatively correlated with epg at 27 dpi and eggs in utero only in CHB sheep. However, neither of these cells were significantly correlated with adult worm counts and length, suggesting that these cells may play a role in modulating fecundity in GIN parasites.

A significant positive correlation between $\gamma\delta$ T cells and eosinophil numbers at the abomasal mucosa has been reported in early infection and associated with resistance against the larval stages (Robinson et al., 2010). In this response, $\gamma\delta$ T cells were postulated to recruit tissue eosinophils through local IL-5 cytokine production, followed by antibody-mediated eosinophil killing of tissue larvae. Such a mechanism may also occur here during adult establishment, however in this case, the effect may be more pronounced on parasite fecundity rather than

the killing of adult worms that have now established in the lumen. Eosinophils are recognised as important multifaceted immune cells releasing multiple cytokines and mediators (Bao et al., 1996; Giembycz and Lindsay, 1999; Rothenberg and Hogan, 2006) and, may also play an as yet unrecognised role in modulating worm fecundity

In conclusion, we have demonstrated disparate immune responses between two breeds of sheep native to the Canary Islands. Parasite infection and establishment in the relatively more susceptible breed, CS breed, was associated with CD4+ local cellular responses and confirms previous studies of the importance of this cell population in modulating GIN infection. In contrast, the resistant CHB sheep demonstrated a different immune response directed against the adult parasitic stage, and in particular its ability to produce eggs. Fecundity was negatively correlated with eosinophil and $\gamma\delta$ T cell responses in the abomasal mucosa, suggesting that these cell populations could play a previously unrecognised role in modulating female egg production.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. David Knox and Dr. David Bartley for their kind donation of the *H. contortus* L3 used for infection of sheeps in these studies. This trial was supported by Canary Government grant (PI 2007/036) and Cabildo Insular of Gran Canaria through sponsoring Álvaro Hernández.

References

- Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Huntley, J.F., Mazzolin, L.P., Gomes, J.C., 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. Vet. Parasitol. 128, 99–107.
- Amarante, A.F.T., Susin, I., Rocha, R.A., Silva, M.B., Mendes, C.Q., Pires, A.V., 2009. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. Vet. Parasitol. 165, 273–280.
- Aumont, G., Gruner, L., Hostache, G., 2003. Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. Vet. Parasitol. 116, 139–150.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2000a. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. Adv. Parasitol. 45, 181–241.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2000b. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 75, 109–120.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunol. 24, 39–46.
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N.T., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. Parasite Immunol. 28, 107–115.
- Bao, S., McClure, S.J., Emery, D.L., 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.
- Beriajaya, Copeman, D.B., 2006. *Haemonchus contortus* and *Trichostrongy-lus colubriformis* in pen-trials with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. Vet. Parasitol. 135, 315–323.
- Claerebout, E., Vercruysse, J., 2000. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematode in cattle: a review. Parasitology 120, S25–S42.
- Gauly, M., Kraus, M., Vervelde, L., van Leeuwen, M.A.W., Erhardt, G., 2002. Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Meri-

Please cite this article in press as: González, J.F., et al., Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and $\gamma\delta$ T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005

I.F. González et al. / Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx-xxx

- noland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 106, 55–67.
- Giembycz, M.A., Lindsay, M.A., 1999. Pharmacology of the eosinophil. Pharmacol. Rev. 51, 213–339.
- Gill, H.S., Watson, D.L., Brandon, M.R., 1993. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. Immunology 78, 43–49.
- González, J.F., Hernández, A., Molina, J.M., Fernández, A., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N.T., Piedrafita, D., 2008. Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. Vet. Parasitol. 153, 374–378.
- Hielscher, A., Brandt, H., Erhardt, G., Gauly, M., 2006. Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhoen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. Vet. Parasitol. 141, 279–284.
- Kemp, J.M., Robinson, N.A., Meeusen, E.N.T., Piedrafita, D.M., 2009. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. Int. J. Parasitol. 39, 1589–1594.
- Kemper, K.E., Elwin, R.L., Bishop, S.C., Goddard, M.E., Woolaston, R.R., 2009. Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis did not adapt to long-term exposure to sheep that were genetically resistant or susceptible to nematode infections. Int. J. Parasitol. 39, 607-614.
- Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergaud, J., Gruner, L., Brunel, J., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. Haemonchus contortus (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. Vet. Res. 37, 1–16.
- MAFF, 1989. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Diagnostic Techniques, third ed. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? Parasitol. Today 16, 95–101.

- Peña, M.T., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2006. Effect of CD4+ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Cost Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 138, 240–246.
- Piedrafita, D., Raadsma, H.W.R., González, J.F., Meeusen, E.N.T., 2010. Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? Trends Parasitol. 26, 568–573.
- Ractliffle, L.H., Le Jambre, L.F., 1971. Increase of rate of egg production with growth in some intestinal nematodes of sheep and horses. Int. J. Parasitol. 1, 153–156.
- Rainbird, M.A., Macmillan, D., Meeusen, E.N., 1998. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. Parasite Immunol. 20, 93–103.
- Redmond, D.L., Knox, D.P., 2004. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. Vaccine 22, 4252–4261.
- Robinson, N., Piedrafita, D., Snibson, K.K., Harrison, P., Meeusen, E.N., 2010. Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunisation and challenge with *Haemonchus contortus*. Vet. Res. 41 (4), doi:10.1051/vetres/2010009.
- Rothenberg, M.E., Hogan, S.P., 2006. The eosinophil. Annu. Rev. Immunol. 24, 147–174.
- Stear, M.J., Bishop, S.C., 1999. The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. Int. J. Parasitol. 29, 777–780.
- Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. Mechanism underlying resistance to nematode infection. Int. I. Parasitol. 29, 51–56.
- Terefe, G., Grisez, C., Prevot, F., Bergaud, J.P., Dorchies, P., Brunel, J.C., François, D., Fourquaux, I., Jacquiet, P., 2007. In vitro pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. Vet. Res. 38, 647–654.
- Zajac, A.M., Krakowka, S., Herd, R.P., McClure, K.E., 1990. Experimental Haemonchus contortus infection in three breeds of sheep. Vet. Parasitol. 36, 221–235.

