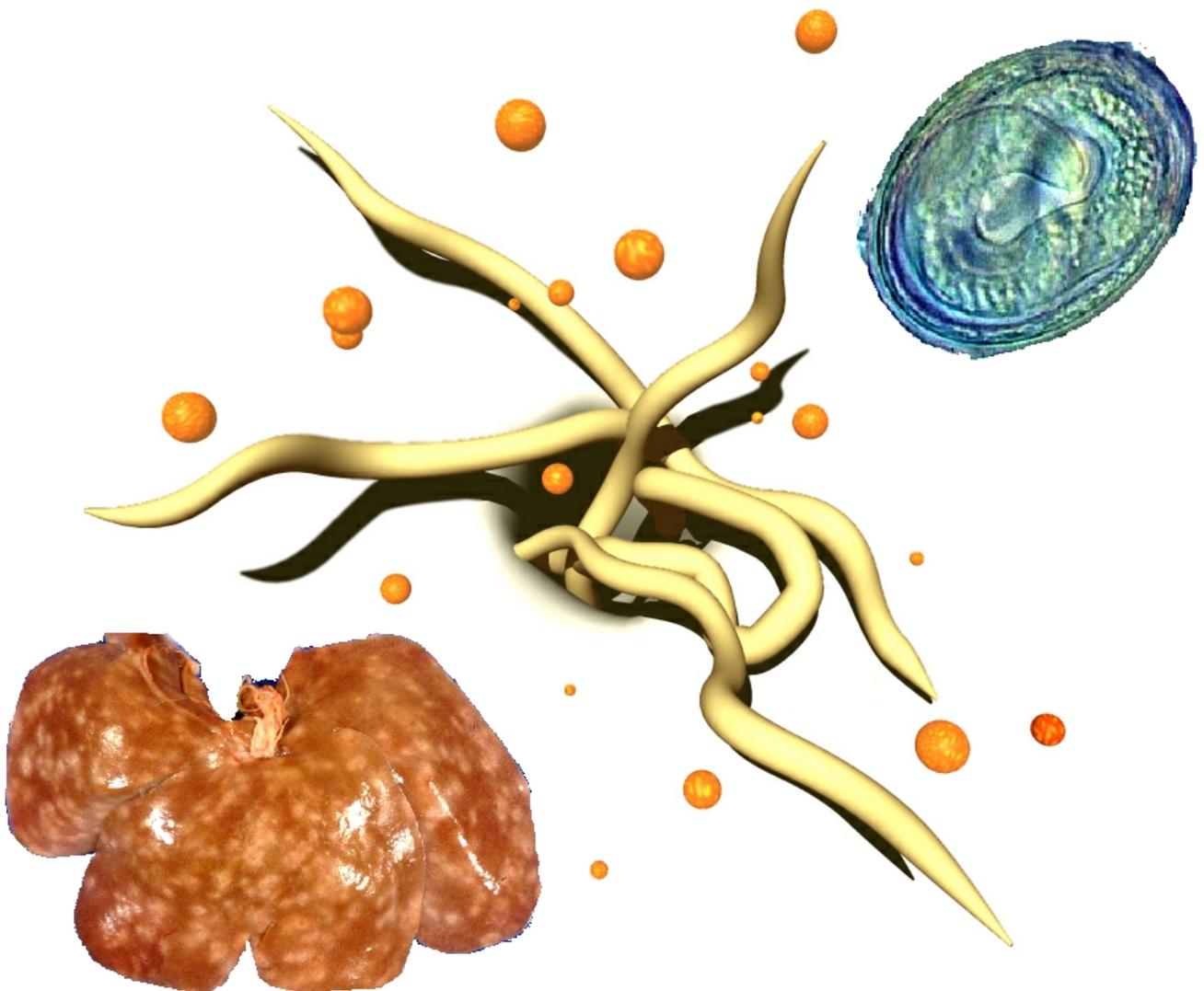




Repercusiones orgánicas de la infección experimental por *Ascaris suum* en el cerdo ibérico



Eva María Frontera Carrión

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Pizarro, 8

Cáceres 10071

Correo e.: publicac@unex.es

<http://www.pcid.es/public.htm>

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y SANIDAD ANIMAL
CÁTEDRA DE PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

**"REPERCUSIONES ORGÁNICAS DE LA INFECCIÓN
EXPERIMENTAL POR *ASCARIS SUUM* EN EL CERDO
IBÉRICO".**

EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN



Año 2000

ÍNDICE

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1.- EL PARÁSITO: <i>ASCARIS SUUM</i> .	
II.1.1.- Encuadre taxonómico	9
II.1.2.- Morfología.	
II.1.2.1.- <u>Huevos</u>	9
II.1.2.2.- <u>Estados larvarios</u>	10
II.1.2.3.- <u>Adultos</u>	10
II.1.3.- Ciclo biológico natural y epidemiología	11
II.2.- EL HOSPEDADOR: CERDO IBÉRICO.	
II.2.1.- Características fisico-funcionales	14
II.2.2.- Sistemas de explotación	15
II.3.- SOBRE LA RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR.....	19
II.3.1.- Respuesta inmune humoral	20
II.3.2.- Patogénesis de la enfermedad.	
II.3.2.1.- <u>Estudio hematológico</u>	22
II.3.2.2.- <u>Estudio macroscópico e histopatológico.</u>	
II.3.2.2.1.- <i>A nivel hepático</i>	24
II.3.2.2.2.- <i>A nivel pulmonar</i>	31
II.3.2.2.3.- <i>A nivel intestinal</i>	33
II.3.2.3.- <u>Estudio inmunohistoquímico</u>	34

ÍNDICE

II.4.- SOBRE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR <i>ASCARIS SUUM</i> .	
II.4.1.- Infección experimental de cerdos y distribución de la carga parasitaria	36
II.4.2.- Embrionamiento de huevos	37
II.4.3.- Antígenos de <i>Ascaris suum</i>.	
II.4.3.1.- <u>Obtención de antígenos de adultos</u>	40
II.4.3.2.- <u>Obtención de antígenos larvarios</u>	44
II.4.3.3.- <u>Otros antígenos</u>	46
II.4.4.- Métodos de recuperación larvaria	47
II.4.4.1.- <u>Método de Baermann</u>	48
II.4.4.2.- <u>Digestión péptica</u>	50
II.4.4.3.- <u>Método del “spin”</u>	52
II.4.4.4.- <u>Método del gel agar</u>	53
II.4.4.5.- <u>Otros métodos</u>	55
II.5.- EN RELACIÓN A LA INMUNIZACIÓN FRENTE A <i>ASCARIS SUUM</i> .	
II.5.1.- En cerdo	56
II.5.2.- En otros hospedadores	61
II.6.- INFLUENCIA DE LA ASCARIOSIS EN LA PRODUCCIÓN.	
II.6.1.- En el peso corporal	63
II.6.2.- En la composición de grasas del hospedador	
II.6.2.1.- <u>En el hígado</u>	66
II.6.2.2.- <u>En la canal</u>	68
II.6.3.- Presencia de enzimas (lipasas, proteasas, etc) en <i>A. suum</i>	69

ÍNDICE

II.7.- TRAMIENTOS ANTIPARASITARIOS EN LA ASCARIOSIS. ACCIÓN DEL PIRANTEL.....	70
III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
III.1.- PLANTEAMIENTO INVESTIGADOR.....	75
III.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	76
III.3.- ANIMALES.	
III.3.1.- Cerdo ibérico.....	80
III.3.2.- <i>Ascaris suum</i>.....	81
III.3.3.- Conejos.....	81
III.3.4.- Ratones.....	83
III.4.- MATERIAL INFECTANTE: HUEVOS EMBRIONADOS.	
III.4.1.- Obtención de huevos de <i>Ascaris suum</i>.....	83
III.4.2.- Cultivo de huevos.....	84
III.4.3.- Estudio de la infectividad de los huevos cultivados.....	84
III.4.4.- Dosificación del material infectante.....	85
III.5.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS.	
III.5.1.- De adultos.....	86
III.5.2.- Larvarios.....	88
III.5.2.1.- <u>Antígeno excretor-secretor larvario</u>	89
III.5.2.2.- <u>Antígeno bruto larvario</u>	89
III.5.3.- De fracciones inmunizantes (de 97, 42 y 14 kDa).	
III.5.3.1.- <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	90
III.5.3.2.- <u>Tinción del gel</u>	

ÍNDICE

III.5.3.2.1.- <i>Tinción reversible de Zinc</i>	94
III.5.3.2.2.- <i>Tinción de Azul de Coomasie</i>	95
III.5.3.3.- <u>Electroelución</u>	96
III.6.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LOS ANTÍGENOS.....	96
III.7.- MÉTODOS DE RECUPERACIÓN LARVARIA. III.7.1.- Del hígado y pulmón. III.7.1.1.- <u>Baermann</u>	98
III.7.1.2.- <u>Digestión artificial</u>	98
III.7.2.- Del intestino	99
III.8.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DEL HOSPEDADOR. III.8.1.- <i>In vivo</i>: Sangre y suero sanguíneo	99
III.8.2.- <i>Post-mortem</i>: Tejidos orgánicos	101
III.8.3.- Recuento de “manchas de leche”	102
III.9.- TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS. III.9.1.- Técnica inmunoenzimática E.L.I.S.A. III.9.1.1.- <u>Estandarización</u>	102
III.9.1.2.- <u>Desarrollo de la técnica</u>	103
III.9.2.- Western blotting	106
III.10.- MÉTODOS HEMATIMÉTRICOS.....	109
III.11.- MÉTODOS HISTOPATOLÓGICOS.....	109
III.11.1.- Técnicas histológicas. III.11.1.1.- <u>Hematoxilina-Eosina</u>	110

ÍNDICE

III.11.1.2.- <u>Tricrómico de Masson</u>	111
III.11.2.- Técnicas inmunohistoquímicas	112
III.11.2.1.- <u>Obtención de sueros hiperinmunes</u>	112
III.11.2.2.- <u>Técnica de PAP</u>	113
III.12.- ANÁLISIS DE MUESTRAS DE GRASA HEPÁTICA.	
III.12.1.- Extracción de grasa	114
III.12.2.- Metilación de los ácidos grasos	115
III.12.3.-Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa ... 116	
III.13.- MEDIOS INSTRUMENTALES.	
III.13.1.- Para la recogida de muestras	
III.13.1.1.- <u>Del parásito</u>	117
III.13.1.2.- <u>Del hospedador</u>	117
III.13.2.- De microscopía óptica	117
III.13.3.- De la analítica inmunológica (ELISA, WB y SDS- PAGE)	118
III.13.4.- Para histopatología e inmunohistoquímica	118
III.13.5.- Tratamiento estadístico	119
IV.- RESULTADOS	121
IV.1.- ASCARIOSIS EN CONDICIONES NATURALES	
IV.1.1.- Resultados parasitológicos	123
IV.1.2.- Resultados serológicos	124
IV.2.- ESTUDIOS PREVIOS A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL (EXPERIMENTO 1).....	129

ÍNDICE

IV.3.- EMBRIONAMIENTO E INFECTIVIDAD DE LOS HUEVOS.....	131
IV.4.- RESULTADOS DE LA REINFECCIÓN E INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL (EXPERIMENTO 2)	
IV.4.1.- Recuento del número de manchas de leche, larvas pulmonares y adultos intestinales.....	134
IV.4.2.- Estudio hematológico.	
IV.4.2.1.- <u>Glóbulos rojos</u>	142
IV.4.2.2.- <u>Hemoglobina</u>	143
IV.4.2.3.- <u>Hematocrito</u>	144
IV.4.2.4.- <u>Glóbulos blancos</u>	145
IV.4.2.5.- <u>Recuento diferencial de leucocitos.</u>	
<i>IV.4.2.5.1.- Linfocitos</i>	146
<i>IV.4.2.5.2.- Neutrófilos</i>	147
<i>IV.4.2.5.3.- Monocitos</i>	148
<i>IV.4.2.5.4.- Eosinófilos</i>	149
<i>IV.4.2.5.5.- Basófilos</i>	150
IV.4.3.- Respuesta inmunitaria humoral mediante la técnica ELISA.	
IV.4.3.1.- <u>Sobre la estandarización de la técnica</u>	151
IV.4.3.2.- <u>Respuesta inmunológica</u>	153
<i>IV.4.3.2.1.- Inmunoglobulina G</i>	154
<i>IV.4.3.2.2.- Inmunoglobulina M</i>	158
IV.4.4.- Estudio macroscópico de las lesiones hepáticas.....	161
IV.4.5.- Estudio histopatológico.....	165

ÍNDICE

IV.4.6.- Estudio inmunohistoquímico	
IV.4.6.1.- <u>Depósito de antígenos en hígado</u>	193
IV.4.6.1.1.- <i>Antígeno pseudocelómico de adultos</i>	195
IV.4.6.1.2.- <i>Antígeno cuticular de adultos</i>	196
IV.4.6.1.3.- <i>Antígeno somático de larvas</i>	198
IV.4.6.1.4.- <i>Antígeno excretor secretor de larvas</i>	199
IV.4.6.1.5.- <i>Antígeno de las fracciones inmunizantes de 14 , 42 y 97 kDa</i>	200
IV.4.6.2.- Depósito de antígenos en pulmón.....	203
IV.4.6.3.- Depósito de antígenos en intestino.....	206
IV.4.6.4.- Depósito de inmunocomplejos mediante detección de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM).....	209
IV.4.7.- Estudios zootécnicos.	
IV.4.7.1.- <u>Influencia en la ganancia de peso de los animales</u>	213
IV.4.7.2.- <u>Perfiles lipídicos del hígado y la canal</u>	219
V.- DISCUSIÓN	229
V.1.- ASCARIOSIS EN CONDICIONES NATURALES.....	231
V.2.- EXPERIENCIA PREVIA DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	236
V.3.- EMBRIONAMIENTO E INFECTIVIDAD DE LOS HUEVOS.....	237
V.4.- EXPERIENCIA DE REINFECCIÓN E INMUNIZACIÓN	
V.4.1.- Resultados parasitológicos (manchas de leche, larvas pulmonares y adultos intestinales)	241
V.4.2.- Análisis hematológico	247

ÍNDICE

V.4.3.- Respuesta inmunitaria humoral.....	251
V.4.4.- Análisis histopatológico e inmunohistoquímico.....	254
V.4.5.- Parámetros productivos: ganancia de peso corporal y perfiles lipídicos en hígado y canal.....	260
VI.- CONCLUSIONES.....	265
VII.- RESUMEN.....	271
VIII.- SUMMARY.....	279
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	285
X.- AGRADECIMIENTOS.....	323

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La ascariosis puede ser considerada como la infección parasitaria más extendida en el mundo entre la población humana y la porcina. Se estima que aproximadamente 1470 millones de personas están infectadas globalmente por *Ascaris lumbricoides* y la morbilidad, con sintomatología evidente, es observada en 122 millones de casos (Chan *et al.* 1994). Por su parte, *Ascaris suum*, "el gusano redondo del cerdo", es igualmente ubicuo, siendo un parásito importante en cuanto a la producción porcina, con una significativa reducción en la ganancia de peso y decomisos de hígados en mataderos, si bien suele presentarse como una infección subclínica (Roepstorff & Nansen, 1994).

La migración de las larvas de *A. suum* en su hospedador natural ha sido descrita por numerosos autores (Murrell *et al.* 1997a; Roepstorff *et al.* 1997). Resumidamente, los cerdos se infectan por la ingestión de huevos en el medio. Esos huevos pasan a través del estómago y eclosionan en el intestino delgado. Las larvas que emergen son L₃ (Geenen *et al.* 1999), las cuales penetran la pared del intestino grueso hacia el hígado. Desde aquí, las larvas migran al pulmón vía sanguínea, penetrando al espacio alveolar, con una ascensión vía traqueal y, al llegar a la boca, son deglutidas para volver nuevamente al intestino delgado. Una vez llegadas a esta localización, la mayoría son expulsadas y el resto se desarrollan hasta adultos.

Al presentar un ciclo evolutivo directo, se encuentra sobre todo en explotaciones intensivas que tienen deficientes instalaciones, manejo y medidas higiénico-sanitarias. No obstante, en explotaciones extensivas, donde se explota la inmensa mayoría del porcino del tronco ibérico de nuestro país, la importancia de la parasitosis que *A. suum* protagoniza, es muy elevada, alcanzando incluso cotas de casi el 50 % en Extremadura (Frontera, 1998).

INTRODUCCIÓN

Debido al régimen de explotación del cerdo ibérico, que requiere la obtención de un producto de la más alta calidad, cualquier injerencia infringida durante el proceso de producción del mismo (y la parasitosis que comentamos la lleva a cabo en buena medida), resulta un detrimento prácticamente irreversible, que alcanza, si cabe, mayor nivel cuando nos referimos a un producto de la cualificación del cerdo ibérico. No cuantitativamente, pero sí cualitativamente, es uno de los principales baluartes de la producción autóctona española de cara a la UE, USA, Japón y al resto del mundo.

A pesar de ello, y con la excepción de los tratamientos periódicos que mediante el uso de antihelmínticos se efectúan, al menos en la gran mayoría de explotaciones, escasas actuaciones se encaminan a luchar contra esta parasitación y sobre todo a prevenir su elevada incidencia. Este hecho y, sobre todo, los relativamente escasos estudios inmunopatológicos y de profilaxis existentes en la actualidad, propiciaron el desarrollo del trabajo planteado en esta tesis.

Así pues, establecimos una serie de objetivos encuadrados del siguiente modo:

- Estudios sobre ascariosis natural en cerdo ibérico, incluyendo análisis parasitológicos e inmunológicos, junto a la recogida de material parasitario para obtención de antígenos encaminados a la estandarización de técnicas inmunodiagnósticas y el conocimiento de su antigenicidad y/o de las fracciones proteicas de los mismos.

INTRODUCCIÓN

- Desarrollo de infecciones experimentales por huevos larvados de *A. suum* en cerdos ibéricos, cuyos principales fines incluyeron estudios parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y zootécnicos, para el conocimiento de las repercusiones de esta parasitosis en la cabaña porcina ibérica.
- Ensayos de antigenicidad e inmunización, que englobaron igualmente la gama de estudios descritos en el párrafo anterior, en pro del conocimiento de la actividad protectora de diferentes proteínas antigénicas, tras el reto realizado a los animales ensayados.

Nos proponemos por tanto, realizar un análisis lo más completo posible de la respuesta orgánica del cerdo ibérico frente a la ascariosis experimental, así como la influencia de esta parasitosis en diferentes parámetros zootécnicos que nos permitan evaluar la importancia de esta frecuente enfermedad parasitaria en nuestra rica cabaña porcina ibérica española.

**REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- EL PARÁSITO: *ASCARIS SUUM*.

II.1.1.- Encuadre taxonómico.

PHYLUM	Nemathelminthes.
CLASE	Nematoda.
SUBCLASE	Secernentea (Phasmodia), Dougherty 1958.
ORDEN	Ascaridida, Skrjabin 1915.
SUPERFAMILIA	Ascaridoidea, Raillet y Henry 1915.
FAMILIA	Ascarididae, Blanchard 1849.
SUBFAMILIA	Ascaridinae, Lane 1923.
GÉNERO	Ascaris, Linneo 1758.
ESPECIE	<i>Ascaris suum</i> , Goeze 1782.

II.1.2.- Morfología.

II.1.2.1.- Huevos.

Los huevos fertilizados son anchos y ovoides, con una cápsula gruesa y transparente, constituida por una membrana vitelina interna, relativamente impermeable y de naturaleza lipoidea, la cual no se encuentra en los huevos infértiles; una capa media transparente y gruesa y una capa externa, mamelonada albuminoide y generalmente teñida de un color café dorado. La membrana vitelina es inerte, y debido a su impermeabilidad evita que sustancias tóxicas del medio ambiente puedan lesionar al embrión. Estos huevos miden 60-75 μm por 50-55 μm en su diámetro menor; cuando son esféricos tienen alrededor de 60 μm de diámetro. El huevo no está segmentado y cuando se elimina con las heces contiene una masa de gránulos gruesos de lecitina.

Los huevos no fertilizados miden aproximadamente 90 μm de longitud,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

suelen ser alargados y su cáscara posee una capa media relativamente delgada y a menudo una capa mamelonada externa escasa o *inexistente*. Estos huevos son producidos por hembras no apareadas, y se observan con frecuencia en las heces de porcinos parasitados. Su estructura interna consiste en una masa de gránulos desorganizados, altamente refringentes y de variados tamaños. Tanto los huevos fértiles como los infértiles, en ocasiones carecen de la capa albuminoide externa. (Beaver, 1986; Chandler, 1965; Bardón, 1992).

II.1.2.2.- Estados larvarios.

La larva presente en el huevo se caracteriza por tres labios, los cuales forman una protuberancia oral definida. Estas larvas son mucho más pequeñas que las de *Toxocara* y presentan distintos orgánulos, tales como aparato bucal, esófago, anillo nervioso, glándulas esofágicas, célula excretora, intestino y primordio genital. Las alas laterales son muy pequeñas y se extienden unos 15 μm en los extremos anterior y posterior. La cutícula carece de estriaciones. Los núcleos ganglionares ocupan toda la cavidad corporal ocultando la mayor parte del esófago, excepto la porción terminal. El intestino carece de lumen y se estructura en siete células poseedoras de gránulos refráctiles. El núcleo de la célula excretora es una estructura oval de unos 6 μm de longitud. En estas larvas también pueden observarse unas pequeñas columnas secretoras. (Nichols, 1956; Bardón, 1992).

II.1.2.3.- Adultos.

El cuerpo de *A. suum* es un muy elongado y fusiforme, de color rosado amarillento. En su extremo cefálico aparecen tres labios con finos denticulos en el margen

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

anterior. El labio dorsal es más ancho que los latero ventrales con una doble papila en cada uno. Carece de interlabia y su esófago puede alcanzar los 6-6,5 mm de longitud.

La longitud del macho se sitúa entre los 15-31 cm, mientras que su anchura oscila de 2 a 4 mm. Su extremidad posterior es cónica y puntiaguda, algo curvada ventralmente. Presenta 75 pares de papilas preanales, una papila impar en el labio anterior de la cloaca y siete pares de papilas postanales. De estas últimas, dos pares, situadas más cerca de la cloaca, son dobles y, las demás son sencillas. Presentan dos espículas iguales, algo curvadas, de unos 1,8-3,5 mm de longitud.

La hembra puede alcanzar unos 20-49 cm de longitud por 3-6 mm de anchura. Su extremo posterior posee un apéndice cónico redondeado y dos anchas papilas postanales, situadas lateralmente. La vulva se sitúa en el tercio medio del cuerpo, en una constricción anular característica que facilita la unión durante la cópula. (Mozgovi, 1968; Schmidt & Roberts, 1984; Soulsby, 1987).

II.1.3.- Ciclo biológico natural y epidemiología.

Ascaris suum, “el gusano redondo del cerdo”, y *Ascaris lumbricoides*, han sido intensamente estudiados a lo largo del tiempo. Los parásitos son cosmopolitas, con una cuarta parte de la población mundial afectada, predominantemente en el tercer mundo (Crompton, 1989; Chan *et al.* 1994) y con cada vez una mayor extendida distribución en el cerdo (Kennedy, 1988; Roepstorff & Nansen, 1994). Aunque los síntomas clínicos son relativamente escasos, una estimación de aproximadamente de 8000 a 10000 niños mueren por ascariosis cada año (Editorial, 1989). En el caso del cerdo, es una parasitosis que afecta sobre todo a la producción (Murrell, 1986;

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Roepstorff & Nansen, 1994), con importante reducción en la ganancia de peso (Stewart & Hale, 1988) y decomisos de los hígados en matadero.

La migración de *A. suum* en su hospedador natural ha sido descrita por Douvres *et al.* (1969), Murrell *et al.* (1997a), Roepstorff *et al.* (1997) y otros. El ciclo evolutivo del género *Ascaris* es directo. Las hembras depositan los huevos insegmentados en el intestino delgado, que salen con las heces y se dispersan en el medio exterior. Una hembra puede depositar unos 200.000 huevos diarios (Brown & Cort, 1927; Sinniah, 1982), aunque algunos autores sugieren que pueden producirse hasta 2×10^6 de huevos por día (Olsen *et al.* 1958).

Los huevos en el pasto llegan a ser infectantes a partir de las 3 ó 5 semanas tras la excreción, dependiendo de que las condiciones del medio sean favorables (Larsen & Roepstorff, 1999). Estos son muy resistentes a los factores disgenésicos ambientales, como falta de humedad, la congelación o el contacto con productos químicos. Esta bionomía le posibilita una viabilidad de hasta 5 años o incluso más. No obstante, el calor y la desecación, tal como ocurre en el suelo arenoso expuesto a la acción directa del sol, los destruyen en pocas semanas. La larva raramente eclosiona, y normalmente la infección se realiza tras la ingestión de huevos infectantes con los alimentos, o a partir de contaminaciones epiteliales que las madres infieren a los lechones. Tras la ingestión, estos huevos eclosionan en el intestino del cerdo (Rogers, 1958), necesitando cuatro estímulos, al menos, para su apertura: temperatura corporal óptima, nivel de anhídrido carbónico de aproximadamente 5 volúmenes/litro, pH aproximadamente 6 y condiciones reductoras no específicas, tales como las proporcionadas por cisteína, glutatión, bisulfito sódico o anhídrido sulfuroso (Fairbairn, 1960, 1961).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las larvas que emergen de los huevos son L₃ (Geenen *et al.* 1999), las cuales penetran la pared del ciego y la parte superior del intestino grueso (Murrell *et al.* 1997a). Subsiguientemente, tras atravesar la pared intestinal van a seguir una migración tisular. Así, la mayoría alcanzan vía sistema porta-hepático, el hígado, aunque algunas, siguiendo una vía linfática, llegan a los ganglios mesentéricos y otras, pueden encontrarse ectópicamente en la cavidad peritoneal y otras localizaciones. Todas estas ubicaciones tienen un carácter claramente excepcional.

La mayoría de las larvas pueden alcanzar el hígado 24 horas después de haber sido ingeridas, o incluso antes. Allí causan una reacción tisular inflamatoria provocando las llamadas “manchas de leche”, descritas en detalle por numerosos autores (Roneus, 1966; Copeman, 1971a,b; Eriksen, 1981; Nakagawa *et al.* 1983). De aquí pasan, vía sanguínea, al corazón para alcanzar el tejido pulmonar en 5 ó 6 días más. Estas larvas migran lentamente desde los alveolos a los bronquiolos, bronquios y, finalmente a la tráquea, teniendo lugar el pico de esta migración a los 12 días post-infección. A partir de aquí las larvas son deglutidas y llegan al intestino entre 14 y 21 días después de la infección. Cuando llegan al intestino delgado la mayoría de las larvas son expelidas (Roepstorff *et al.* 1997) y el resto de las supervivientes se desarrollan hasta formas adultas. El período prepatente dura aproximadamente unas 6 semanas (Roepstorff *et al.* 1997), caracterizándose los adultos por su gran longevidad ya que pueden vivir más de un año.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.2.- EL HOSPEDADOR: CERDO IBÉRICO.

II.2.1.- Características físico-funcionales.

El cerdo o raza ibérica deriva del *Sus mediterraneus* de origen africano, y que en nuestro país se denomina *Sus baeticus*, por ser el área de expansión más definida.

Los animales de esta agrupación tienen una serie de características especiales que lo hacen único en su especie. Las características físicas más destacables son una cabeza de buena longitud, casi en punta, en la cara, con hocico largo y disco terminal muy inclinado. Ojo poco manifiesto y pequeño. Orejas medianas, a veces pequeñas, estrechas y llevadas horizontalmente. Cuello aplanado lateralmente con cruz poco destacada. El tronco es aplanado con un vientre manifiesto. Las extremidades posteriores son poco desarrolladas, dando un jamón poco musculoso y corto (Sotillo & Serrano, 1985).

Estos cerdos destacan por ser muy grasos, de una gran capacidad anabólica y adipogénica, de evolución tardía y con una gran rusticidad y un poder acomodativo muy alto (Aparicio, 1960). La piel siempre es de color oscura y existe una gran variedad de poblaciones regionales con distintas capas según el área geográfica de la península a la que se adaptaron. Así tenemos variedades negras, retintas, rubias y manchadas (Aparicio, 1960).

El peso y crecimiento están muy influidos por el sistema de explotación y nutricional. La camada suele ser variable, entre 5 y 7 lechones por parto, pero se han registrado en algunas ganaderías unas medias superiores (Sotillo & Serrano, 1985). En cuanto al espacio inter-parto, el cerdo ibérico puede hacer hasta dos crías anuales, ostentando un buen instinto maternal con 5 pares de mamas funcionales. Las cerdas de vientre se emplean durante 5 ó 6 años y más, mientras que los verracos de 3 a 4

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

años (Sotillo & Serrano, 1985).

El rendimiento cárnico es muy variable según el sistema de explotación a los que son sometidos, aunque no obstante, para cerdos entre 12 y 14 meses, cuando terminan la “montanera” y con unos 140 Kg, el rendimiento en canal es alrededor del 83 % (Sotillo & Serrano, 1985).

La explotación de esta raza porcina no va encaminada a la obtención de gran cantidad de kilogramos de carne para atender la demanda masiva del mercado, sino a la producción de productos de alta calidad y precio, lo que ha propiciado que sea uno de los escasos tipos raciales no mejorados que han sobrevivido a las modernas técnicas de producción porcina (Ruiz, 1993).

Con el objeto de alcanzar mejoras en distintos parámetros productivos, el cerdo ibérico se ha cruzado con otras razas distintas a las encuadradas en su tronco. Los cruces más significativos han sido con el Tamworth, el Large Black y actualmente el Duroc-Jersey (Aparicio, 1987). Este último aporta importantes ventajas al tronco ibérico: mayor prolificidad, mejor índice de transformación, mayor rendimiento a la canal y mejora en el peso de los jamones (Sotillo & Serrano, 1985), por lo que se ha extendido su empleo hasta el punto de que la mayoría de los cerdos sacrificados pertenecen al cruce de Ibérico x Duroc-Jersey.

II.2.2.- Sistemas de explotación.

El cerdo ibérico se mantiene a pesar de su más baja rentabilidad, en base a la producción de productos elaborados de gran calidad. Para la explotación del porcino ibérico se intenta el aprovechamiento de los recursos naturales de la zona de montes y dehesas. El sistema de explotación es típicamente extensivo. Para realizar el

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

aprovechamiento de la dehesa con el cerdo ibérico, hay explotaciones que desarrollan el ciclo completo partiendo de las cerdas reproductoras llegando al cebo de la totalidad o de una parte de los lechones producidos; otras compran animales en explotaciones especializadas en la cría y recría con el peso adecuado para seguir únicamente la fase de cebo.

Alguno de los factores de los que depende la explotación están relacionados con la reproducción, planes de cría y alimentación en cada etapa.

El ciclo productivo de las cerdas se inicia con la primera cubrición a la edad de 8 a 12 meses. La vida útil es de 3-4 años en los que producen 6-8 camadas de unos 6 lechones cada una, lo que se traduce en la producción de 10 lechones destetados por cerda y año. Los verracos inician las cubriciones al año de edad, renovándose al cabo de 2-3 años (Muñoz, 1993).

Aunque las cerdas pueden dar dos partos por año, serán las condiciones de la explotación las que recomienden que se organicen en dos grupos para obtener cuatro parideras (Tabla 1), de modo que uno de ellos produzca lechones navideños y agostones y el otro marceños y montaneros, buscando en todos un destino final de acabado en montanera:

PARTO	LECHONES	SACRIFICIO	EDAD (meses)
diciembre	navideños	ener-feb	13-14
marzo	marceños	ener-feb	11-12
junio	agostones	dic-ener	17-18
septiembre	montaneros	dic-ener	15-16

Tabla 1.- Distribución de las parideras en explotaciones de cerdo ibérico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El parto se realiza en tres tipos de parideras, mediante el sistema tradicional de boxes individualizados de mampostería, en sistema de camping, (que es el más extendido en la actualidad) y en sistema de jaulas.

El período de cría comprende desde el nacimiento hasta el destete. Los lechones se destetan a la edad de dos meses, habiendo recibido pienso complementario durante la lactancia, llegando hasta un peso de 14 Kg aproximadamente.

Después del destete, se alimentan de pasto y rastrojeras durante la primavera y el verano, complementado con pienso, hasta conseguir el peso adecuado de 8-9 arrobas, para la entrada en la siguiente fase de cebo. En esta etapa de recría es importante que los animales hayan desarrollado un crecimiento adecuado y no estén engrasados (Diéguez, 1992).

El período de cebo va a ser determinante en las características finales de la calidad de la canal. Los animales suelen conseguir un peso de 14 a 16 arrobas con el que se sacrifican. Se puede hablar de tres tipos de cebo:

MONTANERA. Consiste en el tradicional aprovechamiento por el cerdo ibérico de los recursos alimenticios aportados por la dehesa que son fundamentalmente la bellota y los pastos. En la tabla 2 se describe la composición de estas fuentes alimenticias. El consumo es muy variable dependiendo de los factores climatológicos, considerándose el mes de septiembre como condicionante de una buena montanera. Se extiende desde octubre con las bellotas procedentes fundamentalmente de las encinas hasta incluso febrero debido a que las bellotas de alcornoque son más tardías. El cerdo ibérico es el único animal capaz de aprovechar

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la bellota eficientemente. Está capacitado para buscarla y comerla, descascarillándola previamente con facilidad. Se considera que en la fase de cebo los cerdos de unos 100 Kg de peso vivo pueden ingerir por día de 7 a 11 Kg de bellota (Concellón, 1991). Al principio del cebo para que el cerdo reponga 1 Kg de peso son necesarios 8 Kg de bellota, mientras que en la últimas etapas hacen falta aproximadamente 12 Kg de bellota para conseguir el mismo peso. Paralelamente al aprovechamiento de la bellota, el cerdo consume pasto, aproximadamente 1-1,5 Kg/día, que por contener una gran cantidad de fibra bruta, no es un alimento ideal para el cerdo, considerando que es un animal monogástrico, además de que no aporta la suficiente energía. La reposición en montanera es aproximadamente de 60 Kg, siendo en general de 90 días la duración de la montanera, por tanto la reposición en montanera se puede considerar de 0,7 Kg/día.

COMPOSICIÓN	BELLOTA (%)	PASTO (%)
humedad	40	73
proteína	4	10
grasa	6	2
SELN*	80	47
fibra	7	17
cenizas	3	24

Tabla 2.- Composición de la bellota y del pasto.

*SELN: sustancias extractivas libres de nitrógeno.

El régimen en conjunto queda muy desequilibrado en cuanto al contenido en proteínas. Esto origina en los cerdos un alto nivel en la deposición de grasa que puede ir ligado a efectos negativos sobre el crecimiento (Aparicio, 1987). A pesar de los inconvenientes que presenta este tipo de cebo proporciona efectos muy positivos en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la calidad de los productos elaborados, siendo los más apreciados por su más alta calidad sensorial, alcanzando un mayor precio en el mercado.

RECEBO. Se produce cuando la montanera no es buena, debido a condiciones ambientales desfavorables, se hace necesario complementar con pienso a lo largo de la montanera en cantidades de 1-1,5 Kg/día. Cabría hablar de otro tipo de recebo, llamado MEDIA BELLOTA, en el que se alimentan sólo al final con pienso (Muñoz, 1993). El pienso se suministra manteniendo a los cerdos de manera extensiva.

PIENSO. Propio de explotaciones intensivas, donde los animales permanecen durante la fase de engorde en corrales, produciéndose cebones a lo largo de todo el año. Con este sistema se consigue evitar la estacionalidad de la producción, aunque presenta el inconveniente de que se provoca una pérdida de calidad, no sólo condicionada por el tipo de alimentación sino también por la falta de ejercicio.

II.3.- SOBRE LA RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR.

La penetración y el establecimiento de un parásito son dependientes de numerosos factores, que difieren según la localización en el hospedador. Al penetrar, el parásito es reconocido como un agente extraño y se activan una serie de mecanismos inmunológicos que varían considerablemente. Sin embargo, las infecciones parasitarias comparten algunas características comunes. Durante el proceso de invasión de un parásito, se produce una activación del sistema inmunitario adaptativo, en el que se ven involucradas las células T, anticuerpos, etc., y varias clases de células efectoras, tales como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e incluso

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

plaquetas, que ayudan al hospedador a defenderse del parásito (Sbihi, 1996).

El control de las infecciones parasitarias es dependiente de la producción de citoquinas que activan mecanismos que limitan la invasión y supervivencia del parásito. Al contrario, las condiciones que inducen la respuesta inapropiada de citoquinas facilitan la infección y, finalmente, la exacerbación del nivel de la enfermedad.

Según Urban *et al.* (1996), en general, los parásitos intracelulares estimulan una respuesta de tipo I donde el Interferón- γ es el activador inmune predominante. Esta citoquina inhibirá la actividad de la IL-4 en las células B y además promueve el desarrollo de células plasmáticas para que sintetice anticuerpos del tipo IgG₂, que es considerada de mayor importancia en infecciones virales y microbianas que la IgE o la IgG₁ porque es la que establece con mayor eficiencia la fijación de las proteínas del complemento (Paul, 1987).

Los parásitos extracelulares estimulan una respuesta tipo 2 que sintetiza un patrón de citoquinas que incluyen la IL-4, IL-5, IL-9 y IL-10 (Mosmann & Coffman, 1989). En estudios de ratones, la IL-4 producida por las células Th2 inducen una población de células B para diferenciarse preferentemente en células plasmáticas que segreguen anticuerpos de los isotipos IgG₁ o del tipo IgE (Finkleman *et al.* 1997), mientras que la IL-5 estimula la diferenciación de las células B a células plasmáticas que producirán anticuerpos del tipo IgA (Murray *et al.* 1987).

II.3.1.- Respuesta inmune humoral.

Muchos investigadores han encontrado serias dificultades para crear infecciones patentes de *A. suum* en cerdos experimentalmente infectados. Esto puede deberse a

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la resistencia natural, a la resistencia por la edad o incluso a la dieta (ver II.4.1.). De hecho, Andersen *et al.* (1973), demostraron una relación inversa entre la dosificación de huevos y el número de formas adultas desarrolladas en el intestino.

Los cerdos inoculados con *A. suum* exhiben una típica respuesta de hipersensibilidad a la infección del nematodo, incluyendo eosinofilia tisular y periférica, hiperplasia de las células de la mucosa intestinal y producción específica de anticuerpos.

En una serie de estudios de la respuesta inmune humoral a la infección por *A. suum*, Taffs (1963; 1964a; 1964b; 1964c), observó una importante respuesta sérica, medida por las técnicas de fijación de complemento y coagulación. En estas observaciones, los anticuerpos sanguíneos comenzaron a detectarse entre el 7° y 13° d.p.i. Describió dos picos de producción de anticuerpos; uno al 10° d.p.i. y otro entre el 37° y 56° d.p.i. Este segundo pico se correspondía con la muda de L₄ a L₅ en el intestino delgado. No obstante, es de resaltar que el segundo pico observado sólo fue evidenciado en la especie porcina ya que ni en cricetos ni en conejos apareció una segunda oleada de anticuerpos en sangre. La muda de las fases larvarias de *A. suum* en intestino está asociada igualmente con una espontánea pérdida de formas inmaduras (Taffs, 1963; Schwartz, 1959), con lo que es muy posible que el incremento del nivel de anticuerpos en este momento esté muy relacionado con esa pérdida espontánea de formas intestinales.

La inmunidad a la reinfección es adquirida a través de infecciones continuadas naturalmente como ocurre en la naturaleza. Esta inmunidad es transferida vía calostrual a los lechones o por suero o globulinas y puede suponer hasta un 86 % de protección (Kelley & Nayak, 1965a; 1965b).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los cerdos expuestos a *A. suum* desarrollan una sostenida respuesta sérica a los antígenos excretorios secretorios, tanto de los isotipos IgG como de IgA (Lind *et al.* 1993). Debido a que la IgE no ha sido identificada de forma conclusa en el cerdo (Roe *et al.* 1993), y tampoco los reactivos para su detección, no existen actualmente resultados directos para este tipo de respuesta. Sin embargo, las actividades biológicas relacionadas con la producción de IgE, tales como la anafilaxia cutánea pasiva antígeno-específica (Urban *et al.* 1988; Roe *et al.* 1993) y la desgranulación de los mastocitos de la mucosa intestinal (Ashraf *et al.* 1988), están presentes en cerdos infectados con *A. suum*.

II.3.2.- Patogénesis de la enfermedad.

II.3.2.1.- Estudio hematológico.

La migración larvaria de *A. suum* induce, en los cerdos, un pico de eosinofilia en sangre dosis-dependiente al día 10 p.i., y vuelve a los niveles normales a los días 20-30 p.i., independientemente del desarrollo o no de formas adultas en intestino (Ronéus, 1971; Eriksen *et al.* 1980; Rhodes *et al.* 1982).

La respuesta eosinofílica es observada tanto en cerdos recién nacidos como en lechones en crecimiento, mientras que los anticuerpos maternos evitan la respuesta sérica a la inoculación en lechones de 3 días de edad (Eriksen *et al.* 1980). En ratones, en cambio, el pico eosinofílico ocurre más tardíamente, entre el 12 y 17 d.p.i. (Eriksen *et al.* 1980).

Muchos autores han establecido que la defensa contra la gran mayoría de infecciones por helmintos está mediada tanto por anticuerpos del tipo IgE como eosinófilos (Abbas *et al.* 1995).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Este es un tipo especial de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en la que los anticuerpos IgE se unen a la superficie de los helmintos, luego los eosinófilos se unen a través de sus receptores, activándose estos últimos y secretando las enzimas de los gránulos que destruyen a los parásitos.

Estas respuestas observadas tanto en infecciones por *Ascaris* como por otros parásitos, tales como *Nippostrongylus*, filarias y esquistosomas, se atribuyen a la tendencia que tienen los helmintos a estimular la subpoblación Th2 de células T colaboradoras CD4+, que secretan IL-4 e IL-5. La IL-4 estimula la producción de IgE, y la IL-5 estimula el desarrollo y activación de los eosinófilos.

Los eosinófilos pueden matar más eficazmente a los helmintos que otros leucocitos, porque la proteína básica principal de los gránulos de los eosinófilos puede ser más tóxica para los helmintos que las enzimas proteolíticas y que los derivados reactivos del oxígeno producidos por los neutrófilos y macrófagos.

Usando anticuerpos monoclonales y citometría de flujo Lunney *et al.* (1986), han demostrado un incremento transitorio de macrófagos sanguíneos periféricos y expresión celular de MHC-II en cerdos naturalmente expuestos a huevos de *A. suum*, indicando que junto a la especificidad del antígeno presentado, el tipo de exposición al parásito también contribuye al éxito de la respuesta inmune.

En cerdos infectados experimentalmente con dosis múltiples solo se observó un moderado incremento del número de macrófagos. En ninguno de los grupos se pudo determinar cambios en el número de linfocitos T helper circulantes (CD4⁺) ni linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Sí se ha demostrado un corto y transitorio incremento de la respuesta blastogénica de los linfocitos sanguíneos circulantes, proceso que ocurre más tempranamente que la respuesta de los anticuerpos circulantes (Urban &

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tromba, 1982; Rhodes *et al.* 1982; Barta *et al.* 1986).

II.3.2.2.- Estudio macroscópico e histopatológico.

II.3.2.2.1.- *A nivel hepático.*

Las primeras consideraciones realizadas en cuanto a la posible relación en la aparición de lesiones a nivel hepático con la migración de las larvas de *A. suum* fueron establecidas por Hall (1924), que definió como hepatitis focal intersticial a unas manchas de color blanquecino aparecidas en la superficie del hígado. Posteriormente, Schwartz y Alicata (1933), confirmaron este mismo hecho con idénticas consideraciones.

En 1934, Roberts describió el desarrollo de cirrosis hepática en cerdos tras infecciones secundarias por *A. suum*. Sin embargo, la asociación definitiva de las larvas de *A. suum* con el desarrollo de lesiones hepáticas fue demostrada de forma conclusiva por Oldham y White (1944) y Roneus (1966).

Posteriormente, numerosos autores (Copeman, 1971, Eriksen, 1981 y Nakagawa *et al.*,1983), han estudiado en profundidad las lesiones hepáticas caracterizándolas tanto desde un punto de vista macroscópico como histológico.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LAS “MANCHAS DE LECHE”.

Muchos son los autores que han establecido sus propias clasificaciones de las “manchas de leche” hepáticas atendiendo especialmente al aspecto macroscópico visual, de manera que a lo largo de los años de investigación han aparecido muchas denominaciones, destacando que a veces denominaciones diferentes de distintos autores en realidad hacen referencia al mismo tipo de lesión.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Roneus (1966) describió 3 tipos de manchas de leche;

- a) las pequeñas manchas de tejido de granulación, es decir, manchas reticulares,
- b) las grandes manchas de tejido de granulación
- c) las linfonodulares.

Las dos primeras aparecen como lesiones “en red” o “en malla” caracterizadas porque se observan en forma de manchas grises en los septos interlobulares (cantidad incrementada de tejido conectivo). Las grandes manchas de tejido de granulación tienen un tejido central compacto grisáceo-blanco, formándose alrededor de una larva atrapada. Las pequeñas manchas de tejido de granulación no presentan ese centro compacto descrito anteriormente y son generadas a lo largo de tractos migratorios de las larvas. Estas lesiones pueden aparecer hacia el día 3 p.i. y normalmente suelen desaparecer al 40 d.p.i. Las linfonodulares son redondas, con nódulos de linfocitos semitransparentes, perlados y marcadamente de bordes definidos. Estas últimas fueron desarrolladas a partir de las grandes manchas de granulación. En infecciones monodosis las manchas linfonodulares aparecen al día 10 p.i., pudiendo persistir hasta el día 70 p.i. y desapareciendo definitivamente hasta el día 90-170 p.i.

Nakagawa *et al.* (1983) hizo un somero estudio de las lesiones hepáticas en cerdos de 18 meses de edad que procedían de granjas contaminadas por este parásito. Las “manchas de leche” fueron clasificadas en manchas compactas, las llamadas “mesh-worked” (en español podrían denominarse como las manchas reticulares) y manchas linfonodulares. Igualmente Yoshihara *et al.* (1987a,b), se basó en esta misma clasificación para describir las lesiones aparecidas en diferentes lotes de cerdos tratados en mono y multidosis y sacrificados a diferentes tiempos p.i.

Las manchas de leche compactas tienen apariencia de nódulos duros al tacto,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

blancos y redondos, de 0,5 a 1 cm de diámetro. Suelen sobresalir ligeramente de la superficie del hígado y a menudo, se acompañan de pequeñas petequias hemorrágicas en el centro de la lesión.

Las manchas de leche reticulares se observan como focos de forma irregular de color blanquecino con un incremento del tejido conectivo interlobular y un tamaño que puede variar desde los 0,5-1 cm hasta incluso 3-8 cm de diámetro. Suelen ser manchas que aparecen muy tempranamente, pues diversos autores las han descrito en cerdos sacrificados a los pocos días p.i. (Yoshihara *et al.* 1987; Roepstorff *et al.* 1997). Por último, las manchas linfonodulares se definen como nódulos perlados semitransparentes de 0,1-0,3 cm de diámetro y alzadas levemente sobre la superficie hepática. Estas lesiones fueron las únicas que aparecieron en cerdos tratados en monodosis y sacrificados a la 5ª semana p.i. (Yoshihara *et al.* 1987).

En ocasiones, la superficie hepática presenta otras lesiones, tales como manchas de color rojizo de tamaño entre 0,2-0,5 cm, y que son características sobre todo de cerdos sacrificados a los pocos días p.i. tanto tras infección en monodosis como en multidosis (Nakagawa *et al.* 1983).

Roepstorff *et al.* (1997), estudiaron diferentes grupos de cerdos infectados con distintas dosis de huevos de *A. suum*, sacrificándolos secuencialmente para comprobar la patogénesis de las manchas de leche. Distinguen entre manchas blancas de tejido de granulación y las manchas blancas linfonodulares, según la descripción realizada por Roneus (1966). A la necropsia, el máximo número de manchas del primer tipo lo observaron al día 7 p.i., independientemente del nivel de dosificación recibida por los cerdos, no estando directamente correlacionado con el inóculo recibido por los cerdos; no obstante, indican que, a mayor número de huevos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

administrados, aparecieron una cantidad más elevada de estas manchas. La mayoría de las manchas del tipo de granulación al día 10 p.i. fueron claramente de reparación (menos blancas y distintas que las del día 7 p.i.) y al 14 d.p.i. y posteriormente comprobaron una evidente reducción del número de ellas. Por su parte, las manchas linfonodulares las describen como más concretas, comenzando su aparición sobre el 10 d.p.i. y persistiendo en un bajo número a lo largo del experimento, máximo hasta el día 56 p.i.

Tanto las lesiones de tejido de granulación como las linfonodulares son bien conocidas a nivel de inspección de hígados en matadero, procedente de cerdos naturalmente infectados, correspondiendo un 24 % de las manchas a las de tipo linfonodular (Roneus, 1966; Bindseil, 1967). Así, los hígados de cerdos naturalmente infectados presentan manchas similares a las que aparecen en las fases tardías tras infecciones experimentales, indicando que, dichos cerdos de engorde sacrificados en matadero, a menudo han pasado la fase más activa de formación de manchas de leche.

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MANCHAS DE LECHE.

Desde el punto de vista histológico, las manchas compactas, según la clasificación establecida por Nakagawa *et al.* (1983) y por Yoshihara *et al.* (1987) serían consecuencia de la presentación de una hepatitis eosinofílica intersticial acompañada de necrosis intralobular, degeneración arteriolar y aparición de granulomas con posible presencia de restos de la larva en el centro de la lesión. Por su parte, las manchas reticulares, también llamadas como “mesh-worked” por estos autores, presentarían una importante fibrosis acompañada ocasionalmente de infiltración de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

pocos eosinófilos y linfocitos. Por último, las manchas linfonodulares quedan definidas por estos autores como una hiperplasia linfocelular.

La descripción histológica de las lesiones de forma secuenciada según la temporalidad y forma de infección del hospedador es muy similar tras la primera y segunda infección.

Eriksen (1982) estudió la respuesta de cerdos tras infección primaria y secundaria, observando que el número de manchas en hígado a los días 7, 14 y 21 fue similar, se tratara de la primera o segunda infección, presentándose algo mayores y más distinguibles en el segundo caso.

Tras la administración de L₃ en los cerdos, se desencadena un proceso de resistencia adquirida, que queda patente por la observación de lesiones más intensas, un incremento de anticuerpos, respuesta hematológica y decrecimiento del número de vermes en pulmón e intestino delgado. Las manchas de leche son más grandes, numerosas y distinguibles en cerdos con resistencia y además, se produce una más rápida curación de las mismas, entre los días 7 y 21 p.i.

En infecciones primarias, los cambios histológicos más tempranos se describen como una respuesta no específica al daño mecánico producido por el paso de las larvas (Copeman, 1971a, b). Al día 1 p.i. se observan rutas migratorias por el paso reciente de larvas a través del parénquima, que aparecen como focos de neutrófilos y células mononucleares, mezcladas con células desbridadas del hígado (Eriksen, 1981). En la proximidad de las rutas migratorias suelen evidenciarse edemas alrededor de los vasos portales y septos interlobulares. Las lesiones se incrementan al día 3-4 p.i. desarrollando desde pequeños focos hemorrágicos septales y periseptales, hasta necrosis por la ruptura de vasos portales y la migración de las

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

larvas en el parénquima.

Los tractos migratorios se encuentran llenos de eritrocitos, fibrina y células desbridadas del hígado. Se observa además, infiltración celular por neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares, seguida de hiperplasia del tejido conectivo interlobular, conductos biliares y arteria hepática.

Al día 7 p.i. los principales cambios en el hígado van a ser de reparación de los tractos migratorios. El edema de las áreas portales decrece poco a poco y empiezan a observarse los primeros depósitos de fibrina. Además hay una progresiva reducción del número de eosinófilos y mononucleares. La hiperplasia comienza a ser evidente en las áreas portales, en el epitelio de los conductos biliares y en la túnica media de las arterias. Una segunda oleada de eosinófilos, de distribución general a lo largo de los septos interlobulares no asociada a las áreas previamente dañadas, se presenta al día 10-15 después de la primera inoculación. Se evidencia claramente una marcada hiperplasia del tejido conectivo interlobular, conductos biliares y arterias hepáticas. Hacia el día 21 p.i. hay casi una completa reparación de las lesiones. El tejido fibroso interlobular y capsular está muy reducido y solo escasos focos granulomatosos están presentes.

En infecciones secundarias, lejos de aumentar el número de eosinófilos que se produjo en la infección primaria, no sólo localizados en los focos de migración larvaria, se observa una segunda oleada de distribución mucho más generalizada y tan temprana como a los 3-5 d.p.i. La cinética y distribución septal generalizada de los eosinófilos en infecciones secundarias es equivalente a una reacción de hipersensibilidad (Copeman, 1971).

Al día 1 p.i. tras infecciones secundarias, se observan muy pocas larvas en el

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

parénquima hepático, y las que aparecen no se ven rodeadas de reacción celular. En los días siguientes, los septos interlobulares y las áreas portales se van engrosando y ampliando debido al marcado edema, al exudado fibrinoso y a la infiltración de eosinófilos y mononucleares. Hacia la semana post-infección, se observa proliferación de fibroblastos para cumplir la función de reparación del parénquima dañado.

Al cabo de las dos semanas p.i., el diámetro de los septos interlobulares va decreciendo pero todavía hay una masiva infiltración de eosinófilos en algunas áreas e hiperplasia de conductos biliares y de arterias. A la tercera semana p.i., la reparación es casi completa, y es precisamente esa reparación, la que da lugar a la formación de entramados de tejido conectivo de los septos interlobulares (Erisksen, 1981).

Bindseil (1981), estableció la comparación de las lesiones hepáticas provocadas por *A. suum* en ratones con las lesiones en cerdo. Los hallazgos lesionales sugieren que la necrosis del hígado en ratón es inicialmente periacinar (centrolobular), causada por anoxia, tras la obstrucción vascular por la localización de las larvas en los sinusoides, lesión que es muy diferente a la aparecida en cerdo. En ratón no se empiezan a ver las lesiones hasta el día 2 p.i. con un moderado número de manchas grises en la superficie. Entre los días 5 y 7 p.i., se produce el máximo número de manchas, tomando un aspecto moteado. El hígado aparece casi normal tras el día 12 y completamente normal el día 14 p.i.

Histológicamente no se empiezan a observar lesiones hasta la hora 12 p.i., como pequeños focos de células mononucleares, heterófilos y eosinófilos dispersos, además de una discreta necrosis periacinar en áreas alrededor de las venas centrales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los cambios en el hígado de los ratones fueron mucho más severos al día 5 p.i. Áreas confluentes del parénquima necrótico aparecieron a lo largo del hígado correspondiendo con la grisácea y moteada apariencia del hígado. En estos hígados de ratón los resultados negativos del PAS y de la tinción hematoxilina-ácido túngstico, indicaron que la obstrucción por la localización larvaria no está acompañada de cambios fibrinoides ni trombosis.

Al contrario que en el ratón, en el cerdo las lesiones tempranas están caracterizadas por numerosas hemorragias subcapsulares reflejadas histológicamente en masivas hemorragias acinares. Estos cambios coinciden con el pico en el número de larvas en hígado. Las necrosis descritas en ratón nunca se habían descrito en cerdo. Otras diferencias son que las larvas generalmente se localizan en las acumulaciones celulares y sólo muy ocasionalmente en los sinusoides (como sí ocurría en ratón). Además a los pocos días p.i. se ve un gran ensanchamiento de los septos y severa eosinofilia con una recuperación completa de las lesiones en el hígado del cerdo al día 40 p.i. Según todo lo descrito de las lesiones en ratón, se concluye que esta especie animal es un modelo inadecuado para el estudio de la patogénesis de las lesiones hepáticas en cerdo por las grandes diferencias existentes entre ellos.

II.3.2.2.2.- A nivel pulmonar.

Eriksen (1981) describió por primera vez las lesiones patológicas por la migración larvaria de *Ascaris suum* a nivel pulmonar e intestinal.

Al 3 d.p.i., en infecciones primarias, se observa una infiltración eosinofílica a nivel de los septos alveolares, producida por la llegada de las larvas a nivel pulmonar.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Al día 7 p.i., la migración larvaria causa edema intersticial, enfisema alveolar y hemorragias severas en este tejido, conjuntamente con un enorme aumento de la infiltración por eosinófilos y adición de algunas células mononucleares y neutrófilos.

Las larvas atrapadas en el tejido pulmonar consolidado se observan rodeadas de una línea interna de células desbridadas, las cuales son reemplazadas poco a poco por eosinófilos y mononucleares.

Se comprueba un estrecho contacto entre las larvas y eosinófilos degranulados e incluso gránulos eosinofílicos libres en los alveolos. Aparece un importante exudado bronquial compuesto principalmente por eosinófilos y células desbridadas pero con pocos mononucleares y neutrófilos.

Hacia el día 14 p.i. los septos alveolares y perilobulares están engrosados por la infiltración de células mononucleares, mientras que decrece la infiltración eosinofílica.

Al día 21 p.i., se observan como principales procesos los de reparación, con una disminución progresiva del número de eosinófilos y proliferación de nódulos linfoides peribronquiales, junto a algunos focos granulomatosos alrededor de larvas degeneradas.

En infecciones secundarias, de nuevo se observaron edemas y enfisemas acompañados con una marcada bronquitis eosinofílica. Además, parece que las larvas son atacadas por eosinófilos y células mononucleares, apareciendo una marcada proliferación del tejido linfoide peribronquiolar.

También pueden aparecer granulomas con células gigantes y epitelioides alrededor de larvas en degeneración. El proceso de reparación ya se observa al día 14 p.i. acompañado de hiperplasia arterial.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.3.2.2.3.- *A nivel intestinal.*

La primera barrera orgánica a la mayoría de los nematodos gastrointestinales en los mamíferos es el intestino, el cual es un complejo, diverso y dinámico, de tejido cuyo papel primordial está en la digestión y absorción de nutrientes. Sin embargo, debería también funcionar como una barrera selectiva a la entrada de agentes extraños (Urban *et al.* 1989).

Referente a la ascariosis, diferentes estudios han comprobado la existencia de una densa población de eosinófilos a lo largo de las vellosidades, los días 14 y 21 p.i. También se produce un incremento del número de células plasmáticas y de la secreción mucosa.

Los nódulos linfáticos generalmente se encuentran repletos de linfocitos y con infiltración eosinofílica. La administración de *A. suum* también provoca un incremento de anticuerpos del tipo IgA e IgM en las células de la *lámina propia* del yeyuno (Marbella & Gaafar, 1989).

El peso del intestino delgado es mayor tras la administración repetida de huevos, independientemente de la presencia de formas adultas (Rhodes *et al.* 1982). No ha podido ser investigado todavía si esta hipertrofia pudiera ser atribuida a la eclosión y penetración de las L₃.

De cualquier modo, Stephenson *et al.* (1980) encontraron un significativo aumento del peso del intestino, principalmente debido a la hipertrofia de la *tunica muscularis*, tras la infección experimental con larvas transferidas oralmente. Hubo una correlación entre el número de formas intestinales establecidas y la hipertrofia muscular del intestino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.3.2.3.- Estudio inmunohistoquímico.

La historia de la inmunohistoquímica comenzó en 1941 al identificar pneumococci (Coons *et al.* 1941) usando un método de fluorescencia directa. Posteriormente, le siguieron métodos indirectos, la adicción de peroxidasa, la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (Sternberger, 1979) y el uso del complejo avidina y biotina en los comienzos de los años 80 (Falini & Taylor, 1983). Con el paso del tiempo, cada uno de los avances fue favoreciendo la sensibilidad de dicha técnica.

Las lesiones provocadas por la migración larvaria de *Ascaris suum*, han sido estudiadas ampliamente, tal y como se ha descrito en el apartado II.3.2.2.1. Sin embargo, estos estudios se han establecido sobre todo a nivel histológico, y muy pocos trabajos existen actualmente que analicen la distribución de las poblaciones celulares implicadas, con el objeto de evaluar convenientemente la naturaleza de la respuesta inmune, así como el estudio de la distribución de los antígenos tisulares que dejan las larvas en su migración por el organismo.

No obstante, Pérez, *et al.* (1999) analizaron la distribución de linfocitos T (CD3), células B (CD79⁺), macrófagos (Mac387, lisozima), inmunoglobulinas G, M y A, antígeno MHC clase II y proteína S-100 en el infiltrado inflamatorio de lesiones hepáticas de cerdos parasitados naturalmente por *A. suum*. En este estudio, caracterizaron las lesiones hepáticas según Nakagawa *et al.* (1983), observando que las lesiones más agudas presentaban un marcado predominio de eosinófilos y neutrófilos, y menor número de macrófagos, es decir, la respuesta estaba mediada principalmente por células fagocíticas. Estas mismas lesiones presentaban un escaso número de linfocitos (CD3⁺), con moderadas células plasmáticas reactivas frente a IgG o IgA, siendo ocasionales las IgM⁺. Las lesiones algo más crónicas, presentaban

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

tanto linfocitos B como T, con numerosas células dendríticas foliculares (S-100+). Las lesiones más crónicas presentaban una respuesta inmune residual tanto celular como humoral, predominando los fenómenos de fibrosis.

En biopsias hepáticas de personas infectadas por *Toxocara canis*, se observó la presencia de depósitos de antígeno excretor-secretor larvario fagocitados por macrófagos en la periferia de granulomas ricos en eosinófilos, en el infiltrado inflamatoria portal, entre las células epitelioides cercanas a las zonas de necrosis y secuestrados en el colágeno de la región periportal (De Brito *et al.* 1994). Del mismo modo, también se ha reportado la existencia de depósitos de antígenos en la matriz de colágeno en toxocariasis experimental murina (Parson *et al.* 1986).

En el caso de *A. suum*, existen muy pocas referencias bibliográficas referentes al depósito de antígenos del parásito a nivel de los distintos órganos de migración. Marbella & Gafar (1989) realizaron estudios inmunohistoquímicos en animales infectados por *A. suum*, con el fin de detectar la producción y distribución de células portadoras de inmunoglobulinas, preferentemente a nivel intestinal. Del mismo modo, utilizaron la técnica peroxidasa anti-peroxidasa para comprobar la existencia de antígenos del parásito a nivel intestinal. Sus resultados demostraron que la principal localización de los antígenos a nivel de la mucosa intestinal se situaba cerca de las regiones intercriptales, normalmente asociada a los lugares donde también se acumulaban las células plasmáticas cargadas de inmunoglobulinas.

En general, los cerdos infectados en dosis múltiples presentan una mayor concentración de inmunoglobulinas que en dosis única. Además, las células positivas a IgA estuvieron presentes en una mayor cantidad que la IgM e IgG.

II.4.- SOBRE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *ASCARIS SUUM*.

II.4.1.- Infección experimental de cerdos y distribución de la carga parasitaria..

Cuando los cerdos son inoculados experimentalmente con huevos de *A. suum*, las consecuencias en cuanto al establecimiento de la infección, se caracterizan por su alto grado de impredecibilidad, con unos porcentajes muy variables aunque generalmente bajos (aproximadamente un 20,5 % de cerdos desarrollarán formas adultas). De hecho, se observa una relación inversa entre la dosis de infección, respecto al número de adultos establecidos en intestino delgado (Andersen *et al.* 1973; Jorgensen *et al.* 1975).

Generalmente la correlación entre la ingestión de huevos infectantes y el número de vermes intestinales es pobre (Nilsson, 1982; Urban *et al.* 1989; Eriksen *et al.* 1992a,b; Stankiewicz *et al.* 1992; Roepstorff *et al.* 1997).

En condiciones de campo, lo más normal es que los cerdos se encuentren ingiriendo huevos repetidamente y con diferente cantidad de los mismos en cada exposición. Determinadas observaciones indicaron que la dosificación múltiple con huevos de *A. suum* permiten el desarrollo de infecciones patentes de una forma más eficaz que la dosificación única (Stankiewicz *et al.* 1990; Yang *et al.* 1990; Eriksen *et al.* 1980).

Recientemente, se han descrito dos métodos que provocan un mayor éxito en cuanto al establecimiento de infección experimental, que son la transferencia de larvas o vermes adultos a cerdos jóvenes (Jurgensen *et al.* 1996) y la inyección intravenosa de larvas recién eclosionadas (Jurgensen *et al.* 1999).

Típicamente, la población de vermes en los cerdos sigue un patrón de sobredispersión, en el que sólo unos pocos cerdos contienen la mayoría de los

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

helmintos; otros, sólo presentan una carga baja de los mismos y la mayor parte de los animales no presentan infección (Eriksen *et al.*, 1992; Boes *et al.* 1998). Parece ser que el factor clave para este fenómeno es la reacción de autocuración, en la cual los vermes inmaduros son expulsados del intestino.

En infecciones simples (monodosis), este mecanismo de expulsión tiene lugar entre el 14 y el 21 d.p.i. (Roepstorff *et al.* 1997). Sin embargo, este fenómeno ocurre también en exposiciones continuadas al parásito o sus formas infectantes (Urban *et al.* 1988; Eriksen *et al.* 1992; Roepstorff & Murrell, 1997). Aún no ha sido establecido el mecanismo por el que se produce la autocuración con la expulsión de las larvas de *A. suum* del intestino del cerdo, aunque podría estar mediada por mecanismos inmunes del propio animal o bien por factores intrínsecos a las propias larvas.

II.4.2.- Embrionamiento de huevos.

A lo largo de las experiencias realizadas para embrionar huevos de *A. suum*, los distintos autores han empleado varios medios de incubación y temperaturas diferentes obteniendo resultados que no siempre han sido concordantes.

El medio de embrionamiento más utilizado ha sido el **agua formolada**, para evitar el crecimiento de agentes contaminantes durante el periodo de incubación. Así, Wong *et al.* (1976) cultivan en formalina al 0,05 % durante 40 días a temperatura de 24 °C. En 1981, Jablonowski *et al.* consideraron que el medio más favorable para el desarrollo de los huevos de *A. suum* es la solución aireada de formalina al 1 % a una temperatura de 30 °C, aunque señalaron que otros medios acuosos también eran aptos para el embrionamiento, aún a pesar de requerir un mayor tiempo para el desarrollo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Urban *et al.* (1981), también utilizan formalina al 0,1 %, decorticando previamente los huevos. Consiguen el embrionamiento en 28-30 días a 25 °C, con bombeo constante de aire.

Igualmente, Buchwalder *et al.* (1984) tardan unos 30 días en embrionar huevos cultivados en formalina al 1 % a 24 °C. Por su parte, Hale *et al.* (1985) cultivan huevos de *A. suum* en placas de petri con un 2 % de formalina en agitación periódica a 25 °C, tardando aproximadamente unos 30 días en completar la fase de embrionamiento. Smith *et al.* (1983) aumentan considerablemente la concentración de formalina hasta un 4 % para embrionar huevos de *A. lumbricoides* y *A. suum* incubándolos a 19-21 °C, sin concretar el tiempo de embrionamiento. Algunos años más tarde, Haswell-Elkins *et al.* (1992) tras obtener los huevos del útero de las hembras y embrionarlos en un medio constituido del 2 % de formalina y 125 unidades/ml de nistatina, consiguen completar el embrionamiento a 25 °C en 40 días.

Otro de los medios de embrionamiento más utilizado ha sido la solución de **ácido sulfúrico** a distintas concentraciones, con la misma finalidad que la formalina, impedir el crecimiento de microorganismos. Así, por ejemplo, en 1962 Hass & Todd embrionan huevos de *Ascaris* en ácido sulfúrico 0,1 N a una temperatura de 26 °C y en agitación constante. Este mismo medio es utilizado también por Sugane & Oshima (1983). Por su parte O'Grady & Harpur (1985) suspenden huevos de *Ascaris suum* en sulfúrico 0,05 M e incuban a baño de agua a 30 °C en agitación constante durante 21 días. Eriksen (1990) desarrolla los huevos de *A. suum* en recipientes durante 4 a 6 semanas en un medio constituido con ácido sulfúrico 0,1 N y a temperatura ambiente.

Aunque las soluciones de ácido sulfúrico y formalina han sido las más

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

comúnmente utilizadas, muchos otros autores han usado diferentes medios. Entre ellos, el **hidróxido sódico**, ya que también previene el crecimiento de microorganismos. En este sentido, Boroskova *et al.* (1974) cultivaron los huevos de *A. suum* en NaOH 0,1 N a 28 °C durante 30 días. El mismo medio y con similares características fueron utilizadas por Soltys *et al.* (1992) incubando los huevos en NaOH 0,1 M a 37 °C durante 28 días. En ese mismo año, Benkova *et al.* (1992a,b) consiguieron embrionar huevos a partir de hembras grávidas de *A. suum* mediante cultivo de NaOH 0,1 M a temperatura ambiente y durante 4 semanas aproximadamente.

Nicholas *et al.* (1984) embrionan en **agua** a temperatura ambiente los huevos de *A. suum* y, Brow *et al.* (1984) cultivan huevos de este parásito a 27 °C en una mezcla de **arena y sulfato de cobre** al 2 % durante 21 días.

Utilizando **solución salina**, Fenoy *et al.* (1987, 1988) tardan 14 días en obtener un 97 % de huevos embrionados, los cuales alcanzan el 100 % tras 21 días de incubación a 37 °C y en presencia de la luz. Lukes (1992), después de haber extraído los huevos de los úteros de las hembras los cultivó durante 3 horas a temperatura ambiente en HCl al 0,5 % con agitación suave. Al cabo de este tiempo, fueron lavados con agua y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 15 minutos, transfiriéndolos a continuación a un papel de filtro en un vidrio de reloj, tras lo cual, todo el conjunto se pasó a una placa de petri con **dicromato potásico** al 0,05 % incubándolos en esta solución durante 28 días a 27 °C.

Komatsu *et al.* (1996a,b) también obtuvo los huevos a partir de las hembras grávidas, removiendo dichos huevos con un 10 % de **NaOCl** e incubándolos a 28 °C durante 4 semanas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.4.3.- Antígenos de *Ascaris suum*.

II.4.3.1.- Obtención de antígenos de adultos.

En relación a la obtención y purificación de **antígeno procedente de fluido pseudocelómico**, Dubinsky *et al.* (1982) postulan la conveniencia de recoger adultos de *A. suum*, lavarlos en buffer salino, para posteriormente abrirlos y recoger el fluido perivisceral, como paso previo. Una vez obtenido dicho fluido, estos autores proceden a su centrifugación, a 1000 g durante 10 minutos, tras lo cual recogen 0,4 ml del sobrenadante, que es diluido al 13% con NaCl 0,85% (0,4 ml de sobrenadante x 3 ml de NaCl). Por su parte, Rhodes & Staudinger (1983) extraen fluido pseudocelómico de *Ascaris* adultos, separando distintas fracciones por gradientes de sacarosa.

En el mismo año, Zenka & Prokopic (1983) recogen fluido pseudocelómico de *A. suum*, centrifugándolo posteriormente, durante 10 minutos a 23000 g, con objeto de purificar parcialmente el antígeno que comentamos. Tanaka *et al.* (1983) realizan igualmente la obtención de antígeno pseudocelómico a partir del fluido corporal de individuos adultos de *Ascaris suum*. Para ello, proceden a la punción del extremo posterior de los mismos, obtención del fluido y filtración del mismo a través de papel Whatman nº 1. Tras ello, dializan frente a agua destilada, liofilizando finalmente el antígeno purificado. Finalmente, Urban *et al.* (1988), drenan el fluido pseudocelómico de la cavidad corporal de aproximadamente 200 hembras adultas. Este líquido es posteriormente centrifugado a 20000 g durante 20 minutos y filtrado a través de un tamiz (0,45 . m de grosor de poro), conservando la solución resultante como antígeno a -20 °C.

Respecto a la obtención de **antígeno cuticular** de vermes adultos de *A. suum*,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Archer *et al.* (1985) realizan, en primer lugar el lavado de la cutícula de estos parásitos, utilizando solución salina con Tritón x 100 al 1%. Tras ello, se procede a la eliminación del músculo remanente y a la rotura de dicha cutícula, utilizando una batidora. Después de lavar 3 veces en solución salina y resuspender a una concentración de 8 mg/ml, realizan un calentamiento de dicho material, sometiéndolo a sesiones de 60 °C durante una hora y durante 3 días consecutivos, con el fin de asegurar la esterilidad de la suspensión.

Por otra parte, Magnaval *et al.* (1986) diseccionan adultos de *T. canis* y tras separar individualmente sus estructuras, homogeneizan la cutícula y la ultracentrifugan durante 1 hora a 25000 g.

Siguiendo un orden cronológico de aportaciones a los procedimientos de obtención de estos antígenos, Germán (1993) aísla saco muscular de *Ascaris* adultos, lavándolo en solución salina e introduciéndolo en tubos eppendorf con 0,25 ml de Tris-ClH pH 7,1. Tras su homogeneización en frío realiza una centrifugación para finalmente recoger el sobrenadante para su estudio.

En cuanto a los **antígenos ovárico y uterino**, debe mencionarse el carácter único que para muchos autores tienen ambos materiales. Tal es el caso de Wu & Foor (1982) que colectan fluido de aproximadamente 150 hembras, a lo largo de una zona de 3 cm, cuyo centro es la unión oviducto-útero. Este fluido es posteriormente centrifugado a 10000 g durante 5 minutos, con objeto de obtener un único antígeno de aparato reproductor. Por su parte, Dubinsky *et al.* (1982) tras recoger muestras procedentes de ovario de adultos de *A. suum*, las homogeneizan 10 veces con NaCl 0,85%, manteniéndolas durante 30 minutos a 4 °C. Tras obtener 3 ml de la disolución, se centrifugan a 100000 g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante es

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

eliminado y el sedimento se mezcla nuevamente con 3 ml de NaCl 0,85%, repitiendo todo el proceso. Germán (1993) disecciona adultos de *A. suum* aislando el aparato reproductor en conjunto, preparando este antígeno del mismo modo al ya comentado para el antígeno cuticular.

En cuanto al **antígeno esofágico** debemos comentar la ausencia de trabajos relacionados con la obtención y caracterización de este antígeno somático.

Igualmente son pocos los autores que obtienen el **antígeno excretor-secretor de adultos** a partir de la especie parásita que nos ocupa (*A. suum*). Entre ellos, Komatsu *et al.* (1979) incuban 50 hembras en 2 litros de solución salina durante una noche a 37 °C. Posteriormente, recogen el fluido obtenido tras este cultivo, éste es centrifugado a 3000 r.p.m., durante 20 minutos y concentrado hasta 50 ml por ultrafiltración.

No obstante, un mayor número de autores han prestado su atención en obtener antígeno excretor-secretor de adultos de *Toxocara spp.* Entre ellos, Koizumi *et al.* (1983) recogen vermes adultos de *T. canis*, lavándolos en solución salina estéril e incubándolos en 100 ml de PBS con penicilina y estreptomycinina a 30 °C durante 18 horas. El cultivo es cambiado cada 3 horas, recogiendo luego un pool de todos esos cultivos. Por otra parte, Amerasinghe *et al.* (1992) recogen 134 vermes adultos de *T. vitulorum*, que, tras lavados repetidos e incubación en 500 ml de PBS con antibióticos durante 24 horas, centrifugan el medio de cultivo a 1700 g durante 30 minutos, conservándolo hasta su uso a -20 °C.

Muchos autores han obtenido **extracto bruto de adultos** de *A. suum* como antígeno para sus experimentos. Una de las primeras referencias bibliográficas es la de Izzat & Olson (1970) que tras lavar los vermes en solución salina estéril, los

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

homogeneizan en batidora con PBS 0,15N, pH 7,2 durante 10 minutos. Posteriormente se mantienen toda la noche a 5 °C, para finalmente liofilizarlos y conservarlos a -20 °C. Más tarde, en 1974, Torres & Barriga también obtienen Ag bruto de adultos de *A. suum*; tras 5 lavados con NaCl 0,15M, cortan en pequeños trozos el parásito, los cuales son suspendidos en solución tamponada. Posteriormente, son homogeneizados en un baño de hielo a 25000 r.p.m. durante 10 periodos de 1 minuto y centrifugados a 12750 g durante 30 minutos a 2 °C. El sobrenadante se conserva a -15 °C.

Mikulikova (1976) postula una extracción de proteínas con buffer Tris-glicina 0,1M pH 8,3, tras realizar repetidos lavados de los adultos en suero salino al 0,9% y una homogeneización previa a la extracción. Este homogeneizado se centrifuga durante 25 minutos a 25000 g, recogiendo posteriormente el sobrenadante. En 1979, Komatsu *et al.*, homogeneizan mecánicamente los adultos en baño de hielo con PBS pH 7,0, centrifugan a 10000 r.p.m., durante 30 minutos y a 4 °C y utilizan el sobrenadante como extracto crudo.

En ese mismo año, Marreta & Casey (1979) preparan antígeno a partir de adultos, disolviendo 600 mg de helmintos liofilizados en 60 ml de agua destilada. Después de homogeneizar y mantener 2 horas a 5 °C, centrifugan a 650 g durante 15 minutos y filtran el sobrenadante, utilizando un grosor de poro de 0,45 . m. Campos Bueno *et al.* (1981) trituran los vermes en suero salino, utilizando un homogeneizador en frío. Estos autores mantienen los restos de dichos nematodos durante 12-14 horas en refrigeración a 4 °C, agitando 3-5 veces; posteriormente centrifugan a 3000 r.p.m., durante 20 minutos y conservan el sobrenadante.

En 1988(a,b), Águila *et al.*, sonicán los helmintos y luego delipidan con n-

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

hexano. El homogeneizado lo centrifugan a 50000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se conserva a -20 °C. En 1992, Bhalla *et al.*, proceden a la limpieza de parásitos adultos en medio NSS y a su maceración en un mortero, adicionado de PBS 7,4, de los parásitos adultos. Tras congelar y descongelar varias veces, centrifugan a 10000 r.p.m y 4 °C durante 30 minutos, recogiendo, finalmente el sobrenadante.

Igualmente, Camargo *et al.* (1992), usan un antígeno procedente de un extracto crudo de adultos de *A. suum*, el cual es obtenido tras cortar, triturar y homogeneizar los helmintos. Posteriormente se adiciona NaOH 1M al material obtenido, en una proporción de 1,5 ml por 8,5 ml de extracto, neutralizándose toda la solución con 1 ml de HCl y finalmente se realiza la centrifugación a 1500 r.p.m durante 1 hora, el filtrado a través de un tamiz de 0,22 . m de grosor de poro y la adición de éter a una proporción de 1:3, respecto al volumen final. Lukes (1992) disecciona los adultos en pequeños trozos y los homogeneiza en un mezclador durante 5 minutos. La fracción cruda es sedimentada a bajas revoluciones, mientras que el purificado se centrifuga nuevamente a 10000 r.p.m durante 1 hora.

II.4.3.2.- Obtención de antígenos larvarios.

Generalmente los antígenos preparados a partir de estados adultos de *Ascaris suum* han centrado su principal uso en el inmunodiagnóstico de esta parasitosis. Sin embargo, muchas veces están contaminados con sustancias producidas por el hospedador dando resultados inespecíficos. Por ello, se empezaron a utilizar antígenos de estados larvarios, sobre todo los obtenidos a partir de **extracto bruto larvario** y de los **productos de excreción**.

En el primer caso, Koizumi *et al.* (1983) preparan extracto larvario

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

homogeneizando las larvas con 10 volúmenes de PBS, procediendo posteriormente a su sonicación. Esta solución es centrifugada a 10000 g durante 30 minutos, recogiendo el sobrenadante y dializando nuevamente con PBS. Otros autores, como Laubach (1984) prepara extracto de larvas tras la eclosión de huevos embrionados, recolección de larvas viables y homogeneización en una solución con sal de Hanks. Tras esta recolección congela el homogeneizado a -70 °C, realizando 4 descongelaciones y recongelaciones con el fin de romper células y tejidos larvarios. Esta mezcla es centrifugada a 7000 g durante 20 minutos para recoger, como paso final, el sobrenadante y secreción larvarios. Un año más tarde, Urban & Romanowski (1985) obtienen extracto de L₂ y L₃ después de 14 y 28 días en cultivo. Mantienen las larvas en PBS con perlas de vidrio a 4 °C en agitación vigorosa durante 18 horas. Centrifugan a 20000 g durante 30 minutos y lo conservan a -20 °C.

En lo que respecta a los antígenos obtenidos a partir de un extracto bruto larvario y para finalizar, Rhodes *et al.* (1988) sonicar extracto de larvas de *A. suum*, centrifugando a continuación a 5000 g durante 30 minutos. Desechan el sedimento y centrifugan nuevamente el sobrenadante a 82500 g durante 1 hora, para usar el sedimento de esta última centrifugación como antígeno.

Para la obtención de **antígeno excretor-secretor larvario**, Stromberg (1979a,b) recoge semanalmente el sobrenadante de los cultivos preparados para facilitar la muda de las larvas; para lo cual realiza un lavado del medio por diafiltración con ClNa 0,15M y una concentración 10 veces en Amicon YM10 antes de su uso. Poco después, en 1981, Urban & Douvres cultivan larvas de *A. suum* en medio de Dulbecco modificado por Eagle, suplementado con 1-glicil-1-histidil-lisina, incubando a 37 °C con un 5% de CO₂. Para finalizar, comentar que Haswell-Elkins

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

et al. (1989) recuperan larvas de pulmones de conejos infectados una semana antes, manteniéndolas en cultivo con suero bovino a 37 °C durante 7 días. El medio es posteriormente dializado con PBS y conservado a -70 °C.

II.4.3.3.- Otros antígenos.

Los cambios estado-específicos en los antígenos de *A. suum* de las larvas en desarrollo, el fluido de huevos eclosionados y el cultivo, tanto de larvas como de adultos (machos y hembras), está perfectamente documentado (Justus & Ivey, 1969; Williams & Soulsby, 1970; Fetterer & Urban, 1988). Soulsby (1957) reportó que cuando las larvas fueron transferidas a suero inmune, se formaron precipitados alrededor de la boca y el poro excretor, indicando que los antígenos reaccionantes eran principalmente de origen excretor. Los mismos precipitados se observaron en larvas de *A. suum*, intentando migrar dentro de cobayos inmunes. Probablemente, sea el glicocálix cubriendo la cutícula del parásito la parte directamente involucrada en la interacción inmunológica con el hospedador.

Las larvas de *A. suum* son particularmente activas en la inducción de respuesta anti-fosforilcolina en ratones (Brown & Crandall, 1976; Mitchell, 1976). El glicocálix es de origen secretor con un alto contenido en hidratos de carbono, estando también constituido por glucoproteínas, proteoglucanos y glucolípidos (Dennis *et al.* 1995). Los glucolípidos han sido estudiados por Dennis *et al.* (1995), quién concluyó que las bandas antigénicas que migran lentamente en cromatografía de capa fina, consistieron en glucofingolípidos anfotéricos, la mayoría de ellos probablemente como fosforilcolina.

Varios laboratorios han intentado identificar y caracterizar antígenos proteicos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de *A. suum*. Entre ellos, los más citados han sido el alérgeno A, una molécula de 14 kDa (Ambler *et al.* 1972) y ASC-1, una molécula de 17-19 kDa (Hussain *et al.* 1973). ASC-1 es un dímero de 8,2 kDa, que está actualmente en investigación en el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Bethesda (USA).

McGibbon *et al.* (1990) purificaron el mayor componente proteico del fluido pseudocelómico tanto de *A. suum* y *A. lumbricoides*, como una molécula de 25 kDa (ABA-1) que corre, tanto en condiciones reductoras como no reductoras de la técnica SDS-PAGE, como una molécula de 10 kDa presentándose precisamente en forma de este monómero. Esta molécula guarda grandes similitudes con los componentes ASC-1 y el alérgeno A, descritos con anterioridad, aunque sobre todo, idéntico o casi similar a las dos proteínas reportadas por Greenspon *et al.* (1986) como una proteína de 9 kDa y por Kennedy *et al.* (1986) como una proteína de 14 kDa (WLEP-14 kDa).

Las discrepancias en cuanto al peso molecular exacto de estas fracciones proteicas podrían ser explicadas por diferentes condiciones de avance en el SDS-PAGE de cada uno de los autores. El antígeno descrito previamente, que en la mayoría de las ocasiones se trata de la misma fracción proteica (en torno a los 10-15 kDa), es el responsable de más del 80 % de las actividades alérgicas del fluido pseudocelómico de los adultos de *A. suum*, aunque esta parte corporal también contiene un péptido de 2-3 kDa (Uvnäs & Wold, 1967), el cual tiene la capacidad de desgranular células mastocíticas peritoneales tanto de ratas sensibilizadas con anterioridad como libres de gérmenes.

II.4.4.- Métodos de recuperación larvaria.

Tradicionalmente, la cuantificación de larvas de ascáridos se ha venido haciendo por

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

métodos clásicos basados en la digestión artificial o en la trituración de órganos, tales como el método de Baermann, la digestión péptica, el método del “spin” o la digestión salina. Estos métodos son tediosos y presentan múltiples desventajas: las larvas se detectan más fácilmente en unos órganos que en otros, la recuperación de todos los órganos es demasiado laboriosa, requieren mucho tiempo, etc. Por ello, en muchas ocasiones se tiende a utilizar otras técnicas tales como el marcaje radiactivo y la autorradiografía.

En algunas ocasiones se utilizan conjuntamente varias técnicas, siendo la digestión péptica y el Baermann una de las combinaciones más frecuentes. La razón se debe a que con el Baermann únicamente se recuperan larvas libres, mientras que las retenidas en los granulomas requieren una digestión péptica para su liberación.

II.4.4.1.- Método de Baermann.

Su utilidad consiste en la recolección de larvas de los distintos tejidos infectados, si bien tiene otras múltiples aplicaciones.

Se ha visto sometido a diversas modificaciones, pero en todas ellas la idea básica consiste en hacer migrar las larvas a través de diferentes tipos de tejidos para separar las viables de las que no lo son. Incluso si se realiza en condiciones estériles, se consigue liberarlas de los microorganismos superficiales por efecto de retención de los mismos en las capas de tejido interpuesto.

Muchos son los autores que han utilizado este método para la recuperación de larvas de ascáridos a partir de tejidos corporales. Así, Taffs (1962, 1963, 1964, 1968), en sus numerosos experimentos siempre ha usado esta técnica para realizar los contajes de las larvas en los tejidos hepático y pulmonar. Otros autores, en el caso de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

recuperación de larvas de *Toxocara canis*, han aplicado en multitud de ocasiones este mismo método. Lee *et al.* (1976), sacrifican ratones infectados con *T. canis* y dividen en dos partes iguales todos los tejidos y órganos, excepto el hígado. Digieren la mitad de cada órgano con jugo gástrico artificial y recogen las larvas en un aparato de Baermann. Tras tinción con hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff, utilizan la otra mitad para el examen microscópico del tejido.

Igualmente, Casarosa *et al.* (1983), evalúan la eficacia de la ivermectina en el tratamiento de ratones infectados con huevos embrionados de *T. canis* mediante examen microscópico directo de cerebro o mediante inmersión de las vísceras en aparato de Baermann durante 24 horas a 37 °C.

Leventhal & Soulsby (1976), utilizaron la técnica Baermann para recuperar y contar el número de larvas de *A. suum* de los pulmones de cricetos infectados con este parásito. En 1985, Urban & Romanowski, con el fin de comprobar el efecto protector de la inmunización de cerdos con productos larvarios y de huevos de este parásito, se basaron, entre otros parámetros, en el número de larvas recuperadas de los pulmones de estos animales. Para este fin, el tejido pulmonar fue picado con una batidora por un tiempo de unos 4 segundos. A continuación, este tejido fue transferido a un aparato de Baermann y las larvas en el sedimento fueron recogidas secuencialmente y contadas a los 90, 60 y 30 minutos.

Stromber & Soulsby (1976), estudiaron el efecto protector de diversos estados de desarrollo de *A. suum* tras la infección de estas formas larvarias en cricetos, basándose, sobre todo, en la disminución del número de larvas recuperadas en pulmón respecto al grupo control. Para realizar ese conteo, los pulmones fueron cortados en piezas y a continuación, se sometieron a una incubación en un aparato

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Baermann a 37 °C por un periodo de 90 minutos.

Por su lado, Eriksen *et al.* (1992) aplican el método de Baermann con el fin de establecer el número de larvas aparecidas en los pulmones de cerdos infectados experimentalmente. El tejido pulmonar fue picado con una batidora hasta el punto que las piezas resultantes tuvieran un tamaño aproximado de 3 mm³.

A continuación, fueron transferidos a una doble gasa sobre un embudo de 30 cm de diámetro, lleno de una solución de cloruro sódico isotónico. Se mantuvieron en estas condiciones toda la noche a 20 °C y el sedimento fue teñido con solución yodada de Lugol.

Por último, el número total de larvas fue determinado tras el contaje de las mismas bajo un estereomicroscopio.

Otros autores, como Murrell *et al.* (1997b), usaron el método de Baermann para obtener las larvas de los pulmones de cerdos infectados con huevos de *A. suum*, mientras que para otros órganos, utilizaron otros métodos ya que producían mejores resultados.

II.4.4.2.- Digestión péptica.

El método de digestión péptica consiste en liberar las larvas de los tejidos mediante el tratamiento de los mismos en fluido gástrico artificial. Así, Campbell & Timinski (1965), tras triturar el hígado y los pulmones de ratas inmunizadas con huevos embrionados de *A. suum*, digirieron dichos tejidos en una solución constituida por un 0,7 % de pepsina y un 1,0 % de ácido clorhídrico. El líquido de digestión fue transferido en pequeños volúmenes a placas de Petri que fueron visualizadas al microscopio. Kano *et al.* (1989), utilizaron la digestión péptica con el fin de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

recuperar las larvas del hígado y pulmones de ratones previamente infectados con huevos viables de *A. suum* vía peritoneal. El líquido de digestión consistió en un litro de agua destilada con 7 ml de HCl y 5 g de 1:10000 pepsina, manteniéndose a 37 °C durante 2 horas.

Laubach (1990), utilizó la digestión péptica para cuantificar el número de larvas aparecidas en hígado y pulmón determinando el efecto del zinc en la carga larvaria de ratones infectados por *A. suum*. Después de picar 1/3 de cada tejido, fueron mezclados con una solución del 0,7 % de pepsina y un 1,0 % de ácido clorhídrico. El líquido de digestión se filtró y se contaron las larvas.

Con el fin de determinar el % de protección de una serie de antígenos en ratones tras un reto de infección, Lukes (1992), se basó en la disminución de larvas recuperadas en hígado y pulmón de los diferentes lotes establecidos respecto al grupo control. El método de recuperación utilizado fue el de la digestión péptica. Para ello, los dos órganos fueron cortados en pequeñas piezas y se mezclaron con la solución de digestión durante 3 horas a 37 °C. El contenido resultante se filtró y las larvas se contaron al microscopio.

Murrell *et al.* (1997a), realizaron algunas investigaciones con el fin de determinar ciertos aspectos en cuanto al patrón migratorio de las larvas de *A. suum* en su hospedador natural. Quisieron determinar la temporalidad de dicha migración, desde que se infectaron los cerdos hasta 48 horas post-inoculación. Para ello, aplicaron el método de la digestión péptica con el fin de cuantificar el número de larvas recuperadas en el intestino. Para ello, se homogeneizó con una batidora, la mucosa intestinal, añadiendo el resultante a una solución de agua, pepsina y HCl (pH 1,2-1,3). Tras agitación durante 90 minutos a 38 °C, neutralización con 5N NaOH

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

hasta alcanzar un pH de 7-8, dejaron reposar esta mezcla toda la noche a 4 °C. Posteriormente, eliminaron el sobrenadante y realizaron varios lavados, añadiéndole Lugol para fijar y teñir las larvas facilitando, así, su contaje.

II.4.4.3.- Método del “spin”.

El método del “spin” es una técnica donde los tejidos son homogeneizados, filtrados y centrifugados para recuperar las larvas de los mismos.

Johnstone *et al.* (1978), deducen, por comparación de porcentajes de recuperación, que se trata de un sistema más eficaz que el Baermann y la digestión péptica, para la recuperación de larvas de *A. suum* del hígado y pulmones de ratones C57BL/6 infectados experimentalmente. Sacrifican los animales por dislocación cervical y sumergen el hígado y los pulmones en solución salina. Tras homogeneizar cada órgano por separado en una batidora a 17.000 r.p.m., durante 20 segundos en 40 ml de solución salina con citrato y dos gotas de octanol como antiespumante, filtran por triple gasa estéril y lavan tres veces en solución salina con citrato. El primer lavado implica centrifugar a 1000 x g durante 60 segundos y para el segundo y el tercer lavado centrifugan a 500 x g durante 20 segundos. Finalmente, cuentan las larvas en el sedimento total.

Dunsmore *et al.* (1983), emplean una modificación del método del “spin” descrito anteriormente para recuperar larvas, en este caso, de *T. canis*. Sacrifican los ratones con cloroformo, y separan cerebro, hígado, pulmones y músculo de la pata trasera, cubriéndolos con solución salina. Con excepción del cerebro, homogeneizan por separado órganos y tejidos en 15 ml de citrato sódico al 0,25 % en PBS, seguidos de centrifugación. Posteriormente, efectúan el recuento larvario en un microscopio

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

invertido.

II.4.4.4.- Método del gel agar.

Este método de recuperación larvaria está basado en la habilidad de las larvas de migrar a través de un gel de agar.

Básicamente, se realiza mezclando el tejido tisular junto a solución salina y solución de agar a un % determinado (entre el 2 y el 4 % de agar). Esta solución se vierte sobre una bandeja plana y, una vez que haya gelificado, se coloca verticalmente dentro de un recipiente que contenga agua templada. Se deja incubar toda la noche a 37-38 °C y se recoge el sedimento del fondo del recipiente, donde se localizarán las larvas que hayan conseguido migrar a través del gel.

Jorgensen *et al.* (1975), y Mwegoha & Jorgensen (1977), utilizaron este principio para aislar larvas de nematodos de vida libre a partir de muestras de hierba. Van Wyk (1980), modificó esta técnica para obtener nematodos del contenido intestinal de ovejas.

En 1996, el equipo de trabajo del Danish Centre for Experimental Parasitology (Copenhague), ante la gran variedad de métodos utilizados con anterioridad para la recuperación larvaria a partir de tejidos orgánicos, se propusieron establecer un experimento con el fin de comparar dichas técnicas y poder determinar aquel de mayor eficacia.

Slotved *et al.* (1996), tras comparar los métodos del Baermann y del gel agar para aislamiento y conteo rutinario de larvas de *A. suum* a partir del hígado y pulmón de cerdos infectados, llegó a la conclusión de que no existían diferencias significativas entre ambas técnicas en cuanto al número de larvas recuperadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

No obstante, un tiempo después, este mismo autor junto a otros colaboradores (Slotved *et al.* 1997a), continuaron sus comparaciones de métodos existentes para la recuperación larvaria, concluyendo que, la técnica del gel agar fue superior a la del Baermann con respecto al aislamiento de larvas del hígado, mientras que para la recuperación larvaria del tejido pulmonar, el Baermann resultó más eficaz que la del agar.

Por su parte, para la recuperación larvaria a partir del intestino de los ratones, el método de incubación vertical directa de la pared intestinal en 0,9 % de solución salina resultó más eficaz que el Baermann y el gel agar.

Por último, Slotved *et al.* (1997b), establecieron que el método del gel agar es también un método ideal para análisis rutinario de recuperación larvaria del contenido intestinal, obteniendo unos porcentajes de recuperación superiores al 90 %, respecto al número total de larvas halladas en intestino (larvas en gel sin migrar + larvas ya migradas).

Basándose en estos resultados, Murrell *et al.* (1997b), y Jungersen *et al.* (1996), establecieron la técnica del gel agar para recuperar las larvas del hígado de cerdos previamente infectados con huevos de *A. suum*.

En muy recientes trabajos (Helwigh *et al.* 1999), con el fin de estudiar la interacción entre la presencia de *A. suum* y *O. dentatum*, en cerdos infectados por estos parásitos, establecieron como métodos de recuperación larvaria los ya utilizados con anterioridad por Slotved *et al.* (1996, 1997a, 1997b). Los mismos métodos fueron utilizados por Roepstorff *et al.* (1997) y Roepstorff & Murrell (1997).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.4.4.5.- Otros métodos.

El marcaje radiactivo se ha venido utilizando en los últimos años para desarrollar técnicas alternativas en la investigación del comportamiento migratorio de larvas parásitas. Sin embargo, estos radioensayos proporcionan un valor limitado en el rastreo de las larvas marcadas, ya que el contador de radiación no distingue entre isótopo ligado a los parásitos y los acúmulos de radiación fijados a tejidos del hospedador (Christensen & Nansen, 1979).

Dobinson *et al.* (1980), marcan schistosómulas de *Schistosoma mansoni* con L-⁷⁵Se-metionina con el fin de estudiar su comportamiento migratorio en ratones. Inyectan los animales con 1000 schistosómulas, los sacrifican seriadamente y monitorizan la radiactividad en diferentes partes del organismo. Estos autores concluyeron que esta técnica de marcar las schistosómulas y cuantificarlas con un contador de centelleo es válida sólo en los estudios en los que no tiene lugar el metabolismo de la metionina, (por ejemplo en pulmones), pero en aquellos casos donde está implicada una migración hepática o intestinal, el método no es adecuado por el elevado nivel de incorporación del isótopo radiactivo en los tejidos.

Otro método de recuento larvario es la autorradiografía, capaz de detectar cada una de las larvas marcadas en el cuerpo de un hospedador. En este procedimiento, la película de rayos X se expone por contacto a secciones de los órganos planos y secos y la localización de las larvas radiactivas viene representada por focos de plata reducida en la película expuesta y revelada. La radiactividad disociada produce una oscuridad uniforme por toda la película pero no produce focos. Wade & Georgi (1987), utilizaron este método autorradiográfico para estudiar la distribución de las larvas de *T. canis* en ratones CD-1 y realizar el recuento de las

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

mismas en diferentes órganos. Por su parte, Roberts (1990) aplica también esta técnica para estudiar el ciclo de *T. vitulorum* en el búfalo asiático (*Bubalus bubalis*).

II.5.- EN RELACIÓN A LA INMUNIZACIÓN FRENTE A *ASCARIS SUUM*.

II.5.1.- En cerdo.

La inmunidad protectora pre-hepática (intestinal) frente a *Ascaris suum*, medida por la ausencia de manchas de leche y la reducción del número de larvas recuperadas del pulmón en cerdos tras una infección con huevos larvados, ha sido demostrada, tras la exposición natural crónica y repetida experimentalmente (Urban *et al.* 1988).

Este mismo hecho ya fue investigado muy tempranamente por Taffs (1964), quién demostró la aparición de inmunidad adquirida en una gran variedad de especies hospedadoras. En los animales inmunizados, la migración larvaria hacia el pulmón es detenida o, por lo menos, enormemente retardada, con el resultado que los animales inmunes experimentan mucho menor daño a nivel pulmonar que los animales no inmunes.

Eriksen *et al.* (1992b), observaron la adquisición de inmunidad pre-hepática, incluso a las 6 semanas tras el comienzo de la infección de cerdos, con un régimen de dosificación de 2 veces semanalmente. Los lechones provenientes de un corral contaminado por huevos de *A. suum*, adquirieron inmunidad protectora al observarse una reducción en el número de larvas recuperadas de sus pulmones, pero se observó un incremento en el número de manchas de leche en el hígado a las 5-6 semanas de edad (Eriksen *et al.* 1992a).

Por su parte, Southern *et al.* (1989), compararon el efecto protector que producía la exposición natural continuada en ambientes contaminados por el parásito,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

respecto a las infecciones experimentales secuenciadas semanalmente, concluyendo que, este último procedimiento, es más efectivo en cuanto al desarrollo de inmunidad protectora que el descrito en primer lugar.

El desarrollo de inmunidad protectora también se ha demostrado en cerdos vacunados con huevos de *A. suum*, irradiados por rayos ultravioleta tras la exposición a un reto por la reducción del número de larvas a nivel pulmonar (Tromba, 1978; Urban & Tromba, 1982, 1984), así como el número de adultos en intestino delgado (Tromba, 1978).

Por su parte, la inmunización por diferentes vías de antígenos procedentes del propio parásito, ha sido en ocasiones utilizada, a lo largo de las investigaciones con el fin de desarrollar inmunidad protectora en los animales. Es muy importante reseñar que, el efecto de protección que puedan desencadenar cada uno de los antígenos utilizados, va a variar mucho en función de la ruta de administración, de las diferentes proporciones y dosis del material inoculado y de los diferentes adyuvantes utilizados, etc.

De esta forma, Urban & Romanowski (1985), utilizaron como antígenos, productos derivados del fluido de eclosión de los huevos, del medio de cultivo de L₂ a L₃ y del medio de cultivo de L₃ a L₄, observando un claro efecto protector por reducción del número de larvas pulmonares tras un reto en cerdos y conejos.

En este mismo sentido, Benkova (1982), reportó que, antígenos somáticos aislados e inoculados en cerdos procedentes de la sonicación de L₂ y L₃ indujeron unos elevados niveles de inmunidad protectora.

Por su parte, Hill *et al.* (1994), inmunizaron cerdos con fragmentos cuticulares de adultos y de L₂ y L₃ de *A. suum* y los compararon con otros métodos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

que estimulaban una fuerte respuesta protectora en los cerdos. El resultado de sus experimentos demostró que, efectivamente, la inmunización con el componente soluble de la cutícula llamado 2-mercaptoetanol, desencadenó una significativa respuesta protectora (por disminución en la recuperación larvaria pulmonar tras un reto), aunque en menor grado que la inoculación con huevos irradiados o la exposición natural en un medio contaminado.

Con el fin de evitar la inmunización parenteral y favorecer la oral (facilidad de manejo de los animales), Rhodes *et al.* (1988), administraron vía intestinal con cánula y oralmente, una serie de antígenos incorporados con liposomas, con el fin de observar el grado de protección conseguido respecto a cerdos controles. Como antígenos utilizaron un extracto de clara de huevo de gallina, seroalbúmina bovina, pared corporal de L₂ de *A. suum* y una aminopeptidasa intestinal del propio parásito. Los mayores porcentajes de protección fueron alcanzados con el antígeno de L₂, administrado conjuntamente con liposoma y avridina (como potenciador). Se observó una estimulación inespecífica de anticuerpos con todos los antígenos que protegieron, solo en parte y de forma no significativa, a los cerdos inmunizados. En todos estos casos, la inmunidad no previno el desarrollo de manchas de leche en el hígado.

Stewart *et al.* (1984), estudiaron el efecto de la inmunización de cerdos por infección experimental secuencial, seguida por el tratamiento inmediato con febendazol durante la fase de migración larvaria. Comprobaron un alto grado de protección medido por la reducción en el número de cerdos con adultos de *A. suum*, en el número de vermes por cerdo, en el peso de los vermes y la longitud de los mismos en su localización intestinal.

En este mismo sentido, Stankiewicz & Jeska (1990), Stankiewicz *et al.*

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(1990), Stankiewicz & Froe (1995) y Stankiewicz *et al.* (1992), observaron un potente desarrollo de resistencia adquirida en cerdos infectados continuamente en huevos del parásito y, tratados a su vez, con el antihelmíntico larvicida tartrato de pirantel.

La adquisición de resistencia con la edad ha sido demostrada, aunque este tipo de resistencia parece jugar un menor papel en la regulación de las infecciones parasitarias (Eriksen *et al.* 1992a). Además, Gafar *et al.* (1973), demostraron la resistencia no específica a la migración larvaria en cerdos que habían sido previamente infectados con el virus de la gastroenteritis transmisible.

Aunque el desarrollo de inmunidad protectora ha sido sustentada en numerosas ocasiones, por la reducción de recuperación larvaria tras un reto, no existe evidencia para afirmar que esa inmunidad proteja a los cerdos de infecciones patentes. Al contrario, Stankiewicz *et al.* (1992), mostraron el desarrollo de infección patente en todos los cerdos que habían sido previamente inmunizados con huevos y subsiguientemente tratados con un antihelmíntico antes de una inoculación con *A. suum*.

Además, también se ha demostrado que la eliminación de formas adultas en cerdos infectados naturalmente de forma crónica, no reduce la inmunidad a la migración larvaria (Urban *et al.* 1988).

No existen todavía estudios sobre la duración de la inmunidad protectora adquirida por varios protocolos de inmunización. Los desafíos o retos han sido típicamente administrados desde la 0-2 semanas tras la última inmunización, donde los cambios inflamatorios tras la migración larvaria son patentes y que podrían prevenir de forma inespecífica a la protección observada. Nadie ha podido demostrar

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

como se efectúa la inmunidad protectora.

En niños naturalmente infectados por *A. lumbricoides* se ha visto que, la magnitud de la respuesta inmune serológica, refleja la intensidad de la infección en vez de la capacidad protectora individual (Palmer *et al.* 1995).

En cerdos, resultados conflictivos se han obtenido por la posibilidad de adquisición de resistencia a la migración larvaria, tras la transferencia de suero, lisados de linfocitos o calostro de cerdos hiperinmunes a lechones (Kelley & Nayak, 1965a; Kelley & Nayak, 1965b; Rhodes *et al.* 1986).

De forma similar, el desarrollo de inmunidad a la reinfección, tras administraciones de huevos larvados abreviadas con tratamiento, no se correlacionó con la respuesta blastogénica de linfocitos sanguíneos a los antígenos de *A. suum* (Barta *et al.* 1986), mientras que la inmunidad a este parásito tras la vacunación, ha sido correlacionada con el incremento de respuesta por los linfocitos a antígenos específicos (Urban & Tromba, 1982).

Todos los estudios hasta la actualidad, han usado casi siempre preparaciones de antígenos crudos, a menudo de diferentes estadios del parásito, los cuales implican serias dificultades para comparar los resultados y para establecer la contribución individual de cada antígeno al desarrollo de inmunidad protectora.

En conclusión, parece ser que los mecanismos implicados en la inmunidad a *A. suum* en cerdo, incluyen anticuerpos humorales, respuestas mediadas por células, respuestas de anticuerpos secretores en el aparato digestivo y resistencia no específica en el intestino y probablemente en el hígado.

II.5.2.- En otros hospedadores.

En un principio, algunos estudios en animales de laboratorio indicaban que, aunque los estadios larvarios prepulmonares podían contener antígenos funcionales, los antígenos que normalmente inducían inmunidad protectora contra *A. suum*, no se producían hasta las fases larvianas pulmonares.

Sin embargo, más tarde otros autores demostraron que, incluso las fases larvianas prepulmonares, también eran capaces de desencadenar una alta resistencia a la reinfección en cobayos, ratones y conejos infectados con huevos de *Ascaris suum* (Kerr, 1938; Sprent & Chent, 1949; Campbell & Timinski, 1965).

Arean & Crandall (1962), usando conejos inmunizados por inyección intraperitoneal de L₂ muertas, demostraron la habilidad de los pulmones para derrotar a las L₂ inoculadas intravenosamente al llegar a este tejido.

Este mismo antígeno fue utilizado por Soulsby (1957) quién, igualmente, reportó una significativa reducción de larvas migrantes. Usando antígenos metabólicos de L₃ a L₄ Soulsby (1963) y Guerrero & Silverman (1969) demostraron resistencia inducida artificialmente a la infección por *Ascaris suum*, en diferentes especies de animales de laboratorio.

Kelley & Nayak (1964, 1965a,b) y Matoff & Tersijski (1967), consideraron también la pared intestinal como de vital importancia en la inmunidad frente a *Ascaris suum*. Este último hecho fue constatado por Bindseil (1969a,b), quién, en cambio, no confirmó las afirmaciones de otros autores que le precedieron sobre el papel que jugaba el hígado en la inmunidad protectora frente a este parásito.

Lejkina (1965), realizó numerosos ensayos de vacunación con diferentes antígenos específicos sobre cobayos y ratas. Los mejores resultados (según la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

aparición de anticuerpos circulantes específicos y una reducción en cuanto a la infección tras un reto en los animales vacunados), fueron obtenidos por inmunización de extractos tisulares de hembras adultas y larvas de *Ascaris suum* y con una fracción proteica ácido-soluble.

En 1976, Stromberg & Soulsby, ensayaron la vacunación en cobayos con diferentes estados larvarios de *A. suum* y por distintas vías de administración, concluyendo que, la L₂ produjo los más altos grados de inmunidad en los animales por inoculación directa en la vena mesentérica, mientras que la L₄, fue la que confirió una menor protección.

Un año más tarde, los mismos autores observaron que los productos de secreción-excreción de los estados adultos y larvarios del parásito no inducían ningún tipo de protección en los animales inmunizados con ellos.

Stromberg (1979b), aisló un antígeno obtenido del cultivo in vitro de L₃ a L₄, de 67 kDa que indujo una protección significativa en cobayos inoculados intramuscularmente con dicho antígeno. Esta fracción fue capaz de inducir, también, una respuesta alérgica importante (fuerte producción de IgE), en animales sensibilizados.

La tendencia general en el desarrollo de eficaces y exitosas vacunas se inclina por la utilización, entre otros componentes, de seguros e inocuos adyuvantes y apropiados inmunoestimuladores. Uno de los más seguros son los liposomas (Bangham, 1980). Por este motivo, Lukes (1992), practicó la inmunización de antígenos crudos de adultos de *A. suum*, en combinación (o no) con liposomas y/o levamisol como inmunomodulador. Como resultado observó que la mayor protección (88,9 %), se produjo con una doble dosificación del anterior antígeno encapsulado

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

en los liposomas y utilizando el levamisol.

Otros autores, han utilizado algunos inmunomoduladores con el fin de incrementar la actividad del complemento y así Soltys *et al.* (1992), observaron que la administración de glucano en cricetos incrementó considerablemente el nivel del complemento en la vía clásica y la alternativa, provocando un 46 % de protección en los cricetos y un 65,4 % en cerdos, tras una infección experimental con *A. suum*.

Se ha demostrado en ratones que, la administración de huevos larvados de *A. suum*, simultáneamente con tiabendazol, provoca un bloqueo en la migración larvaria al hígado y pulmón, pero no cuando esos ratones solamente reciben los huevos larvados. Incluso, estos ratones se hacen muy resistentes cuando son infectados previamente, a muy baja dosis, durante un cierto periodo de tiempo (Jeska & Stankiewicz, 1989).

Al igual que ocurría con los cerdos, en numerosas ocasiones se produce una resistencia no específica a la migración tisular de las larvas de *A. suum*.

En este sentido Benkova *et al.* (1986), observaron cómo la aplicación subcutánea de la vacuna de la tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) en cobayos, desencadenó una sobreestimulación en la producción tanto de linfocitos T como B con un efecto protector frente a la ascariosis del 55 % respecto al grupo control, medido por la reducción de larvas migratorias a nivel pulmonar.

II.6.- INFLUENCIA DE LA ASCARIOSIS EN LA PRODUCCIÓN.

II.6.1.- En el peso corporal.

Ascaris suum es uno de los parásitos más comunes en la producción porcina (Murrell, 1986; Ajayi *et al.* 1988; Roepstorff & Jorsal, 1989). En Estados Unidos, se han

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

realizado estudios económicos de la influencia de este parásito sobre la producción y ganancia de peso de los animales, estimándose pérdidas de hasta 174,5 millones de dólares en 1994 (Stewart, 1996).

Numerosos autores han confirmado la influencia de este parásito en las pérdidas de ganancia de peso de los cerdos, tanto en infecciones naturales como en experimentales. Uno de los primeros trabajos realizados, con el fin de comprobar la posible influencia de esta parasitosis en la ganancia de peso media corporal, fue llevada a cabo en los años 40 por Spindler, quien concluyó que, las infecciones experimentales por este parásito, redujeron la ganancia de peso corporal en una relación inversa al número de vermes adultos en intestino. Los datos de Lindquist (1957), indicaron pérdidas incluso del 50 % de peso corporal en cerdos infectados con 34.000, 85.000 y 170.000 huevos larvados de *A. suum*.

En otro estudio similar, se observó que la administración de 75.000 huevos por 3 veces, produjo un detrimento del 46 % sobre la ganancia de peso media (Brody & Wuest, 1963). En esta misma línea Forsum *et al.* (1981), o Drummond *et al.* (1981), observaron una disminución del 28 % en la ganancia de peso en cerdos infectados, comparada con cerdos no infectados. Igualmente, Hale *et al.* (1985) observaron que cerdos que recibieron 60.000 huevos de *A. suum* tuvieron un 13 % de pérdidas en la ganancia de peso. Más recientes estudios, como los de Helwigh & Nansen (1999), han mostrado que cerdos infectados con 60.000 huevos una sola vez presentaron una ganancia de peso significativamente inferior a los no infectados.

No obstante, a pesar de que la mayor parte de autores han observado influencias negativas de esta parasitosis en la ganancia de peso de cerdos infectados, se han realizado estudios en los que, la migración larvaria y/o presencia de adultos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

intestinales de *A. suum*, no presentan una influencia significativa en estos parámetros productivos.

En este sentido, Stewart *et al.* (1985), no observaron diferencias significativas en la ganancia media diaria de peso de cerdos infectados y/o tratados con fenbendazol, comparada con cerdos no infectados ni tratados, aunque sí observó una mejora del 2,3 % en cuanto al índice de conversión del pienso en los animales tratados respecto a los no tratados.

De igual forma, Zimmermman *et al.* (1971; 1973), encontraron que cerdos tratados con pirantel, presentaban un mayor crecimiento e índices de conversión que cerdos no tratados. No obstante, Stephenson *et al.* (1980), infectaron cerdos de 15 días de edad con huevos larvados de *A. suum* y no observaron diferencias en cuanto a la ganancia media de peso, ni al índice de conversión ni a la absorción de nutrientes, respecto a cerdos control no infectados.

Algo más reciente Stankiewicz *et al.* (1990), no encontraron diferencias en la ganancia de peso entre cerdos infectados y/o tratados con los cerdos control.

En los pocos estudios de campo realizados, Nilsson (1982) determinó que, solamente existen diferencias significativas en cuanto a la ganancia de peso, entre los cerdos con ligeras cargas parasitarias por *A. suum* o sin ellos y los que presentan muy altas cargas (más de 10.000 huevos/gr heces o más de 20 vermes adultos en intestino). Comprobó que la ganancia de peso fue del 4,8 % superior en los animales sin adultos que los que tenían muy alto número de parásitos. Bernardo *et al.* (1990a,b,c), igualmente obtuvo los mismos resultados que el autor anterior, indicando que sólo fuertes cargas parasitarias produjeron un detrimento de la ganancia de peso.

II.6.2.- En la composición de grasas del hospedador.

II.6.2.1.- En el hígado.

El hígado es la glándula de mayor tamaño del organismo de los vertebrados (Kolb, 1975). En él se cumplen diversas funciones metabólicas, como son la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, de las grasas, de las proteínas y la intervención en el metabolismo hormonal, aparte de otras como pueden ser la detoxificadora, la secreción biliar, etc.

Su composición es similar a la del resto de las vísceras, estando constituido por un 70 % de agua, un 20 % de proteínas, un 3-4 % de grasa. Su principal peculiaridad es su alto contenido en hidratos de carbono (2,5-3,5 %), con respecto al resto de tejidos del organismo (Pearson & Dutson, 1988), ya que es el principal lugar del organismo donde se almacena la glucosa en forma de glucógeno. También contiene una gran cantidad de vitaminas y pigmentos. Además, la cantidad de lípidos hepáticos, está muy influida por el contenido energético de la ración y el gasto que de esa energía haga el animal (Kolb, 1975).

La grasa del hígado tiene la particularidad de presentar una mayor cantidad de lípidos polares (30-40 %) que la subcutánea o la intramuscular. Estos lípidos se caracterizan por la presencia de algunos ácidos grasos poco frecuentes en otras grasas, y por tener una composición menos dependiente de los ácidos grasos de la ración, que la de los lípidos apolares que componen la gran mayoría del tejido adiposo (Ordóñez & de la Hoz, 1992).

Por otra parte, el componente apolar presenta interesantes diferencias en la composición de ácidos grasos, con respecto a los triglicéridos del panículo adiposo (Ruiz, 1993), como son la concentración de mirístico, palmítico y palmitoleico, la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

menor cantidad de esteárico, oleico, linoleico y linolénico y la presencia en cantidades considerables de araquidónico, un ácido graso que aparece en porcentaje muy bajo en el caso del tejido subcutáneo (Miller *et al.* 1990).

El perfil de ácidos grasos mayoritarios del hígado está representada en la tabla 3.

RAZA (fracción)	PORCINO BLANCO (totales)	PORCINO IBÉRICO (totales)	PORCINO IBÉRICO (apolares)
Mirístico	0,78	0,83	1,67
Palmitico	17,2	17,76	26,27
Palmitoleico	1,17	1,34	1,97
Esteárico	27,3	19,84	8,83
Oleico	18,0	30,95	47,49
Linoleico	13,7	11,53	7,65
Linolénico	--	2,29	2,39
Araquidónico	17,2	10,3	1,61
C22:5	1,17	--	--
C22:6	0,78	--	--

Tabla 3.- Porcentaje de los ácidos grasos mayoritarios hepáticos en cerdo blanco e ibérico.

Fuente: Datos de Pearson & Dutson (1988) y Ordóñez & de la Hoz (1992).

La fuente de ácidos grasos en el organismo está constituida por la presencia de los mismos en los alimentos ingeridos y por la síntesis endógena. En cuanto a la síntesis endógena de ácidos grasos o lipogénesis, en los mamíferos, ésta tiene lugar fundamentalmente en el tejido adiposo, hígado, mucosa intestinal y glándula mamaria (Chang *et al.* 1992). En los animales de estómago monocavitario, los lípidos pasan por el estómago hasta el duodeno con peque¹os cambios, a no ser que la grasa del

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

alimento contenga ácidos grasos de cadena corta, en cuyo caso se pueden liberar y absorber en el propio estómago.

El principal mecanismo de regulación de la síntesis de ácidos grasos es el estado nutricional del organismo. Los mecanismos de control pueden establecerse a corto o a largo plazo (Stryer, 1988). El control a largo plazo está regulado por cambios en las velocidades de síntesis y degradación de los enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos. Este tipo de regulación se denomina también control adaptativo (Stryer, 1988).

A corto plazo, el regulador más importante es la concentración de citrato en el citosol, el cual estimula la acetil-CoA carboxilasa.

II.6.2.2- En la canal.

Los lípidos están implicados en muchos aspectos de calidad de la carne y productos cárnicos, tales como valor nutricional, características sensoriales y propiedades tecnológicas (Tejeda, 1999). En el jamón ibérico, la composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular, caracterizada por elevados niveles de ácido oleico y bajos de ácidos grasos saturados, determina una elevada fluidez de la grasa, lo cual, deriva en un brillo intenso sobre la superficie de corte del jamón, aspecto relacionado con la calidad del mismo (Ruiz, 1996).

El contenido y composición de los lípidos intramusculares, está directamente relacionado con la calidad de la carne del cerdo, especialmente con la jugosidad (Wood *et al.* 1986), el *flavor* (Cameron *et al.* 1990) y el aroma (Mottram & Edwards, 1983; Cameron & Enser, 1991).

Se han descrito numerosos factores que afectan a la composición de ácidos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

grasos de la grasa del cerdo, entre los que destacan, la raza (Gandemer *et al.* 1992), el sexo (Smithard *et al.* 1980; Bardon-Gade, 1987), la edad y el peso (Ohtake *et al.* 1975), la alimentación (Cava *et al.* 1997; Ruiz *et al.* 1998) y otras, como la localización anatómica (Malmfors *et al.* 1978).

II.6.3.- Presencia de enzimas (lipasas, proteasas, etc) en *A. suum*.

Existen una gran variedad de procesos biológicos que son dependientes de la división proteolítica de los péptidos en las proteínas. En los parásitos, las reacciones catalizadas por las proteasas son esenciales en la degradación de la cutícula de dichos parásitos o la pared de los huevos para la muda, desenvaine y eclosión de los mismos (Lustigman *et al.* 1997; Gamble *et al.* 1989; Xu & Dresden, 1989).

Igualmente, esas reacciones dependientes de proteasas son esenciales para la degradación de proteínas del hospedador por las que el parásito va a establecer su invasión y migración (McKerrow, 1989). Así pues, las proteasas son consideradas como esenciales para el crecimiento y supervivencia de los parásitos.

Ascaris suum, ha sido sujeto de numerosos estudios bioquímicos, incluyendo aspectos fundamentales del parásito. Sin embargo, se han identificado y caracterizado muy bajo número de lipasas y proteasas. Entre ellas, una proteasa aspártica (pH óptimo 3,5) y una proteasa cistéica (pH óptimo 5,6), han sido identificadas en extractos intestinales del parásito (Maki & Yanagisawa, 1986). Igualmente, se ha identificado una aminopeptidasa leucina en extractos de adultos de los ovarios, útero, pared corporal y fluido perientérico de *A. suum* (Rhodes *et al.* 1966, 1969a, 1969b; Douch, 1978; Lee, 1962).

Recientemente, ha sido identificada, además, una metalo-aminopeptidasa a

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

partir del fluido del cultivo de desarrollo de L₃ a L₄ del verme (Rhoads *et al.* 1997). El pico de secreción de esta última enzima, se localiza, sobre todo, en el tiempo de muda activa de L₃ a L₄, sugiriendo un papel importante del enzima en este complejo proceso. No obstante, esta misma metaloproteasa, también ha sido reconocida en los cultivos *in vitro* de adultos de este parásito, con una mayor actividad en el tejido intestinal, seguida por los tejidos reproductivos, muscular y fluido perientérico (Rhoads & Fetterer, 1998).

Por otra parte, se ha comprobado que *Ascaris suum* contiene una considerable cantidad de la enzima superóxido-dismutasa. Si bien se desconoce exactamente la función del enzima en este parásito, en otros nematodos, como *Nippostrongylus brasiliensis* y *Nematospiroides dubius*, se ha observado que la habilidad de estos parásitos intestinales para sobrevivir en el hospedador está directamente correlacionado con la presencia de enzimas endógenas anti-oxidantes del tipo de la superóxido-dismutasa (Sánchez-Moreno *et al.*, 1994).

II.7.- TRATAMIENTO ANTIPARASITARIO EN LA ASCARIOSIS. ACCIÓN DEL PIRANTEL.

Anteriormente a 1938, no existía ningún tratamiento útil, mediante el uso de antiparasitarios químicos, frente a las infecciones por nematodos. Los benzimidazoles, reportados en 1961 (Brown *et al.* 1961), seguido por el éxito comercial del tiabendazol, instauró una nueva era del campo antihelmíntico por su seguridad, no toxicidad, aplicación vía oral y amplio espectro de acción. El tetramisol y levamisol, así como el pirantel y morantel, fueron desarrollados hacia 1966 y cada uno de ellos fue encontrando su propio espacio en dicho campo antiparasitario.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El descubrimiento de las avermectinas, en 1976, seguido a la introducción de la ivermectina como uno de los principales agentes antiparasitarios de mayor campo de acción, han sido quizás, los hechos más importantes en el control de las infecciones parasitarias de las últimas décadas (Campbell & Benz, 1986).

Las características generales que debería reunir el antiparasitario ideal serían, las de ausencia de toxicidad, buena tolerancia, dosis únicas y bajo coste. Según estas condiciones, en el capítulo de Botero, del libro de Campbell & Rew (1986), se establecen como antiparasitarios de elección frente a la ascariosis; el pamoato de pirantel, albendazol y mebendazol.

El pamoato de pirantel pertenece al grupo de las amidinas cíclicas, cuya fórmula química corresponde a $C_{34}H_{30}N_2O_6S$. Es un compuesto insoluble en agua y es muy fácilmente absorbido en el intestino. Es efectivo en la ascariosis humana en dosis únicas de 10 mg/Kg (Botero & Castaño, 1973; Sanati & Ghadirian, 1971). El tratamiento en el cerdo suele ser bien tolerado y no se han observado efectos tóxicos, y por tanto, puede ser usado en hembras preñadas y en lechones.

La toxicidad resulta de los efectos nicotínicos en los ganglios, ya que el mecanismo de acción del pirantel es a través del bloqueo de los ganglios colinérgicos. Se ha demostrado que la acetilcolina es el neurotransmisor excitatorio de la función neuromuscular de *A. suum* (Johnson & Stretton, 1980).

La acetilcolina causa la despolarización y contracción del músculo, el cual, puede ser bloqueado por tubocuranina y potenciado por inhibidores de la colinesterasa (Del Castillo *et al.* 1963).

Las moléculas de pirantel, se unen a los lugares de unión donde lo hace la acetilcolina, provocando un efecto contractor de la musculatura, no pudiendo ser

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

inactivado, posteriormente, por la acetilcolinesterasa (Eyre, 1970). Así pues, el efecto del pirantel es provocar una contracción permanente de la musculatura de *A. suum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- PLANTEAMIENTO INVESTIGADOR.

El presente trabajo pretende realizar un estudio sobre la patogenia de la ascariosis experimental en el cerdo ibérico. Para dicho fin, se han establecido varias líneas de trabajo que han consistido en un primer experimento, en el que se prueban diferentes posibilidades de infección experimental en cuanto a nivel y modo de la misma. El objeto de esta primera parte de la investigación es evaluar la respuesta inmunitaria mediante la técnica de Western blotting, al enfrentar los sueros de estos animales, con una serie de antígenos procedentes de *Ascaris suum*, pudiendo así, seleccionar aquellos extractos y fracciones antigénicas con mayor reactividad y antigenicidad y considerados, por tanto, de mayor idoneidad para el siguiente experimento.

Igualmente, se pretende el estudio de la ascariosis natural en nuestra cabaña porcina ibérica extremeña. Para ello, se analizan un conjunto de cerdos ibéricos en condiciones naturales y sacrificados en matadero en distintas condiciones de infección por *A. suum* (con y sin infección patente). Al igual que en la investigación señalada con anterioridad, los sueros de estos animales se analizan mediante Western blotting, ayudando a la mayor comprensión de aquellas fracciones y extractos antigénicos con mayor reactividad y reconocimiento en esta parasitación.

Una vez estimados los extractos y fracciones antigénicas a utilizar, se plantea un segundo experimento y cuerpo fundamental de esta investigación, consistente en la inoculación de las mismas a cerdos ibéricos divididos en lotes homogéneos. Éstos se enfrentan con diferentes dosis de huevos infectantes, con objeto de evaluar el grado de resistencia frente a los diferentes tratamientos seguidos en el curso del experimento, mediante la observación de la posible disminución de manchas de leche, larvas pulmonares y adultos intestinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Del mismo modo, se pretende evaluar la respuesta inmunitaria humoral (IgG e IgM) y la evolución de los diferentes parámetros hemáticos. Además, estudiamos el grado de correlación entre los diferentes parámetros analizados, junto a un análisis del nivel de depósito de antígenos e inmunocomplejos en diferentes órganos.

Por último, se analizan los perfiles lipídicos de los hígados y la canal de los cerdos experimentales, así como la ganancia de peso comparada entre los diferentes lotes, con el fin de estimar la posible influencia en los caracteres zootécnicos, en las diferentes condiciones de inmunización e infección planteadas.

III.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para la consecución del desarrollo experimental, se utilizaron un total de 69 cerdos, divididos en dos experimentos. Dentro de cada una, los animales se subdividieron en diferentes lotes según protocolo experimental, de tal manera que cada uno de esos lotes se colocó en dependencias aisladas, para así evitar la posibilidad de reinfecciones a través de la coprofagia o la caudofagia, comportamientos que son relativamente frecuentes en esta especie animal. Todos los animales fueron convenientemente identificados mediante crotal en la oreja.

Los animales en condiciones naturales fueron analizados en un número de 95, a los que se le extrajeron los paquetes viscerales y suero para su posterior estudio. El esquema general de los experimentos realizados fue el siguiente:

Experimento 1: Control de dosis y respuesta en cerdos infectados natural y experimentalmente.

En primer lugar, se pretendió establecer las dosis infectantes para nuestras

MATERIAL Y MÉTODOS

condiciones experimentales, capaces de producir en el hospedador, tanto una respuesta inmunitaria valorable mediante nuestras técnicas inmunodiagnósticas, como un nivel de respuesta orgánica evidente. Para ello se contó con 13 animales, que se infectaron según la siguiente tabla 4:

Dosificación	Cerdo (n° crotal)	Dosis infectante (n° huevos infectantes)	Día de sacrificio
Monodosis	513	100	69 d.p.i.
	505	1000	
	508	10000	7 d.p.i.
	852		21 d.p.i.
	516		42 d.p.i.
	515	50000	7 d.p.i.
	sc		21 d.p.i.
	518		115 d.p.i.
	519		
Multidosis	513b	500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000	115 d.p.i.
	514		
	517		
	520		

Tabla 4.- Esquema del diseño experimental del experimento de infección inicial.

Como se puede observar en la tabla, los animales fueron sacrificados en fechas diferentes, de manera que se pudiera valorar, tanto la infectividad de la dosis, determinando la llegada de larvas a pulmón a los 7 d.p.i., como su llegada al intestino a los 21 d.p.i., así como su maduración en el lumen del mismo hasta adultos, a los 42 d.p.i. y 115 d.p.i.

También nos permitió valorar qué forma de administración de la dosis, si en monodosis o multidosis, así como el tamaño de la misma, provocaba una respuesta

MATERIAL Y MÉTODOS

orgánica mayor, detectada por la presencia de manchas de leche en el hígado o Petequias en el pulmón, así como una respuesta inmunitaria más elevada, la cual valoramos mediante la técnica ELISA y Western Blotting, lo que nos orientó en la infección de los cerdos de la fase siguiente.

En cuanto a los cerdos criados en condiciones naturales y sacrificados en matadero, fueron un total de 95, con niveles de infección por *A. suum* muy variado, que nos permitió valorar la respuesta inmunitaria de cada una de las mencionadas condiciones (con/sin infección patente y con/sin presencia de huevos del parásito en heces).

Experimento 2: Cerdos inmunizados experimentalmente

En esta fase se establecieron 7 grupos de cerdos. Cada grupo estaba formado por 8 animales; 5 de 4 meses de edad y 3 animales de 2 meses. Cada grupo fue sometido a una prueba diferente, las cuales vamos a detallar:

- Grupo 1: Grupo control, sobre el que no se ejerció ninguna actividad a lo largo del experimento.
- Grupo 2: Infectado a los 7 días pre-sacrificio (lo que llamamos abreviadamente como reto), con objeto de obtener un grupo sin resistencia previa a esta parasitación.
- Grupo 3: Infectado durante 6 semanas con dosis crecientes para obtener un grupo resistente, inmunizado de manera natural. A los 7 días pre-sacrificio se le administró una dosis (reto), para comprobar el grado de protección obtenido.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Grupo 4: Se procedió con este grupo del mismo modo que con el anterior, con la diferencia de que las infecciones eran tratadas con pirantel, evitando que las larvas llegasen a hígado, obteniendo así una protección prehepática.
- Grupo 5: Grupo inmunizado una vez a la semana, durante 6 semanas con la proteína de 14 kDa del fluido pseudocelómico (APS). A los 7 días presacrificio, se infectó con 10.000 larvas (reto), para valorar el grado de protección ofrecida por dicha fracción antigénica.
- Grupo 6: En este grupo se procedió del mismo modo que en el anterior, solo que se utilizó la proteína de 42 kDa del APS.
- Grupo 7: En este grupo se inmunizó con la fracción de 97 kDa de la cutícula, obrando con él del mismo modo que con los grupos 5 y 6.

En la siguiente tabla 5, se muestran de manera esquemática como fueron agrupados los cerdos de este experimento:

Lote	Características (Tratamientos sometidos)	Nº animales (viejos + jóvenes)
1	CONTROL	8 (5 + 3)
2	RETADO	8 (5 + 3)
3	INFECTADO + RETADO	8 (5 + 3)
4	INFECTADO + TRATADO + RETADO	8 (5 + 3)
5	INMUNIZADO (14 kDa) + RETADO	8 (5 + 3)
6	INMUNIZADO (42 kDa) + RETADO	8 (5 + 3)
7	INMUNIZADO (97 kDa) + RETADO	8 (5 + 3)

Tabla 5.- Esquema del diseño experimental del experimento de infección e inmunización.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.3.- ANIMALES.

III.3.1.- Cerdo ibérico.

Todos los cerdos experimentales (n=69) han sido de raza ibérica puros, de ambos sexos y con distintas edades según cada experimento (entre 2 y 4 meses). Los animales de mayor edad, procedían del Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) de la provincia de Badajoz. Los animales más jóvenes, nacieron en las dependencias de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Antes de comenzar los experimentos, los animales fueron convenientemente examinados, no mostrando ninguna patología a la exploración clínica. Se tomaron muestras de heces a cada animal, con el propósito de determinar la existencia de parásitos gastrointestinales o pulmonares, según los métodos descritos en el capítulo III.7.2, obteniendo de este modo, datos a tener en cuenta en el momento de analizar resultados. No obstante, los animales no fueron desparasitados, con objeto de trabajar en unas condiciones lo más similares posibles al medio natural, donde habitan en las explotaciones.

Además, se testó el suero de todos estos animales mediante la técnica ELISA, frente a diferentes antígenos de *A. suum*, para comprobar la seronegatividad esperada de todos ellos.

Los animales se mantuvieron durante los experimentos en las instalaciones de la Granja de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (UEX), perfectamente adaptadas para esta especie animal.

La alimentación administrada a los cerdos consistió, en pienso compuesto de crecimiento y desarrollo, sin medicación alguna, distribuyendo las raciones en forma

MATERIAL Y MÉTODOS

constante y equilibrada según la edad y el peso de cada animal.

Por su parte, los cerdos de matadero fueron de raza ibérica o ibérica x Duroc, de 12-14 meses de edad y 150-180 Kg al sacrificio, de los que se obtuvo el paquete visceral y sangre para su posterior estudio.

III.3.2.- *Ascaris suum*.

La obtención de los parásitos adultos se realizó a partir de intestinos de cerdos sacrificados en diferentes mataderos de la región; Matadero “Productos del Cerdo ibérico” de Alcuéscar (Cáceres), Matadero “MAFRESA” de Fregenal de la Sierra (Badajoz) y del Matadero municipal de Deleitosa (Cáceres).

Tras la palpación de una formación sospechosa por presencia de *Ascaris suum*, se procedía al corte del tramo intestinal donde se encontraba alojado, para después, en los laboratorios de la Cátedra de Parasitología, proceder a la apertura de dicho tramo y extracción de los vermes alojados en el interior de los mismos.

Posteriormente, se procedía varias veces, al lavado de los ejemplares sobre un tamiz de 2 mm de grosor de poro con agua templada para eliminar el material grosero adherido a la cutícula de los helmintos. A continuación, los parásitos eran incluidos en suero fisiológico estéril a temperatura ambiente de laboratorio, hasta su procesamiento.

Los adultos obtenidos serían, más tarde, diseccionados para la obtención de los antígenos somáticos del parásito y para la obtención de huevos para cultivo.

III.3.3.- Conejos.

Fueron utilizados 14 conejos de raza Neozelandesa de 1,5 meses de edad, con 4-5 Kg

MATERIAL Y MÉTODOS

de peso, con el fin de obtener los sueros hiperinmunes necesarios para el análisis inmunohistoquímico de depósito de antígenos e inmunocomplejos a nivel tisular.

Estos conejos serían inmunizados con 7 antígenos diferentes (2 animales por cada antígeno):

U	Cuticular (ACU)	U	Fracción de 14 kDa
U	De fluido pseudocelómico (APS)	U	Fracción de 42 kDa
U	Somático de larvas (ASL)	U	Fracción de 97 kDa
U	Excretor-secretor de larvas (ESL)		

Las inmunizaciones fueron realizadas vía subcutánea a una dosificación de 10 µg/ml de antígeno/Kg peso vivo, junto a adyuvante incompleto de Freund. El total del inóculo consistió en 1 ml del preparado.

La cronología de inmunización fue establecida mediante 3 inyecciones al día 0, día 10 y día 17. Al día 30, tras la primera inoculación, se realizó una toma de sangre para controlar el nivel de anticuerpos en sangre.

En los casos cuyos títulos fueron elevados se procedió al sacrificio de los animales ese mismo día 30 p.i. En el caso de los conejos inmunizados con el antígeno somático de larvas y la fracción de 97 kDa, se procedió a una 4ª inmunización y posterior sacrificio al día 45 p.i., una vez comprobada la alta titulación de anticuerpos alcanzada.

Además, todos los animales fueron sangrados al día 0, previamente a la inmunización de la primera dosis, con el fin de obtener sueros controles negativos para los posteriores análisis inmunohistoquímicos de los tejidos porcinos analizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.3.4.- Ratones.

Con el fin de comprobar la infectividad de los huevos larvados del parásito, se inocularon una serie de ratones de raza SWISS con una dosis de 10000 huevos. Se evaluó el porcentaje de larvas recuperadas en hígado y pulmón a los 3 días post-infección, respecto a la dosis suministrada.

III.4.- MATERIAL INFECTANTE: HUEVOS EMBRIONADOS.

III.4.1.- Obtención de huevos de *Ascaris suum*.

Las hembras adultas de *A. suum* eran lavadas y conservadas con suero fisiológico estéril a 30° C, para posteriormente realizar la disección de las mismas, como se detalla en el capítulo III.5.1 de esta sección.

Durante la disección, se realiza la identificación de la vagina y la parte contigua del útero, hacia la mitad anterior del cuerpo de la hembra, porciones que contienen gran cantidad de huevos fértiles. Estas partes se seccionan y se extraen del cuerpo del verme, introduciendo dichos órganos en una solución de NaOH 0'1N. Aquí, se disgregan con la ayuda de una hoja de bisturí, con el fin de liberar los huevos de los tejidos a los cuales se hallan adheridos, y permitir que la solución en la que se encuentran, elimine los restos tisulares y contaminantes que puedan quedar alrededor de los huevos.

La solución se filtra a través de una malla y tras varios lavados, se procede a realizar el conteo de huevos disponible. Para este último cometido, se cogen 50 µl de la solución y se cuenta el nº total de huevos en ese volumen. A continuación, extrapolamos dicho conteo hasta un volumen de 1 ml y, de este modo, conocemos el nº de huevos/ml de nuestra solución.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.4.2.- Cultivo de huevos.

Tras calcular los huevos por ml que tenemos, estos se reparten en matraces con NaOH 0'1N, de manera que en cada ml podemos encontrar alrededor de 25.000 huevos. Estos matraces se mantienen a temperatura ambiente, agitándolos cada 2-3 días para facilitar su oxigenación. Los cultivos se mantienen en estas condiciones durante, al menos 1,5 ó 2 meses, realizando un seguimiento microscópico del desarrollo larvario en el interior de los huevos. Finalizado este periodo, los huevos destinados a la obtención de antígenos larvarios, se introducen a temperatura de refrigeración con objeto de ralentizar el ciclo vital de la larva. De este modo, se mantienen conservados e intactos hasta el momento de su uso.

III.4.3.- Estudio de la infectividad de los huevos cultivados.

Para comprobar la infectividad de los huevos cultivados, se seleccionaron dos especies animales, que en este caso fueron cerdos y ratones.

A un ratón se le administró 500 huevos larvados de *Ascaris suum*, mientras que a otro ratón se le administró 1000 huevos larvados. Se mantuvieron hasta el 5º d.p.i., en el que fueron sacrificados los dos animales infectados.

A cada uno de ellos se les extrajo el hígado y pulmón, y se procedió a su observación al estereomicroscopio para observar posibles lesiones provocadas por la migración de las larvas.

A continuación, se realizó la digestión artificial de cada órgano de los citados con anterioridad, siguiendo las pautas descritas en el apartado III.7.1.2, con objeto de liberar las larvas y poder establecer el porcentaje de recuperación de las mismas y de este modo, evaluar la infectividad de los huevos con los que posteriormente

MATERIAL Y MÉTODOS

infectaríamos los cerdos ibéricos.

En el caso de la especie porcina, utilizamos un cerdo de 3 meses de edad, al que infectamos con 10000 huevos larvados. Al cabo de los 7 días, fue sacrificado y el número de larvas pulmonares fue contado, mediante el sometimiento consecutivo de los pulmones a un aparato Baermann y digestión artificial (descritos en los apartados III.7.1.1. y III.7.1.2.).

III.4.4.- Dosificación del material infectante.

La administración de la dosis infectante a cada cerdo se llevó a cabo mediante sondaje gástrico. Para ello, se inmoviliza convenientemente al cerdo, y se le introduce en la boca una tabla de madera de bordes romos, con un agujero en medio, que permite tener abierta la boca al animal, lo que facilita la introducción de la sonda gástrica en la cavidad bucal, sin que la muerda ni la mueva con la lengua.

Posteriormente, se localiza la entrada al esófago, y se introduce el tubo de plástico hasta una longitud que nos asegure su entrada al estómago. Una vez allí, se inyectan a través de la sonda, con una jeringa estéril, 10 ml de suero fisiológico estéril, con objeto de llenar el tubo de la sonda con líquido, además de lubricarlo y limpiarlo.

Posteriormente, se inyecta el inóculo correspondiente a cada cerdo, tras el cual, se inyectan 20 ml de suero fisiológico estéril, con objeto de empujar hacia el estómago los restos de inóculo que hayan podido quedar en la sonda. Finalmente, con una de las jeringas utilizadas, se inyectan varios volúmenes de aire, con lo que empujamos todo el líquido de la sonda, asegurándonos de que todo el inóculo llega al estómago. A la vez, se realiza la extracción de la sonda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con objeto de evitar regurgitaciones o vómitos, los cerdos se mantienen en ayunas durante las 12 horas previas a la infección. Además, se observan durante 10-15 minutos con objeto de comprobar que no regurgiten el inóculo.

III.5.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS.

III.5.1.- De adultos.

Las hembras, una vez limpias, son fijadas mediante 2 alfileres, a una distancia de 1-1,5 cm y a 3-4 cm del extremo cervical y caudal, respectivamente, sobre una placa de poliuretano humedecida con suero fisiológico estéril, procurando que quede lo más extendida posible.

A continuación, se procede a la extracción del **líquido pseudocelómico** a través de una pequeña incisión en la mitad del cuerpo del parásito, a través de la cual se succiona la mayor cantidad de este líquido con la ayuda de agujas hipodérmicas. Posteriormente, se realiza una incisión longitudinal con un bisturí, a lo largo de todo el cuerpo del nematodo, sujetando la cutícula a la placa a ambos lados de la línea de apertura.

Una vez que las estructuras internas se hallan expuestas al exterior, se procede a la identificación y separación de cada una de las mismas.

Luego, se separa la vagina y primer tramo uterino, donde se localizan los huevos maduros de la hembra grávida. A continuación, fueron extraídas las dos **ramas uterinas** y separadas de los **ovarios**, los cuales también fueron separados, evitando en cualquier caso, romper el intestino adherido a la cutícula en su parte interna.

El **esófago** fue extraído de la porción más cervical, proceso muy minucioso

MATERIAL Y MÉTODOS

debido al pequeño tamaño del mismo.

Por último, la **cutícula**, una vez libre de todas las estructuras internas, fue diseccionada por ambos extremos del parásito. Todos los antígenos extraídos fueron lavados con suero fisiológico estéril y llevados a congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su estudio.

Una vez que los helmintos adultos de *A. suum* han sido diseccionados, separando cada una de sus estructuras internas, se procede a la preparación de esos antígenos somáticos para el estudio antigénico de los mismos.

Se preparó un litro de PBS (1x), al que se le añadió un vial de penicilina y antiproteasas (0,59 gr EDTA y 0,17 de PMSF).

Por otro lado, se pesa 1 gr del tejido del nematodo del cual se va a obtener el antígeno. Éste se colocó en un homogeneizador y se añadieron 4 ml de PBS (1x) estéril y se homogeneiza la muestra, recogiendo el líquido en tubo falco. Se volvieron a añadir otros 4 ml de PBS, realizando la misma operación, hasta llegar a 20 ml.

Recogidos los 20 ml, se sonicaron utilizando el bástago Microtips, y bajo las condiciones siguientes: 175 W de salida, durante 30 minutos, a medio ciclo de sonicación (30 minutos sonicación, con paradas cada 5 minutos y control de temperatura; 50 % Duty; 5 en control).

La sonicación se realizó en hielo picado, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y consecuentemente posible desnaturalización proteica.

Finalizada la sonicación, la muestra se centrifugó a 3500 r.p.m., durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se repartió el sobrenadante en eppendorf y se ultracentrifugó durante 3 minutos.

Finalmente, se repartieron en nuevos eppendorf y se mantuvieron en

MATERIAL Y MÉTODOS

congelación (-80 °C) hasta su estudio posterior.

III.5.2.- Larvarios.

Se utilizan cultivos que contienen, aproximadamente, 25 huevos/ μ l tras 3 meses de incubación (periodo óptimo de embrionamiento e infectividad de los huevos) en NaOH 0,1N. Esta solución se centrifuga a muy baja velocidad, realizando lavados sucesivos con PBS estéril con el fin de eliminar la solución de cultivo donde se hallan los huevos.

A continuación, se desecha el sobrenadante y el sedimento de los huevos embrionados se transfiere a un vaso de precipitado de 250 ml de capacidad, donde se añaden bolitas de vidrio de 2 mm de diámetro. La cantidad de bolitas será tal que cubra todo el fondo del vaso de precipitado.

Además, se añade una uña magnética del mismo diámetro que el fondo del vaso y se deja rotar con la ayuda de un agitador magnético a muy baja velocidad, a 37° C. La agitación se detiene cuando hayan eclosionado el 60-80% de los huevos (aproximadamente a los 45-60 minutos).

La separación de las larvas libres de los restos de huevos se realiza mediante un Baermann, de tal modo que usamos una copa de sedimentación llena de PBS a 37° C. Se coloca un "lens paper", papel muy fino para limpiar gafas, en medio de una doble gasa, encima de la copa de sedimentación hasta que toque la superficie del PBS, y se añade sobre éste la solución de los restos de huevos + larvas. Se incuba a 37° C durante 3-4 horas.

Al cabo de las 3 horas de incubación, se toman cuidadosamente unos 10 ml del sedimento con una pipeta, donde se localizarán todas las larvas libres que han

MATERIAL Y MÉTODOS

migrado hacia el fondo de la copa de sedimentación, mientras que los huevos han quedado retenidos entre las gasas o el papel de lente. Esos 10 ml se transfieren a dos tubos falco y se lava 9 veces en PBS estéril por centrifugación a 200 g durante 5 minutos cada lavado.

III.5.2.1.- Antígeno excretor-secretor larvario.

Tras los 9 lavados correspondientes con PBS, se realizan dos últimos lavados con medio de cultivo (Medio RPMI-1640, Sigma R-8758) con L-glutamina y NaHCO_3 , suplementado con penicilina (100 U.I./ml), con estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y con nistatina (100 U.I./ml), con el fin de evitar la contaminación bacteriana y fúngica del mismo.

Tras rellenar de nuevo con medio de cultivo hasta los 50 ml, tomamos 50 μl de la suspensión y contamos el número de larvas en la misma.

La concentración de larvas final en cada frasco de cultivo será de 8000 larvas por ml. Cada frasco dispondrá de 10 ml de cultivo. Las condiciones del mismo será de 37° C, 10 % de humedad y 5% de CO_2 .

El medio es colectado a los 2 días tras centrifugación a 200 g durante 5 minutos y se congela a -20° C hasta su posterior utilización.

Al sedimento con las larvas se le añade de nuevo medio de cultivo y se mantiene en las mismas condiciones que anteriormente hasta los 4 días, repitiendo el mismo proceso de recogida y reposición del medio de cultivo. Finalmente, el día 7, recogemos por tercera y última vez el sobrenadante del cultivo tras su sedimentación (en las mismas condiciones anteriores) y se conserva igualmente a -20° C hasta su posterior utilización.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.5.2.2.- Antígeno bruto larvario.

El proceso de obtención del ASL es el mismo que se ha descrito en el punto III.5.2., pero en este caso, una vez que se ha realizado el Baermann y se han lavado las larvas, entonces se someten a sonicación con las siguientes condiciones:

10 ml de PBS + Larvas

175 W de salida

½ ciclo de sonicación

15 minutos (paradas cada 2 minutos)

Sonicación en frío

Finalizada la sonicación, la muestra es ultracentrifugada durante 12-15 minutos. Se recoge el sobrenadante y se conserva a -80° C hasta su uso.

III.5.3.- De fracciones inmunizantes (de 97, 42 y 14 kDa).

Una vez seleccionadas las fracciones con las que habíamos de inmunizar a los animales, procedimos primeramente a su aislamiento, mediante el procedimiento descrito a continuación:

III.5.3.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Esta técnica pretende la escisión de las distintas fracciones proteicas de los antígenos cuticular y pseudocelómico en orden a su peso molecular.

En primer lugar, se montan las placas de vidrio que harán de molde para el gel, según las instrucciones del kit de laboratorios Bio-Rad. Posteriormente, se prepara la mezcla para formar el gel de separación (0.375 M Tris, pH 8.8). En este gel, durante la electroforesis, se separarán las proteínas antigénicas según su peso

MATERIAL Y MÉTODOS

molecular. La mezcla acuosa que formará el gel está constituida por:

REACTIVOS	GEL 12%
Acrylamida/bis (30 %T, 2.67 %C)	40 ml
Agua destilada	33.5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	25 ml
SDS 10% (p/v)	1 ml
Amonium Persulfato 10%	500 μ l
TEMED	50 μ l

El volumen usado dependerá si se realiza un mini-gel (10 ml) o un maxi-gel (40 ml). La solución gelificante se deposita entre las placas de vidrio. Se sella el frente superior del gel con alcohol isobutírico y se deja gelificar a 25 °C durante dos horas. Durante este tiempo, se prepara el gel de concentración o *stacking* (0.125 Tris, pH 6.8). En este gel se depositan los extractos antigénicos, permitiendo que las proteínas migren a través suya, rápidamente, sin separarse, con el objetivo de formar un frente continuo de proteína que penetrará simultáneamente en el gel de separación. Este gel está compuesto por:

REACTIVOS	GEL 4%
Acrylamida/bis (30 %T, 2.67 %C)	1.3 ml
Agua destilada	6.1 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10% (p/v)	100 μ l
Amonium Persulfato 10%	50 μ l
TEMED	10 μ l

MATERIAL Y MÉTODOS

El volumen que se usa, al igual que antes, varía según se trate de un mini-gel (10 ml) o un maxi-gel (7.5 ml).

Una vez que ha gelificado el gel de separación y se ha retirado el alcohol isobutírico, se añade el gel de concentración y se coloca sobre él un molde de plástico de frente continuo y además un pequeño pocillo adicional.

Se deja gelificar a 30 °C hasta conseguir su total polimerización.

Mientras tanto, el antígeno se diluye mediante agitación en Sample Buffer.

Esta solución desnaturizante está compuesta por:

REACTIVOS	VOLUMEN
0.5 M Tris HCL, pH 6.8	2.38 ml
Glycerol	1.9 ml
SDS 10 % (p/v)	3.8 ml
~ -Mercaptoetanol	950 µl
Azul de Bromo fenol 0.05 % (p/v)	950 µl
VOLUMEN TOTAL	10 ml

Con estos volúmenes, se logra una solución 3x, la cual pretende diluir el antígeno en un volumen adecuado para su uso en nuestras técnicas laboratoriales, sin que el Sample Buffer pierda actividad desnaturizante.

Posteriormente, el antígeno se somete a 100 °C durante 3 minutos, tras lo cual, se refrigera a 4 °C, todo ello con el fin de completar la desnaturización de las proteínas antigénicas.

Finalizada la polimerización del gel de concentración, se prepara la cubeta de electroforesis, usando la cubeta de electroforesis "Protean® II xi Cell" para un maxi-

MATERIAL Y MÉTODOS

gel o la cubeta "MiniProtean[®]" si es un mini-gel.

Los geles quedarán en posición vertical y estarán bañados por sus extremos en una solución de migración o *buffer running* (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3), el cual, permite el paso de corriente eléctrica a través del gel, lo que implica el movimiento de las proteínas a través suyo.

Las condiciones en las que hemos realizado la migración es la siguiente:

TIEMPO (Horas)	DIF.POTEN (Voltios)	AMPERAJE (Amperios)	POTENCIA (Wattios)	TAMAÑO GEL
14	50	0,9	180	Maxi

Una vez que el compartimento que corresponde a la parte superior de los geles se encuentra cubierto por el buffer, se procede a colocar la muestra sobre el frente continuo, formado por el molde de plástico colocado con anterioridad y ya separado. Igualmente, colocaremos la proteína patrón (Sigma Marker, wide molecular weight range), en el pequeño pocillo dejado por dicho molde tras la polimerización del gel. Se llena primero con el buffer, para evitar que el antígeno se difunda en el mismo, debido a las turbulencias que crearía si se añadiera con posterioridad.

La migración finaliza cuando el frente de proteínas, que está teñido por el azul de Bromo fenol del Sample Buffer, llega al final del gel. Después, se desmonta la cubeta de electroforesis y se separa el gel de las placas de vidrio con sumo cuidado.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.5.3.2.- Tinción del gel.

III.5.3.2.1.- *Tinción reversible de Zinc.*

Una vez realizado el SDS-PAGE en frente continuo y proteínas patrón, se corta el gel en ambos lados, de manera que tengamos finalmente 3 trozos del gel. El trozo central se teñirá con la tinción reversible de Zinc, de donde obtendremos las fracciones inmunizantes y los dos trozos de los extremos, los teñiremos con Azul de Coomasie para visualizar, con mayor claridad, la situación de las proteínas patrón y las bandas proteicas de nuestro antígeno.

La tinción reversible de Zinc se trata de una tinción negativa, que provoca que el gel se tiña con un fondo blanco, mientras que las bandas de proteínas no se tiñen, de manera que, al colocar el gel sobre un fondo negro, se pueden evidenciar claramente como bandas oscuras. La cantidad de reactivo que hay que preparar, es la suficiente como para que se cubra completamente el gel.

Protocolo de la tinción de Zinc:

1. Diluimos una parte de Sol. A (imidazole) en 9 partes de agua destilada. Bañamos el gel con esta solución en una cubeta. La solución debe cubrir completamente al gel. Se le somete a agitación suave, a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos
2. Diluimos una parte de Sol. B (Zinc sulfato) en 9 partes de agua destilada y bañamos el gel en esta solución, para revelarlo, durante 1 minuto.
3. Lavamos el gel con agua destilada en otro recipiente, agitando durante 3 minutos, reemplazando este líquido por agua limpia.
4. Por último, colocamos el gel sobre una lámina negra con el fin de observar las bandas proteicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.5.3.2.2.- Tinción con Azul de Coomasie.

Una vez que se ha teñido la parte central del gel con el método de Zinc, procedemos a teñir las zonas laterales con la tinción de Azul de Coomasie. Con esta tinción, se pretende detectar el mayor número posible de fracciones proteicas y visualizar, con mayor claridad, las bandas que nos interesan.

El Azul de Coomassie usado es el R-250 y tiñe polipéptidos de membrana. Su sensibilidad es de 0.1 ng de proteína por mm².

Para prepararlo, se disuelven 2.5 g de este reactivo en agua:metanol:ácido acético glacial (60:30:10%, v/v).

Los dos extremos del gel se tiñen durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminada la tinción, para eliminar el exceso de colorante, se decolora con una solución de agua:metanol:ácido acético glacial (50:40:10%, v/v) a 40-50 °C.

El tiempo de decoloración no está definido, sino que se decolora hasta eliminar el exceso de Azul de Coomasie. Tras la decoloración, las fracciones antigénicas aparecen como bandas teñidas de color azul brillante intenso.

Realizadas las pertinentes mediciones y comparaciones con la proteína patrón, se identifican las tres fracciones proteicas: la de 97 kDa, identificada en el antígeno cuticular y las otras dos de 14 y 42 kDa, en el líquido pseudocelómico.

Rápidamente, se recortaron las bandas identificadas en el trozo de gel central, siguiendo la banda oscura no teñida que se correspondía con las fracciones señaladas con anterioridad. Las tiras de gel que contenían las fracciones, se cortaron en pequeños rectángulos y se introdujeron en un recipiente, congelándolas a -20 °C hasta su procesamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.5.3.3.- Electroelución.

Finalmente, se realizó una electroelución de dichas fracciones proteicas, para solubilizarlas y separarlas del gel en el que se encuentran atrapadas. Para ello, se realiza una electroforesis, mediante la cual, las proteínas migrarán desde el gel al medio líquido. Además, así también logramos concentrar dichas proteínas.

La electroelución se llevo a cabo en la cubeta de electroforesis Little Blue Tank aparato de ISCO, utilizando las copas de muestra tipo MicroTrap, con membranas de diálisis de tamaño de exclusión de 10 kDa, en buffer 12.5 mM Tris-glicina, 0.1% SDS, pH 8.8, durante 4-8 horas, y unas condiciones de 3W y 10 mA por copa, sin superar nunca los 400 voltios.

Finalizada la electroelución, se recoge la muestra, se determina su concentración proteica y se separa en alícuotas que son congeladas a -80° C hasta su uso.

III.6.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LOS ANTÍGENOS.

Las necesidades técnicas que se utilizan en este trabajo, necesitan unas concentraciones antigénicas concretas, por lo que es imprescindible conocer la cantidad de proteína presente en cada uno de los extractos estudiados.

Para llevar a cabo tal fin, se sigue una modificación del método Bradford (Coomasie Plus Protein Assay, de Pierce). Para lo cual, en primer lugar, se preparan en placas de ELISA, curvas patrones de concentración proteica, utilizando diluciones progresivas de seroalbúmina bovina. Las concentraciones usadas para cada curva, varían según el antígeno a estudiar, dependiendo de que la cantidad de proteína

MATERIAL Y MÉTODOS

presente en el mismo sea elevada o reducida.

En el caso que el antígeno estudiado presente una concentración de proteína elevada, se realiza una curva patrón con concentraciones, desde 1500 $\mu\text{g/ml}$ hasta 50 $\mu\text{g/ml}$. Si el determinado es un antígeno con escasa concentración proteica, el rango de las concentraciones usadas para realizar la curva es menor (de 250 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$).

Para realizar la curva, se mezclan en la placa de ELISA estas diluciones de proteína con el reactivo de Coomassie Plus Protein Assay, en las proporciones 1:1 y 1:30, según el tipo de curva patrón realizada, obteniendo un volumen final de 300 μl .

Tras determinar la curva, se procede a la colocación, por duplicado, de la muestra junto con el reactivo colorimétrico en la placa de ELISA. Si la coloración obtenida es similar o excede la concentración más alta de la curva patrón, también se aplica a diferentes diluciones con el fin de obtener coloraciones dentro del rango de la curva.

Finalmente, se realiza el procesado automático de la placa en el equipo de ELISA, programado para su lectura a 595 nm y realización de curvas patrón de concentraciones proteicas, adición de reactivos, lectura espectro-fotométrica y cálculo de la concentración proteica de las muestras a partir de la curva patrón.

Concentración del antígeno

Si la proteína antigénica se obtiene a una concentración inferior a la necesaria para su utilización en la electroforesis, se le aplica una técnica comercial de concentración de proteínas (*StrataClean Resin*, Stratagene 400714-61), a razón de 10 . l de resina por cada 300 . g de antígeno. La resina se homogeneiza con la dilución de antígeno, mediante agitación durante 3 minutos. Posteriormente, se ultracentrifuga la mezcla

MATERIAL Y MÉTODOS

resina-antígeno durante 3 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet que queda en el fondo del recipiente contiene el antígeno unido a la resina. Este pellet fue diluido por agitación en el volumen de líquido deseado.

III.7.- MÉTODO DE RECUPERACIÓN LARVARIA.

III.7.1.- Del hígado y pulmón.

III.7.1.1.- Baermann.

Con el fin de recoger el mayor número de larvas en hígado y pulmón, en primer lugar, durante las primeras horas tras la necropsia de los animales, sometimos el hígado y el pulmón a un Baermann. Para ello, trituramos los tejidos con ayuda de cuchillos y bisturíes, de tal modo que quedaron trozos de un tamaño de unos 2-3 mm de diámetro. El líquido de migración fue PBS estéril a 37° C, dejando el aparato Baermann 24 horas a temperatura ambiente.

Al cabo de este tiempo, recogimos el sedimento con las larvas separadas de los tejidos y realizamos el conteo de las mismas. Finalmente, el resto del tejido hepático y pulmonar triturado, lo sometimos secuencialmente al siguiente método de recuperación larvaria descrito a continuación.

III.7.1.2.- Digestión artificial.

Una vez realizado el Baermann según se ha descrito en III.7.1.1., se procede a la recuperación de aquellas larvas que aún no han migrado mediante una digestión péptica de estos órganos.

Para ello, los tejidos ya triturados, se mezclan con líquido de digestión en una proporción tejido:líquido 1:30.

MATERIAL Y MÉTODOS

La composición del líquido de digestión fue:

! 0'5 gr de pepsina Merck 2000 U/g FIP (1/10000 NF).

! 0,7 cc de ácido clorhídrico concentrado al 35%.

! 100 cc de agua destilada a 40 °C.

Tras homogeneizar la mezcla, ésta se incubó en una estufa con agitador orbital a 40 °C y 175 r.p.m durante una hora. Finalizado el proceso de digestión, tras el cuál las larvas de *Ascaris* son liberadas del tejido pulmonar o hepático, el contenido de los botes de digestión se pasa a través de dos tamices de 0,125 y 0,063 . m de luz de malla. Del último de ellos, en un pequeño volumen de agua, se recogen los restos del filtrado, el cual debe contener las larvas, para su posterior estudio al estereomicroscopio.

III.7.2.- Del intestino.

Una vez realizada la necropsia, el intestino fue abierto longitudinalmente para observar posibles lesiones macroscópicas, así como la búsqueda de parásitos observables a simple vista (adultos de *A. suum*, adultos de *Trichuris spp.*, *Oesophagostomum spp.*, etc). A continuación, fue lavado en un volumen aproximado de 2 litros de PBS, filtrando el líquido resultante sobre una malla de 0,125 µm de diámetro para finalmente, visualizar el filtrado al microscopio.

III.8.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DEL HOSPEDADOR.

III.8.1.- *In vivo*: Sangre y suero sanguíneo.

La distribución de las tomas de sangre, en los días en que se desarrolló según cada experimento y por cada animal, puede observarse en la tabla 6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1: Cerdos infectados experimentalmente	
CERDO	Sangría. Días Post-Infección
513	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 48, 60, 69
505	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 48, 60, 69
508	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 48, 60, 69
852	0, 7
sc	0, 7
516	0, 7, 14, 21
518	0, 7, 14, 21
515	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
519	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
513b	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 71, 85, 100, 115
514	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 71, 85, 100, 115
517	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 71, 85, 100, 115
520	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 71, 85, 100, 115

Experimento 2: Cerdos inmunizados experimentalmente	
LOTE	Sangría. Días Post-Infección
1	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
2	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
3	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
4	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
5	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
6	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42
7	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42

Tabla 6.- Esquema de las tomas de sangre realizadas en todos los cerdos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

De cada animal se obtuvieron 10 ml de sangre en cada extracción, mediante venipunción de la yugular derecha. En los experimentos, se utilizaron tubos estériles sin coagulante, en el caso de la obtención del suero sanguíneo y tubos estériles con anticoagulante (EDTA), para el análisis de los parámetros hemáticos.

III.8.2.- *Post-mortem*: Tejidos orgánicos.

Todos los animales experimentales, previa insensibilización, se sacrificaron por el método de sangrado, con lo que además, se facilitó la toma de muestras de este material.

Para la realización de la necropsia, se siguió el método de Gázquez (1987); para lo cual, en primer lugar se observaron, macroscópicamente, las lesiones que aparecieron en el exterior e interior de cada animal. Posteriormente, centramos nuestro estudio en la búsqueda de los distintos parásitos que pudieran encontrarse en el cerdo. Para ello:

En vísceras, se realizó una primera visualización macroscópica de los órganos, con el objeto de detectar cualquier anomalía anatomopatológica de origen parasitario o no. Así, fueron anotadas todas aquellas alteraciones de peso, volumen, forma, color, superficie o consistencia que nos orientaran acerca de cualquier patología. En caso de detectarse la presencia de helmintos, éstos se recogieron para su posterior identificación, anotándose el número de ellos.

En heces, las cuales, una vez disecado el recto, se recogieron, almacenaron e identificaron individualmente para su posterior análisis coprológico.

En musculatura, en todos los animales del experimento, se tomaron muestras

MATERIAL Y MÉTODOS

de tejido muscular cardíaco para realizar una digestión trípica manual para el diagnóstico de *Sarcocystis*. Por otra parte, y para descartar la presencia de larvas 1 de *Trichinella*, se tomó tejido muscular diafragmático de cada animal para la realización de una digestión péptica manual.

III.8.3.- Recuento de “manchas de leche”.

En el hígado se realizó el conteo de las manchas de leche, lesión que evidencia el paso de las larvas de este nematodo a través del parénquima del hígado. Este conteo se realiza mediante observación macroscópica del hígado y ayudados de un contador, anotándose características macroscópicas de éstas, siendo posteriormente fotografiadas. Las manchas fueron clasificadas con diferentes nombres, siguiendo la clasificación de Róneus (1966), descritas en el apartado III.3.2.2.1 de esta tesis.

III.9.- TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

III.9.1.- Técnica inmunoenzimática ELISA.

III.9.1.1.- Estandarización.

Con el objeto de obtener una óptima relación entre la concentración de antígeno (Ag) y la densidad óptica (d.o), se realizaron una serie de ensayos encaminados a determinar los parámetros que mayor influencia tienen en la fiabilidad de la técnica, como son:

- dilución óptima del suero y/o antisuero.
- dilución óptima del conjugado.
- concentración óptima de O.P.D.
- concentración óptima de H₂O₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

- tiempo de reacción enzimática.

Para ello, cada Ag fue enfrentado a sueros negativos y sueros positivos a diferentes diluciones, las cuales se ensayaron a su vez frente a distintas diluciones de antisuero (en su caso) y conjugado.

En un segundo ensayo, y utilizando la dilución óptima de suero, antisuero y conjugado determinada previamente, se enfrentaron sueros positivos y negativos frente a varias concentraciones de O.P.D y de H₂O₂, realizándose lecturas aproximadamente cada 5 minutos, hasta llegar a los 70 minutos.

III.9.1.2.- Desarrollo de la técnica.

Se emplea el método de micro-ELISA indirecto de dobles anticuerpos (en el caso de la detección de IgG) y de triples anticuerpos (en la detección de IgM). Para su realización, se utilizan placas de poliestireno de microELISA, de 96 pocillos, de fondo plano y unos 350 . l de capacidad (Costar, 3590). En cada pocillo, se depositan 100 . l de Ag disuelto en PBS 0,01 M, pH 7,2 sin Tween. A continuación, las placas se incuban durante 4 horas a 37°C, para permitir la adsorción del antígeno a las paredes del pocillo y, consecuentemente se siguen incubando toda la noche a 4 °C.

Tras este período, el exceso de antígeno no fijado es arrastrado por una solución de PBS 0,01 M y pH 7,2, utilizando para ello un equipo automático, realizándose tres lavados. Seguidamente, las placas son sacudidas enérgicamente sobre un papel de filtro, para eliminar las gotas de líquido de lavado que pudieran permanecer en los pocillos.

Con objeto de tapizar perfectamente las zonas de los pocillos que no hubieran sido recubiertas por Ag y evitar adsorciones inespecíficas de inmunoglobulinas, se

MATERIAL Y MÉTODOS

depositan 200 . l de BSA al 5%, en PBS estéril de pH 7,2, incubándose las placas a 37°C durante media hora. Inmediatamente después, se someten a un nuevo proceso de lavado.

Las placas con el antígeno adsorbido de esta forma, se mantienen a -80°C hasta el momento de su utilización. Para ello, se introducen en bolsas de plástico selladas herméticamente.

Una vez descongeladas las placas a temperatura ambiente, cada pocillo es rellenado con 100 . l del suero elegido, diluido a la concentración adecuada en PBS-Tween 20 (ver IV.4.3.1). Dichas diluciones fueron seleccionadas durante la estandarización de la técnica, ya que con ellas se obtiene una mayor diferenciación entre sueros positivos y negativos. Tras la incubación a 37°C durante cuarenta minutos y posterior lavado, se añaden 100 . l de conjugado antiespecie (inmunoglobulina anti-IgG porcina obtenida en conejo marcada con peroxidasa, Sigma A5670), a la concentración idónea. Se somete a una nueva incubación, a 37°C durante cuarenta minutos y después, a un nuevo proceso de lavado para eliminar las inmunoglobulinas marcadas que no hayan reaccionado con el complejo antígeno-anticuerpo. Esta descripción fue aplicada para la detección de la IgG, ya que en el caso de la IgM, se practicó un paso intermedio, entre el suero y el conjugado antiespecie, que consistió en la adicción e incubación de un antisuero (inmunoglobulina anti-IgM porcina obtenida en ratón, ICN 643901) durante 1 hora a 37 °C y posterior lavado. A partir de aquí, se siguió el mismo procedimiento que la IgG, con la diferencia de que el conjugado consistió en una inmunoglobulina anti-IgG de ratón obtenida en conejo, conjugada a la peroxidasa (Sigma, A9044).

Posteriormente, las dos inmunoglobulinas (IgG e IgM) siguen el mismo

MATERIAL Y MÉTODOS

proceso, en el que se añaden 100 . l de sustrato. El sustrato, incoloro o ligeramente amarillento, en presencia de peroxidasa, toma color anaranjado intenso o rojizo, con una intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos fijados al antígeno o al antisuero. Este sustrato se elabora, como máximo, una hora antes de su uso debido a la poca estabilidad del preparado (el H₂O₂ se añade justo en el momento de su utilización).

Las lecturas se realizan a 450 nm de longitud de onda, en el caso de la detección de IgG y 490 nm, en el caso de la IgM y después de haber parado la reacción con H₂SO₄.

Para comprobar que todos los pasos de la técnica han sido realizados correctamente, es necesario reservar unos pocillos en cada placa para realizar los siguientes controles:

*Control de conjugado

Se utiliza una columna de ocho pocillos sin suero problema, siendo éste sustituido por PBS-Tween 20, continuando los demás pasos rutinariamente. Este control nos puede dar información sobre numerosos errores de procedimiento (procesos de lavado inadecuado, reactivos en mal estado, etc.)

*Control positivo

Se utiliza como referencia un suero positivo conocido (cedido amablemente por el Danish Centre for Experimental Parasitology - Dinamarca), en cuatro pocillos, que nos garantiza que la técnica está bien realizada.

*Control negativo

Igualmente, se utiliza un suero negativo conocido (procedente de lechones libres de contacto con *Ascaris suum*) en cuatro pocillos. Al igual que el control

MATERIAL Y MÉTODOS

positivo, la repetitividad de su lectura garantiza la correcta realización de la técnica.

III.9.2.- Western blotting.

La técnica de Western Blotting (WB) que hemos usado, necesita como primer paso, la preparación de un SDS-PAGE, descrita con anterioridad en el punto III.5.3.1.

Se utilizó una concentración de 500 . g/ml de antígeno para un WB a partir de un mini-gel y 1000 . g/ml para un WB a partir de un maxi-gel.

Tras la migración del antígeno por el gel de acrilamida, se procede a realizar la transferencia electroforética de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana, permite que las proteínas que se adhieran a ella puedan ser reconocidas por los anticuerpos.

La transferencia se realiza con un método semi-seco, que consiste en colocar el gel sobre una membrana de nitrocelulosa de las mismas dimensiones, que a su vez, se coloca entre papeles de filtro Wathman n#1 empapados en buffer de transferencia (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, (20% metanol, pH 9.2). Todo ello se dispone en un aparato que hará pasar corriente a través del gel, de un ánodo a un cátodo, lo que provoca el paso de las proteínas del gel a la nitrocelulosa.

Las condiciones en que se lleva a cabo la transferencia se calculan según las siguientes reglas:

	Mini-gel	Maxi-gel
Amperaje	5'5 mA / cm ²	3 mA / cm ²
Voltaje	24 V	24 V
Tiempo de transferencia	1 hora	1,5 horas

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez terminada la transferencia, se realiza la tinción reversible de la membrana con Rojo Ponceau, para asegurar que la transferencia se ha realizado adecuadamente. El Rojo Ponceau tiñe las bandas de antígeno de color rojo, sin alterar la composición de las proteínas. Posteriormente, se lava la membrana con TBS (100 mM Tris-Base, 1.3 M NaCl, 50 mM HCL, 10 mM EDTA) + Tween 20, a 37 °C y 80 rpm, para eliminar el colorante e impedir así que interfiera en la posterior reacción antígeno-anticuerpo.

Terminada la comprobación, se procede al bloqueo de la nitrocelulosa con proteínas lácteas al 3% p/v disueltas en TBS, durante 1 hora, a 37 °C y 80 rpm. El objetivo de este paso, es cubrir toda la membrana de proteína que no puede ser reconocida como antígeno y saturar así, todas las zonas de la membrana que no están ya ocupadas por los antígenos del parásito. Con esto, se evita que los anticuerpos del suero o el conjugado, al ser también proteínas, se fijen a la membrana de forma inespecífica. Tras varios lavados con TBS, eliminaremos el exceso de proteína no unida a la nitrocelulosa.

Tras el bloqueo, se realiza la incubación con los sueros de los cerdos infectados en la membrana de nitrocelulosa. Para ello, dicha membrana es prensada en un aparato consistente en dos placas de metacrilato, una lisa y la otra con calles verticales labradas en una de sus caras, destinadas a colocar los sueros. Este aparato permite que cada uno de los sueros colocados en una calle vertical, esté en contacto con las bandas horizontales de antígeno que hay en la membrana.

La forma usual de realizar estas incubaciones del suero, ha sido cortar la membrana en tiras verticales e incubar cada una de ellas con el suero en un recipiente *ad hoc*. El método usado por nosotros tiene varias ventajas: en primer lugar, la

MATERIAL Y MÉTODOS

comodidad y consiguiente ahorro de tiempo; en segundo lugar, la identificación de las bandas es mucho más fácil y da lugar a menos errores y, por último, al quedar entre los sueros una zona en la que no se coloca suero, gracias a la presión que ejercen las placas de metacrilato (se atornillan), podemos comprobar la efectividad del bloqueo. De este modo, cualquier coloración final en esa zona sin suero, indicaría que el conjugado se fija inespecíficamente a la membrana.

Posteriormente, los sueros se incuban durante una hora, a 37 °C y en agitación a 40 rpm, para permitir que los anticuerpos se fijen a las bandas de antígenos.

La dilución de suero que fue utilizada en la técnica de WB fue de 1:8, sin que esto produjera un color de fondo inespecífico entre bandas.

Después de la incubación, se realizan lavados de la membrana con TBS (un lavado de 2 minutos y 4 lavados de 10 minutos cada uno), para eliminar el exceso de suero que podría interferir en la posterior reacción del conjugado y producir una fuerte coloración de fondo. La cantidad y duración de los lavados también fue determinada en ensayos previos.

Posteriormente, se procede a la incubación del conjugado. Se lleva a cabo en una cubeta en la que se añade el conjugado diluido en TBS + proteínas lácteas 1,5 %. La dilución del conjugado también se determinó por estandarización, realizando pruebas de dilución de 1:100 a 1:1000. Esta incubación también se realiza durante una hora, a 37 °C y en agitación.

Por último, se añade el sustrato a la membrana, con el fin de evidenciar si la enzima está presente. Éste consiste en una solución de cloro naftol, 8 ml de metanol, 32 ml de TBS y 90 µl de H₂O₂ a 50 °C. Esta solución cromógena forma un precipitado de color violáceo donde la enzima esté activa, es decir, teñirá las zonas

MATERIAL Y MÉTODOS

donde está el complejo antígeno-anticuerpo-conjugado, lo cual permite la medida e identificación de cada una de ellas, de acuerdo a los pesos moleculares de las proteínas patrones, según los distintos sueros.

III.10.- MÉTODOS HEMATIMÉTRICOS.

Una vez llega la sangre al laboratorio se procede de la siguiente manera:

*Tubos con silicona:

Se centrifugan en refrigeración (4 °C) a 3500 rpm durante 15 minutos, separándose el suero de los elementos formes, por la interfase de silicona. El suero se recoge en eppendorff y son debidamente rotulados y almacenados a -80 °C.

*Tubos con EDTA:

En primer lugar, se realiza un frotis sanguíneo y posteriormente se tiñe con panóptico rápido. Se rotulan y se determina la fórmula leucocitaria, obteniendo el % de neutrófilos, basófilos, linfocitos, eosinófilos y monocitos. También determinamos otros parámetros tales como el número de glóbulos rojos, número de glóbulos blancos, hemoglobina y hematocrito.

III.11.- MÉTODOS HISTOPATOLÓGICOS.

El material obtenido de las necropsias, fue fijado en formol al 10% tamponado, tallado en pequeños bloques, tras varios días de fijación, e incluido en parafina en un procesador automático (LEICA, TP1020), siendo almacenados hasta su uso.

Se realizaron cortes de entre 4 y 8 . m de espesor, se depositaron en

MATERIAL Y MÉTODOS

portaobjetos y se sometieron a calentamiento suave para provocar su adherencia. Más tarde, se desparafinan sometiéndolo primero a 50 °C durante un mínimo de 1 hora. A continuación, se someten a dos baños de xilol, y posteriormente se rehidratan mediante sucesivos baños de alcohol etílico de concentración decreciente (100°, 96° y 70°) y luego en agua destilada. Por último, se realiza la técnica de tinción que corresponda.

Una vez teñido, se realiza este mismo proceso pero en sentido contrario, para lograr la deshidratación absoluta del tejido, y tras el último baño de xilol, se cubre la preparación con medio de montaje permanente. Todas las tinciones fueron realizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

FORMALINA TAMPONADA

- Formaldehído al 40%	120 ml.
- NaH ₂ PO ₄ • 1H ₂ O	4 g.
- Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	4,8 g.
- Agua destilada	880 ml.

III.11.1.- Técnicas histológicas.

III.11.1.1.- Hematoxilina-Eosina.

Reactivos y técnica:

- Hemalumbre de Hematoxilina de Mayer	6 min.
- Tampón ácido para diferenciación	1 min.
- Tampón básico de viraje	2 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Eosina G 5 min.
- Tampón neutro de diferenciación 5 min.

Entre cada paso, hay un lavado con agua destilada.

Con esta tinción, se observan los núcleos celulares en color azul oscuro, mientras que el citoplasma aparece en distintas tonalidades de rosa. Es la tinción más básica que se emplea en histología, y cualquier estudio debe comenzar por la observación de al menos un corte teñido con esta técnica.

III.11.1.2.- Tricrómico de Masson.

Reactivos:

Solución A: (Agua destilada: 99,0 cc; Fucsina ácida: 0,5 gr; Ácido acético: 0,5 cc).

Solución B: (Ácido fosfomolibdico 1 %).

Solución C: (Agua destilada: 96,5 cc; Ácido acético: 2,5 cc; Verde luz o saturno: 1 gr).

Solución D: (Agua destilada: 99 cc; Ácido acético: 1 cc).

Solución E: (Alcohol absoluto: 100 cc; Ácido acético: 0,1 cc).

Técnica:

- Hematoxilina 20 min.
- Lavar con agua destilada
- Solución A 3 min.
- Lavar con agua destilada
- Solución B 5 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Escurrir, no lavar.
- Solución C 20 min.
- Lavar con agua destilada
- Solución D 30 min.
- Lavar con agua destilada
- Solución E 5 min.

Esta es una técnica especialmente útil para el estudio del tejido conectivo. Los núcleos celulares se observan en un marrón casi negro; el citoplasma, la queratina, las fibras musculares y los gránulos acidófilos, en rosa; el colágeno, el moco y los gránulos basófilos, en azul, y los eritrocitos en rojo anaranjado.

III.11.2.- Técnicas inmunohistoquímicas.

Con las técnicas inmunohistoquímicas, se busca poner de manifiesto alteraciones que de otro modo pasan desapercibidas, o bien confirmar la etiología de las que se hayan encontrado con otras técnicas microscópicas.

En nuestro caso, buscamos el posible depósito de diferentes antígenos de *A. suum*, así como de inmunoglobulinas del tipo IgG, IgM e IgA.

Para ello, hemos utilizado un sistema peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP), para el estudio mediante el microscopía óptica.

III.11.2.1.- Obtención de sueros hiperinmunes.

Un total de 14 conejos fueron utilizados para la obtención de los sueros hiperinmunes, necesarios como primer anticuerpo añadido en la técnica PAP de

MATERIAL Y MÉTODOS

nuestro estudio, en cuanto al análisis de depósitos de antígenos de adultos y larvas de *A. suum*.

El protocolo de inmunización ya fue descrito en el apartado III.3.3. de esta sección de material y métodos.

III.11.2.2.- Técnica de PAP.

Hemos utilizado, excepto para la búsqueda de IgA en los tejidos, dos kits comerciales; uno para anticuerpo primario de ratón (DAKO EnVision™ +System, HRP (DAB), K4007) y otro para anticuerpo primario de conejo (DAKO EnVision™ +System, HRP (DAB), K4002).

En el caso del estudio de depósito de antígenos, el anticuerpo primario fue obtenido en conejos, como acabamos de ver. En el caso del estudio de depósito de IgG, se utilizó un anticuerpo primario comercial anti-IgG cadena ligera de cerdo obtenida en ratón (Labclinics, CTS6133). Para el análisis del depósito de IgM se utilizó el anticuerpo primario anti-IgM obtenido en ratón (ICN, 643901).

En el análisis del depósito de IgA se usó, como anticuerpo primario, una anti-IgA de cerdo obtenida en cabra (ICN, 643911). Al no disponer de kit comercial para anticuerpo primario de cabra, utilizamos como segundo anticuerpo, una inmunoglobulina anti-cabra obtenida en conejo peroxidasa-conjugada (Sigma, A-5420).

En todos los casos se utilizó, como sustrato cromógeno, la diaminobencidina (DAB).

Técnica:

- 1.- Los cortes son desparafinados y rehidratados, del mismo modo que hemos

MATERIAL Y MÉTODOS

visto en III.11.

2.- Digestión proteica del tejido mediante solución de tripsina durante 15 minutos en cámara húmeda.

3.- Inhibición de la peroxidasa endógena que pueda encontrarse en el tejido. Se utilizó el producto aportado en el kit comercial, fundamentalmente constituida por metanol y H_2O_2 , incubándose la muestra durante 12 minutos.

4.- Lavado con agua destilada. Secar alrededor del corte.

5.- Incubación con el anticuerpo primario o con control negativo, durante 25 minutos.

6.- Lavar con PBS-Tween 0,5 % y secar alrededor del corte.

7.- Incubar con el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa del kit comercial durante 25 min.

8.- Lavar igual que en el paso 6. Secar alrededor del corte.

9.- Incubar con el sustrato-cromógeno (DAB) durante 10 min.

10.- Lavar abundantemente con agua destilada.

11.- Contratinción. Cubrir con Hematoxilina de Mayer durante 10 min.

Con ello se tiñen los tejidos, permitiendo una más fácil identificación de los lugares en los que ha habido marcaje inmunológico.

12.- Lavar con agua destilada.

13.- Montar las preparaciones con medio de montaje (Eukitt®).

III.12.- ANÁLISIS DE MUESTRAS DE GRASA HEPÁTICA.

III.12.1.- Extracción de grasa.

La extracción de grasa fue realizada por el método de Bligh y Dyer (1959).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se pesaron aproximadamente 10 gr de muestra, previamente picada, y se homogeneizaron con 30 ml (tres veces el de la muestra) de cloroformo-metanol en la proporción 1:2 durante un minuto.

Una vez homogeneizada, se centrifugó durante 5 minutos a 7000 r.p.m, tras lo cual, se recogió el sobrenadante y se volvió a homogeneizar la muestra con 10 ml de cloroformo, repitiéndose la centrifugación.

Se volvió a recoger el sobrenadante, uniéndose al anterior, y se añadieron 10 ml de agua destilada. Se centrifugó a 10000 r.p.m durante 5 minutos, filtrándose el sobrenadante y lavando el residuo con cloroformo:metanol (1:2).

El filtrado obtenido se agitó vigorosamente en un embudo de decantación, y se dejó reposar. Cuando se produjo la separación de las fases, se recogió la inferior, que contenía el extracto lipídico, filtrándola con sulfato sódico anhidro.

El disolvente se evaporó en un rotavapor a una temperatura no superior a los 45 °C. El residuo se pesó a temperatura ambiente y fue recogido para los análisis posteriores.

III.12.2.- Metilación de los ácidos grasos.

Para el estudio de la composición en ácidos grasos de las muestras, fue necesaria la derivatización de éstos a sus correspondientes ésteres metílicos.

En un tubo de rosca, donde estaba el extracto lipídico de la muestra, se añadió 1 ml de una disolución de ácido tridecanoico (0,0625 gr de ácido en 50 ml de cloroformo), que fue utilizado como patrón. Se evaporó con nitrógeno y se añadió 1 ml de metilato sódico.

Los tubos fueron mantenidos durante 30 minutos en una estufa a 80 °C, tras

MATERIAL Y MÉTODOS

lo cual, se volvió a añadir 1 ml de ácido sulfúrico en metanol, y se llevaron de nuevo a la estufa durante el mismo tiempo.

Transcurrido este tiempo, se echó 1 ml de hexano, después de que las muestras se hubieran enfriado, y posteriormente otro ml de una disolución de cloruro sódico. Finalmente, se recogió en viales el hexano separado en la parte superior de los tubos, se llevaron a sequedad y se redisolviéron nuevamente en 1 ml de hexano.

III.12.3.- Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

Se empleó un cromatógrafo de gases HP-5890-II, con inyección de tipo *on column*, equipado con una columna semicapilar de sílice fundido (30m x 0,53mm x 1,0 μ m) con fase estacionaria polar constituida por FFAP (polietilenglicol-TPA modificado). La detección de los compuestos se realizó mediante un detector de ionización de llama (FID).

La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con el de patrones sometidos a las mismas condiciones.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Flujo de gas portador	2,6 ml/min
Temperatura del horno (isotermo)	225 °C
Temperatura del inyector	230 °C
Temperatura del detector	230 °C

MATERIAL Y MÉTODOS

III.13.- MEDIOS INSTRUMENTALES.

III.13.1.- Para la recogida de muestras.

III.13.1.1.- Del parásito.

Para la multitud de disecciones anatómicas a partir de los parásitos adultos y obtención y purificación de sus antígenos somáticos y larvarios, ha sido necesaria la utilización de:

- Placas de poliuretano y alfileres.
- Bisturí de disección.
- Estufa de incubación de CO₂ Forma Scientific Mod. 3862.
- Centrifuga refrigerada Kubota Mod. 5800.
- Homogeneizadores cilíndricos de tejidos de 10 ml de capacidad.
- Sonicador Sonics & Materials Vibra-Cell Mod. 600-att Dual Output.
- Eppendorffs, vasos de precipitado, agujas hipodérmicas, etc.

III.13.1.2.- Del hospedador.

Para este cometido, hemos utilizado material habitualmente presente en un laboratorio, como tubos falco para la recogida de sangre entera, material de necropsia (tijeras, pinzas, cuchillos, etc), cubetas para el transporte de vísceras, bolsas, botes para la conservación de cortes histológicos, etc.

III.13.2.- De microscopía óptica.

- Microscopio ultragrancampo Nikon Mod. Optiphot.
- Microscopio invertido Olympus Mod. CK2.
- Microscopio Nikon Mod. Labophot.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Microscopio de contraste interferencial de Nomarski Nikon Mod. Optiphot.
- Estereomicroscopio Nikon Mod. SMZ-10, con fuente de luz fría de iluminación episcópica y lámparas halógenas para iluminación diascópica.
- Sistema automático de fotografía Nikon HFX-II.
- Fotomicroscopio NIKON OPTIPHOT.

III.13.3.- De la analítica inmunológica (ELISA, WB y SDS-PAGE).

En la realización de las técnicas SDS-PAGE, WB y ELISA se ha utilizado el siguiente material;

- Lector de placas ELISA Merck, System Mios, Bio-Teck EIA Reader Mod. EL- 307.

- Dispensador y lavador de placas Merck System MIOS.
- Placas microtiter ELISA (Costar, 3590).
- Cubeta de electroforesis BIO-RAD Mod. Protean[®] II xi Cell.
- Cubeta de electroforesis BIO-RAD Mod. Mini-Protean Iitm.
- Alimentador de electroforesis Consort Mod. E-702.
- Placa de incubación de membranas de nitrocelulosa con sueros Immunetics[®] Mod. Miniblotter[®] 25.
- Aspirador de sueros para Miniblotter[®] 25 Immunetics[®] Manifold F2.
- Aparato de transferencia de proteínas BIO-RAD Mod. Trans-blot SD Semi-Dry Tranfer Cell.

III.13.4.- Para histopatología e inmunohistoquímica.

- Formol tamponado al 10%.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Alcohol etílico absoluto, de 96°, de 70°.
- Xileno.
- Parafina.
- Albúmina de Mayer.
- Reactivos para la tinción de Hematoxilina-Eosina.
- Reactivos para la tinción de Tricrómico de Masson.
- Solución de montaje Eukitt®
- Procesador de tejidos SHANDONN DUPLEX PROCESSOR.
- Dispensador de parafina.
- Microtomo NEDIM DDM SYSTEM PATHOLOGIE.
- Estufa KOWELL D2-I, etc.

III.13.5.- Tratamiento estadístico.

La relación entre las distintas variables ha sido estimada por los coeficientes lineales de correlación de Pearson. Las diferencias entre los diferentes grupos de datos se ha analizado por el test de análisis de varianza y comparación post hoc para diferencias específicas entre pares de datos, usando los tests F de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch, el de Newman-Keuls y de Duncan. El nivel de significación ha sido establecido como $p < 0,05$. Todos los cálculos fueron llevados a cabo usando el paquete SPSS 10,0.

RESULTADOS

RESULTADOS

IV.1.- ASCARIOSIS EN CONDICIONES NATURALES.

IV.1.1.- Resultados parasitológicos.

Se analizaron un total de 95 cerdos sacrificados en matadero con diferentes condiciones de infección por *A. suum* y/u otros parásitos. Los resultados de la necropsia de todos ellos quedan reflejados en la tabla 7.

PROTOZOOS.....	97,50 %
<i>Eimeria spp.</i>	35,00 %
<i>Balantidium coli</i>	86,25 %
<i>Sarcocystis spp.</i>	20,00 %
CESTODOS.....	17,50 %
<i>Echinococcus hydatidosus</i>	17,50 %
<i>Cysticercus tenuicollis</i>	17,50 %
NEMATODOS.....	85,00 %
<i>Ascaris suum</i>	48,75 %
<i>Metastrongylus spp.</i>	37,50 %
<i>Oesophagostomun dentatum</i>	16,25 %
<i>Ascarops strongylina</i>	10,00 %
<i>Trichuris suis</i>	3,75 %
<i>Strongyloides ramsoni</i>	1,25 %
ACANTOCÉFALOS.....	2,50 %
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	2,50 %

Tabla 7.- Prevalencia parasitaria de los 95 animales sacrificados en diferentes mataderos de la región extremeña.

El porcentaje de cerdos con adultos de *A. suum* en el intestino delgado fue del 42,1 %, aunque el 49,5 % del total del colectivo fue positivo por métodos

RESULTADOS

coprológicos, al presentar huevos del parásito en heces. El total de animales con algún contacto evidente con este helminto, bien por la presencia de adultos y/o la presencia de huevos fue de 58, lo que representa el 61,1 %. El número de cerdos que resultaron ser falsos positivos por técnicas coprológicas fue de 18 (18,94 %). El número de falsos negativos fue de 11 (11,57 %).

IV.1.2.- Estudio serológico.

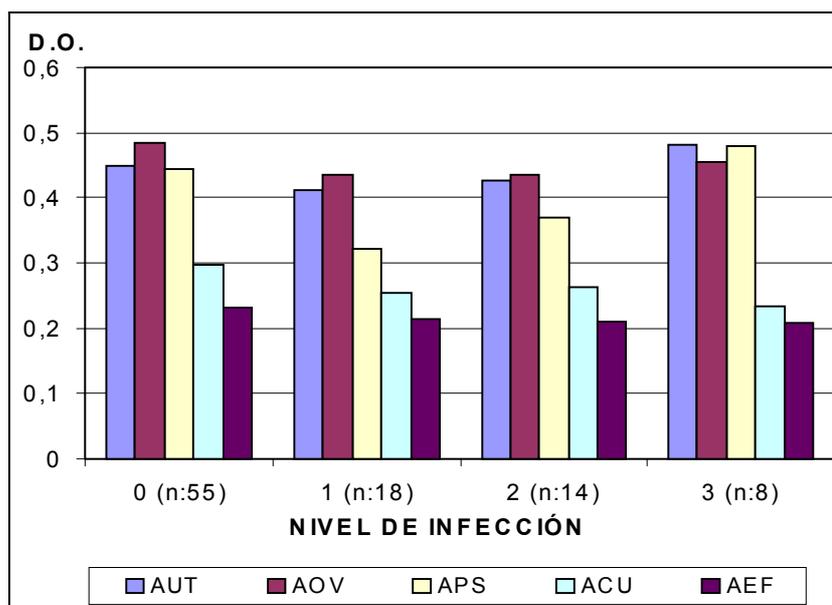
El análisis, mediante la técnica ELISA, de la reactividad de los sueros por de todos los animales de matadero frente a todos los antígenos ensayados (APS, ACU, AEF, AOV y AUT) mostró que los cerdos sin formas adultas de *A. suum* en el intestino (nivel de infección = 0) o aquellos que, por el contrario, presentaban muchos parásitos (nivel de infección = 3) presentaron los más altos valores de densidad óptica para todos los antígenos (Gráfica 1).

No obstante, no se encontró correlación significativa entre el número de adultos o huevos en heces respecto a la densidad óptica alcanzada frente a todos los antígenos (tabla 8). En esta misma tabla, se observa la estrecha y significativa correlación entre las d.o. de todos los antígenos. La más alta correlación fue observada entre UTA y OVA ($r = 0,93$; $p < 0,05$), mientras que la más baja fue entre OVA y OSA ($r = 0,66$; $p < 0,05$) (tabla 8).

Para todos los antígenos, la media de la d.o. de los sueros de animales con adultos del parásito en el intestino delgado fue más baja que la media de la d.o. de los animales sin dichas formas intestinales. Estas diferencias fueron significativas para el ACU ($F = 4,15$; $p = 0,04$) y para el APS ($F = 4,12$; $p = 0,04$). Estos resultados fueron similares al comparar la media de la d.o. de los animales con huevos de *A.*

RESULTADOS

suum en heces, que siempre fue más baja que los que no los presentaban. No obstante, estas diferencias no fueron significativas.



Gráfica 1.- Respuesta inmunitaria media por ELISA frente a 5 antígenos de *A. suum* (leyenda) en los 95 animales de matadero, según el nivel de infección por el número de adultos en el intestino delgado (0: sin adultos; 1: entre 1-2 adultos; 2: entre 3-8 adultos; 3: más de 8 adultos).

Los 95 animales procedieron de 14 granjas diferentes de la región extremeña. El % de ellas con cerdos positivos a *A. suum* por técnicas directas (necropsia y/o coprología) fue del 93,8 %. Generalmente, la mayor reactividad se encontró en las granjas donde los animales no tenían o tenían muy pocos adultos y/o huevos del parásito. No obstante, es importante mencionar que, mediante la técnica indirecta de ELISA, el 100 % de las granjas presentaron anticuerpos anti-*Ascaris* en sus animales.

RESULTADOS

	APS	ACU	AEF	AOV	AUT	HUEVOS
ACU	0.7517*					
AEF	0.7572*	0.7063*				
AOV	0.8037*	0.8447*	0.6685*			
AUT	0.8197*	0.8310*	0.7134*	0.9299*		
HUEVOS	-0.0367	-0.1054	-0.0506	-0.0607	-0.0121	
ADULTOS	0.1250	-0.1495	-0.0300	-0.0054	0.0781	0.4605*

Tabla 8.- Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de densidad óptica de los 5 antígenos utilizados, el número de huevos del parásito en heces y número de adultos en intestino delgado. *p<0.05.

La determinación de las posibles reacciones cruzadas entre la presencia de adultos de *Ascaris suum* y otros parásitos naturalmente adquiridos, no reveló diferencias significativas con ninguno de los Ag frente a ninguno de los grupos parasitarios estudiados (protozoos, cestodos, otros nematodos y acantocéfalos), exceptuando una débil relación significativa entre *Trichuris suis* con APS y ACU ($r=0.26$), si bien este dato debe ponerse en duda al darse de forma paralela una asociación marcada ($r=0.44$) entre la presencia de este nematodo y *A. suum*.

Mediante la técnica de Wester blotting, el análisis de los sueros de los cerdos ibéricos en condiciones naturales (con/sin infestación patente y con/sin huevos del parásito en heces), confirmó lo observado por la técnica ELISA, indicando que la reactividad de los sueros con infección patente fue generalmente más baja que la de aquellos animales sin la presencia de adultos. En la Fig. 1 queda representada una

RESULTADOS

composición de diferentes Western blotting, pertenecientes a algunos de los sueros más representativos de cada una de las condiciones posibles de infección (animales con/sin adultos y con/sin huevos del parásito) junto al control positivo (pool de sueros hiperinmunes de *A. suum*) frente a los 5 antígenos.

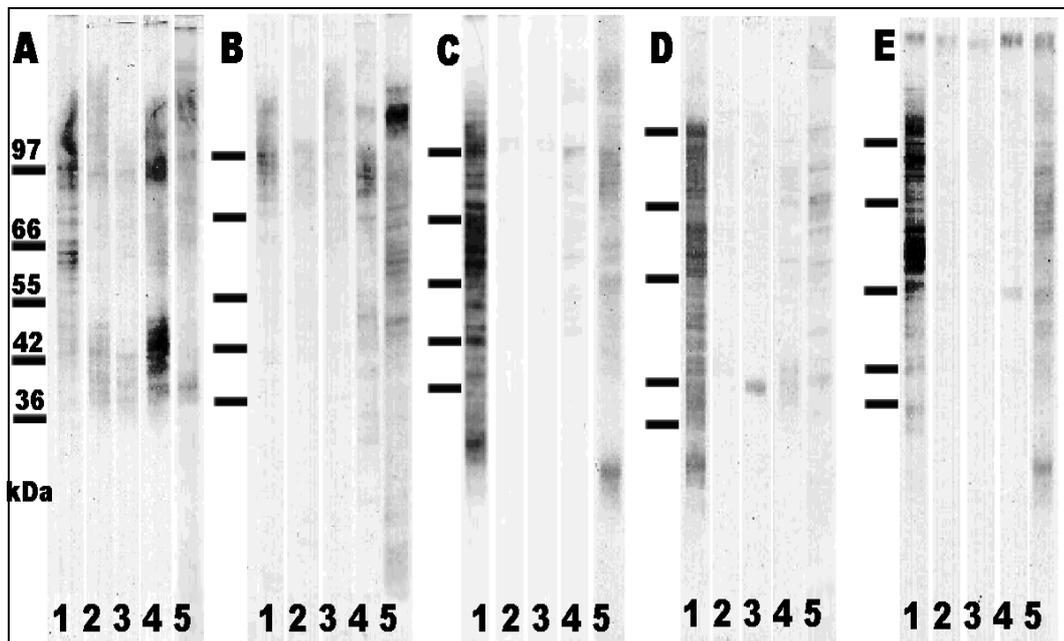


Fig. 1. Western blotting de algunos sueros seleccionados (**línea 1:** suero hiperinmune; **línea 2:** cerdo de matadero con adultos y con huevos; **línea 3:** cerdo con adultos y sin huevos; **línea 4:** cerdo sin adultos y con huevos; **línea 5:** cerdo sin adultos y sin huevos) frente a diferentes antígenos de *A. suum* (**A:** ACU; **B:** AEF; **C:** AOV; **D:** APS; **E:** AUT).

En general, tres grupos de bandas con un peso molecular de 97, 54-58 y 42-44 kDa fueron las más reconocidas por una gran parte de los sueros de matadero. El número de cerdos que reconocieron estas fracciones y el porcentaje medio de

RESULTADOS

reconocimiento para cada antígeno, respecto a los controles negativo y positivo del mismo Western blotting está representado en la tabla 9.

BANDAS PROTEICAS						
Antígenos	97 kDa		54-58 kDa		42-44 kDa	
	Cerdos	% reconocimien.	Cerdos	% reconocimien.	Cerdos	% reconocimien.
ACU	83	23,6±29,5	72	25,5±20,5	85	108,7±110,4
AOV	95	11,1±8,9	95	7,5±6,6	87	4,3±2,6
AUT	95	17,1±19,9	95	10,6±15,9	95	13,9±13,3
AEF	82	8,3±8,4	77	13,9±15,9	56	9,8±12,9
APS	76	34,3±5,4	86	51,9±59,7	78	33,9±26,9

Tabla 9.- Número de cerdos que reconocieron cada fracción proteica (97 kDa, 54-58 kDa y 42-44 kDa) frente a los 5 antígenos utilizados y la media ± desviación estándar del porcentaje de ese reconocimiento, respecto a los controles positivo y negativo del mismo Wester blotting.

La correlación entre el porcentaje de reconocimiento de cada banda y el número de adultos en intestino fue siempre negativa para todos los antígenos. Sin embargo, este hecho fue solo estadísticamente significativo con el APS ($r = -0,42$; $p < 0,05$) y el OVA ($r = -0,40$; $p < 0,05$). Lo mismo ocurrió analizando la correlación entre el reconocimiento de estas tres bandas y el número de huevos en heces, la cual presentó siempre valores negativos aunque en ningún caso se alcanzó la significación.

Debido a ese mayor reconocimiento y a la mayor intensidad del mismo, las fracciones de 97 kDa y la de 42-44 kDa serían elegidas como candidatas para el

RESULTADOS

desarrollo de los ensayos inmunoprotectores del 2º experimento de este trabajo. A pesar de que ninguna fracción inferior a los 20 kDa fue reconocida por ningún suero y ninguno de los antígenos, la banda proteica de 14 kDa fue seleccionada igualmente como candidata de vacunación al ser una molécula ampliamente estudiada por diversos autores como el más importante alérgeno del parásito, habiéndose ensayado anteriormente la inmunización de la misma en animales de laboratorio pero nunca en su hospedador natural, el cerdo.

IV.2.- ESTUDIOS PREVIOS A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL (EXPERIMENTO 1) .

Como fue comentado en el capítulo de material y métodos, en su apartado III.2, el experimento 1 fue establecido con la finalidad de valorar qué forma de administración del inóculo infectante, si monodosis o multidosis, qué patrón temporal migratorio sigue *A. suum* en el cerdo ibérico, así como qué tamaño de inóculo provoca una respuesta orgánica mayor, lo que nos orientaría en la infección e posterior inmunización de los cerdos del experimento 2.

De igual forma, en el apartado IV.1 de resultados, tras el análisis exhaustivo de la respuesta inmunitaria de los cerdos de matadero y los cerdos de este primer experimento, mediante la técnica de Western blotting, pudimos seleccionar las fracciones proteicas candidatas a los ensayos de inmunización.

El resultado del número de manchas totales encontradas en los hígados de cada cerdo, así como el número de larvas pulmonares, se encuentran recogidas en la tabla 10. Estos resultados muestran que el mayor número de manchas de leche se observó a la 3ª s.p.i, con una disminución progresiva de las mismas al cabo del

RESULTADOS

tiempo. Las larvas pulmonares, por su parte, fueron observadas en mayor medida al día 7 p.i., no encontrándose a partir de la 2ª s.p.i.

CERDO (crotal)	DOSIS (n° huevos)	SACRIFICIO (d.p.i.)	MANCHAS HEPÁTICAS	LARVAS PULMÓN	ADULTOS INTESTINALES
852	10.000	7	17	2656	0
S.C	50.000	7	286	4502	0
516	10.000	20	464	0	0
518	50.000	20	668	0	0
515	10.000	42	51	0	0
519	50.000	42	389	0	0
505	1.000	69	-	-	0
508	10.000	69	-	-	0
513	100	69	-	-	0
513b	Multidosis	115	0	0	0
514	Multidosis	115	0	0	0
517	Multidosis	115	0	0	0
520	Multidosis	115	0	0	0

Tabla 10.- Resultados parasitológicos (número de manchas hepáticas, larvas pulmonares y adultos intestinales) de los animales del experimento 1.

En cuanto al desarrollo de adultos en intestino, es de mencionar que ni tras infecciones con monodosis ni con multidosis logramos recuperar *A. suum* en esta localización. No obstante, y con el fin de simular al máximo las condiciones

RESULTADOS

presentes en la naturaleza, decidimos practicar en el experimento posterior la forma multidosis.

Así pues, con todos estos datos, el modo de infección que pudiera desembocar en la respuesta protectora de mayor probabilidad de éxito resultó ser la forma en multidosis, con aumento progresiva de la misma semanalmente. Por otro lado, y según lo analizado en este experimento previo a la definitiva infección experimental, se decidiría sacrificar los animales al 7º d.p.i., con objeto de medir en los ensayos de inmunización el nivel de protección con un mayor grado de seguridad y fiabilidad a tenor del número de larvas recuperadas en pulmón.

IV.3.- EMBRIONAMIENTO E INFECTIVIDAD DE HUEVOS.

El resultado obtenido tras los diferentes modelos de embrionamiento utilizados fue evaluado cualitativamente, de forma que la viabilidad de los mismos fue establecida en base a la información visual al microscopio, desde el día 0 de cultivo, hasta la formación de la larva de segundo o tercer estadio en su interior.

Se pudo comprobar que los cultivos mantenidos en oscuridad, en general presentaban un mayor porcentaje de huevos inviables que los mantenidos con luz natural, si bien este hecho no fue cuantificado ya que, como hemos mencionado, solo valoramos cualitativamente nuestros resultados.

Por otro lado, probamos diferentes medios de cultivo, tales como ácido sulfúrico diluido, suero fisiológico adicionado con antibióticos y antifúngicos, NaOH 0,1N, etc, determinando que el medio más apropiado en cuanto a viabilidad de los huevos y no contaminación de agentes bacterianos y/o fúngicos resultó ser el NaOH.

La temperatura también influyó en gran medida en las condiciones de

RESULTADOS

viabilidad y desarrollo de los huevos cultivados. Así, se ensayaron las posibilidades del mantenimiento a temperatura ambiente (en torno a los 25 °C en invierno o incluso los 28-33 °C en agosto), e igualmente, temperaturas controladas en estufas (37 °C) o al baño María (37 °C).

Se comprueba que, a mayor temperatura los huevos embrionaron a mayor velocidad, pudiendo desarrollar incluso la L₂ en el interior del huevo a los 30 días de cultivo, cuando los huevos eran mantenidos a 37 °C.

Sin embargo, y con el fin de simular las condiciones naturales, decidimos cultivar los huevos a temperatura ambiente, de manera que la formación de las larvas infectantes en su interior comenzaban a evidenciarse ya desde los 35-40 días de iniciado el cultivo.

En la Fig. 2 se muestran diversas fases evolutivas del huevo en formación. En el día 0 solo se observa una masa indefinida en su interior, que pronto comienza a dividirse en numerosos blastómeros, hasta llegar a la fase de “judía” en la primera semana de cultivo, que es un esbozo embrionario de lo que será la futura larva infectante.

Al cabo de 2 semanas ya comienza a definirse perfectamente la morfología larvaria, que completará su desarrollo final hasta el día 35-45 en el que se halla la L₂ en el interior. Para nuestros estudios de infección, los huevos fueron cultivados a temperatura ambiente (25 °C) hasta los 3 meses ya que, es el tiempo en el que las larvas alcanzan su mayor infectividad dentro del huevo.

RESULTADOS



Día 0. Huevo en fase de mórula.



Día 1. Huevo con 2 blastómeros.



Día 4. Huevo en fase plena de división.



Día 7. Huevo en fase de “judía” o esbozo embrionario.



Día 16. Huevo con larva formada en su interior.

Fig. 2.- Detalle de huevos de *Ascaris suum* en distintas fases evolutivas.

RESULTADOS

Por último, con el fin de comprobar la perfecta infectividad de los huevos a usar en el experimento principal de esta memoria (2º experimento), procedimos a infectar un cerdo y dos ratones con este mismo cultivo. La dosis suministrada al cerdo fue de 10.000 huevos y el número de larvas recuperadas en pulmón fue de 2656, lo que supuso un 26,56 % de la dosis inicial.

En el caso de los ratones, tras ser infectados con 500 y 1000 huevos, se obtuvo un porcentaje de recuperación larvaria del 19,4y el 25,6 %, respectivamente. Una vez comprobada la alta viabilidad del cultivo a utilizar, se procedió a iniciar el 2º experimento, como fue expuesto en el apartado III.2.

IV.4.- RESULTADOS DE LA REINFECCIÓN E INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL (EXPERIMENTO 2).

IV.4.1.- Recuento del número de manchas de leche, larvas pulmonares y adultos intestinales.

Dicha actividad se realiza para conocer el grado de resistencia a la migración larvaria de *Ascaris suum* tras un reto aplicado a todos los animales, y que estará ocasionada por cada uno de los estímulos antigénicos ensayados a lo largo de este experimento.

Tal resistencia va a venir determinada por la reducción de las manchas de leche, y por el número de larvas en pulmón a los 7 d.p.i., respecto de los animales control (lote 2).

El número total de manchas de leche, así como el número de larvas pulmonares, así como la media obtenida de cada lote junto a su desviación estándar están representadas en las tablas 11A (animales viejos) y 11B (animales jóvenes).

RESULTADOS

LOTE	CERDO	MANCHAS POR CERDOS	MANCHAS POR LOTES	LARVAS PULMONARES POR CERDO	LARVAS PULMONARES POR LOTES
1	122	6	5,4 ± 1,82	0	0,0 ± 0,0
	123	5		0	
	124	3		0	
	128	8		0	
	158	5		0	
2	126	273	153,2 ± 80,47	167	66,4 ± 64,04
	149	145		20	
	154	63		29	
	157	103		22	
	160	182		94	
3	127	48	27,4 ± 14,12	1	1,6 ± 0,89
	133	23		1	
	135	21		2	
	136	34		1	
	137	11		3	
4	129	42	29,0 ± 20,26	0	0,6 ± 0,89
	131	7		1	
	132	48		0	
	138	7		0	
	139	41		2	
5	141	82	67,6 ± 13,92	0	4,8 ± 4,09
	145	61		3	
	147	47		3	
	150	77		10	
	156	71		8	
6	121	82	119,4 ± 58,04	6	21,8 ± 14,2
	134	91		19	
	143	190		37	
	148	173		36	
	159	61		11	
7	140	90	172,4 ± 58,68	55	66,2 ± 18,66
	142	194		84	
	146	240		58	
	151	138		46	
	152	200		88	

Tabla 11A.- Resultados individuales y por lotes del número de manchas de leche y larvas pulmonares en los animales de 4 meses de edad.

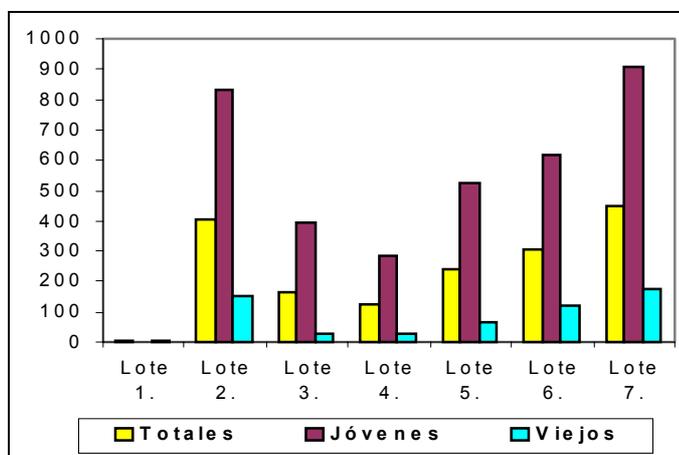
RESULTADOS

LOTE	CERDO	MANCHAS POR CERDO	MANCHAS POR LOTE	LARVAS EN PULMÓN POR CERDO	LARVAS EN PULMÓN POR LOTES
1	161	0	0,0 ± 0,0	0	0,00 ± 0,00
	171	0		0	
	181	0		0	
2	162	843	829,67 ± 119,56	3430	3180,33 ± 243,73
	172	704		2943	
	182	942		3168	
3	163	551	393,67 ± 148,48	28	33,33 ± 20,53
	173	374		56	
	183	256		16	
4	164	289	286,33 ± 81,03	46	35,0 ± 12,12
	174	204		37	
	184	366		22	
5	165	553	524,0 ± 105,53	369	376,67 ± 46,97
	175	407		427	
	185	612		334	
6	166	598	617,33 ± 95,48	694	727,67 ± 125,92
	176	533		622	
	186	721		867	
7	167	902	906,33 ± 118,56	1366	1607,67 ± 222,15
	177	790		1803	
	187	1027		1654	

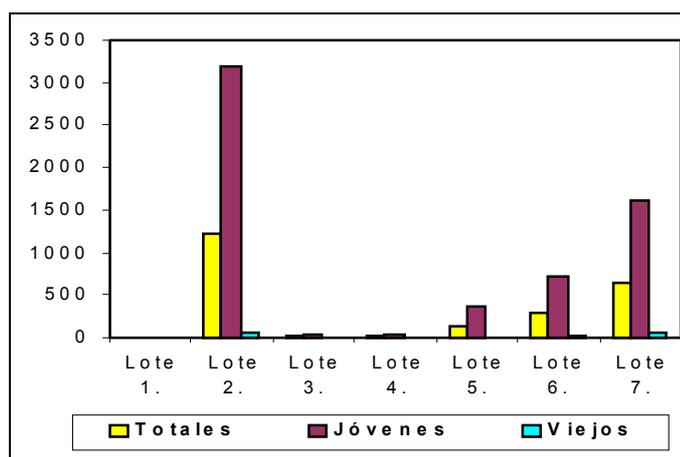
Tabla 11B.- Resultados individuales y por lotes del número de manchas de leche y larvas pulmonares en los animales de 2 meses de edad.

Estos mismos resultados quedan expuestos gráficamente en las gráficas 2A (número medio de manchas de leche por lotes) y 2B (número medio de larvas pulmonares por lotes).

RESULTADOS



Gráfica 2A.- Número medio del número de manchas de leche en animales jóvenes, viejos y total, según cada lote experimental.

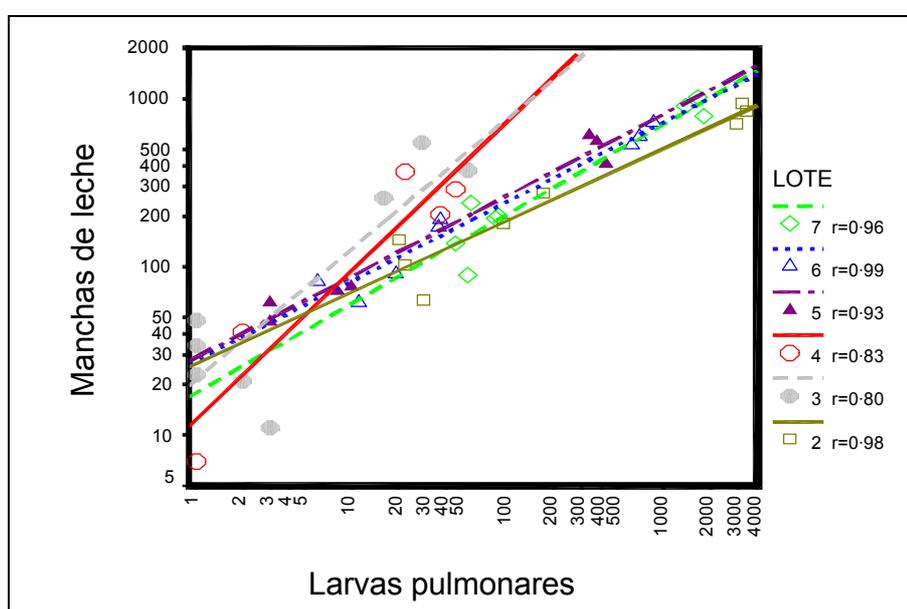


Gráfica 2B.- Larvas pulmonares en animales jóvenes, viejos y totales, según lotes experimentales.

Estas figuras muestran que la carga larvaria pulmonar estuvo fuertemente correlacionada ($r= 0,8$; $p<0,01$) con la cantidad de manchas de leche en hígado, pero solo las de tipo reticular (ver resultados IV.4.4) tuvieron una influencia significativa

RESULTADOS

($r=0,99$). Esta relación fue muy similar en todos los grupos, aunque ligeramente más baja para los grupos infectados 3 y 4. En estrecha dependencia con el carácter edad, el ratio entre el número de larvas en pulmón respecto al número de manchas de leche en hígado varió entre el 387 % en los animales más jóvenes del lote 2, al 3,83 % en los animales más viejos del grupo 4 (Gráfica 3).



Gráfica 3.- Ratio entre nº de manchas de leche en hígado y larvas pulmonares en los diferentes lotes.

Igualmente, se observa una correlación negativa, claramente significativa, entre la edad y el número de manchas de leche ($r = -0,73$) y, en menor medida, con el de larvas pulmonares ($r = -0,51$). Así, pudimos comprobar como el número de larvas recuperadas del pulmón de los animales jóvenes ($\$ = 851$) fue enormemente superior a las encontradas en los animales viejos, los cuales sólo presentaron un 2,64

RESULTADOS

% de los jóvenes.

Sin embargo, el nivel de reducción de manchas de leche y migración larvaria con respecto a los cerdos del lote 2 entre animales de la misma edad dentro de lotes, fue sorprendentemente similar (Tabla 12).

Lote	Reducción manchas de leche		Reducción larvas pulmonares	
	viejos	jóvenes	viejos	jóvenes
1	96.5±1.5	100±0.5	100±0.5	100±0.5
2	Control	Control	Control	Control
3	82.5±9.5	52.5±17.5	97.5±1.5	99.5±0.5
4	81.5±13.5	65.5±9.5	99.5±1.5	98.5±0.5
5	55.5±9.5	36.5±12.5	92.5±6.5	88.5±1.5
6	22.5±37.5	25.5±11.5	67.5±21.5	77.5±4.5
7	-12.5±38.5	-9.5±14.5	0.5±28.5	49.5±7.5

Tabla 12.- Porcentaje de reducción (%) en el número total de manchas de leche en el hígado y larvas pulmonares de cerdos infectados e inmunizados en relación al lote control 2.

Como se observa en la tabla 12, los grupos 3 y 4 obtuvieron aproximadamente un 98 % de protección en la localización pulmonar. Los grupos inmunizados presentaron distintos niveles de resistencia. El grupo 7 mostró solo una moderada reducción de larvas en los animales jóvenes, mientras que los viejos incluso presentaron mayor número de larvas que el grupo control del reto (lote 2). Los resultados del lote 5 fueron muy similares a los grupos expuestos a infección

RESULTADOS

semanalmente, mientras que el lote 6 tuvo una protección intermedia entre los otros lotes inmunizados.

En cuanto a los resultados parasitológicos a lo largo del proceso experimental, ninguno de los cerdos eliminó huevos de *A. suum* a través de las heces. Sin embargo, un total de 5 vermes hembras, de un tamaño entre 18 y 34 cm, fueron encontradas en 3 cerdos del grupo 1 en la necropsia. Así pues, este lote tuvo significativamente un mayor número de adultos que el resto de grupos experimentales, en los cuales solamente se encontró una hembra en un cerdo del lote 5.

En lo que respecta a otras parasitaciones, todos los animales de mayor edad presentaron un bajo nivel de huevos de *Strongylida* (79 % de muestras positivas). Del mismo modo, todos estos animales, excepto uno de ellos, eliminaron huevos de *Trichuris suis* (37 % de muestras positivas), normalmente con una concentración menor de 100 huevos/gr de heces. En la necropsia, sólo un bajo número de adultos de *Oesophagostomum* sp. y de *T. suis* pudieron ser detectados.

Ninguno de los animales jóvenes, en cambio, presentó huevos de *A. suum* ni de otros helmintos a lo largo del experimento. Lo mismo ocurrió en cuanto a la presencia de adultos intestinales, los cuales estuvieron ausentes en todos los lotes experimentales del grupo de menor edad.

La recuperación larvaria por medio de la digestión péptica fue mucho más eficiente que la obtenida por el método de Baermann, probablemente debido a que los trozos cortados de tejido pulmonar eran excesivamente grandes en este último método lo que dificultaba la migración de las larvas desde las zonas internas del tejido hacia la solución tampón.

La comparación esquematizada, en cuanto a la recuperación larvaria

RESULTADOS

conseguida por los dos métodos utilizados, se encuentra expresada en la tabla 13.

Lotes	Métodos de recuperación larvaria pulmonar			Larvas totales
	Baermann		Digestión	
	12 horas	24 horas	péptica	
1	0	0	0	0
2	287	202	2691	3180
3	3	5	25	33
4	4	4	27	35
5	80	27	269	376
6	117	40	570	727
7	237	98	1272	1607

Tabla 13.- Número medio de larvas recuperadas en los pulmones de los cerdos de 2 meses de edad, según los dos métodos utilizados por lotes.

IV.4.2.- Estudio hematológico.

En este apartado se incluyen los resultados hematológicos obtenidos en los animales del segundo experimento, es decir, tras la infección y/o inmunización de los diferentes lotes. Durante el tiempo en que se desarrolló el experimento, las pruebas analíticas hematológicas se realizaron semanalmente en todos los animales. Ello permitió establecer un seguimiento riguroso de la evolución de los parámetros sanguíneos, acontecidos en el protocolo experimental de este trabajo. A tal efecto, se evaluaron los siguientes parámetros sanguíneos:

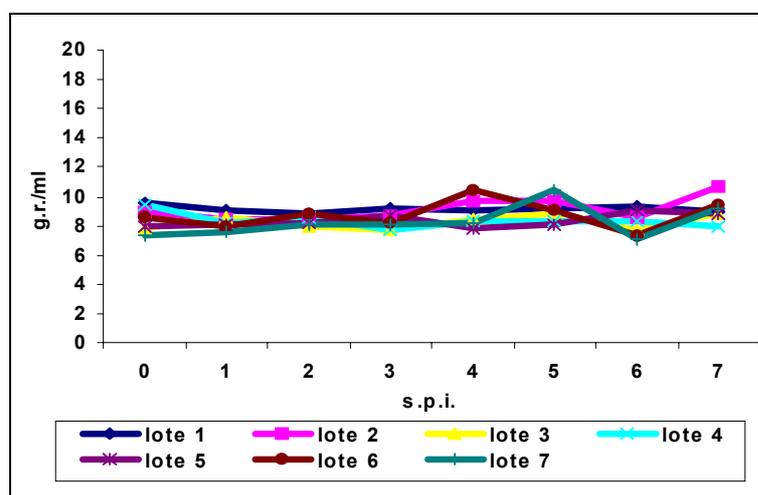
RESULTADOS

IV.4.2.1.- Glóbulos rojos.

La evolución del recuento de glóbulos rojos en los diferentes lotes experimentales se recogen en la gráfica 4.

La media de los valores el día 0 del experimento osciló entre $10,03 \pm 0,6 \times 10^6$ glóbulos rojos/ml de sangre en el lote 2 y $7,87 \pm 1,05 \times 10^6$ glóbulos rojos/ml en el lote 7. El análisis estadístico, mediante el test de Newman-Keuls, no reveló diferencias significativas entre grupos al comienzo del experimento.

Durante el desarrollo experimental, los valores se mantuvieron constantes y sin variaciones resaltables en ninguno de los lotes. Solamente, se observaron algunas diferencias significativas puntuales inter-grupos al día 7 p.i. entre el lote 1 y los lotes 3, 5, 6 y 7. No obstante, y como se observa en la gráfica 4, al final del experimento hubo un aumento en el número de glóbulos rojos en algunos lotes, que marcó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los lotes 2 y 4, el día del sacrificio y entre el lote 5 y los lotes 3, 6 y 7, el día del reto.



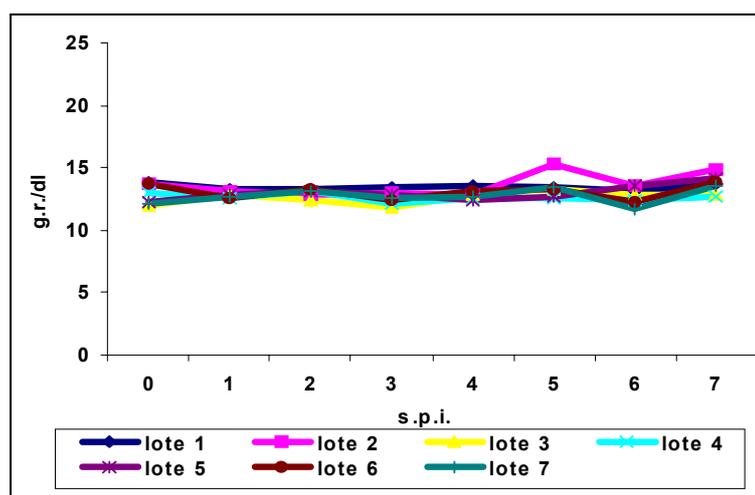
Gráfica 4.- Evolución media del nivel de glóbulos rojos en los lotes experimentales.

RESULTADOS

IV.4.2.2.- Hemoglobina.

La evolución de la cantidad de hemoglobina (en gr./dl) en todos los lotes se reflejan, en valores medios, en la gráfica 5.

Al igual que el resto de parámetros hemáticos analizados (excepto el número de monocitos) al día 0 no se encontraron diferencias significativas entre los 7 lotes del estudio. Los valores iniciales oscilaron entre $13,98 \pm 0,54$, en los animales del lote 1 y $12,56 \pm 1,24$, en los pertenecientes al lote 3. A lo largo del desarrollo experimental, los valores alcanzados en todos los lotes fueron muy similares, no detectándose diferencias significativas a este respecto.



Gráfica 5.- Evolución media de la cantidad de hemoglobina en los lotes experimentales.

En cuanto a la evolución temporal de la hemoglobina, no se observó una tendencia clara de incremento o disminución en ninguno de los lotes. Únicamente, es de resaltar la subida generalizada que experimentaron todos ellos a partir del reto,

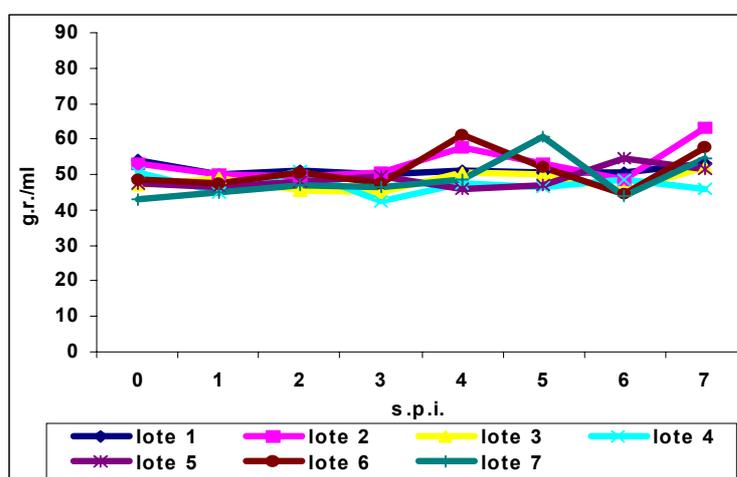
RESULTADOS

evidenciándose unos valores de hemoglobina al día del sacrificio más altos que las semanas precedentes. Este hecho fue estadísticamente significativo en los lotes 5 y 6 ($p < 0,05$).

IV.4.2.3.- Hematocrito.

La evolución de este parámetro se representa en la gráfica 6.

En todos los grupos, los valores previos al comienzo del estudio se situaron entre $57,78 \pm 5,35$ %, como valor medio del lote 1 y $45,21 \pm 4,44$ % del lote 7. En esta fecha, no existieron diferencias significativas entre lotes.



Gráfica 6.- Evolución del % de hematocrito en los distintos lotes del experimento.

A lo largo del experimento, la evolución fue similar entre los distintos grupos, con alguna diferencia significativa entre lotes, sólo en los días del reto y del sacrificio. Estas diferencias se encuentran, sobre todo, entre el lote 5, el día del reto y el lote 2, el día del sacrificio, cuando se observaron unos niveles más elevados

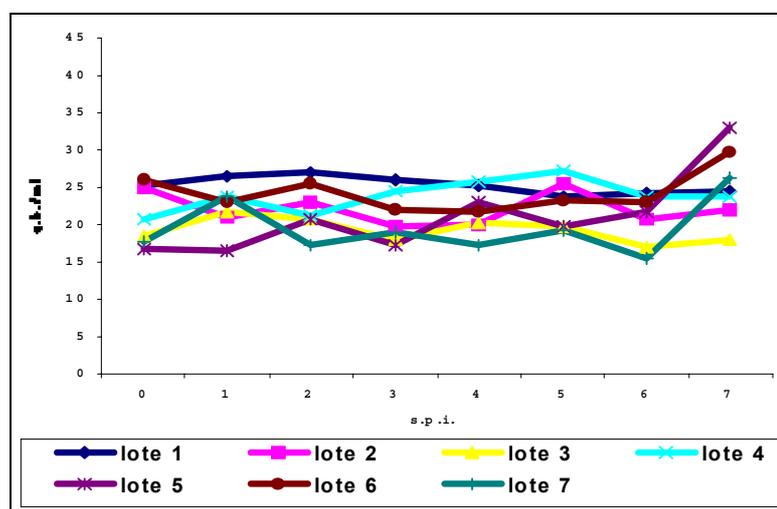
RESULTADOS

respecto al resto de grupos.

Tal y como señalábamos anteriormente, el nivel de hematocrito se mantuvo estable a lo largo del tiempo, excepto al final del experimento, cuando se produjo una subida generalizada en la mayoría de los grupos. Esta subida fue significativa ($p < 0,05$) en los lotes 2, 5, 6 y 7.

IV.4.2.4.- Glóbulos blancos.

La evolución de los leucocitos se muestra en la gráfica 7.



Gráfica 7.- Evolución del nivel de leucocitos en los distintos lotes experimentales.

En todos los grupos, los valores previos al comienzo de la infección y/o inmunización se situaron entre $26,0 \pm 2,2 \times 10^3$ glóbulos blancos/ml de sangre, en el lote 2 y $18,7 \pm 4,12 \times 10^3$ glóbulos blancos/ml, en el lote 7. Al comienzo del experimento, no se observó ninguna diferencia significativa entre los 7 grupos del

RESULTADOS

estudio. La evolución en el número de glóbulos blancos demostró un muy ligero aumento a lo largo del estudio, destacando de forma más acusada, la subida detectada entre el reto y el sacrificio, al igual que ocurría en el número de glóbulos rojos. Este aumento del nivel de leucocitos a partir del reto fue significativo en los lotes 5 y 7.

IV.4.2.5.- Recuento diferencial de leucocitos.

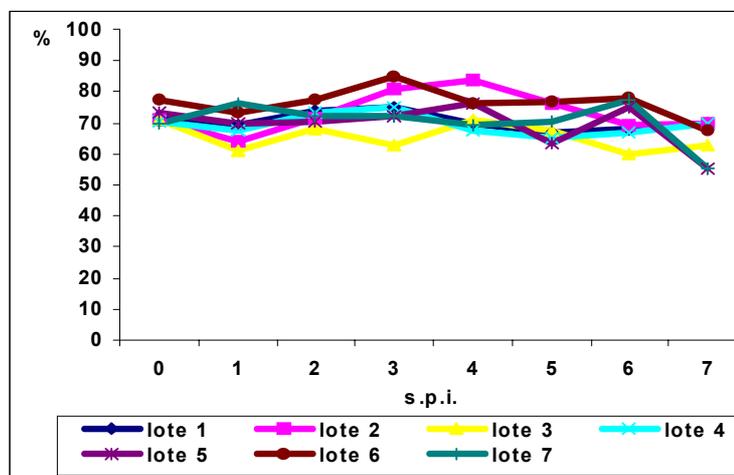
IV.4.2.5.1.- *Linfocitos.*

La evolución temporal en el porcentaje de linfocitos queda representada en la gráfica 8. Los valores señalados, representan el porcentaje de linfocitos sanguíneos en el total de leucocitos hemáticos.

Los valores iniciales, en el día 0 del estudio oscilaron entre $75,66 \pm 6,18$ %, como media para el lote 6 y $68,00 \pm 6,44$ % en el lote 2. Estas diferencias no fueron significativas entre ninguno de los grupos experimentales. La misma tónica de homogeneidad entre lotes se observó durante todo el proceso, excepto en la 3 s.p.i., en la cual el lote 6 presentó unos niveles de linfocitos distintos al resto; diferencia que alcanzó significación en relación al lote 3.

En cuanto al comportamiento temporal, se observó prácticamente en todos los lotes, una ligera linfocitosis desde el comienzo del experimento, hasta la 3 s.p.i., para ir disminuyendo con posterioridad hasta el momento del sacrificio. Al final del estudio, los valores generalmente fueron menores que el día 0, excepto en el lote control 2. No obstante, en ningún lote hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje de linfocitos entre las diferentes semanas post-infección, o post-inmunización.

RESULTADOS



Gráfica 8.- Evolución media del % de linfocitos sanguíneos en los diferentes lotes experimentales.

IV.4.2.5.2.- Neutrófilos

La evolución del porcentaje de neutrófilos se muestra, en valores medios, en la gráfica 9. Es de destacar la fuerte correlación negativa entre los niveles de neutrófilos y los linfocitos, la cual alcanzó significación estadística ($r = -8834$; $p < 0,001$).

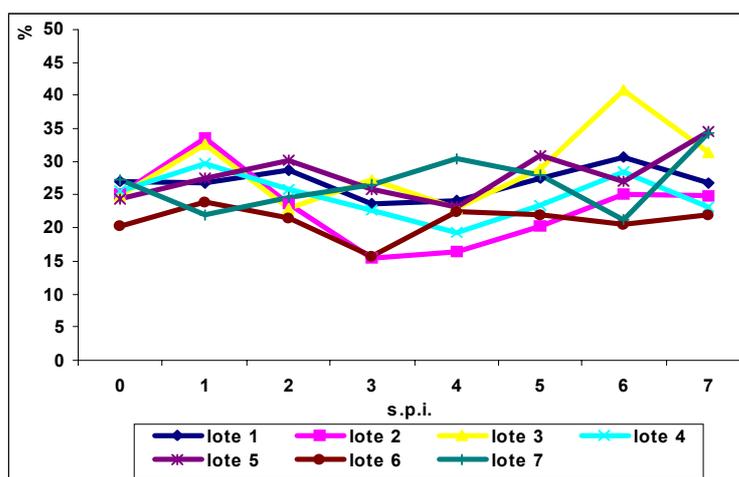
Al comienzo del experimento, los porcentajes medios oscilaron entre el $27,33 \pm 4,45$ % en el lote 4 y el $22,33 \pm 5,50$ % en el lote 6. No hubo diferencias significativas entre lotes el día 0 del experimento.

Debido a la correlación negativa antes mencionada, la evolución del porcentaje de neutrófilos respecto al tiempo y en cada uno de los lotes, fue contraria a la observada para los linfocitos. Así, hubo un descenso generalizado, es decir, una neutropenia, desde el día 0 del estudio hasta la 3 s.p.i. aproximadamente, para continuar con un paulatino ascenso hasta el día del reto.

Entre éste y el sacrificio, el comportamiento fue en general de un claro

RESULTADOS

descenso, excepto en el lote 5.



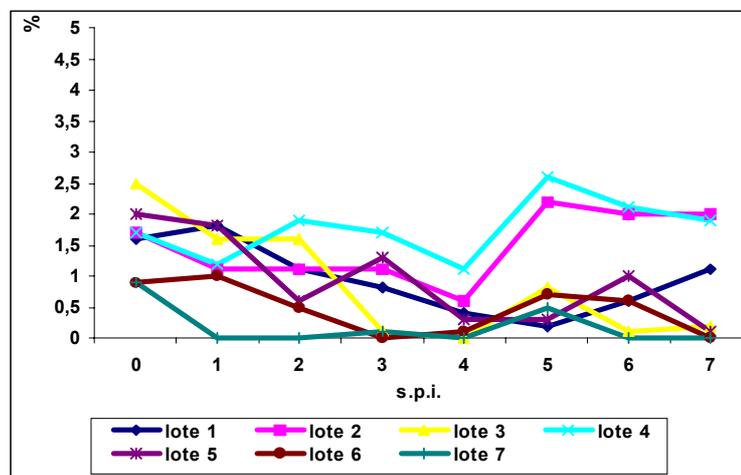
Gráfica 9.- Evolución del % de neutrófilos en el total de leucocitos sanguíneos en los diferentes grupos experimentales.

IV.4.2.5.3.- Monocitos.

La evolución del porcentaje de monocitos está representada en la gráfica 10.

Al comienzo del experimento, se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, especialmente establecidas por los mayores niveles que presentaba el lote 2 respecto al resto. Sin embargo, es importante mencionar que las grandes fluctuaciones observadas en la gráfica 10, fueron debidas a la escala de dicha gráfica, donde los valores más altos nunca sobrepasaron el 5 %, con lo que, pequeñas oscilaciones indujeron a variaciones aparentemente mayores. Los mayores valores siempre fueron alcanzados por el lote 4, que marcó diferencias significativas con el resto de grupos a lo largo de la prueba.

RESULTADOS



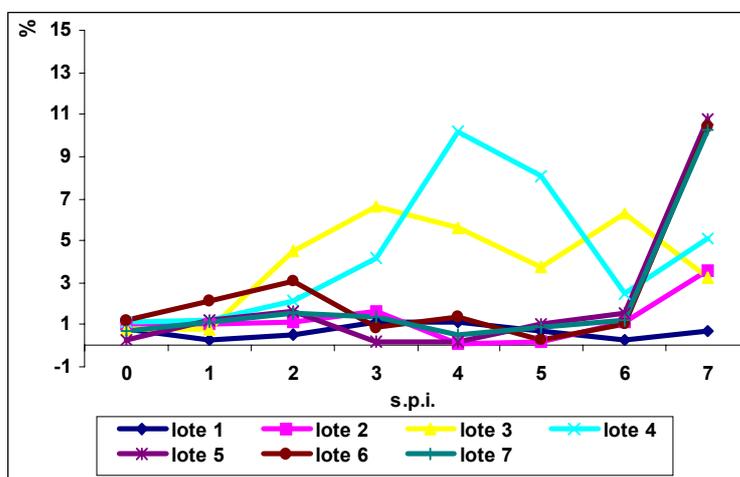
Gráfica 10.- Evolución media del % de monocitos en los lotes experimentales.

La tendencia general en el tiempo fue variable según el lote estudiado. Así, el lote 4 presentó oscilaciones ascendentes y descendentes a lo largo del estudio, si bien parece que al final del experimento los niveles fueron más elevados que al comienzo. El resto de lotes tuvo un comportamiento de ligero descenso desde el comienzo hasta la mitad del experimento, para ir subiendo ligeramente hasta el final del estudio. Estas diferencias no fueron significativas, salvo en casos puntuales.

IV.4.2.5.4.- Eosinófilos.

Los valores medios alcanzados por los eosinófilos de los animales experimentales se representan en la gráfica 11.

RESULTADOS



Gráfica 11.- Evolución del % de eosinófilos en todos los lotes del experimento.

El día 0 del experimento, los valores medios estuvieron siempre dentro de la normalidad, oscilando entre el $1,16 \pm 0,98$ %, en el lote 4 y $0,16 \pm 0,41$, en el lote 3. A partir de este día, sufren un incremento significativo ($p < 0,05$) en los lotes 3 y 4 respecto al resto de grupos experimentales, hasta alcanzar los niveles máximos a la 3ª s.p.i. (lote 3) y la 4ª s.p.i. (lote 4). Tanto el lote 2 como los inmunizados se mantuvieron en niveles relativamente constantes hasta el día del reto, a partir del cual, experimentan un fuerte y significativo aumento.

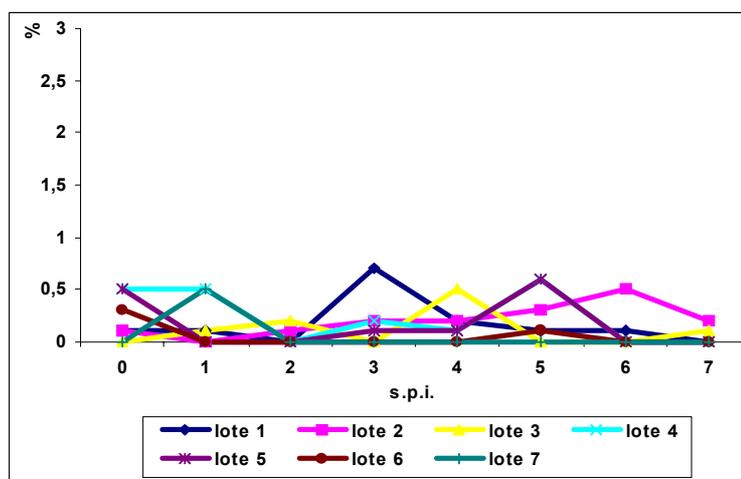
IV.4.2.5.5.- Basófilos.

La evolución del porcentaje medio de basófilos a lo largo del experimento se recoge en la gráfica 12.

Al igual que ocurre con los monocitos, los valores normales de este parámetro

RESULTADOS

no superan, en ningún caso el 1 %, con lo que las pequeñas variaciones no pueden ser consideradas significativas. Por lo tanto, y como se observa en la gráfica 12, existen unos niveles constantes y sin grandes variaciones a lo largo del tiempo, siempre oscilando entre el 0 y el 1% del total de leucocitos.



Gráfica 12.- Evolución del % de basófilos del total de leucocitos sanguíneos en los lotes experimentales.

IV.4.3.- Respuesta inmunitaria humoral mediante la técnica ELISA.

IV.4.3.1.- Sobre la estandarización de la técnica.

La alta sensibilidad de esta técnica inmunoenzimática, así como los muy diferentes pasos que su realización conlleva, posibilitan serias dificultades a la hora de su optimización. Es posible, por tanto, que distintas combinaciones se erijan como aceptables en su desarrollo, y la elección de una de ella conlleve altos niveles de sutileza.

Para dicha elección, se realizaron una serie de ensayos encaminados a

RESULTADOS

determinar los parámetros que mayor influencia tienen en la fiabilidad de la técnica, los cuales fueron descritos en el apartado III.9.1.1.

Con respecto a la concentración antigénica, se observó que las concentraciones cercanas o superiores a 5 µg/ml, producían la mejor diferenciación entre los controles positivos y negativos.

Las concentraciones óptimas de cada antígeno se detallan en la tabla 14. En la misma, se pueden observar las diluciones de suero, del 2º anticuerpo, para el caso de la detección de en IgM, así como las de conjugado, para las dos inmunoglobulinas. También están expresados los tiempos óptimos de incubación, utilizados en cada paso de la técnica.

Puede observarse que, en el caso del ELISA de triples anticuerpos (para la IgM) se han usado diluciones séricas (anticuerpo primario) y de conjugado relativamente altas, con tiempos de incubación cortos, mientras que el 2º anticuerpo sólo dio resultados aceptables a diluciones bajas, cercanas a las recomendadas por los laboratorios comerciales, y con tiempos de incubación de 1 hora.

Estas condiciones se seleccionaron debido a un alto color de fondo producido por la reacción cruzada entre el conjugado y la IgG porcina del suero, apreciable en ausencia del segundo anticuerpo, de modo que se intentó minimizar tal efecto aumentando la dilución sérica y del conjugado.

No obstante, se comprobó que tal efecto no puede eliminarse totalmente, indicando la necesidad de emplear un control individual de la densidad óptica de cada suero en ausencia del segundo anticuerpo, cuyo valor se sustrae a la densidad óptica de la muestra.

RESULTADOS

Antígeno	Concentración (µg/ml)	Inmunoglobulina	IgG	IgM	
<i>APS</i>	5	<i>Suero</i>	Dilución	1/400	1/800
<i>ACU</i>	7,5		Tiempo Incubac.	40 min.	30 min.
<i>ASL</i>	6	<i>Antisuero</i>	Dilución	-	1/500
<i>ESL</i>	5		Tiempo Incubac.	-	60 min.
<i>14 kDa</i>	5	<i>Conjugado</i>	Dilución	1/8000	1/10000
<i>42 kDa</i>	5		Tiempo Incubac.	40 min.	60 min.
<i>97 kDa</i>	5	<i>Sustrato</i>	1,8 µg/ml O.P.D. // 3 µl/ml H ₂ O ₂		
Condiciones de lectura			30min. 450 nm	45 min. H ₂ SO ₄ / 490 nm	

Tabla 14.- Resultados de las condiciones del ELISA, tras la estandarización de todos los parámetros implicados en la ejecución de la misma.

IV.4.3.2.- Respuesta inmunológica.

Una vez analizados los resultados parasitológicos de este experimento de reinfección-inmunización, es decir, una vez comprobado el número de manchas hepáticas, larvas pulmonares y adultos intestinales de *A. suum*, observamos una enorme diferencia según la edad de los animales y la procedencia de los mismos.

Al comprobar que algunos de los animales de mayor edad del lote 1 (no infectado ni inmunizado a lo largo de todo el estudio) presentaron algunas manchas de leche en sus hígados, confirmamos el contacto previo que habían mantenido estos

RESULTADOS

animales en su explotación de origen, antes de llegar a las dependencias de la Granja de la Facultad de Veterinaria. Este hecho, llevó a plantearnos el análisis de la respuesta inmunitaria humoral de las dos inmunoglobulinas más importantes en la respuesta orgánica a los agentes extraños; la IgM, en el caso de las respuestas inmunitarias primarias y la IgG, en el caso de las respuestas secundarias.

IV.4.3.2.1.- Inmunoglobulina G.

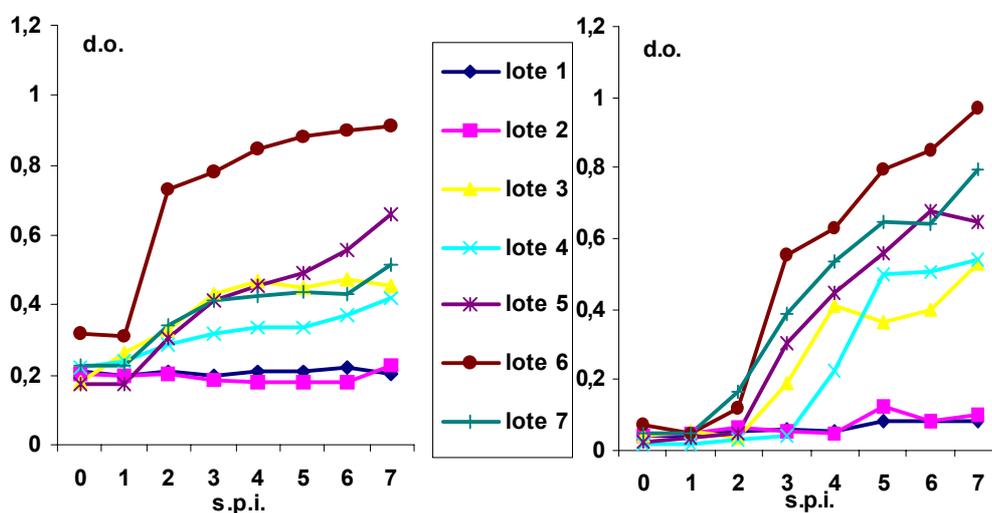
La respuesta IgG específica frente a *A. suum*, mostró en valores medios una correlación positiva, aunque no significativa (tabla 15) con la presencia de lesiones hepáticas ($r=0,01$). En cambio, el índice de correlación de Pearson entre esta misma respuesta IgG frente al número de larvas pulmonares pasa a ser significativamente negativa ($r=-0,131$; $p=0,006$). Se puede observar la importante relación entre las dos inmunoglobulinas analizadas en este trabajo (IgG e IgM), con valores de correlación ampliamente significativos ($r=0,537$; $p<0,001$).

	% G.P.	Manchas	Larvas	Edad	Ig G
Manchas	0,48***				
Larvas	0,32***	0,80**			
Edad	-0,63**	-0,73**	-0,51**		
Ig G	0,33***	0,01 ^{ns}	-0,13*	0,18***	
Ig M	0,22***	-0,19***	-0,23***	0,26***	0,54**

Tabla 15.- Índices de correlación de Pearson entre diferentes parámetros de los animales experimentales. * $p=0,006$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$; ns=no significativo.

RESULTADOS

En las gráficas 13a y 13b, se pueden observar los valores medios de las evoluciones de la IgG de cada uno de los lotes frente a los diferentes antígenos en cerdos de ambos grupos de edad. En los animales de mayor edad, siempre los niveles basales de densidad óptica ($\$ = 0,236$) fueron significativamente más elevados que los anticuerpos que presentaron los animales jóvenes ($\$ = 0,071$) el día 0 del experimento ($F = 82,9$; $p < 0,0001$).



Gráficas 13a (izqda) y 13b (drcha).- Evolución media de los niveles de IgG en animales de 4 meses (13a) y 2 meses (13b), frente a todos los antígenos analizados.

Además, en los animales mayores, la respuesta es algo más precoz, iniciándose incluso a partir del 7º d.p.i. y alcanzando valores elevados a la 3ª-4ª s.p.i., permaneciendo posteriormente en niveles practicamente constantes, con tendencia de muy ligero aumento hasta el sacrificio.

RESULTADOS

En cambio, en los cerdos de 2 meses de edad, los niveles de IgG comienzan a subir desde los 14 d.p.i., aunque hay lotes, especialmente el lote re infectado y tratado con pirantel, cuya pendiente en la subida de anticuerpos no empieza a ser patente hasta incluso la 3^a s.p.i. Posteriormente, los valores de d.o. se disparan de forma casi exponencial hasta, aproximadamente la 5^a s.p.i., para mantener un ritmo de crecimiento lento desde aquí hasta el momento del sacrificio.

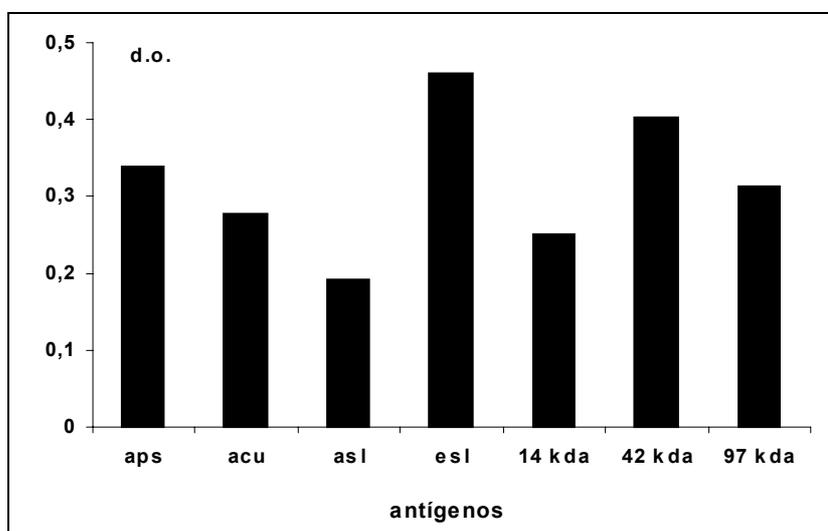
Según el análisis por lotes, se observa cómo los grupos control mantienen su lógico nivel basal de anticuerpos a lo largo del estudio. Los lotes re infectados tienen un comportamiento similar entre sí (sin diferencias significativas entre ellos a lo largo del tiempo de estudio), aunque el lote 4 presenta una respuesta más tardía. Los niveles alcanzados por ambos lotes son más bajos que los alcanzados por los lotes inmunizados, especialmente por el lote 6, que desarrolla un nivel de anticuerpos visiblemente superior al resto de lotes, marcando diferencias significativas respecto a los demás desde la 2^a s.p.i. Los valores medios de densidad óptica de cada lote según los grupos de edad están representados en la tabla 16.

Lotes	1	2	3	4	5	6	7
A	0,21±0,08	0,21±0,07	0,40±0,13	0,38±0,12	0,40±0,17	0,70±0,24	0,44±0,17
B	0,07±0,02	0,11±0,05	0,28±0,18	0,27±0,22	0,36±0,25	0,52±0,35	0,49±0,32

Tabla 16.- Valores medios de densidad óptica de la IgG en cada uno de los lotes y según los dos grupos de edad (A: animales de 4 meses; B: animales de 2 meses).

RESULTADOS

Al estudiar la respuesta IgG anti-*Ascaris* de todos los lotes frente a los 7 antígenos utilizados, se comprueba que el antígeno excretor secretor larvario fue el más ampliamente reconocido por los sueros de los animales experimentales (gráfica 14). Este hecho fue estadísticamente significativo al aplicar el test de Newman-Keuls. Curiosamente, el otro antígeno larvario (somático de larvas) fue el que determinó significativamente los menores valores de d.o. en la detección de IgG. El antígeno de la fracción de 42 kDa fue el segundo antígeno más reconocido, seguido del pseudocelómico y el antígeno de 97 kDa, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí. A continuación, fueron los antígenos cuticular y de 14 kDa, que tampoco presentaron diferencias significativas entre sí y por último, y como ya hemos comentado, el menos reconocido fue el somático larvario. Todas estas diferencias se observan en la gráfica 14.



Gráfica 14. Nivel de IgG media reconocida por cada antígeno frente a todos los sueros experimentales.

RESULTADOS

IV.4.3.2.2.- Inmunoglobulina M.

La evolución del isotipo IgM fue diferente a la experimentada por la IgG. Sin embargo, como se observa en la tabla 15, y como fue comentado al estudiar la IgG, se evidenció una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los valores de DO de los dos isotipos de inmunoglobulinas ($r = 0,54$; $p < 0,001$).

En los animales de mayor edad, los niveles de d.o. fueron bajos durante todo el experimento, mientras que en los animales más jóvenes sí hubo una evolución significativa de IgM en el transcurso del estudio. Ya el día 0, las diferencias encontradas entre los dos grupos de edad alcanzaron un elevado nivel de significación ($F = 32,94$; $p < 0,0001$).

Sin embargo, no hubo diferencias significativas ni el día del reto ($F = 2,10$; $p = 0,148$) ni el día del sacrificio ($F = 0,024$; $p = 0,876$) entre los animales jóvenes y los viejos. Las d.o. medias, obtenidas por ELISA según los 2 grupos de edad están representadas en la tabla 17.

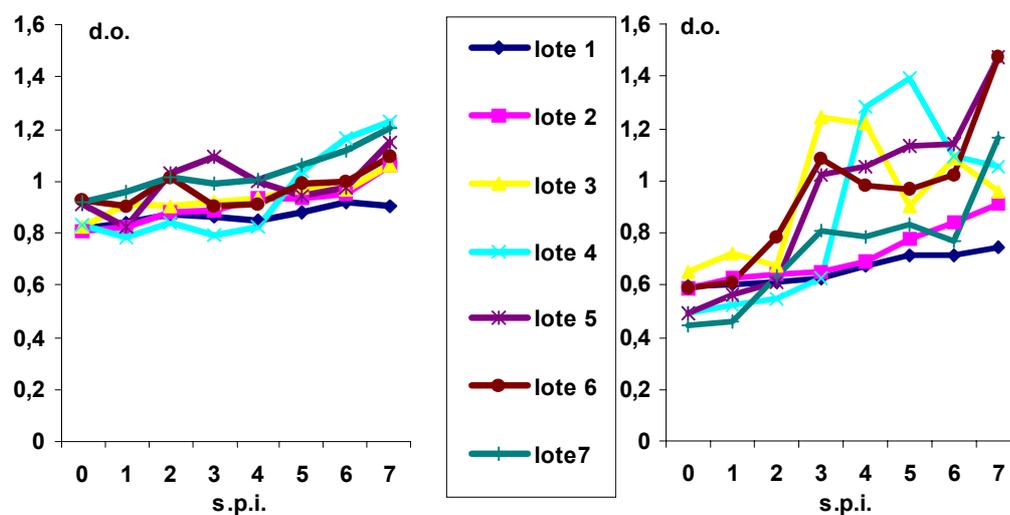
Lotes	1	2	3	4	5	6	7
A	0,87±0,14	0,91±0,16	0,94±0,18	1,04±0,32	0,99±0,16	0,96±0,17	1,03±0,37
B	0,66±0,06	0,71±0,12	0,93±0,24	0,87±0,36	0,94±0,33	0,94±0,27	0,73±0,22

Tabla 17.- Valores medios de densidad óptica de la IgM en cada uno de los lotes y según los dos grupos de edad (A: animales de 4 meses; B: animales de 2 meses).

En cuanto a la seroconversión a lo largo de la prueba, se observaron

RESULTADOS

variaciones significativas de los valores de d.o, evidenciables en los animales de 2 meses de edad (Gráfica 15b). En estos animales, los lotes control 1 y 2 presentaron una curva con una leve pendiente constante desde el día 0 hasta el sacrificio. Sin embargo, el comportamiento en los lotes 3 y 4 fue totalmente diferente, ya que mostraron un importante y significativo aumento a la 2ª s.p.i. y 3ª s.p.i., respectivamente, manteniendo esos altos niveles hasta dos semanas más tarde. A partir de aquí, experimentaron un paulatino descenso hasta el final del estudio. Por su parte, los grupos inmunizados mostraron dos picos en los niveles de IgM. El primero de ellos fue detectado a la 3ª s.p.i. y el segundo se observó al día del sacrificio (Gráfica 15b).



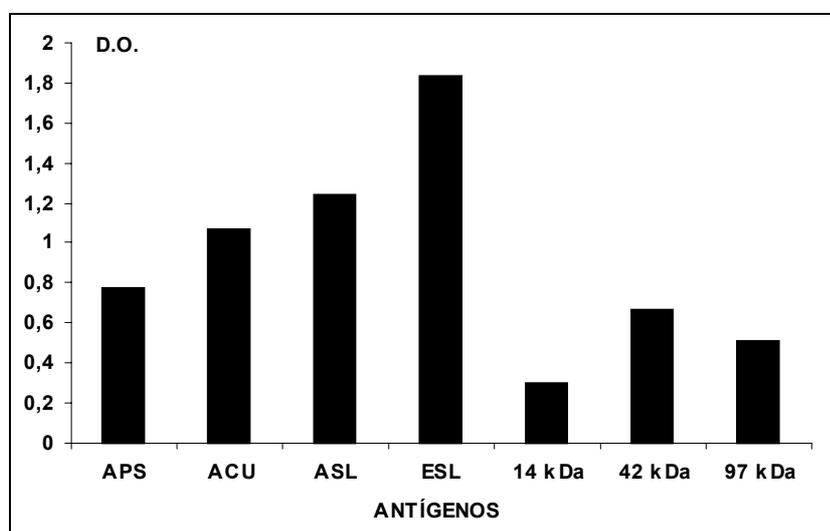
Gráficas 15a (izqda) y 15b (drcha).- Evolución media de los niveles de IgM en animales de 4 meses (15a) y 2 meses (15b), frente a todos los antígenos analizados.

RESULTADOS

Por su parte, los animales de 4 meses apenas experimentaron cambios en los niveles de IgM a lo largo del estudio (Gráfica 15a). En estos últimos, únicamente se observó una ligera subida al final del experimento, sin que en ningún caso se alcance la significación estadística.

Al analizar los índices de correlación de Pearson entre los niveles de IgM y los resultados parasitológicos, se evidenciaron correlaciones negativas, estadísticamente significativas, tanto con el número de manchas de leche hepáticas ($r=-0,085$; $p<0,0001$), como con el número de larvas pulmonares ($r=-0,1059$; $p<0,0001$) (tabla 15).

Por último, y al estudiar la respuesta inmunitaria de los cerdos basada en la IgM frente a los 7 antígenos utilizados en este estudio, hemos comprobado como el antígeno excretor secretor larvario fue el más intensamente reconocido entre todos ellos con una gran diferencia significativa respecto a los mismos (Gráfica 16).



Gráfica 16. Nivel de IgM media reconocida por cada antígeno en todos los sueros experimentales.

RESULTADOS

El análisis estadístico, mediante el test no paramétrico de Duncan, evidenció diferencias significativas en la respuesta por ELISA entre los 7 antígenos. Los valores más bajos de d.o. se evidenciaron al utilizar las tres fracciones proteicas como antígenos, sobre todo la banda de 14 kDa. Por su parte, los antígenos procedentes de los helmintos adultos (APS y ACU) mostraron niveles intermedios de d.o. Todos estos últimos resultados se muestran en la gráfica 16.

IV.4.4.- Estudio macroscópico de las lesiones hepáticas.

Como fue comentado en el apartado IV.4.1, el número de manchas de leche en los cerdos de 4 meses ($\$ = 80,7$), fue solamente un 15,89% de las encontradas en los animales jóvenes ($\$ = 508,2$).

Los diferentes tipos de manchas de leche se clasificaron en 4 tipos: manchas tipo “red” o reticulares (3-4 mm, intensas, no salientes sobre la cápsula), grandes manchas (>6-10 mm, duras y salientes, con centro definido), manchas tipo “foggy” (5-10 mm, como ligera opalescencia de la cápsula hepática) y manchas linfonodulares (1-2 mm, circunscritas, duras y salientes al tacto). Alguno de estos tipos de manchas se pueden observar en las Fig 3a y 3b.

En los animales más jóvenes, las manchas reticulares fueron generalmente más intensas, más pequeñas y planas que en el colectivo de 4 meses y, además, los hígados de estos animales no presentaron una fibrosis generalizada.

En el grupo 5, los animales de 2 meses de edad mostraron manchas de leche reticulares, con un centro definido y nodular, haciendo prominencia sobre la superficie hepática, mostrando muchas de ellas, un centro hemorrágico de aproximadamente 1 mm.

RESULTADOS

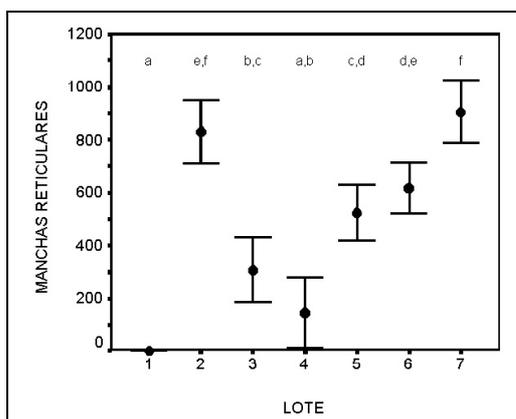


Fig. 3a.- Detalle de manchas tipo reticular en el hígado de uno de los cerdos del lote 2.

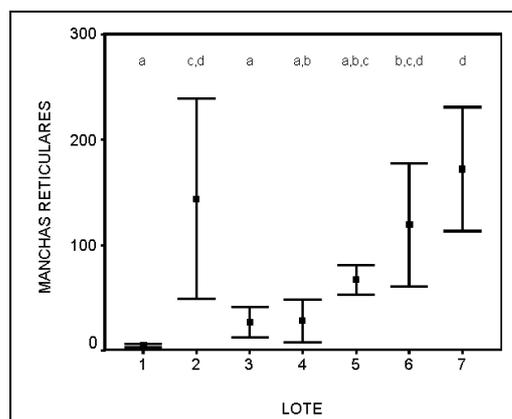


Fig. 3b.- Detalle de manchas tipo foggy en el hígado de uno de los cerdos del lote 3.

En las gráficas 17a y 17b se representan el número medio y desviación estándar de este tipo de manchas, indicando con diferentes caracteres la relación entre los diferentes lotes, de forma que aquellos grupos con el mismo carácter no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí.



Gráfica 17a.- Número de manchas reticulares en animales jóvenes.

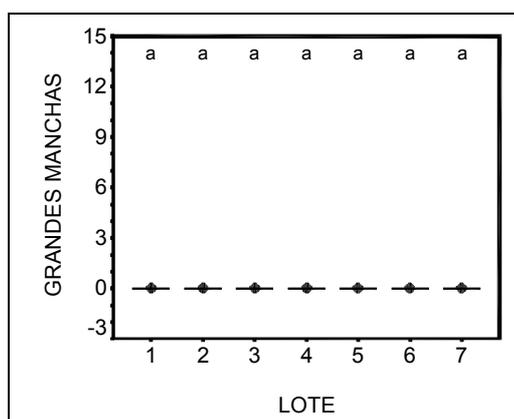


Gráfica 17b.- Número de manchas reticulares en animales viejos

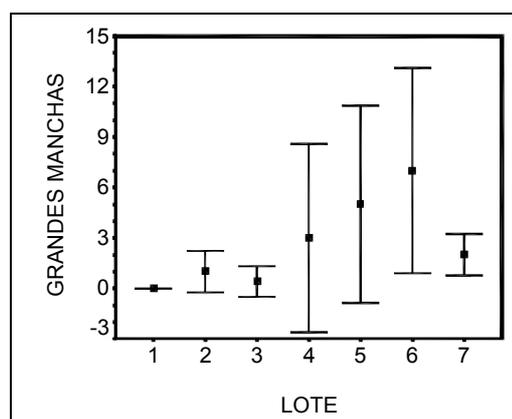
RESULTADOS

En los cerdos viejos y sobre todo en los grupos 4, 5 y 6 presentaron además, un tipo de manchas relativamente grandes ($> 6-10$ mm), duras al tacto y sobresaliendo sobre la superficie del hígado, a las que denominamos como grandes manchas, usualmente con un centro definido, aunque las diferencias en cuanto al número de las mismas entre grupos no fue significativa.

El número medio de estas manchas, junto a su desviación estándar, se muestra en las gráficas 18a y 18b. Quizás deba mencionarse que la confluencia de manchas y el incremento del tejido conectivo intralobular hizo muy difícil el conteaje del



Gráfica 18a.- Número de grandes manchas en animales jóvenes.



Gráfica 18b.- Número de grandes manchas en animales viejos.

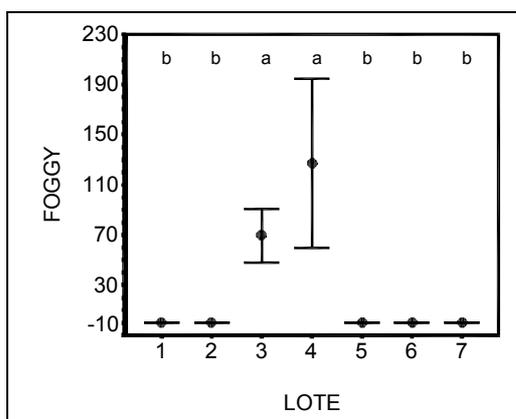
número exacto de lesiones. Igualmente, y como puede verse en la gráfica 18a los animales más jóvenes nunca mostraron este tipo de lesiones. Las manchas tipo “foggy”, sólo se presentaron en los cerdos de los grupos 3 y 4, los cuales tuvieron, a su vez, un número moderado de manchas linfonodulares de 1-2 mm (Fig. 3b).

La correlación de los dos tipos de lesiones (linfonodulares y foggy) fue

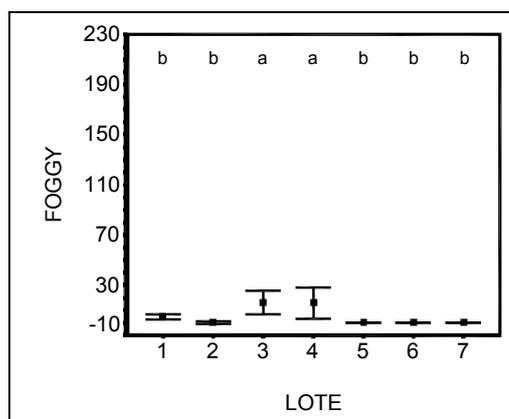
RESULTADOS

significativa ($r= 0,81$; $p<0,01$).

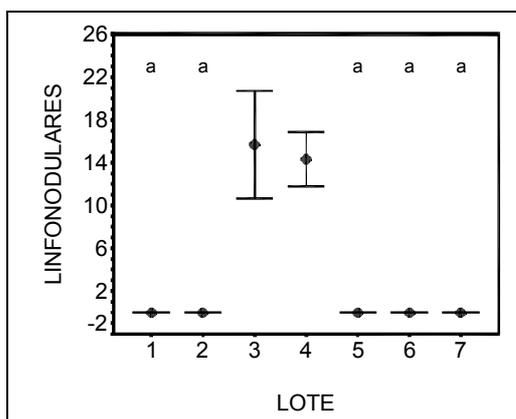
La representación del número medio y la desviación estándar de estos dos tipos de manchas, se encuentran en las gráficas 19a y 19b y las gráficas 20a y 20b.



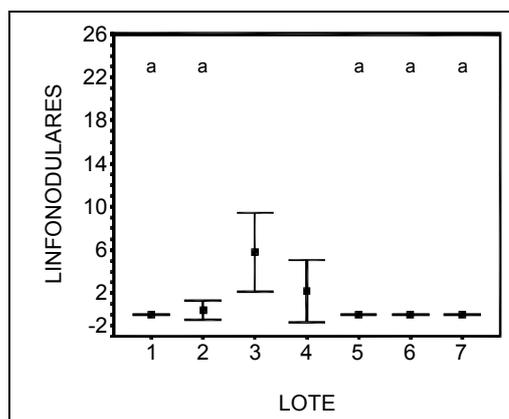
Gráfica 19a.- Número de manchas tipo foggy en animales jóvenes.



Gráfica 19b.- Número de manchas tipo foggy en animales viejos.



Gráfica 20a.- Número de manchas linfonodulares en animales jóvenes.



Gráfica 20b.- Número de manchas linfonodulares en animales viejos.

RESULTADOS

IV.4.5.- Estudio histopatológico.

Como fue comentado, se realizó un estudio histopatológico en los cerdos del 2º experimento, con el fin de comprobar las lesiones provocadas por la migración larvaria de *Ascaris suum* a través del organismo, así como para determinar las diferencias de respuesta a nivel tisular de los cerdos en diferentes condiciones de infección e inmunización.

Los resultados del estudio se muestran detallados por lotes, describiendo las diferentes lesiones encontradas en los mismos en las tablas 18, 19 y 20.

LOTE 1

Tal y como describimos en el diseño experimental (III.2), este lote fue mantenido en las dependencias de la granja de la Facultad de Veterinaria, sin ningún tipo de infección y/o inmunización a lo largo de toda el experimento.

El resultado del estudio histopatológico realizado en estos animales, reveló una ausencia casi total de lesiones, con la excepción de algunas modificaciones no dignas de mención a nivel de ciertos órganos, debiadas a una reacción totalmente inespecífica y muy leve.

LOTE 2

Este lote fue infectado una semana antes del sacrificio, en el reto al que fueron sometidos, con lo cual, estos animales fueron tomados como referencia, respecto a las lesiones encontradas en el resto de los lotes que también recibieron el reto y que previamente habían mantenido algún tipo de estimulación antigénica.

RESULTADOS

Duodeno

La mucosa del duodeno presentó como lesiones más importantes un moderado infiltrado y una descamación apical del epitelio de dicha mucosa (Fig. 4). Dicho infiltrado fue más patente en zonas basales que en áreas apicales. El infiltrado estuvo constituido por macrófagos, linfocitos, algunas células plasmáticas y pocos eosinófilos. En zonas apicales hubo

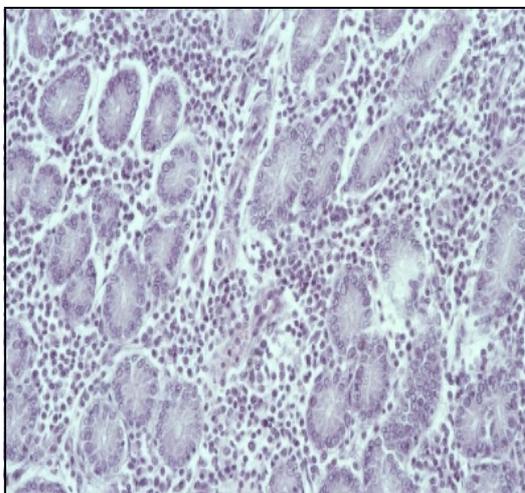


Fig. 4.- Detalle de la infiltración celular en el duodeno del lote 2.

una mayor presencia de tejido conectivo laxo más propio de esta zona de la mucosa intestinal.

Yeyuno

Las características lesionales que encontramos en esta zona fueron similares a las encontradas en duodeno, pero con la particularidad que observamos una mayor presencia de eosinófilos y un mayor acúmulo focal de un infiltrado linfocitario y de células macrocíticas. El resto de la mucosa se presentó similar al duodeno, es decir con mayor presencia de eosinófilos más acumulados en zonas basales.

Intestino grueso

Al igual que en los tramos anteriores, encontramos un infiltrado, que sin embargo,

RESULTADOS

en este caso se distribuye por toda la pared de la mucosa (Fig. 5). Además, se observó

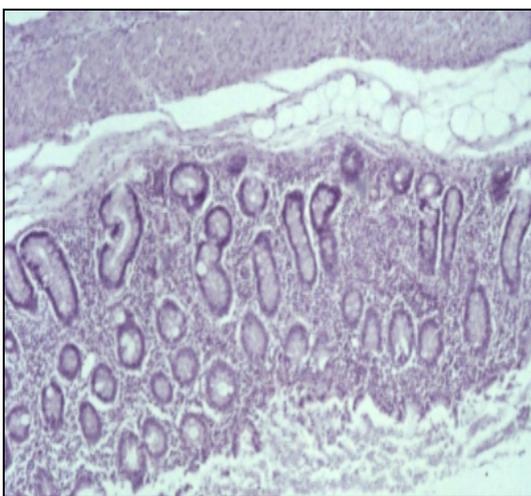


Fig. 5.- Moderado infiltrado en la mucosa del intestino grueso del lote 2.

la presencia de folículos linfoides aislados constituidos por un centro germinativo moderadamente activo y un infiltrado de células linfocíticas y macrófagos, aunque en mayor número los primeros que los últimos. En el caso de los eosinófilos, se presentaron en escaso número en esta localización. En zonas apicales y siempre de forma focal, apareció una descamación de las células epiteliales. Posiblemente la única diferencia con el resto de tramos

intestinales, fue la distribución uniforme del infiltrado celular por toda la mucosa.

Hígado

El parénquima hepático presentó dos lesiones características: a) un infiltrado fibroblástico y linfocitario con presencia de células eosinofílicas en los interseptos y en los espacios de Kiernan y b) la presencia de un ligero infiltrado a modo de hepatitis parenquimatosa (Fig. 6). Igualmente, se presentó una moderada hiperplasia de canalículos biliares (escaso). En ocasiones se observó un tejido pericanalicular conectivo laxo, gran cantidad de sustancia fundamental amorfa y sobre todo, de fibroblastos maduros, como si existiera un ligero edema pericanalicular. Junto a estas

RESULTADOS

lesiones, encontramos una tumefacción turbia en los lobulillos hepáticos. Finalmente, no se observó ningún tipo de granuloma parasitario. La presencia de tejido conectivo fue moderada.

Pulmón

El parénquima pulmonar presentó un moderado enfisema junto a otras áreas atelectásicas, en las que se visualizó un aumento de los interseptos debido a la

presencia de macrófagos, linfocitos, escasos eosinófilos y muy pocos neutrófilos, es decir, presencia de células linfocitarias. En algunas áreas, se observaron acúmulos de macrófagos, sobre todo en zonas peribronquiales, y conjuntamente una muy escasa presencia de eosinófilos.

Ganglio

El parénquima linfático de los ganglios mostró una hiperplasia de nódulos linfáticos con núcleos germinativos claros, y una zona extranodular con gran cantidad de proliferación linfocitaria. Hay una linfadenitis reactiva inespecífica.

Bazo

La víscera esplénica presentó, como principal característica, un aumento de nódulos linfáticos donde se observa una reacción hiperplásica. Sin embargo, también es

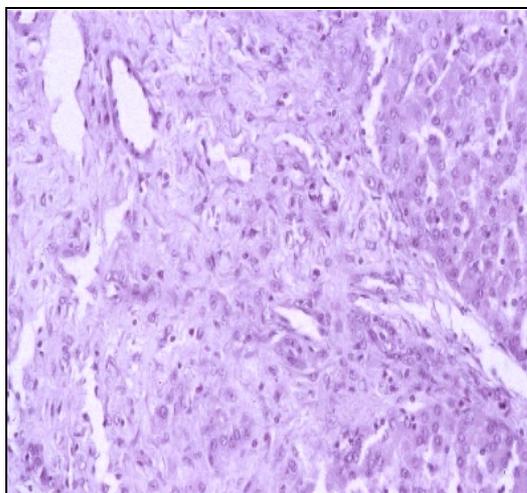


Fig. 6.- Detalle del tejido interlobulillar, con ligero infiltrado celular.

RESULTADOS

característico la presencia, en la pulpa blanca, de un fuerte infiltrado de eosinófilos y macrófagos, sobre todo a nivel de senos. Así mismo, se acompaña de un aumento de tipo linfocitario con acúmulo de macrófagos muy característica.

Riñón

El riñón presentó una ligera glomerulonefritis serosa y tubulonefrosis moderada.

Cerebro y ojo

Si alteraciones significativas.

LOTE 3

Duodeno

A este nivel encontramos una infiltración de macrófagos y eosinófilos, aunque no tan patente como en yeyuno. En este lugar,

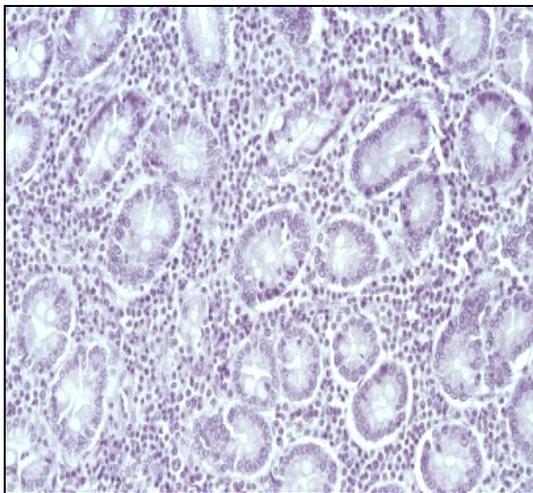


Fig. 7.- Detalle del tejido duodenal del lote 3, con ligero infiltrado celular.

las descamaciones son importantes en las zonas apicales de las vellosidades intestinales. Sin embargo, los elementos celulares de las zonas no basales, presentaban una morfología normal pero con fuerte infiltrado (Fig. 7). Hubo áreas donde se apreciaron elementos macrofágicos y en algunas células proliferativas aparecían fenómenos de mitosis. Del mismo modo, nos

RESULTADOS

encontramos áreas donde parecía haberse perdido el epitelio de las vellosidades intestinales en las áreas más basales, encontrándose ocupadas por un fuerte infiltrado, fundamentalmente hialógeno, caracterizado por macrófagos y células plasmáticas.

Yeyuno

La mucosa yeyunal presentó una fuerte infiltración que provocó el aumento del grosor de las vellosidades, las cuales en su zona apical incluso aparecían con el epitelio descamado. La infiltración que encontramos en esta zona estuvo compuesta, sobre todo, por macrófagos, linfocitos y especialmente eosinófilos. Así mismo, encontramos buena cantidad de células plasmáticas y algún que otro neutrófilo. En las zonas intersticiales de las vellosidades, existían grupos de macrófagos de gran tamaño con un citoplasma homogéneo muy eosinofílico. En ningún caso se observaron elementos parasitarios.

Intestino grueso

En esta zona entérica, el cuadro lesional fue similar al observado en intestino delgado, existiendo una moderada infiltración en la mucosa de elementos celulares propios de un proceso inflamatorio aunque fue menos patente la infiltración eosinofílica. Igualmente, se detectó cierta descamación y la aparición de elementos celulares de tipo conectivo, intercalados en dicha proliferación.

Hígado

El estudio histológico reveló, en principio, un parénquima aparentemente normal. Sin embargo, en algunos espacios de Kiernan apareció una marcada infiltración

RESULTADOS

eosinofílica y en menor medida la presencia de macrófagos. Así mismo, encontramos diversos granulomas, caracterizados por un centro de elementos linfocitarios y macrófagos, rodeado por una pequeña cápsula de tejido conectivo proveniente del centro lobulillar, y que se proyecta en pequeñas y delicadas travéculas dividiendo en pseudolóbulos a dicho granuloma, y todo ello rodeado de una

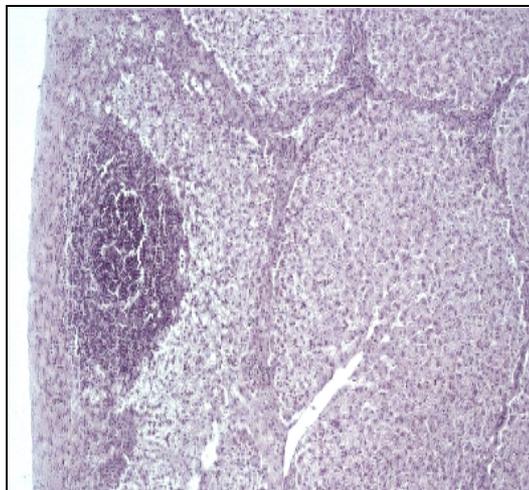


Fig. 8a.- Granuloma parasitario en parénquima hepático (lote 3).

corona de elementos linfocitarios sin que entre éstos y el parénquima hepático exista una verdadera delimitación capsular (Fig. 8a y 8b). Los hepatocitos generalmente presentaron una estructura citoplasmática de tipo granular, llegando incluso a alterarlos mediante una degeneración hidrópica. En general podríamos definir el cuadro lesional observado, como una degeneración turbia parenquimatosa. A veces se presentó un engrosamiento de los interseptos interlobulillares debido a la aparición de elementos fibroblásticos muy proliferativos, que simulaban el

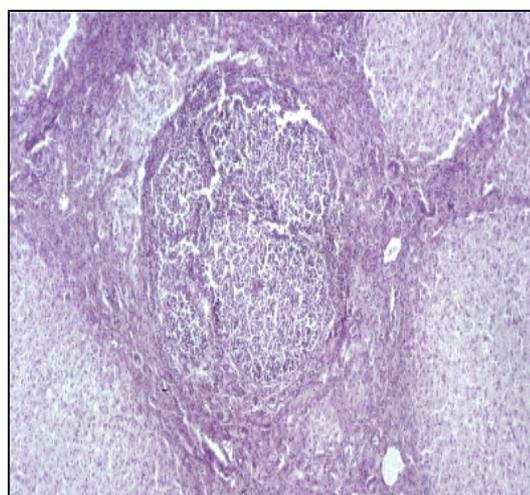


Fig. 8b.- Granuloma parasitario, principalmente constituido por linfocitos y eosinófilos.

RESULTADOS

comienzo de una fibrosis interlobulillar. Otra de las imágenes dignas de mención fue el aumento de los canaliculos biliares, pudiendo decir que hubo una moderada hiperplasia en este nivel.

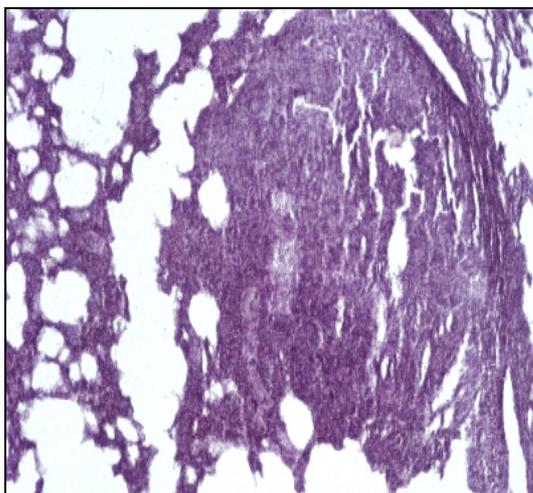


Fig. 9.- Importante infiltrado celular a nivel septal de los cerdos del lote 3.

Pulmón

Las luces alveolares no presentaron alteración destacable, no apreciándose ni elementos celulares ni linfoplasmáticos en su interior. Sin embargo, a nivel septal hubo un engrosamiento debido al infiltrado de elementos linfoblásticos y macrófagos localizados en estas zonas (Fig. 9). En ocasiones aparecieron, aisladamente, elementos eosinofílicos localizados a nivel peribronquial, sobre todo en

bronquiolos terciarios y cuaternarios.

Ganglio

Es de reseñar una linfoplasia o aumento de nódulos linfáticos en la corteza del ganglio. En su mayoría, los ganglios no presentan centros germinativos muy reactivos y en general se constituyen por linfocitos y linfoblastos con una delicada corona nodular. A nivel de senos no aparecieron alteraciones importantes.

RESULTADOS

Bazo

Los cambios histopatológicos en parénquima esplénico son similares a los observados en ganglios, es decir, una hiperplasia linfoblástica, donde los nódulos no presentan centro germinativo y los senos esplénicos se encuentran algo colapsados.

Riñón

El parénquima renal no presenta alteración digna de mención y como única reseña puede mencionarse una moderada tubulonefrosis en áreas focales.

Cerebro y ojo

Ni en tejido nervioso cerebral ni en ojo se apreciaron cambios dignos de mención.

LOTE 4

Duodeno

La mucosa del duodeno se caracterizó, en los animales de este lote, por un infiltrado fundamentalmente de elementos linfocitarios entre los que destacan algunos macrófagos, aunque siempre en cantidad moderada. Lo más característico del grupo es que el infiltrado es moderado y las vellosidades intestinales presentan una descamación del epitelio en su parte apical. El resto de la pared del duodeno no muestra alteraciones dignas de mención. Algunas células del infiltrado mostraban procesos de mitosis.

Yeyuno

El yeyuno, en su parte baja de la mucosa, presenta un aumento del número de

RESULTADOS

eosinófilos. No obstante, el número de elementos celulares es moderado, incluso en menor densidad que lo observado en la mucosa duodenal. A nivel de la región basal, el infiltrado se encuentra un poco más denso y podemos encontrar algunas estructuras epiteliales en zonas degenerativas, apareciendo mayor cantidad de células caliciformes que en las otras regiones. Se observa descamación epitelial en las zonas apicales.

Intestino grueso

En estas zonas más distales, se sigue manteniendo el infiltrado moderado en áreas localizadas, que motiva una separación de las vellosidades de dicho intestino (Fig. 10). Dicho infiltrado denota la presencia de células de tipo fibroblástico y macrófagos. Respecto a los eosinófilos, aparecen en menor cantidad que en yeyuno pero, aparentemente en mayor número que en duodeno. Hay áreas del intestino grueso con descamación del epitelio

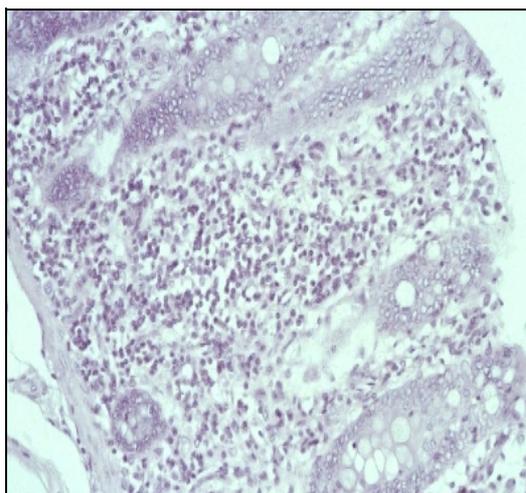


Fig. 10.- Detalle de la mucosa del intestino grueso de los cerdos del lote 3.

apical de la mucosa que está reemplazado con un fuerte infiltrado. Así mismo, hay una menor descamación del epitelio en la zona apical y en general esta zona intestinal tiende a la normalidad.

RESULTADOS

Hígado

El parénquima hepático de estos animales presenta como más características dos tipos de lesiones; a) un ligero aumento del espacio interlobulillar por la presencia de estructuras de tipo fibroblástico (Fig. 11a) y b) una hiperplasia de canalículos biliares, sobre todo a nivel de los espacios de Kiernan.

Mediante la tinción del Tricrómico de Masson (Fig. 11a), se puede observar, en color verde, la distribución interlobulillar del tejido fibroblástico en los cerdos de este lote.

Otra lesión digna de reseñar es la aparición de pseudogranulomas de pequeño-mediano tamaño (Fig. 11b). Estos granulomas están constituidos, en primer lugar, por una acumulación de pequeños nódulos semejantes a nódulos linfáticos ya que presentan, sobre todo linfocitos, células de pequeño tamaño, de morfología redondeada que están delimitados por

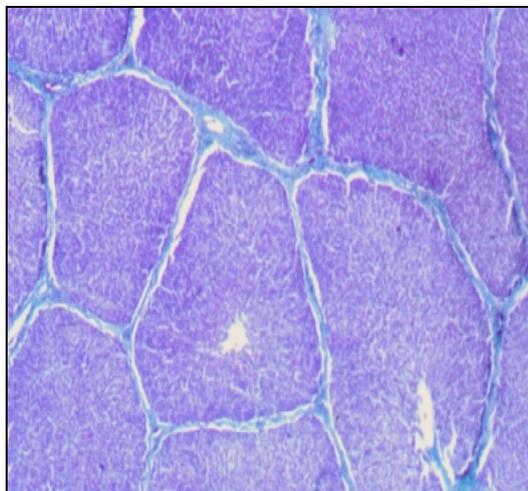


Fig. 11a.- Tejido hepático del lote 4, con un ligero aumento de tejido fibroblástico interlobulillar (verde). Tricrómico de Masson.

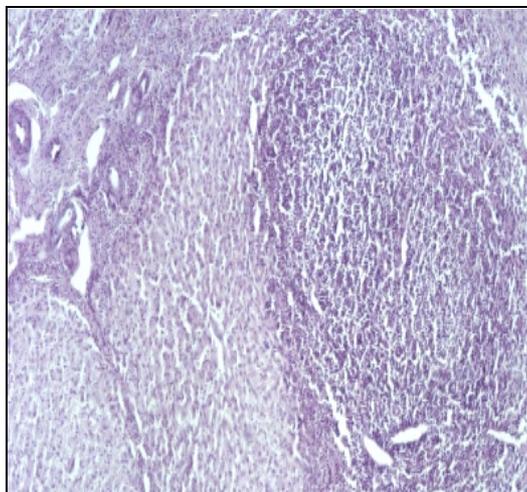


Fig. 11b.- Formación de granuloma en el tejido hepático del lote 4, como consecuencia de la migración larvaria de *A. suum*.

RESULTADOS

septos de tejido conectivo, pero que además aparecen con un fuerte infiltrado. Todo este cuerpo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo patente, que parece proyectar travéculas hacia el interior constituyendo verdaderas lobulaciones. Podemos decir que estos granulomas están constituidos por aproximadamente unas 7-10 pequeñas nodulaciones que, agrupadas, constituyen todo el cuerpo. Además, los hepatocitos presentan un citoplasma muy granular y eosinofílico, dando la apariencia de una degeneración turbia.

En algunos espacios de Kiernan, se presenta una fuerte hiperplasia canalicular, junto a un infiltrado de células linfocitarias, gran cantidad de eosinófilos y fibroblastos. Además, en las arteriolas y vénulas de dichos espacios de Kiernan encontramos microtrombos de pequeño calibre.

En ocasiones, los canaliculos biliares presentan un material amorfo de tipo granular, y ocasionalmente se ven unas estructuras de tipo cristaloides de color marrón que posiblemente se trate de secreción biliar.

Pulmón

El parénquima pulmonar presenta, como hecho más significativo, la existencia de un infiltrado interseptal que determina un engrosamiento de los septos interalveolares y que va a dar lugar, en algunas áreas, a imágenes de atelectasia, mientras que

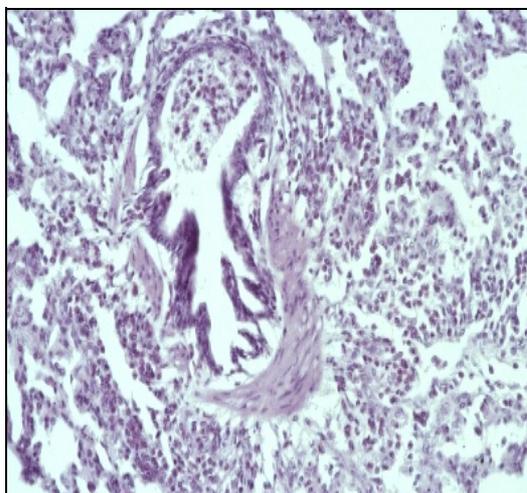


Fig. 12.- Imagen del tejido pulmonar con material granular en el interior de algunos bronquios. Atelectasia pulmonar (lote 4).

RESULTADOS

en otras, como función vicariante, podemos observar enfisema alveolar (Fig. 12). Sin embargo, lo más significativo es un fuerte infiltrado eosinofílico peribronquial, tanto en bronquios secundarios, terciarios, así como en bronquios de mayor calibre, si bien es más fuerte en los bronquiolos terminales. Así mismo, a nivel de la luz de bronquios terciarios y cuaternarios aparece un material granular, fundamentalmente macrófagos y neutrófilos (Fig. 12). En el intersepto, los elementos infiltrativos se constituyen sobre todo de macrófagos, neutrófilos y linfocitos y algunos eosinófilos. En ciertas áreas se observa descamación del epitelio bronquial.

Ganglio

Encontramos una fuerte y llamativa reacción linfoblástica, con gran cantidad de nódulos linfáticos caracterizados por un centro germinativo con elementos linfoblásticos de gran tamaño junto a otros de mediano tamaño, en los que son frecuentes las imágenes de mitosis. Rodeando a estos elementos, se presentan nítidas coronas linfocíticas, que en muchos casos conectan unas con otras formando verdaderas mantas linfocitarias. El resto del parénquima no presenta alteraciones salvo a nivel medular, donde sí aparece un infiltrado eosinofílico.

Bazo

El parénquima esplénico presenta una relativa hiperplasia nodular, cuyos nódulos linfáticos no tienen centro germinativo sino que todo el nódulo es un acúmulo de linfocitos. Los senos esplénicos se encuentran colapsados por la gran cantidad de todo tipo de células, como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, etc, dando la sensación de una reacción activa linfoblástica. Estas lesiones generalmente son de

RESULTADOS

tipo inespecífico.

Riñón

Destaca un proceso de tubulonefrosis focal junto a un infiltrado intersticial en áreas focales. Este infiltrado es más patente a nivel tubular que a nivel glomerular. En esta última localización, podemos ver una clara glomerulonefritis serosa con la presencia de estructuras esféricas hialinas. Los túbulos afectados presentan material eosinofílico de tipo granular, lo que es indicativo de una rescisión de orina, sobre todo en los túbulos yuxtamedulares (entre corteza y médula).

Cerebro y ojo

El tejido nervioso presenta escasa proliferación de microglia. Igualmente, se presentan algunos fenómenos de neuronofagia. El sistema ocular no presenta ningún tipo de alteración lesional digna de mención.

LOTE 5

Duodeno

La pared del duodeno presenta modificaciones a nivel de la mucosa con un fuerte infiltrado celular y pérdida parcial del epitelio de las vellosidades en su zona apical (Fig. 13). El infiltrado está constituido por linfocitos y macrófagos y, en ocasiones, llega a ser tan intenso que incluso provoca una separación importante entre las vellosidades. Las células plasmáticas también forman parte de ese infiltrado, sin que aparezcan gran cantidad de eosinófilos. Llama la atención la abundancia de linfocitos

RESULTADOS

de gran tamaño, posiblemente linfoblastos, y en las zonas apicales la existencia de una importante descamación epitelial.

Yeyuno

A nivel de yeyuno se presentan similares modificaciones que en duodeno, sin embargo, la infiltración celular es algo menor. Aparece una descamación en zonas apicales y el

infiltrado es idéntico al encontrado en duodeno. Los eosinófilos siguen apareciendo en escasa cantidad.

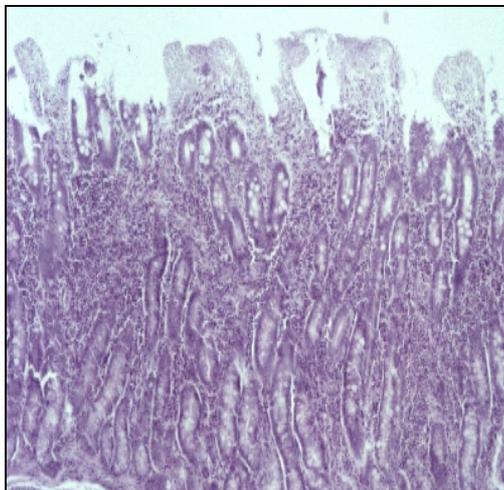


Fig. 13.- Fuerte infiltrado celular en la mucosa duodenal de los cerdos del lote 5.

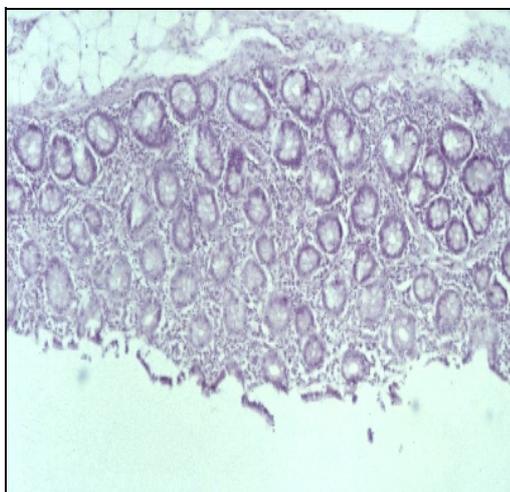


Fig. 14.- Zona de la mucosa del intestino grueso (lote 5), con abundantes células inflamatorias.

Intestino grueso

La mucosa del intestino grueso presenta un infiltrado celular, aunque es menor que el aparecido en la mucosa del intestino delgado. Dicho infiltrado es más intenso en la zona interna de la mucosa que en las zonas apicales (Fig. 14). Está constituido, en su mayoría por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Aquí, es frecuente encontrar un tejido conectivo

RESULTADOS

laxo donde hay grandes espacios aerolares. La presencia de eosinófilos es escasa y, como ya se ha mencionado, el infiltrado es similar al que encontrábamos en duodeno y yeyuno. La descamación también es bastante menor que en intestino delgado (duodeno y yeyuno).

Hígado

En el parénquima encontramos un fuerte infiltrado interlobulillar, que determina grandes áreas de tejido con importante hiperplasia folicular y un tejido conectivo que

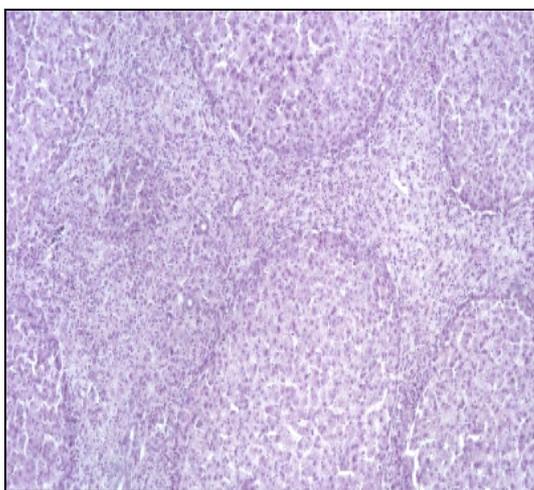


Fig. 15.- Fuerte infiltrado interlobulillar con gran cantidad de tejido conectivo en el hígado de los cerdos del lote 5.

tiende a ser fibroso. El infiltrado celular está constituido, principalmente, por fibroblastos, linfocitos y eosinófilos, éstos en moderada presencia. La proliferación de este tejido fibroblástico prácticamente ahoga el tejido funcional hepático. En estas áreas existen vasos sanguíneos con pequeños grupos plaquetarios adosados al endotelio vascular. A este nivel, destaca la presencia de numerosas vascularizaciones de capilares, dando la

impresión de un tejido de granulación. El interior de esos capilares muestra un ligero aumento de células de Kupffer. Los hepatocitos presentan una tumefacción turbia. En algunas áreas interlobulillares, existe una verdadera acumulación de linfocitos y macrófagos e igualmente, una mayor presencia de eosinófilos (Fig. 15). Estas

RESULTADOS

acumulaciones podrían asemejarse a pseudogranulomas, pero no son tan delimitados y con las lobulaciones denunciadas en los lotes 3 y 4. El parénquima hepático colindante se encuentra atrofiado y con un fuerte infiltrado entre los capilares hepáticos. Hay áreas que se componen casi exclusivamente de tejido fibroblástico, incluso, si pudiéramos de algún modo cuantificar la presencia de ese tejido fibroblástico interlobulillar podríamos concretar que, hay zonas con un 60 % de fibrosis, con atrofia de lobulillos y una degeneración turbia muy importante.

Pulmón

El parénquima pulmonar presenta zonas con un claro infiltrado eosinofílico, dando lugar a una neumonía focal que ocupa grandes áreas del lobulillo respiratorio (Fig. 16). En bronquiolos terminales aparece un infiltrado constituido por una gran cantidad de eosinófilos y algunos macrófagos. Junto a áreas de alveolos colapsados (atelectasia) nos encontramos claras zonas de enfisema. Existe una hiperplasia moderada de folículos linfoides peribronquiales, así como descamación celular del epitelio bronquial.

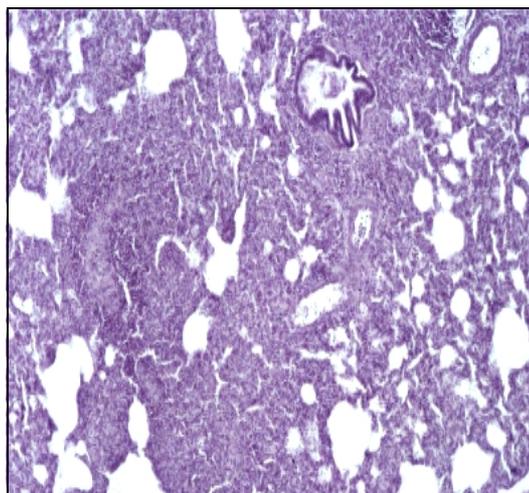


Fig. 16.- Tejido pulmonar, con claro infiltrado celular, esencialmente de eosinófilos en el lote 5.

RESULTADOS

Ganglio

El ganglio linfático presenta una reacción linfoblástica activa con gran cantidad de nódulos linfáticos, algunos con centros germinativos patentes. En las áreas de cordones y de médula aparecen mantas de células linfoides, ejemplo de una reacción totalmente inespecífica.

Bazo

En el parénquima esplénico aparecen unos pequeños nódulos linfáticos sin apenas centro germinativo. La pulpa blanca se encuentra como si estuviera “lavada”. En algunos casos, hay una reacción a nivel de los senos pero sin importancia.

Riñón

En el riñón observamos una glomerulonefritis serosa y una tubulonefrosis moderada. El resto del parénquima aparece en condiciones normales.

Cerebro y ojo

En el parénquima del sistema nervioso las modificaciones a tener en cuenta son fundamentalmente ligera proliferación de células de glia y neuronofagia. No hay alteraciones dignas de mención en las estructuras oculares.

LOTE 6

Duodeno

A nivel de la mucosa del duodeno se observa un fuerte infiltrado (Fig. 17). El infiltrado está constituido por linfocitos, macrófagos y escasos eosinófilos, en todo

RESULTADOS

caso, más concentrados éstos en zonas apicales. También se observa descamación en áreas apicales.

Yeyuno

A nivel de yeyuno las modificaciones son similares que en duodeno, aunque se detecta una mayor presencia de elementos fibroblásticos en zonas apicales y zonas medias, localizándose

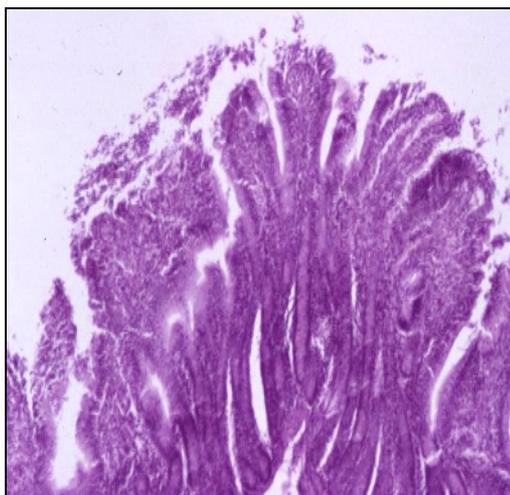


Fig. 18.- Tejido yeyunal con abundante infiltrado y tejido fibroblásticos en los cerdos del lote 6.

por toda la mucosa.

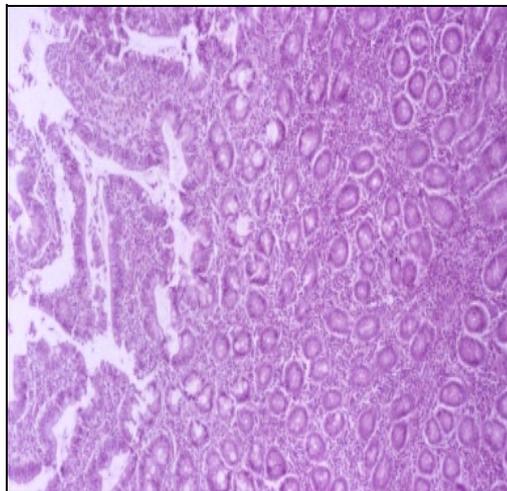


Fig. 17.- Tejido duodenal de los cerdos del lote 6, con abundante infiltrado celular.

el infiltrado sobre todo en zonas basales (Fig. 18). La presencia de eosinófilos es moderada, más profusa que en duodeno.

Intestino grueso

A nivel de la mucosa de intestino grueso sigue existiendo un fuerte infiltrado de elementos linfocitarios y, sobre todo de macrófagos. Hay una moderada presencia de eosinófilos. La descamación en este caso apenas se hace patente y lo más llamativo es que el infiltrado se reparte

RESULTADOS

Hígado

El parénquima hepático presenta una fuerte proliferación fibroblástica y eosinofílica a nivel del tejido interlobulillar, aunque no se observan granulomas parasitarios (Fig. 19). Esta fuerte infiltración da lugar a que los lobulillos hepáticos estén prácticamente ahogados y con procesos atróficos muy patentes, llegando a existir elementos

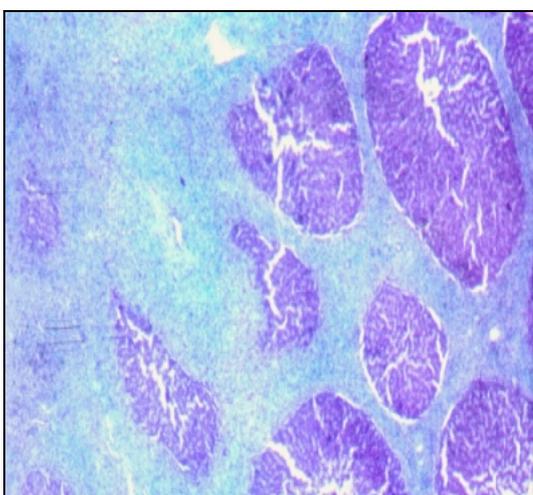


Fig. 19.- Fuerte tejido infiltrativo y conectivo interlobulillar en los cerdos del lote 6. Tinción con Tricrómico de Masson.

celulares muy degenerativos. Se detecta la presencia clara de eosinófilos.

Por otra parte, en los espacios de Kiernan, aparece proliferación o hiperplasia de canalículos biliares. Junto a esta infiltración, aparecen aisladamente acúmulos de linfocitos y macrófagos, aunque en comparación con los otros lotes, lo más llamativo es la presencia de una reacción más crónica por presentar una mayor cantidad de fibras (Fig. 19). En

resumen, la imagen típica del órgano es, sobre todo, una hepatitis parenquimatosa y, como fue mencionado, fuerte proliferación de tejido conectivo con gran cantidad de eosinófilos. Las células de los lobulillos atróficos presentan una degeneración muy patente, convirtiéndose, algunas de ellas, en células alargadas, constreñidas y con núcleos pignóticos. Hay una importante hiperplasia folicular.

RESULTADOS

Pulmón

Presenta procesos enfisematosos focales junto a procesos atelectásicos. En estos lugares, aparece una fuerte infiltración eosinofílica, sobre todo en el tejido peribronquial, que se localiza no sólo en los interseptos, sino también en los alveolos (Fig. 20). En la luz del bronquio también se localiza un exudado muy rico en eosinófilos. En definitiva, se describe una bronconeumonía con componente eosinofílico muy patente.

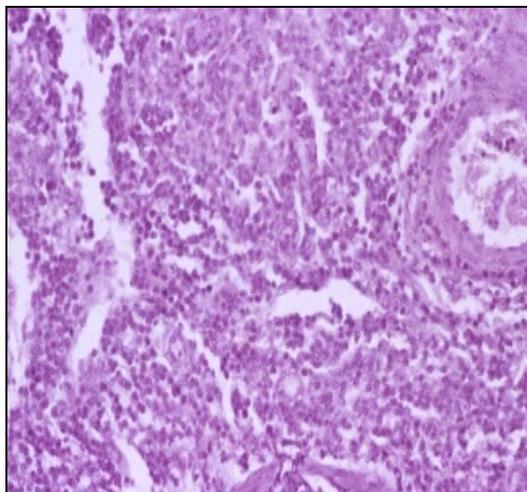


Fig. 20.- Fuerte infiltración eosinofílica en el tejido peribronquial y alveolar, con atelectasia (lote 6).

Ganglio

El parénquima ganglionar expone un aumento de nódulos linfáticos. En ellos, se denota un centro germinativo patente, con un fuerte infiltrado de células linfoides y macrófagos en el resto del parénquima. Es escasa la presencia de eosinófilos.

Bazo

El parénquima esplénico de este lote presenta características similares a los otros grupos inmunizados, es decir una hiperplasia nodular que permite la formación de auténticas mantas de linfocitos, junto a la presencia de un infiltrado linfocitario en las células de Birroch de la pulpa esplénica blanca.

RESULTADOS

Riñón

Se puede apreciar una leve tubulonefritis serosa y tubulonefrosis inespecífica.

Cerebro y ojo

Hubo leve proliferación de células de glia. El ojo no presentó ninguna alteración.

LOTE 7

Duodeno

La mucosa intestinal duodenal presenta un infiltrado que ocupa toda la mucosa. Dicho infiltrado está constituido sobre todo por linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y escasos eosinófilos. Al igual que en los anteriores lotes, la descamación epitelial es un hecho.

Yeyuno

Las modificaciones son similares que las observadas en duodeno. Apenas se hace evidente la presencia de eosinófilos, siendo llamativa la existencia de macrófagos en las zonas más apicales de dichas vellosidades (Fig. 21).

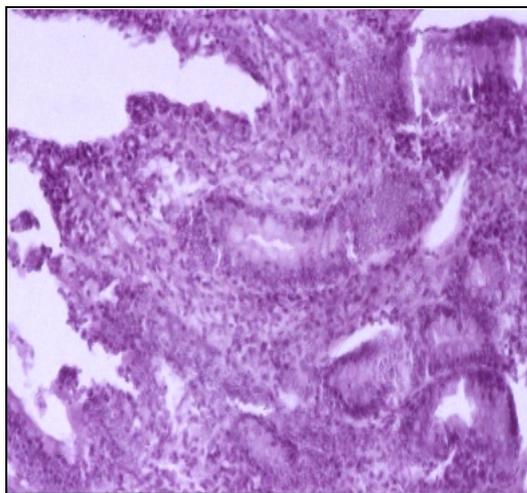


Fig. 21.- Mucosa del yeyuno de los cerdos del lote 7, con abundante infiltrado celular.

Intestino grueso

En esta zona, el infiltrado es relativamente moderado, con mayor presencia de células

RESULTADOS

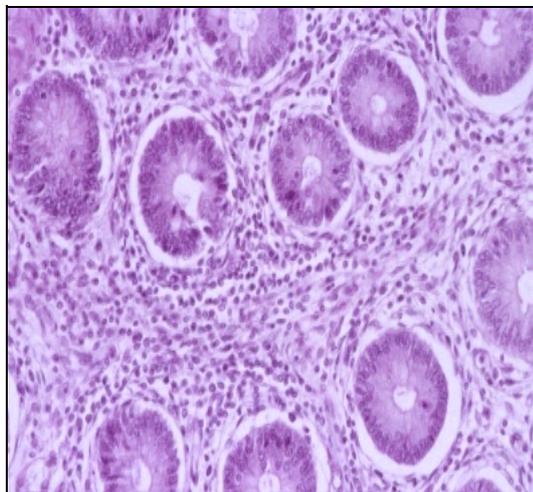


Fig. 22.- Tejido infiltrativo en la mucosa del intestino grueso de uno de los cerdos del lote 7.

fibroblásticas y macrófagos que en el intestino delgado (Fig. 22). Aunque, la presencia de eosinófilos y linfocitos es menor, la separación entre vellosidades es muy patente, apareciendo entre ellas un tejido conectivo, con una gran riqueza del sistema lagunar, lo que indica la presencia de un edema.

Hígado

El parénquima hepático se muestra muy similar a los lotes inmunizados anteriores, es decir, con una abundante infiltración, constituida por eosinófilos, linfocitos y algunos macrófagos. El tejido fibroblástico interlobulillar es muy abundante, con áreas donde sólo observamos este tipo de tejido, perdiendo la estructura normal o, en todo caso, encontrándose muy degenerado (Fig. 23). Existe, además, una fuerte proliferación canalicular. Hay áreas con hemorragias circunscritas por un tejido de granulación. Estas áreas se denominan “lagunas hemáticas” y se deben al paso de parásitos, encontrando

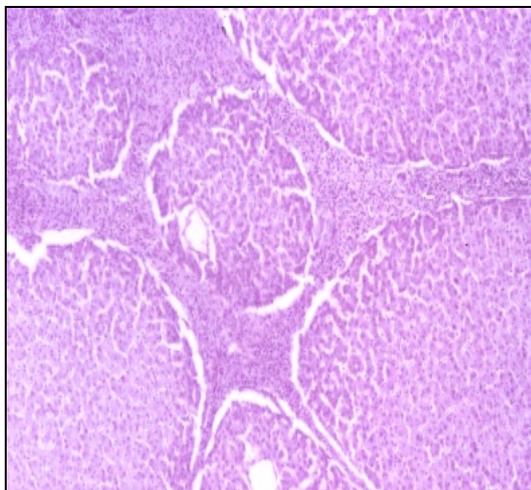


Fig. 23.- Tejido hepático del lote 7, con gran cantidad de tejido conectivo y células inflamatorias en la zona interlobulillar.

RESULTADOS

fundamentalmente, hematíes deformados y células en necrosis. Igualmente, se destaca la presencia de una degeneración turbia a nivel de hepatocitos.

Pulmón

El tejido respiratorio presenta áreas de enfisema junto a áreas de atelectasia, sobre

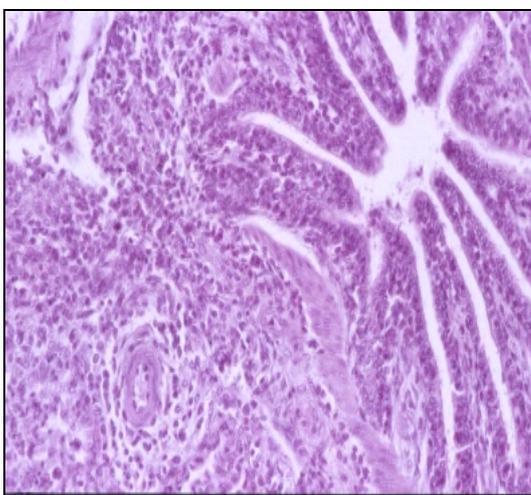


Fig. 24.- Detalle del tejido pulmonar, con fuerte infiltrado. Bronconeumonía crónica (lote 7).

todo en zonas peribronquiales, donde vemos un fuerte infiltrado eosinofílico, localizándose no sólo en ese espacio peribronquial, sino también en el propio epitelio del bronquio. En la luz epitelial se observan células infiltrativas. Los interseptos están aumentados de grosor, en los cuales, la barrera respiratoria se encuentra totalmente dañada. Se trata, en definitiva, de una bronconeumonía de carácter crónico (Fig. 24). No obstante,

hablamos de una cronicidad temprana, porque no aparece tejido fibroblástico sino infiltrativo, con células linfocitarias y macrófagos.

Ganglio

En este tejido nos encontramos una hiperplasia folicular muy patente, formando mantas de tejido linfoide en algunas áreas de los senos ganglionares.

RESULTADOS

Bazo

El parénquima esplénico se muestra similar al descrito en los animales del lote 6, es decir, hay esplenitis hiperplásica, en el que gran cantidad de nódulos linfáticos llegan a unirse unos a otros formando verdaderas mantas de tejido linfoide. En la pulpa blanca se presenta un infiltrado linfocitario con macrófagos en senos de Bilroch.

Riñón

En este caso, aparece una clara glomerulonefritis serosa, con una tubulonefrosis y presencia de material eosinofílico en la luz del sistema tubular, tanto en túbulos contorneados proximales como distales.

Cerebro y ojo

Los animales del lote 7 presentaron una ligera proliferación de glia y neuronofagia. El ojo no presentó alteraciones reseñables.

Tal y como señalábamos al inicio de la descripción histológica de las lesiones encontradas en los órganos de migración por las larvas de *A. suum*, en las tablas siguientes (tablas 18, 19 y 20), se resumen los cuadros histopatológicos más importantes en los distintos lotes de cerdos analizados.

RESULTADOS

Lote	Infiltrado	Tipo de células	Lesión característica
1	Nulo	-	-
2	Escaso +	Micróf.(+) Linfoc.(+) Eosinóf. Céls. Plasmát.	Descamación apical del epitelio
3	Moderado ++	Micróf.(+) Linfoc.(+) Eosinóf.(+) Céls. Plasmát.(+) Neutróf.(+)	Descamación del epitelio Pérdida parcial del epitelio
4	Escaso +	Micróf. Linfoc.(+) Eosinóf.(+) Céls. Plasmát.	Descamación Ligero edema
5	Fuerte +++	Micróf.(+) Linfoc.(+) Linfobl.(+) Eosinóf.	Descamación Pérdida parcial del epitelio
6	Muy fuerte ++++	Micróf.(+) Linfoc.(+) Linfobl.(+) Eosinóf.	Descamación Pérdida parcial del epitelio
7	Fuerte +++	Micróf.(+) Linfoc.(+) Céls. Plasmát.(+) Eosinóf.	Descamación Pérdida parcial del epitelio

Tabla. 18.- Esquema de la respuesta celular y lesiones anatomopatológicas en el intestino de los animales del ensayo de inmunización.

RESULTADOS

Lote	Infiltrado	Tipo de células	Granuloma parasitario	Lesión característica
1	Nulo	-	No	-
2	Escaso +	Linfoc.(+) Eosinóf. Fibrobl.	No	Ligera hepatitis parenquimatosa Ligera tumefacción turbia Ligera hiperplasia y edema canalicular
3	Escaso +	Macróf. Linfoc. Eosinóf.(+) Fibrobl.(+)	Sí	Degeneración turbia Hiperplasia canalicular
4	Moderado ++	Macróf. Linfoc.(+) Eosinóf.(+) Fibrobl.(+)	Sí	Degeneración turbia Hiperplasia canalicular Microtrombos Sust. amorfa y estruct. cristaloides en canaliculos
5	Fuerte +++	Macróf.(++) Linfoc.(++) Fibrobl.(+++) Eosinóf.(++)	No	Hiperplasia canalicular Tejido de granulación Aumento de céls. Kupffer Pseudogranulomas Atrofia de lobulillos Gran tejido fibroblástico
6	Fuerte +++	Macróf.(++) Linfoc.(++) Eosinóf. (+++) Fibrobl.(+++)	No	Hiperplasia canalicular Tejido de granulación Atrofia-degeneración lobulillos Gran tejido fibroblástico
7	Fuerte +++	Macróf.(++) Linfoc.(+) Eosinóf.(+++) Fibrobl.(+++)	No	Hiperplasia canalicular Tejido de granulación Atrofia-degeneración lobulillos Gran tejido fibroblástico Lagunas hemáticas

Tabla 19.- Esquema de la respuesta celular y lesiones histopatológicas en el hígado de los cerdos experimentales.

RESULTADOS

Lote	Infiltrado	Tipo de células	Lesión característica	Distribución del infiltrado
1	Nulo	-	-	-
2	Escaso +	Micróf.(+) Linfoc.(+) Eosinóf. Neutróf.	Moderado enfisema Aumento de interseptos	Zona peribronquial
3	Moderado ++	Micróf.(++) Linfoc.(++) Eosinóf.	Engrosamiento septal	Zona peribronquial
4	Moderado ++	Micróf.(+) Linfoc.(+) Neutróf.	Engrosamiento septal Enfisema Atelectasia	Eosinóf. en zona peribronquial y luz bronquial y otros elem en interseptos
5	Fuerte +++	Micróf.(++) Linfoc.(+) Eosinóf.(+++)	Neumonía focal Descamación epitelial Hiperplasia folículos linfoides peribronquiales Enfisema Atelectasia	Eosinóf. muy abundantes en zona peribronquial y zonas más centrales
6	Fuerte +++	Eosinóf. (+++)	Bronconeumonía Enfisema Atelectasia	Zona peribronquial Alveolos
7	Fuerte +++	Micróf.(++) Linfoc.(++) Eosinóf.(+++)	Bronconeumonía Enfisema Atelectasia	Zona peribronquial Epitelio

Tabla. 20.- Esquema de la respuesta celular y lesiones histopatológicas en el pulmón de los animales del ensayo de inmunización.

RESULTADOS

IV.4.6.- Estudio inmunohistoquímico.

Uno de los principales objetivos de esta tesis es establecer la localización fundamental de los diferentes componentes antigénicos de *A. suum*, tanto adultos como larvarios, así como una serie de proteínas aisladas del propio parásito. Con este conocimiento, podremos intentar clarificar ciertos aspectos patogénicos, así como los componentes inmunomediados de muchas de las lesiones halladas tras la migración parasitaria en el hospedador natural, el cerdo.

IV.4.6.1.- Depósito de antígenos en hígado.

La Fig. 24b intenta esquematizar la distribución principal de los diferentes antígenos analizados en el tejido hepático porcino, independientemente del tratamiento a que fueron sometidos cada uno de los lotes del estudio. Como se puede comprobar, en general el ESL se localizó a nivel de colangiololes, mientras que el otro antígeno larvario, el ASL se dispone en conductos biliares y tejido conectivo. En esta última localización, es donde se han hallado la mayor

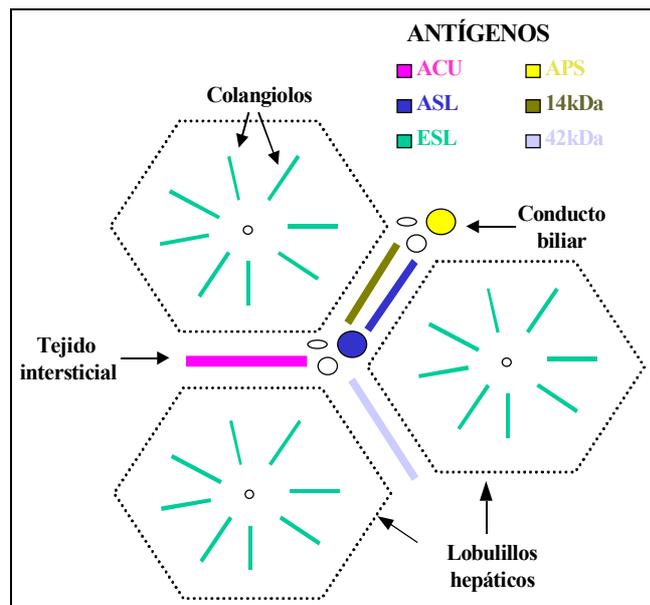


Fig. 24b.- Dibujo esquemático del tejido hepático de los cerdos analizados, con la localización inmunohistoquímica de diferentes antígenos de *A. suum*.

RESULTADOS

cantidad de antígenos de *A. suum*, incluyendo además del ya mencionado, al ACU y las proteínas de 14 y 42 kDa. A nivel de conductos biliares y en algunos macrófagos, también se detectaron ciertos depósitos de APS. La proteína de 97 kDa apenas fue detectada en el hígado de ninguno de los animales del estudio, salvo los cerdos del lote 6, y en ellos en escasa cantidad.

En la tabla 21, se representan los resultados del estudio inmunohistoquímico realizado en el hígado, según los diferentes lotes del estudio.

ESTRUCTURA HEPÁTICA				
LOTE	Colangiolo	Conducto biliar	Tejido intersticial	Trayecto parasitario
1	-	-	-	-
2	ESL	APS	ACU / ASL / 14kDa / 42kDa	APS
3	-	APS / ESL	ESL / 42kDa	-
4	ESL	APS	ACU / 42kDa	-
5	-	APS / ASL	ACU / ASL / 14kDa / 42kDa	-
6	ESL	APS	ACU / ASL / 14kDa / 42kDa	-
7	-	-	ACU / ASL / 42kDa	-

Tabla 21.- Distribución de los principales antígenos analizados en el tejido hepático, en función de los distintos lotes del estudio.

Analizando, en detalle, los resultados obtenidos por cada antígeno:

RESULTADOS

IV.4.6.1.1.- Antígeno pseudocelómico de adultos.

En el parénquima hepático de los cerdos sometidos únicamente al reto, es decir, del lote 2, se observa una reacción inmunohistoquímica positiva en las áreas de reacción

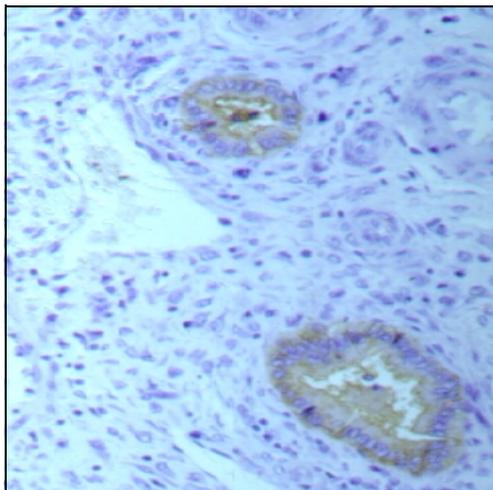


Fig. 25.- Depósito de APS en conductos biliares del tejido hepático en el lote 5.

fibroblástica, especialmente a nivel de los conductos biliares del espacio de Kiernan. Dicha reacción viene caracterizada por una positividad marcada, tanto a nivel de las células epiteliales, fundamentalmente en su porción apical como, en algunas de ellas, en zonas perinucleares. Igualmente se evidencia, como ya se ha mencionado, reacción nítida en la luz de los conductos biliares. En el resto de las estructuras, bien fibroblásticas o vasculares del espacio de Kiernan, no se observa reacción alguna.

Sin embargo, se han detectado ciertas reacciones de positividad en el interior del lobulillo hepático y en concreto en aquellas zonas de trayecto parasitario ya que existe una reacción linfocitaria y macrofágica, siendo en estos últimos donde se visualiza positividad inmunohistoquímica al APS. En resumen, se puede decir que en el lote 2 la reacción inmunohistoquímica al antígeno pseudocelómico muestra una especificidad localizada, fundamentalmente, a nivel de los conductos biliares de la triada portal y, parcialmente, en macrófagos de trayectos intralobulillares.

En el caso de los cerdos re infectados semanalmente (lote 3), y los que además fueron tratados con pirantel (lote 4), el estudio inmunohistoquímico del depósito de

RESULTADOS

APS mostró reacción positiva exclusivamente en la zona apical de los conductos biliares portales. Si bien, y como se estudiará más adelante, el grupo de animales del lote 3 mostraron leve positividad solamente frente al APS y la proteína de 42 kDa.

Los cerdos de los lotes inmunizados 5 y 6 muestran una reacción positiva frente al APS (Fig. 25 y 26), localizada casi exclusivamente en los conductos biliares hiperplasiados



Fig. 26.- Detección de APS en conductos biliares del hígado en el lote 6.

de la triada portal. Esta reacción se detecta en el epitelio biliar, tanto en la superficie de las células, donde la reacción es más intensa, como en las propias células epiteliales. Además, algunos macrófagos resultaron positivos a este antígeno. En el caso del lote 7, no se detectó reacción inmunohistoquímica positiva frente al APS.

Finalmente, los animales control del lote 1 mostraron una total negatividad inmunohistoquímica frente a este antígeno.

IV.4.6.1.2.- Antígeno cuticular de adultos.

En el grupo de cerdos control del lote 2, la reacción inmunohistoquímica se detecta, casi exclusivamente en áreas fibroblásticas perilobulillares (Fig. 27). Dentro de estas áreas, se evidenció una reacción positiva en el espacio intersticial próximo a

RESULTADOS

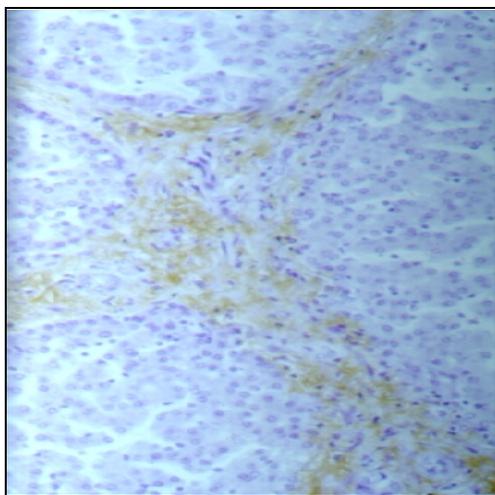


Fig. 27.- Detalle del hígado del lote 2, con depósito de ACU en tejido conectivo.

elementos fibroblásticos. Dicha reacción es más patente cuanto más reacción fibroblástica se presenta, teniendo en cuenta que se circunscribe a las zonas portales, no habiéndose encontrado reacción alguna en los trayectos parasitarios intralobulillares.

En los lotes re infectados, y especialmente en el lote 4, se detecta una reacción positiva al ACU en el tejido fibroblástico, fundamentalmente

periarterial y pericanalicular. Dicha reacción es localizada a nivel del tejido intersticial intercelular, tanto en áreas con reacción fibroblástica como de estructuras

más tempranas o agudas con elementos linfocitarios y macrofágicos.

En los tres lotes inmunizados, se observa una reacción positiva frente al ACU en las zonas fibroblásticas (Fig. 28).

Es de resaltar que, este antígeno es, junto al ASL y la proteína de 42 kDa, los únicos evidenciables en el grupo de animales inmunizados con la proteína de 97 kDa (lote 7). No obstante, esta

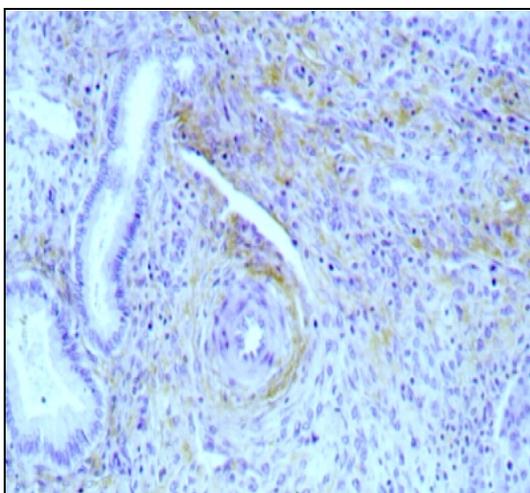


Fig. 28.- Reacción positiva al ACU, en el tejido fibroso intersticial hepático del lote 5.

RESULTADOS

reacción presenta una leve intensidad y es visualizada sobre todo, a nivel de la sustancia fundamental del tejido fibroblástico. Los animales del lote control 1 fueron, en todos los casos, negativos a este antígeno.

IV.4.6.1.3.- Antígeno somático de larvas.

La reacción que se detecta en los cerdos del lote 2 frente al ASL es patente principalmente, en las áreas fibroblásticas portales, tanto en aquellas zonas en que la reacción fibrosa es muy significativa como en zonas ocupadas principalmente por elementos linfocitarios y macrofágicos. No obstante, en las proximidades a los fibroblastos, la reacción es más patente y, más concretamente, en las áreas reactivas periféricas a los conductos biliares hiperplasiados.

En los dos lotes re infectados semanalmente (lotes 3 y 4), no se observó reacción positiva frente a este antígeno. Por último, sí se observó positividad inmunohistoquímica al ASL

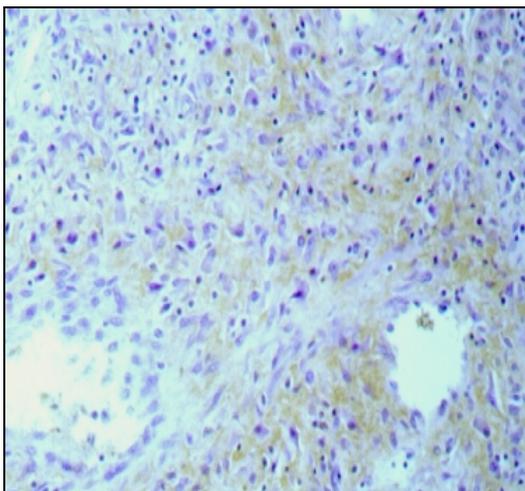


Fig. 29.- Depósito del ASL en el tejido hepático de los cerdos del lote 6.

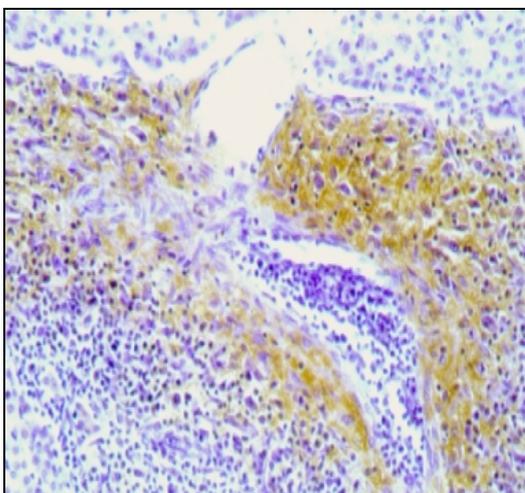


Fig. 30.- Reacción positiva al ASL en los trayectos migratorios del tejido hepático (lote 7).

RESULTADOS

en los lotes inmunizados. Esta reacción se detecta de un modo moderado en el lote 5, tanto en la sustancia intersticial de las áreas fibroblásticas, como en el epitelio canalicular biliar. Casi de forma exclusiva, el ASL se detecta en la sustancia fundamental de los lotes 6 (Fig. 29) y lote 7 (Fig. 30).

IV.4.6.1.4.- Antígeno excretor secretor de larvas.

Este antígeno se caracteriza porque sus depósitos se han localizado sobre todo, en colangiolo. En el caso de los animales encuadrados dentro del lote 2 (Fig. 31), efectivamente la detección inmunohistoquímica de este antígeno ha sido a nivel de la red de colangiolo, no apareciendo depósitos en ninguna otra zona hepática. En esta reacción no participa grupo celular alguno, puesto que, como hemos mencionado, solo aparece en las luces colangioloares.

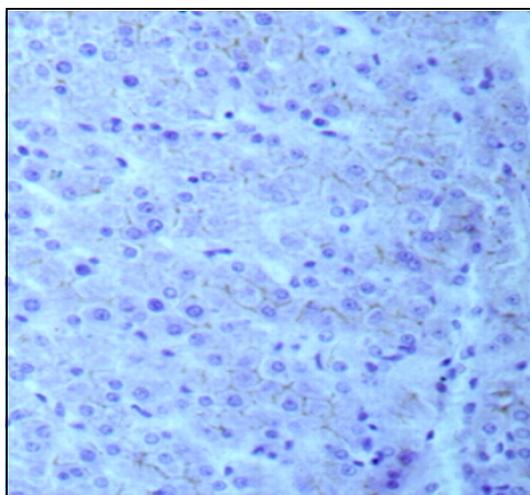


Fig. 31.- Detección inmunohistoquímica positiva al ESL en colangiolo en el hígado de los cerdos del lote 2.

En los animales reinfectados (Fig. 32 y 33), especialmente en el caso del lote 4, se detecta de forma evidente una reacción positiva en la luz de colangiolo, de forma similar a la observada en los cerdos del lote 2, si bien en el lote 3 también aparece reacción positiva en la luz de conductos biliares. Por su parte, es de destacar la reacción inmunohistoquímica de este antígeno en el lote 6 (Fig. 34), encontrándose, como anteriormente, en la luz de colangiolo.

RESULTADOS

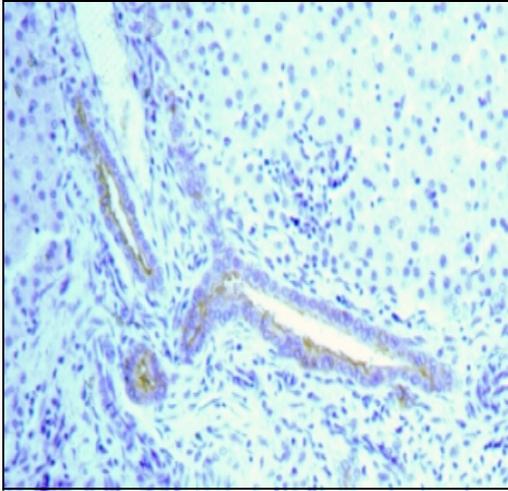


Fig. 32.- Depósitos de ESL en conductos biliares en el hígado de los cerdos del lote 3.

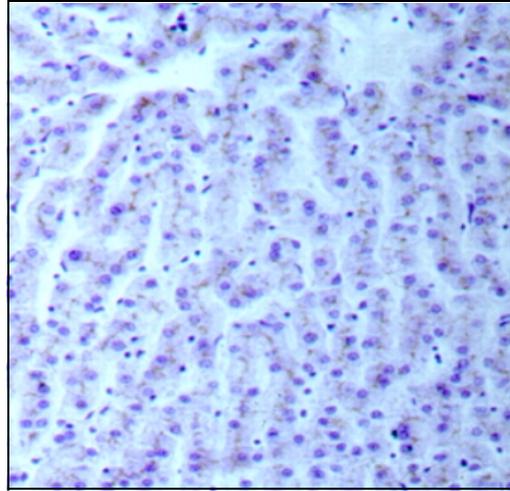


Fig. 33.- Reacción inmunohistoquímica positiva al ESL en colangiolos del tejido hepático de los cerdos del lote 4.

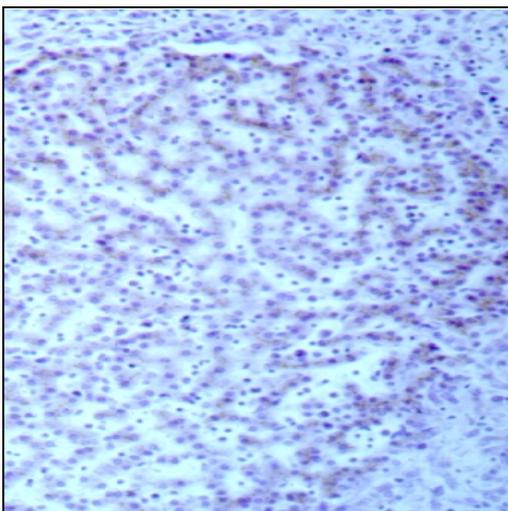


Fig. 34.- Depósitos de ESL en colangiolos hepáticos en los cerdos del lote 6.

Los cerdos del lote control 1 no mostraron, en ningún caso, reacción positiva al ESL.

IV.4.6.1.5.- Antígenos de las fracciones inmunizantes de 14, 42 y 97 kDa.

La visualización del depósito de estas 3 proteínas en el tejido hepático en los cerdos del lote 2 ha mostrado dos hechos significativos; por un lado que ante la proteína de 97 kDa no se ha presentado

reacción positiva alguna y que las otras dos se han evidenciado de forma exclusiva en las áreas de reacción fibroblástica, en el espacio intercelular y próxima a

RESULTADOS

fibroblastos y fibrocitos.

Además, se observa, de forma evidente, que la proteína de 14 kDa (Fig. 35) se presenta con menor intensidad que la de 42 kDa (Fig. 36).

En el caso de los animales de los lotes que habían sido reinfectados semanalmente (lotes 3 y 4), es la proteína de 42 kDa la que se encuentra depositada de forma más clara en la región conectiva-fibroblástica pericanalicular (Fig. 37).

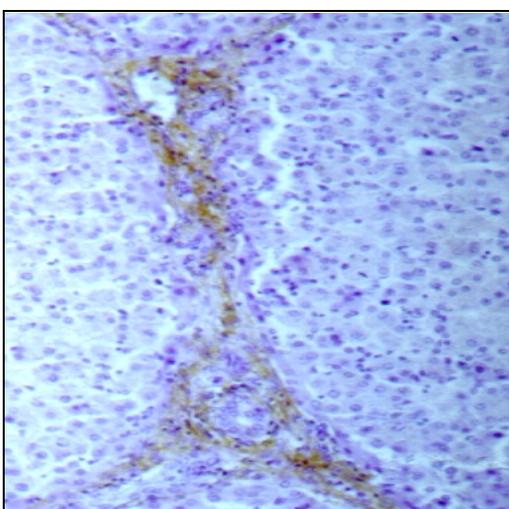


Fig. 35.- Depósito de la fracción de 14 kDa en el tejido conectivo hepático de los cerdos del lote 2.

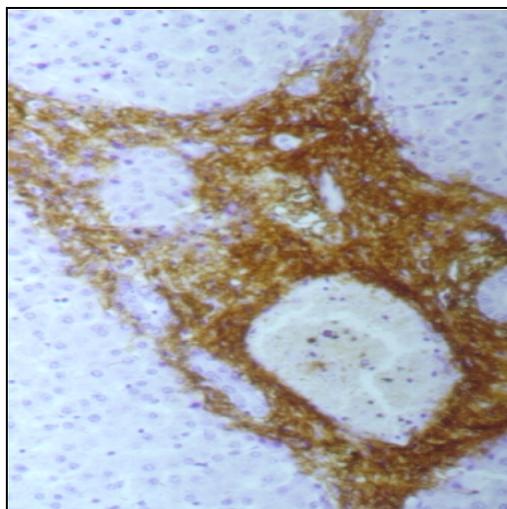


Fig. 36.- Fuerte reacción positiva a la proteína de 42 kDa en zona pericanalicular y conectiva del hígado de los cerdos del lote 2.

En los lotes inmunizados, concretamente en los animales del lote 5, se observa una reacción moderada al intentar visualizar el depósito de la proteína homóloga (14 kDa), teniendo en cuenta que su localización principal es en áreas de tejido fibroso. En este mismo lote, la reacción al detectar la fracción de 42 kDa es extremadamente fuerte (Fig. 38), quizás la más intensa de entre las encontradas en

RESULTADOS

este estudio y localizada igualmente, a nivel del área fibroblástica perilobulillar. Lo mismo ocurre en el tejido hepático de los cerdos del lote 6, donde se evidencia de forma muy clara el depósito de la fracción de 14 kDa y, sobre todo de la proteína homóloga de 42 kDa (Fig. 39). Esta última proteína es igualmente visualizada en el tejido hepático fibrótico de los animales del lote 7.

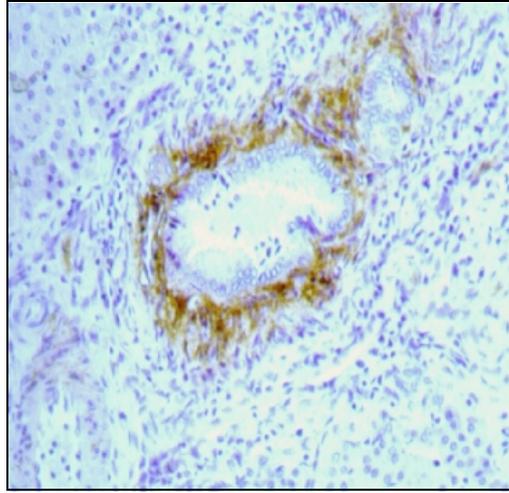


Fig. 37.- Depósitos de la proteína de 42 kDa en zona pericanalicular de los cerdos del lote 6.

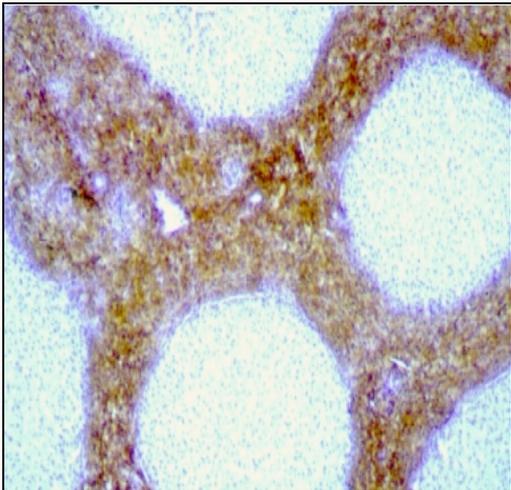


Fig. 38.- Amplio depósito de la fracción de 42 kDa en el tejido conectivo hepático, en el lote 5.

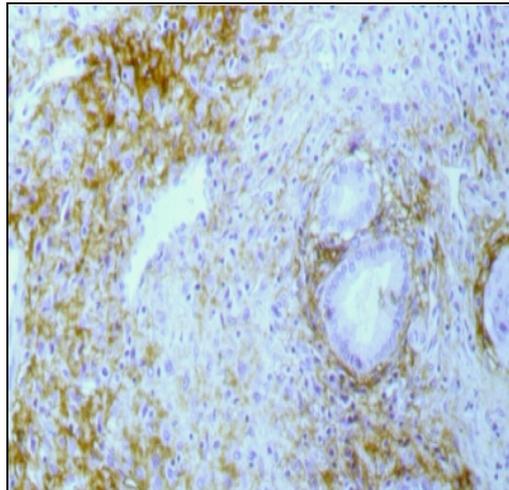


Fig. 39.- Reacción inmunohistoquímica positiva a la fracción de 42 kDa en los cerdos del lote 6.

RESULTADOS

IV.4.6.2.- Depósito de antígenos en pulmón.

En los animales del lote 2, sometidos únicamente al reto, se observa una reacción moderada en cuanto a la detección del APS. Dicha reacción se detecta a nivel del epitelio bronquial, y más concretamente en su borde apical. Por el contrario, la detección del ACU (Fig. 40) en estos mismos animales no sólo aparece en el epitelio bronquial, sino además en el tejido peribronquial, en la sustancia fundamental del tejido conectivo y en el tejido periarterial e intersticial del lobulillo respiratorio. Un hecho muy similar ocurre con la ubicación del antígeno somático larvario (ASL), cuya

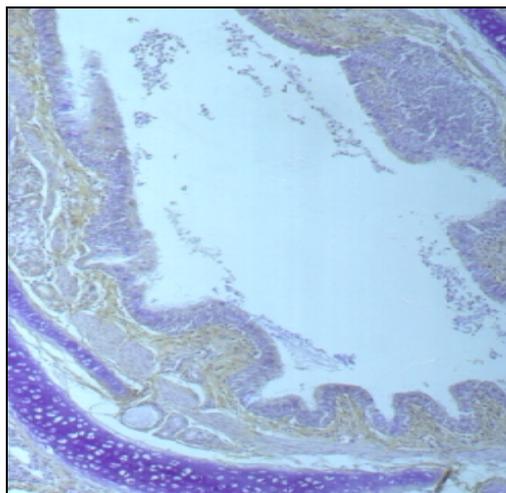


Fig. 40.- Reacción positiva al ACU en el tejido peribronquial de los cerdos del lote 2.

reacción es más manifiesta en el tejido peribronquial. Por último, en este mismo lote 2 y en cuanto a la detección de los diferentes antígenos vacunales, todos ellos son detectados en el tejido peribronquial, siendo el de 42 kDa (Fig. 41) el que presenta mayor intensidad y cantidad de depósito.

Respecto a los lotes re infectados (3 y 4), se ha detectado reacción, de leve a moderada, frente a los antígenos larvarios y al ACU. Respecto a este último, se encuentra localizado de forma muy tenue a nivel del tejido conectivo intersticial peribronquial y del lobulillo respiratorio, hecho similar al que ocurre con el ASL, si bien este antígeno es más patente en el tejido conectivo interlobulillar y de la adventicia de los vasos arteriolares. El ESL es el único que se manifiesta de forma

RESULTADOS

leve en el lote 4 (Fig. 42), ubicándose en la zona apical del epitelio bronquial.

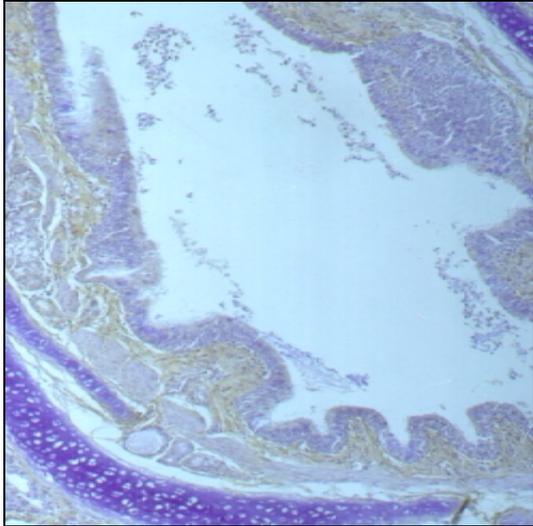


Fig. 41.- Reacción positiva a la fracción de 42 kDa en el tejido pulmonar de los cerdos del lote 2.

Respecto a los antígenos vacunales, se detecta reacción positiva tan sólo en el caso de la proteína de 14 kDa y, especialmente, en la reacción granulomatosa interlobulillar.

Como muestra la Fig. 43, se detectó reacción en el corte sagital de una larva.

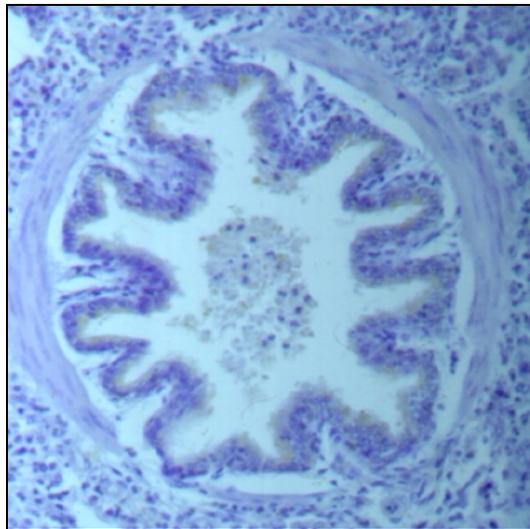


Fig. 42.- Depósito de ESL en la luz bronquial de los cerdos del lote 4.

RESULTADOS

Por último, y en cuanto al estudio del parénquima pulmonar de los animales sometidos a inmunización con las proteínas de 14, 42 y 97 kDa, se ha detectado

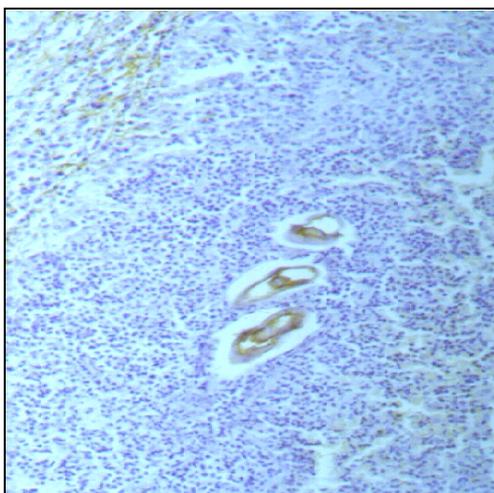


Fig. 43.- Reacción positiva a la proteína de 14 kDa en las estructuras larvarias cortadas a nivel pulmonar de un cerdo del lote 3.

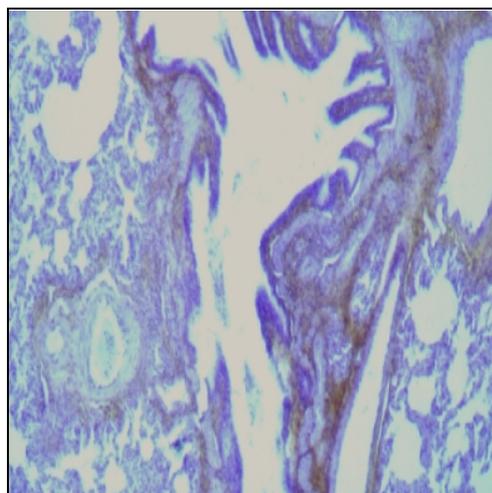


Fig. 44.- Reacción positiva a la proteína de 42 kDa, en el pulmón de los cerdos del lote 6.

reacción positiva frente al APS y al ACU, sobre todo a nivel de los granulomas parasitarios, así como en el epitelio bronquial. Por su parte, al analizar el depósito de las propias proteínas, tanto homólogas como heterólogas, se detectan reacciones de positividad en el tejido intersticial peribronquial, especialmente al analizar el depósito de la proteína de 42 kDa (Figs. 44 y 45).

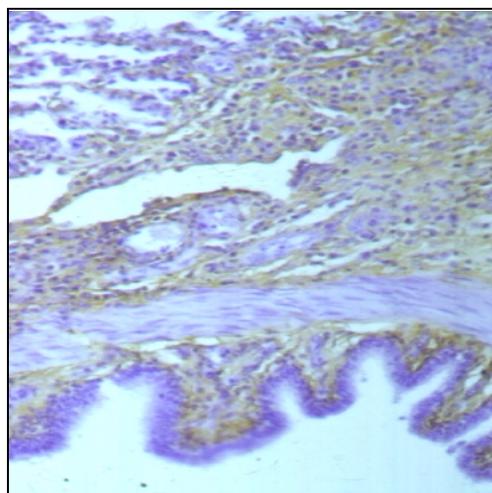


Fig. 45.- Depósito de la fracción de 42 kDa en los cerdos del lote 5.

RESULTADOS

Es de resaltar que la proteína de 97 kDa apenas ha sido detectada en ninguno de los animales objeto de este estudio.

El depósito de los diferentes antígenos en el pulmón de los lotes experimentales queda esquematizado en la tabla 22.

LOTES	ESTRUCTURAS PULMONARES		
	Epitelio bronquial	Tejido peribronquial	Tejido conectivo interlobulillar
1	-	-	-
2	APS/ACU	ACU/ASL/14kDa/42kDa	ACU
Reinfectados (3 y 4)	ESL	ACU/ASL	ACU/14kDa
Inmunizados (5, 6 y 7)	-	APS/ACU/14kDa/42kDa	-

Tabla 22.- Distribución de los principales antígenos analizados en el tejido pulmonar, en los distintos lotes del estudio.

IV.4.6.3.- Depósito de antígenos en intestino.

La demostración inmunohistoquímica de antígenos en la mucosa intestinal de los animales del lote 2, los cuales no han recibido ningún tipo de tratamiento previo al reto, no ha revelado la existencia de depósitos de ninguno de los 7 antígenos analizados.

En cambio, en los animales reinfectados semanalmente (lote 3) se detectó reacción positiva en el caso del ACU (Fig. 46), la cual se localizó en la sustancia fundamental de la lámina propia intestinal. En los cerdos reinfectados y tratados (lote

RESULTADOS

4), también se detectó reacción positiva frente al ACU y además, frente al ESL. En ambos casos, la reacción estuvo localizada de forma patente, en la lámina propia y de forma moderada, en el epitelio de la mucosa. En ambos lotes, la demostración de depósitos pertenecientes a las proteínas vacunales, mostró resultado positivo frente a las 3 fracciones, fundamentalmente a nivel de la lámina propia intestinal. Las proteínas de 42 (Fig. 47) y 97 kDa fueron las que mayor reacción desencadenaron.

En los animales vacunados con la proteína de 14 kDa (lote 5) y con la de 42 kDa (lote 6), se detectó reacción frente al ACU y APS, teniendo en cuenta que la reacción al ACU fue a nivel del tejido conectivo de la lámina propia, mientras que el APS se observó fundamentalmente en el epitelio de la mucosa intestinal.

Finalmente, en el tejido intestinal del lote 7 se encontró, como

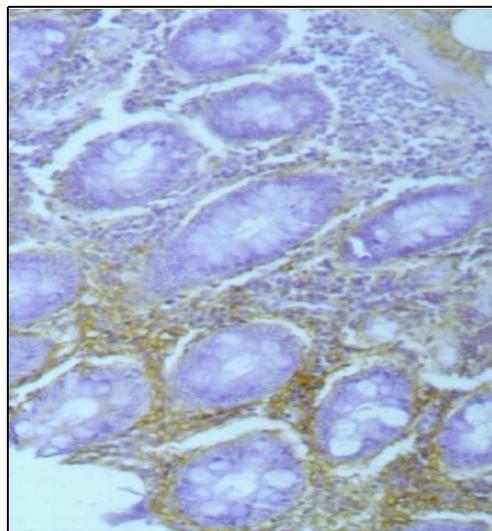


Fig. 46.- Reacción positiva al ACU en el intestino grueso de los cerdos del lote 3.

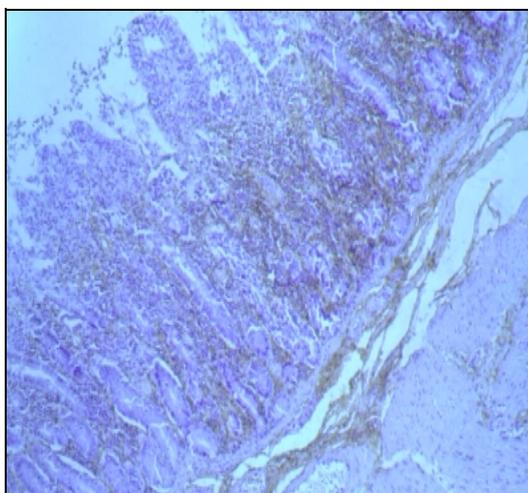


Fig. 47.- Zonas de reacción positiva a la proteína de 42 kDa en el yeyuno de los cerdos del lote 3.

RESULTADOS

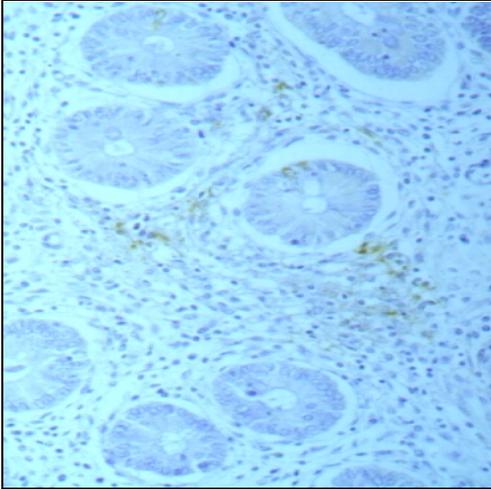


Fig. 48.- Reacción inmunohistoquímica positiva al ACU en la mucosa intestinal de los cerdos del lote 7.

El resumen de la distribución y depósito de los diferentes antígenos en la mucosa intestinal, queda reflejado en la tabla 23.

en los 2 anteriores, reacción positiva al ACU (Fig. 48) en la sustancia fundamental de la lámina propia y en macrófagos, y también reacción al APS (Fig. 49), en las zonas erosionadas del epitelio intestinal. Por último, se detectó una reacción leve al ESL, sobre todo en zonas epiteliales que no han sido erosionadas. La fracción de 42 kDa fue patente en la lámina propia de estos animales, sobre todo, en los cerdos pertenecientes al lote 6.

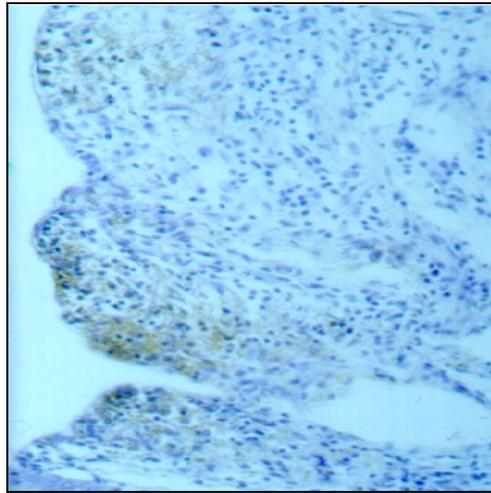


Fig. 49.- Reacción positiva al APS, en el intestino grueso de los cerdos del lote 7.

RESULTADOS

ESTRUCTURAS INTESTINALES		
LOTE	Lámina propia	Epitelio intestinal
1	-	-
2	-	-
Reinfectados (3 y 4)	ACU/ESL/42kDa/97kDa	ACU/ESL
Inmunizados (5, 6 y 7)	ACU/42kDa	APS/ESL

Tabla 23.- Distribución de los principales antígenos analizados en el tejido intestinal, en los distintos lotes del estudio.

IV.4.6.4.- Depósito de inmunocomplejos mediante detección de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM).

El estudio inmunohistoquímico se completa con la detección de inmunocomplejos en los órganos ubicados en la ruta migratoria de las larvas de *A. suum*, mediante detección inmunohistoquímica de inmunoglobulinas porcinas, tanto IgG, como IgA, como IgM.

Con el fin de establecer las condiciones idóneas de trabajo, se probaron diferentes diluciones de anticuerpo primario, así como distintos tiempos de incubación. En los casos de IgG e IgM, el anticuerpo secundario fue suministrado en el kit utilizado y descrito en el apartado III.11.2.2, pero en el caso de IgA, también se probaron distintas diluciones de anticuerpo secundario con el fin, como ya se ha mencionado, de establecer las condiciones más fiables en la realización de la técnica.

En los animales del lote 2, se evidenció reacción positiva a IgA a nivel de la mucosa intestinal y del hígado (Fig. 50 y 51).

RESULTADOS

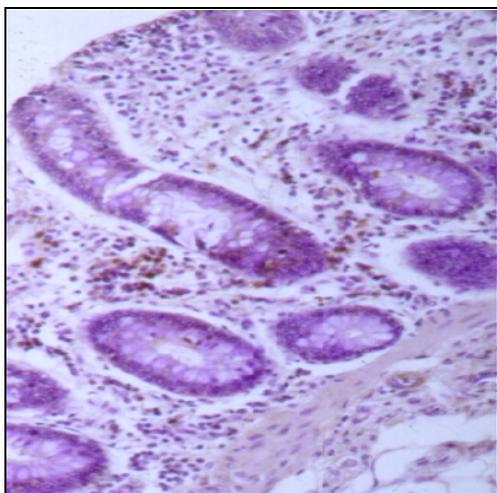


Fig. 50.- Detección de IgA en la mucosa intestinal de los cerdos del lote 2.

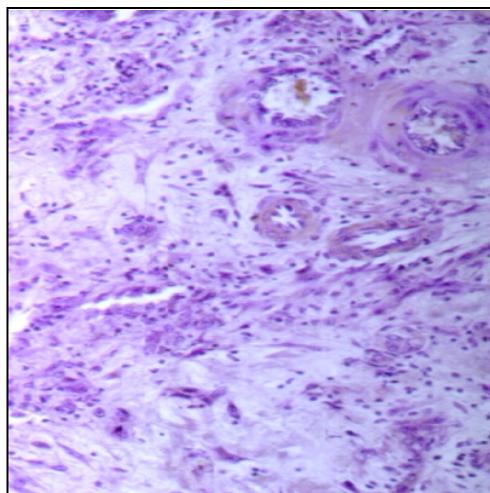


Fig. 51.- Reacción positiva a IgA, en las arteriolas del tejido hepático de los cerdos del lote 2.

En el caso de la mucosa intestinal, se encontró una reacción leve en el epitelio de las glándulas intersticiales, mientras que en el parénquima hepático apareció una reacción escasa a nivel de la luz de las arteriolas del sistema portal.

Los lotes reinfectados (lotes 3 y 4), fueron los únicos, junto a los cerdos del lote 6, en los que pudo detectarse reacción positiva a IgG, especialmente a nivel del epitelio de la mucosa intestinal, tanto en la zona apical como en las células linfocitarias de la lámina propia. También hubo depósitos de IgG a nivel del parénquima pulmonar (Fig. 52). No obstante, fue más patente la detección de IgA, tanto en intestino (Fig. 53) como en pulmón (Fig. 54). Fue especialmente a este último nivel, donde se evidenciaron depósitos de inmunoglobulina en las células epiteliales que revisten el lobulillo respiratorio. Igualmente, apareció reacción positiva a IgA en células linfoblásticas localizadas en el tejido peribronquial (Fig. 54).

RESULTADOS

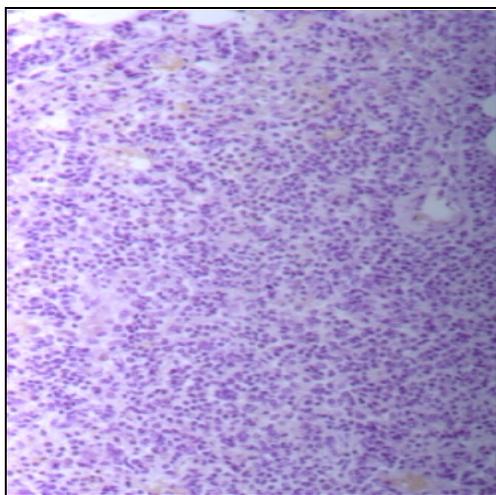


Fig. 52.- Leves depósitos de IgG en el tejido pulmonar en los cerdos del lote 4.

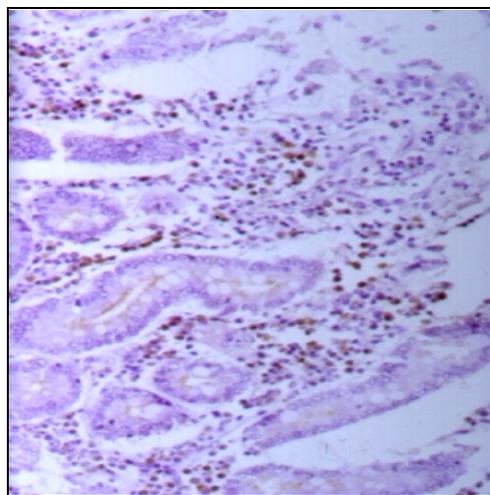


Fig. 53.- Mucosa duodenal de los cerdo del lote 3, con células plasmáticas positivas a IgA.

La IgA también fue detectada en pulmones de animales sometidos a la inmunización con las proteínas de 14, 42

y 97 kDa. En los cerdos del lote 5, la localización fue a nivel de la zona apical de las células epiteliales, así como en células linfoblásticas del intersepto alveolar, apareciendo en algunos casos, en células macrofágicas. Un hecho similar ocurre en el grupo de animales del lote 6, con detección de IgA a nivel del intersepto, fundamentalmente en macrófagos y en la luz y epitelio bronquial (Fig. 55 y 56). En estos cerdos,

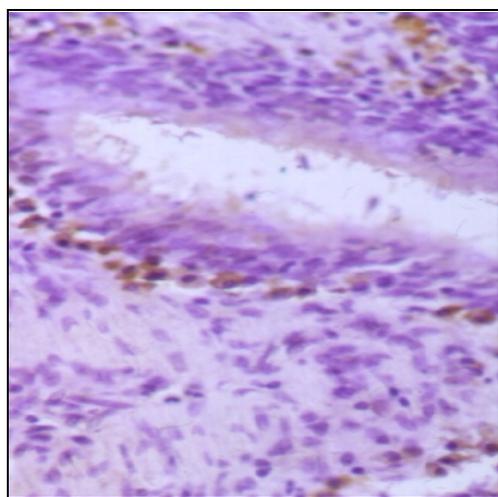


Fig. 54.- Detalle de zona peribronquial de los cerdos del lote 4, con células plasmáticas positivas a IgA.

RESULTADOS

además, se detecta de forma evidente depósitos de IgA a nivel del epitelio de la

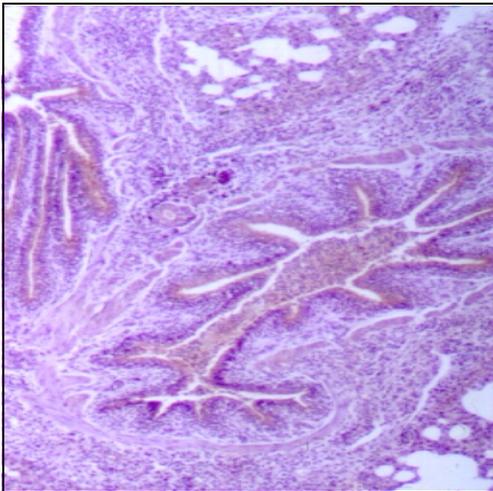


Fig. 55.- Reacción positiva a IgA en la luz bronquial de los cerdos del lote 6.

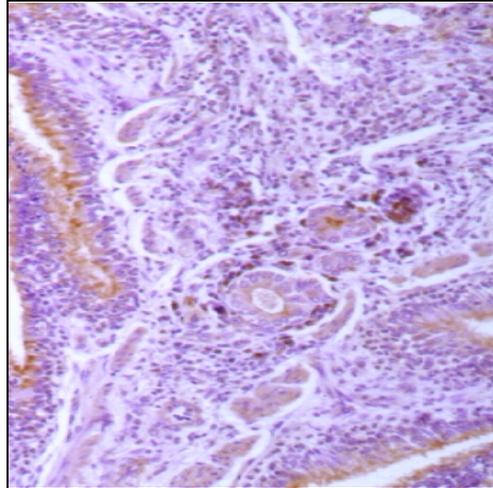


Fig. 56.- Reacción positiva a IgA en células plasmáticas, interseptos y luces bronquiales en los cerdos del lote 6.

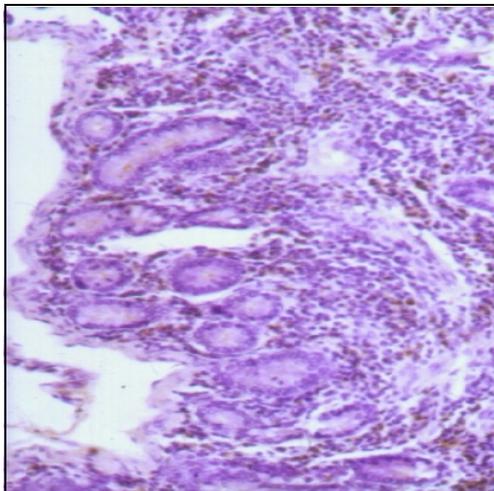


Fig. 57.- Células linfoblásticas y tejido intersticial intestinal positivo a IgA, en cerdos del lote 6.

mucosa intestinal y en células macrofágicas y linfoblásticas de la lámina propia (Fig. 57). En estos animales se detectan, igualmente, ciertos depósitos de IgG en el intersepto pulmonar (Fig. 58). Por último, en los cerdos del lote 7 se observa presencia de IgA en el epitelio bronquiolar, así como en el tejido peribronquial (Fig. 59). En el intestino de estos mismos animales la reacción es leve

RESULTADOS

y cuando se detecta, se circunscribe al epitelio entérico.

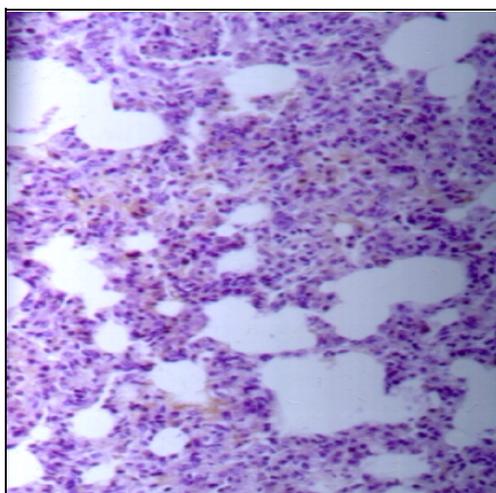


Fig. 58.- Depósitos leves de IgG en el tejido pulmonar de los cerdos del lote 6.

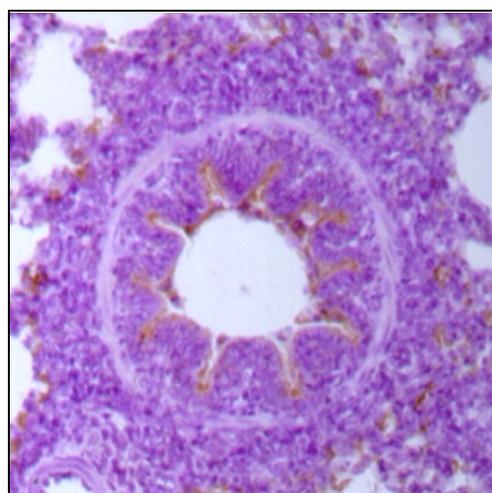


Fig. 59.- Reacción inmunohistoquímica positiva a IgA en luz bronquial y células linfoblásticas de los cerdos del lote 7.

IV.4.7.- Estudios zootécnicos.

IV.4.7.1.- Influencia en la ganancia de peso de los animales.

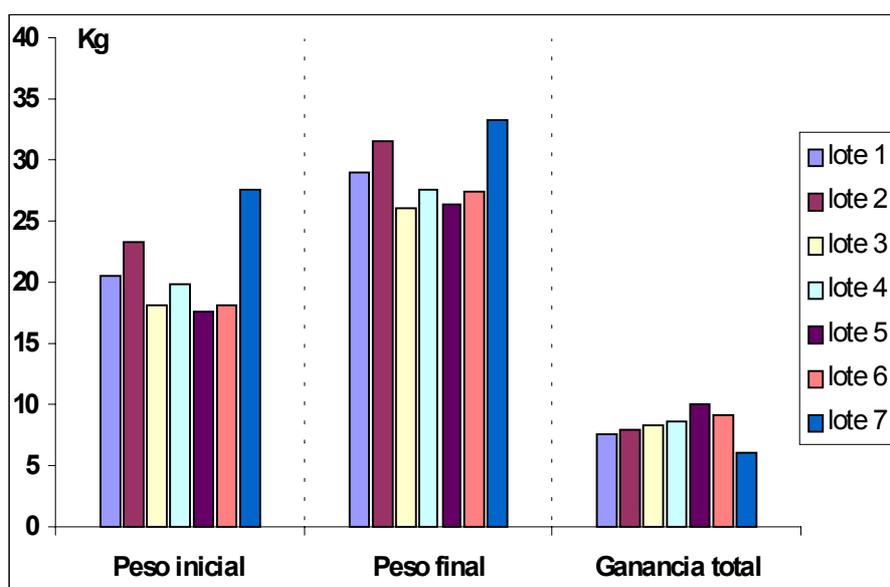
Como es obvio, el último objetivo del control parasitario en las explotaciones porcinas es, fundamentalmente prevenir el daño económico que suponen los parásitos. Por este motivo, planteamos determinar la influencia de los diferentes tratamientos antigénicos, instaurados en el protocolo experimental sobre la ganancia de peso, de forma que pueda comprobarse el crecimiento medio de cada cerdo desde el día 0 hasta el sacrificio, respecto al crecimiento de los cerdos control según cada grupo de edad.

El resultado de los parámetros productivos realizados en este estudio se muestra en la tabla 24 y en la gráfica 21.

RESULTADOS

PARAMETROS PRODUCTIVOS				
LOTES	Peso inicial (Kg)	Peso final (Kg)	Ganancia total	Ganancia media diaria
1	20.46±10.15	28.93±8.89	7.52±3.08	0.1534
2	23.36±10.30	31.50±7.69	7.93±3.53	0.1618
3	18.06±8.14	26.03±7.15	8.30±2.03	0.1693
4	19.80±7.13	27.56±3.80	8.61±2.06	0.1757
5	17.60±6.66	26.43±4.65	9.97±3.12	0.2167
6	18.06±6.63	27.46±5.50	9.10±2.35	0.1857
7	27.56±14.40	33.36±8.24	6.10±5.47	0.1244

Tabla 24.- Parámetros productivos de los diferentes lotes del estudio (media ± desviación estándar).

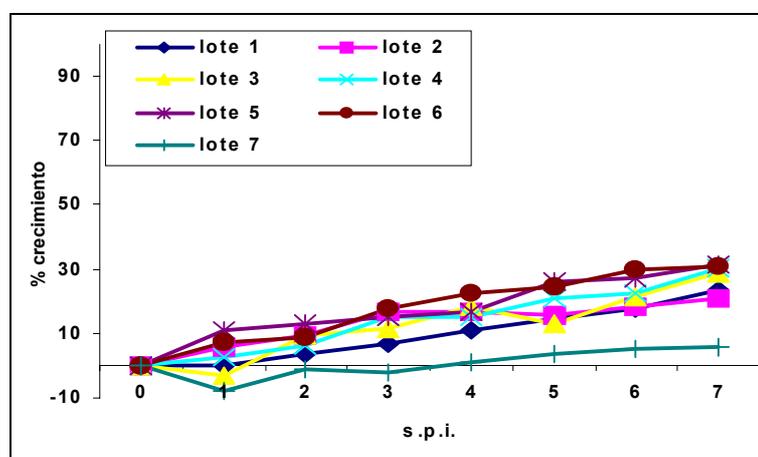


Gráfica 21.- Representación gráfica de los parámetros productivos en los diferentes lotes.

RESULTADOS

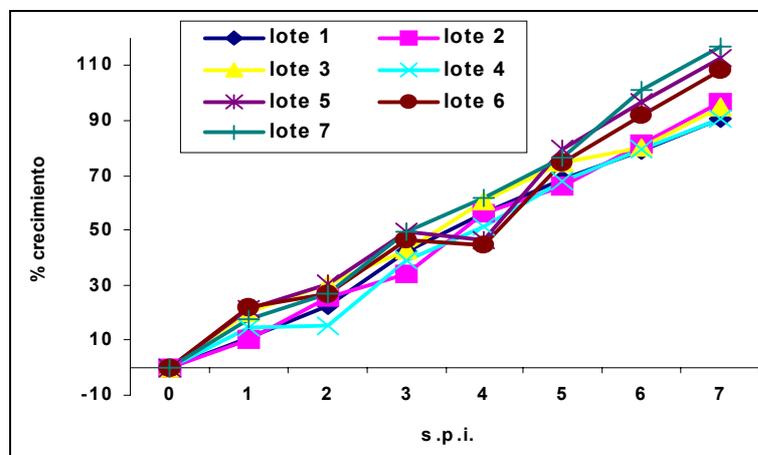
No obstante, y con el fin de realizar una óptima comparación de dichos resultados entre los distintos lotes, decidimos analizar los datos en forma de porcentaje (%) de ganancia de peso a partir del día 0 del estudio. En las gráficas 22a (viejos) y 22b (jóvenes) se muestran las evoluciones temporales en cuanto a los porcentajes medios en la ganancia de peso de los diferentes lotes experimentales.

Llama la atención la gran diferencia, estadísticamente significativa, en el porcentaje de ganancia de peso entre los animales jóvenes y viejos, tanto al día del reto ($F = 449,9$; $p < 0,0001$) como al día del sacrificio ($F = 492,4$; $p < 0,0001$), siendo en todos los casos mucho más alta la ganancia de los animales de 2 meses que los de 4 meses de edad. Además, el análisis estadístico evidencia una correlación significativamente negativa entre el porcentaje de ganancia de peso y la edad de los animales ($r = -0,625$; $p < 0,05$).



Gráfica 22a.- Evolución media del % de crecimiento de los animales de 4 meses de edad respecto al peso inicial de los mismos, en cada lote y a lo largo del tiempo.

RESULTADOS



Gráfica 22b.- Evolución media de cada lote del % de crecimiento en los animales de 2 meses de edad respecto a su peso inicial a lo largo del tiempo.

El análisis estadístico, mediante el test no paramétrico de Newman-Keuls, realizado con el fin de detectar diferencias entre los distintos lotes, reveló que, en ningún momento, existen diferencias significativas entre grupos, cuando analizamos los porcentajes de ganancia de peso a lo largo del tiempo de estudio.

En las tablas 25a (viejos) y 25b (jóvenes) se expresan los valores del porcentaje medio de ganancia de peso en los distintos lotes a lo largo del periodo de estudio, tomando como referencia el peso inicial de los cerdos.

No obstante, al aplicar este mismo análisis estadístico según cada grupo de edad, sí aparecen diferencias significativas entre lotes, especialmente en el grupo de animales de 4 meses de edad. En este caso, observamos que el lote 7 presenta unos porcentajes de crecimiento mucho menores que el resto de lotes, alcanzando la significación estadística desde la 1ª s.p.i. y hasta el final del estudio. Respecto a este hecho, es importante señalar que precisamente este lote fue el único que presentó

RESULTADOS

unos pesos significativamente mayores que el resto al comienzo del experimento.

s.p.i.	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	6	-3	3	11	8	-8
2	4	9	10	6	13	9	-1
3	7	16	12	15	15	18	-2
4	11	17	18	15	17	23	1
5	15	16	13	21	26	24	4
6	18	18	21	23	27	30	5
7	24	21	29	30	31	31	5

Tabla 25a.- Media en el incremento de peso (%) de los diferente lotes del estudio de 4 meses de edad.

s.p.i.	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
0	0	0	0	0	0	0	0
1	11	10	20	15	21	22	18
2	23	26	30	15	30	27	27
3	42	34	43	39	49	46	50
4	57	56	61	51	47	45	62
5	68	66	75	68	80	75	76
6	79	81	80	79	97	92	101
7	91	97	95	91	113	108	117

Tabla 25b.- Media en el incremento de peso (%) de los diferente lotes del estudio de 2 meses de edad.

RESULTADOS

Los lotes inmunizados con las fracciones de 14 y 42 kDa (lotes 5 y 6, respectivamente) presentaron % de ganancias de peso significativamente más altas que el lote control 1 en una gran parte del estudio experimental, si bien esos % aunque se mantienen más elevados que el control, dejan de ser significativos en las dos últimas semanas de la experiencia. Por su parte, los lotes re infectados mantuvieron unos % de ganancia de peso mayores que los controles, si bien estos resultados solo fueron significativos en alguna s.p.i. puntualmente.

Al analizar los datos de ganancia de peso en los animales jóvenes, no se evidenciaron diferencias significativas entre lotes. Únicamente se detectó un menor porcentaje, estadísticamente significativo, en la ganancia de peso en el lote 4 respecto a los lotes 3 y 5, a la 2ª s.p.i. Además, llama la atención que este lote 4, re infectado y simultáneamente tratado con pirantel, presentó generalmente ganancias de peso más bajas (no significativas) que los lotes control, hecho que no ocurría en los animales de mayor edad.

La relación encontrada entre la ganancia de peso de los animales y los parámetros parasitológicos e inmunológicos (Tabla 26) evidencia que, en los animales de 4 meses, hay correlaciones significativamente negativas entre la ganancia de peso y el número de manchas de leches ($r = -0,134$; $p < 0,05$) y las larvas encontradas en pulmón ($r = -0,196$; $p < 0,05$). Sin embargo, ocurre lo contrario entre la ganancia de peso y los niveles de inmunoglobulinas detectadas, siendo una correlación positiva de alta significación, tanto para la IgG ($r = 0,436$; $p < 0,0001$) como para la IgM ($r=0,271$; $p < 0,0001$).

En cambio, en los animales de 2 meses de edad, las correlaciones pasan a ser positivas, aunque no significativas, entre la ganancia de peso y los parámetros

RESULTADOS

parasitológicos (Tabla 26), tanto con las manchas de leche ($r = 0,071$; $p = 0,35$) como con el número de larvas encontradas en pulmón ($r = 0,001$; $p = 0,98$). Al igual que en los animales de mayor edad, en los animales jóvenes se observa una fuerte correlación positiva entre el porcentaje de ganancia de peso y los niveles de inmunoglobulinas, tanto de IgG ($r = 0,702$; $p < 0,0001$) como de IgM ($r = 0,698$; $p < 0,0001$).

		Nº MANCHAS	Nº LARVAS	Ig G	Ig M
GANANCIA PESO	VIEJOS	-0,13*	-0,19**	0,44***	0,27***
	JÓVENES	0,07	0,001	0,70***	0,69***

Tabla 26.- Índices de correlación de Pearson entre la ganancia media de peso según la edad y los demás parámetros parasitológicos e inmunológicos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

IV.4.7.2.- Perfiles lipídicos del hígado y la canal.

Las medias y desviaciones estándar de los porcentajes obtenidos para los distintos ácidos grasos en el hígado se muestran en la tabla 27.

Para la determinación del porcentaje de ácidos grasos de la grasa del hígado, se extrajo previamente la grasa por el método de Bligh & Dyer (1959), y tras su metilación, tal y como se describe en III.12, los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron cuantificados por cromatografía gaseosa, e identificados por patrones y por espectrometría de masas. En las gráficas 23a y 23b, se representan los cromatogramas de una de las muestras de grasa hepática y los patrones de algunos ácidos grasos, a partir de cuyos tiempos de retención pudimos identificar los correspondientes a las

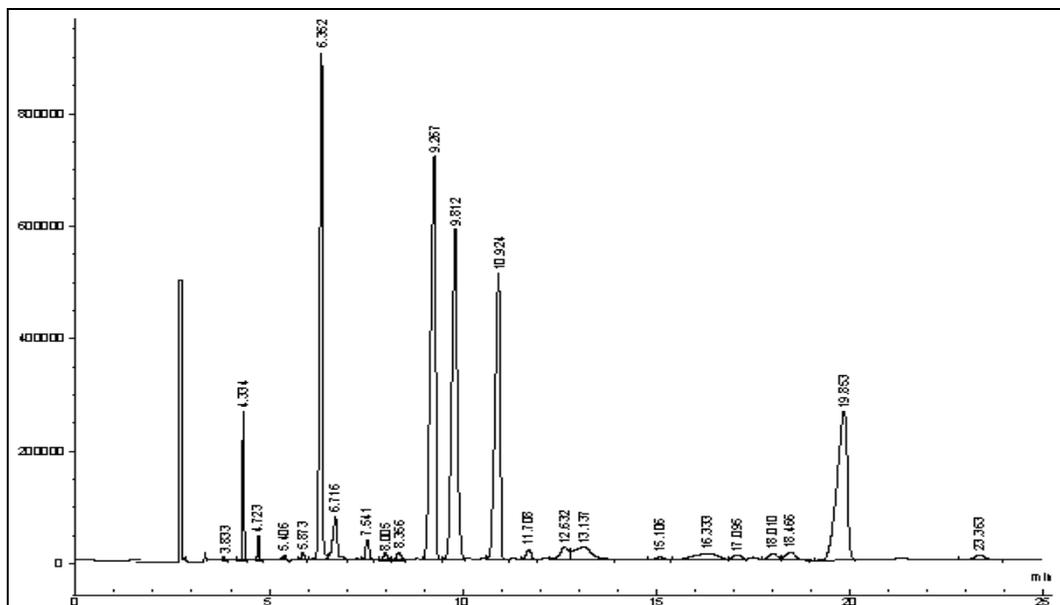
RESULTADOS

muestras de nuestro estudio.

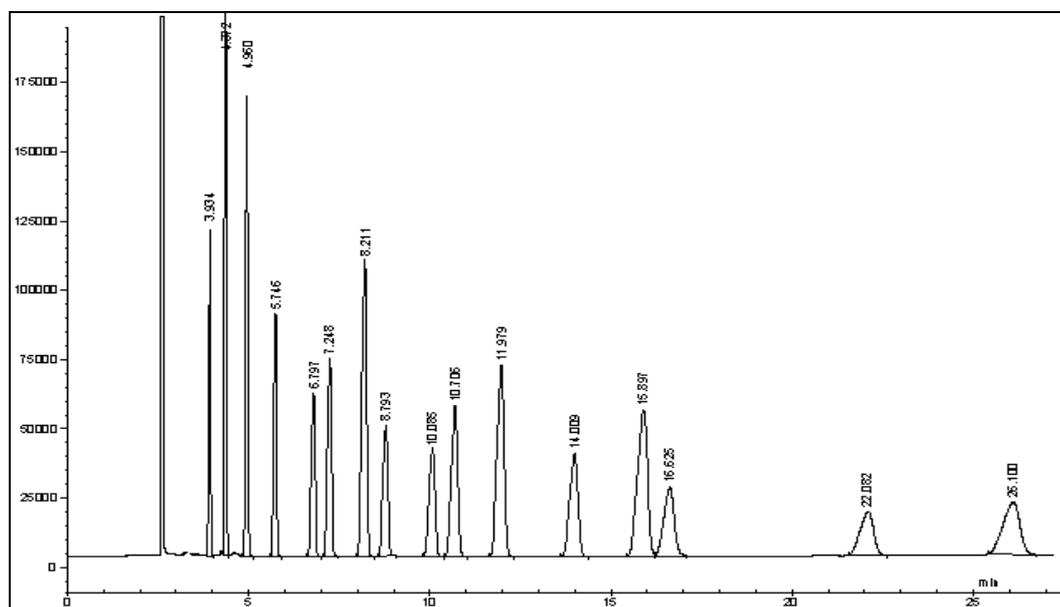
	LOTES						
	1 (n = 3)	2 (n = 3)	3 (n = 3)	4 (n = 3)	5 (n = 3)	6 (n = 3)	7 (n = 3)
$C_{14:0}$ Mirístico	0.28±0.06	1.45±1.39	0.25±0.04	0.24±0.03	0.30±0.02	0.33±0.04	1.11±1.51
$C_{16:0}$ Palmitico	15.20±0.68	13.78±3.60	15.71±2.25	14.78±1.56	15.64±0.63	17.44±0.47	13.85±3.17
$C_{17:0}$ Margárico	0.88±0.19	3.73±3.79	1.61±0.03	1.64±0.35	1.82±0.23	0.89±0.09	2.64±2.22
$C_{18:0}$ Esteárico	33.82±8.95	23.79±5.67	31.55±2.86	32.65±4.82	31.03±4.46	30.32±6.50	22.99±7.82
' Saturados	50.17±8.88	42.75±5.47	49.11±5.15	49.31±6.36	48.79±4.82	48.98±6.44	40.59±7.27
$C_{16:1}$ Palmitoleico	1.29±0.18	6.81±7.03	1.67±0.60	1.46±0.49	1.80±0.58	1.56±0.57	7.46±9.61
$C_{17:1}$ Heptadecenoico	0.25±0.05	1.03±0.89	0.35±0.04	1.51±2.12	0.33±0.02	0.25±0.01	0.90±0.99
$C_{18:1}$ Oleico	19.12±0.38	17.62±6.61	19.40±2.38	17.58±1.37	19.62±1.45	20.49±0.29	19.58±4.99
' Monoinsat.	20.65±0.52	25.46±5.94	21.43±2.95	20.54±0.26	21.75±1.88	22.30±0.28	27.94±8.64
$C_{18:2}$ Linoleico	21.71±0.20	16.50±4.63	19.61±2.51	20.49±4.03	20.53±3.59	20.54±2.11	17.36±4.61
$C_{18:3}$ Linolénico	1.05±1.23	7.53±7.78	2.10±1.50	2.33±1.73	1.82±1.47	1.86±1.12	6.13±8.25
$C_{20:4}$ Araquidónico	6.42±9.31	7.76±8.74	7.75±11.93	7.33±11.55	7.11±11.21	6.32±9.55	7.98±10.99
' Poliinsatur.	29.18±8.81	31.79±5.28	29.46±8.08	30.15±6.11	29.46±6.54	28.73±6.50	31.47±6.20

Tabla 27.- Composición de ácidos grasos (%) identificados en la grasa hepática de cerdos ibéricos, según los diferentes lotes del estudio.

RESULTADOS



Gráfica 23a.- Perfil de los ácidos grasos totales en la muestra hepática de uno de los cerdos del lote 2.



Gráfica 23b.- Patrón de ácidos grasos, a través del cual, son identificados los ácidos grasos de las muestras problema.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos, en la cantidad total de ácidos grasos hepáticos, no muestran diferencias, al menos estadísticamente significativas, entre los diferentes lotes. De igual manera, el análisis estadístico, mediante el test de Newman-Keuls, para observar diferencias entre los lotes, con cada uno de los ácidos grasos identificados, no reveló diferencias significativas entre las medias obtenidas por cada uno de aquellos.

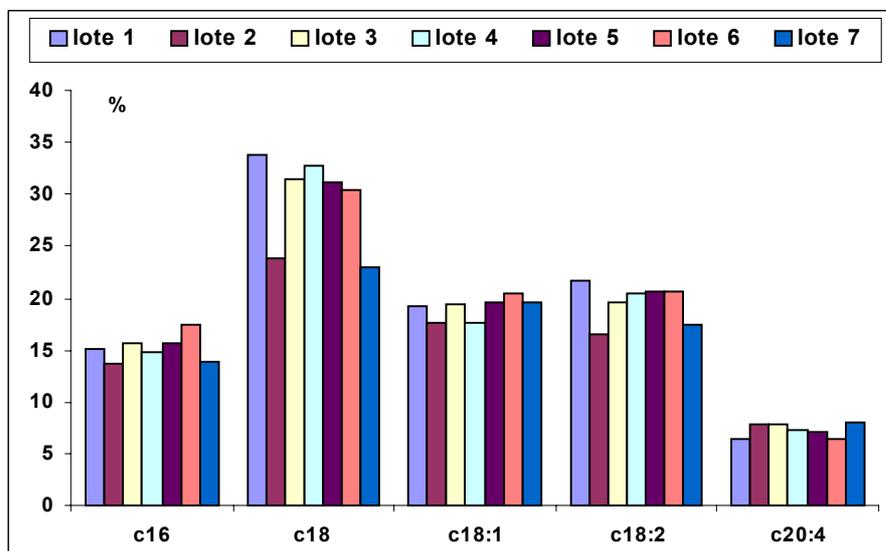
Los animales que presentaron mayor cantidad de manchas de leche, es decir, los lotes 2 y 7, son los que tuvieron el menor porcentaje de ácidos grasos saturados, mientras que el lote control 1 y los lotes reinfectados, es decir, los que tuvieron el menor número de lesiones en hígado, son los que presentaron el menor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados. En cuanto al porcentaje de poliinsaturados, fueron los lotes 2 y 7 nuevamente, los que presentaron el mayor porcentaje.

De todos los ácidos grasos, el esteárico ($C_{18:0}$) fue el más abundante en la grasa hepática en todos los animales, seguido por el oleico, linoleico, palmítico y araquidónico, con variaciones diversas según lote.

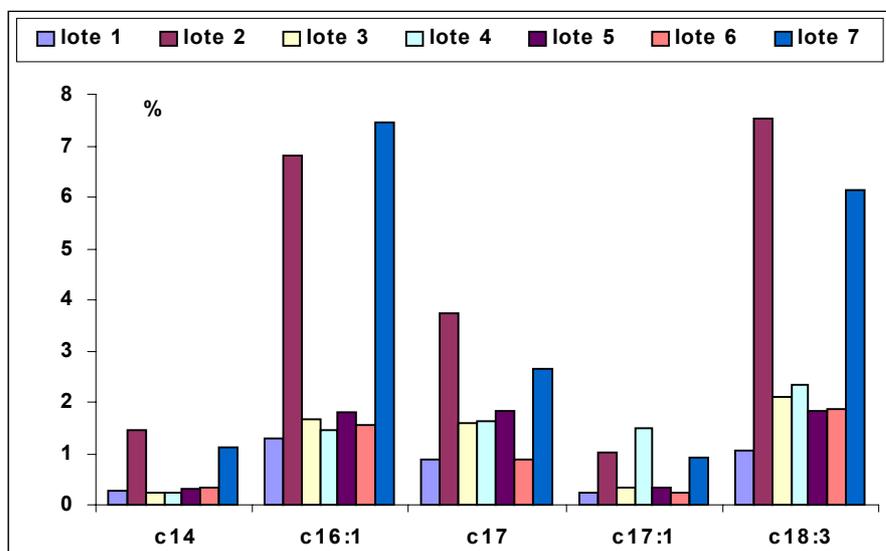
En las gráficas 24a y 24b, se representan los ácidos grasos mayoritarios y minoritarios, respectivamente, presentes en la grasa hepática de los cerdos ibéricos del estudio, en función de los lotes constituidos.

En términos absolutos, es decir, el análisis de la cantidad total de ácidos grasos de cada uno de los lotes (gráfica 25), mostró que los animales procedentes de los lotes más afectados por el paso de la migración de las larvas de *A. suum*, es decir, los lotes 2 y 7, presentaron la menor cantidad de ácidos grasos en la grasa hepática.

RESULTADOS

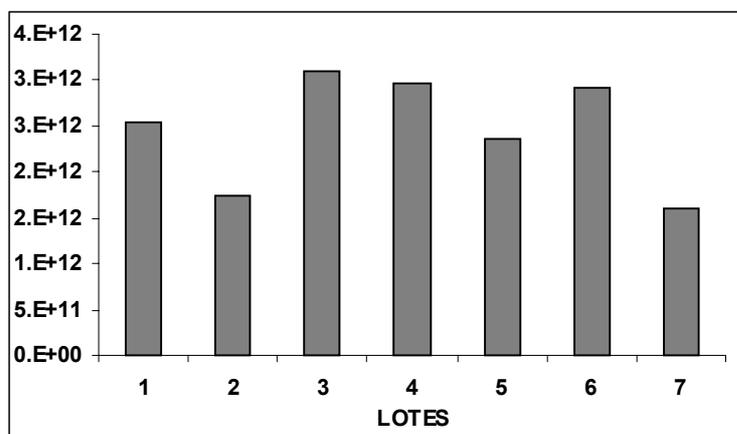


Gráfica 24a.- Porcentaje de ácidos grasos mayoritarios de la grasa hepática de los distintos lotes experimentales.



Gráfica 24b.- Porcentaje de ácidos grasos minoritarios de la grasa hepática de los distintos lotes experimentales.

RESULTADOS



Gráfica 25.- Cantidad total de ácidos grasos en los diferentes lotes.

En cuanto al perfil de ácidos grasos presentes en la grasa intramuscular del jamón (músculo *biceps femoris*), es importante mencionar que sólo fue analizado un cerdo de cada uno de los 7 lotes del estudio, con lo que los resultados obtenidos constituyen únicamente una primera aproximación, que deberá continuarse en posteriores estudios.

En la tabla 28 se esquematizan, según el lote experimental, los porcentajes de los distintos ácidos grasos presentes en la grasa intramuscular de los animales objeto de estudios.

El análisis de dicha tabla demuestra que, contrariamente a lo sucedido en la grasa hepática, los lotes re infectados son los que presentan menor porcentaje de ácidos grasos saturados y mayor de monoinsaturados. No obstante, estas diferencias son mínimas y se deben a un único animal analizado por cada lote.

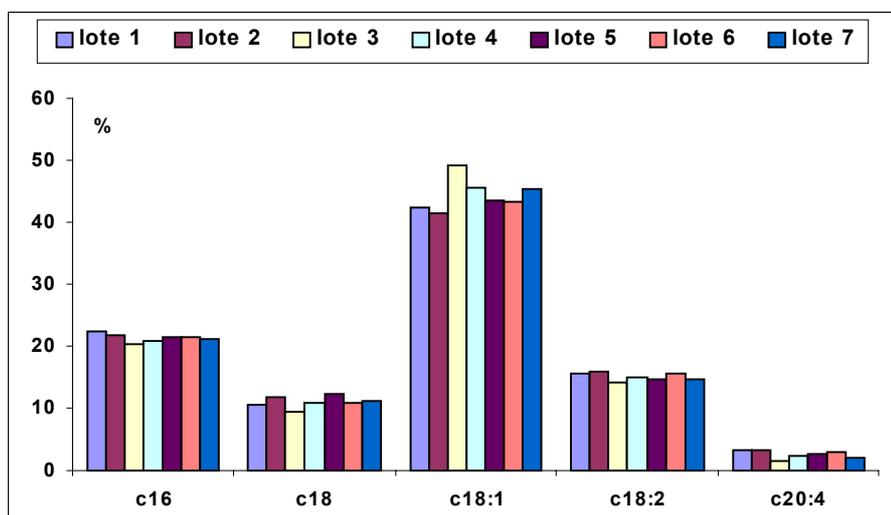
RESULTADOS

	LOTE						
	1 (n = 1)	2 (n = 1)	3 (n = 1)	4 (n = 1)	5 (n = 1)	6 (n = 1)	7 (n = 1)
C_{14:0} Mirístico	0.96	0.92	0.85	0.87	0.84	0.87	0.86
C_{16:0} Palmítico	22.49	21.71	20.19	20.80	21.44	21.33	21.12
C_{17:0} Margárico	0.36	0.39	0.35	0.35	0.40	0.39	0.41
C_{18:0} Esteárico	10.64	11.80	9.29	10.91	12.28	11.00	11.25
' Saturados	34.46	34.81	30.68	32.92	34.96	33.59	33.64
C_{16:1} Palmitoleico	3.25	3.20	3.26	3.25	3.00	3.28	3.07
C_{17:1} Heptadecenoico	0.41	0.41	0.46	0.36	0.38	0.40	0.39
C_{18:1} Oleico	42.42	41.61	49.16	45.45	43.60	43.35	45.33
' Monoinsat.	46.08	45.21	52.88	49.06	46.98	47.04	48.79
C_{18:2} Linoleico	15.53	15.93	14.24	14.98	14.64	15.63	14.70
C_{18:3} Linolénico	0.76	0.73	0.85	0.78	0.70	0.80	0.79
C_{20:4} Araquidónico	3.18	3.32	1.35	2.27	2.75	2.96	2.08
' Poliinsatur.	19.46	19.98	16.44	18.02	18.06	19.38	17.56

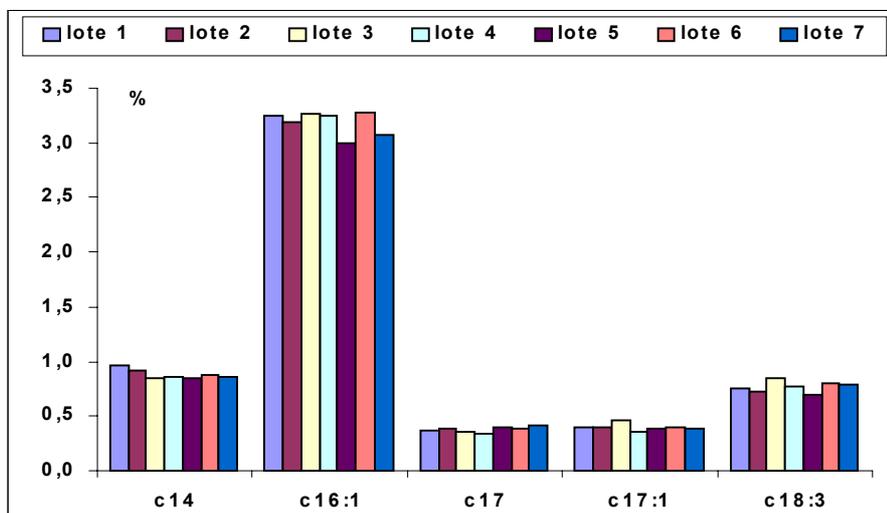
Tabla 28.- Composición de ácidos grasos (%) identificados en la grasa intramuscular del *biceps femoris* (jamón) de cerdos ibéricos según los diferentes lotes sometidos a distintas pautas de tratamiento.

La representación gráfica del porcentaje de cada uno de los ácidos grasos en el jamón está expuesta en las gráficas 26a (ácidos grasos mayoritarios) y 26b (ácidos grasos minoritarios).

RESULTADOS



Gráfica 26a.- Porcentaje de ácidos grasos mayoritarios de la grasa intramuscular del *biceps femoris* en los distintos lotes experimentales.



Gráfica 26b.- Porcentaje de ácidos grasos minoritarios de la grasa intramuscular del *biceps femoris* en los diferentes lotes del estudio.

RESULTADOS

El ácido graso más abundante, en todos los lotes experimentales fue el oleico, con niveles más elevados en los lotes re infectados. Le sigue, en cuanto a porcentaje, el ácido palmítico, aunque en este caso, curiosamente los cerdos pertenecientes a los lotes re infectados son los que presentaron los niveles más bajos, ya que como fue comentado, los animales re infectados mostraron un menor porcentaje de ácidos grasos saturados en la musculatura estudiada, en beneficio de los monoinsaturados. Finalmente, los poliinsaturados tuvieron, en los distintos lotes, un comportamiento diferente según el ácido graso en cuestión.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

V.1.- ASCARIOSIS EN CONDICIONES NATURALES.

La comparación de la respuesta inmunitaria frente a los cinco complejos antigénicos, muestra, en todos los cerdos sacrificados, una gran correlación, en especial entre los resultados del AUT y AOV, que obtuvieron las lecturas más elevadas. Esto indica que la composición de todos ellos es muy similar. Por otra parte, también muestra que, en condiciones naturales, las diferencias de respuesta entre dos cerdos son de similar magnitud para todos los antígenos.

En este sentido, Lind *et al.* (1993) mostraron este tipo de semejanza entre el APS, productos excretorios secretorios de L₂-L₃ y huevos eclosionados, demostrando unas respuestas inmunitarias muy parejas en lechones infectados experimentalmente. Si bien la respuesta es más intensa frente a los antígenos larvarios, el APS mostró una respuesta algo más precoz.

Estos datos son importantes por varias razones. En primer lugar, se excluye que el grado alto de reactividad de muchos sueros sea debido a errores metodológicos cometidos en pocillos individuales o placas de algún antígeno en particular. Hay que señalar que simultáneamente y en las mismas placas, se analizaron los sueros de cerdos experimentales antes de su inmunización y en ningún caso, mostraron un elevado color de fondo. En segundo lugar, indica que las fracciones antigénicas específicas de los antígenos ensayados cuantitativamente son poco importantes, o la respuesta que originan es marcadamente paralela a las fracciones comunes, y según Lind *et al.* (1993), también a antígenos larvarios.

Dado que los antígenos de adultos son fáciles de obtener en grandes cantidades, la posibilidad de su utilización para la detección de infecciones en su fase migratoria debería analizarse en profundidad, mediante el estudio de la respuesta por

DISCUSIÓN

WB a una población porcina mayor y más heterogénea.

No obstante, no debe obviarse que nuestros resultados también muestran reiteradamente diferencias entre AUT y AOV con el resto de los antígenos. Así, los dos primeros reaccionan intensamente de forma casi indiscriminada contra todos los sueros, independientemente de la procedencia del cerdo, alcanzando una sensibilidad hasta del 100%. En el extremo opuesto, los otros antígenos son reconocidos con menos intensidad, especialmente cuando existen formas adultas en el intestino, hasta el punto de que los escasos sueros negativos a alguno de ellos (12,5 % del total), en un 50 % corresponden a cerdos con ascariosis intestinal en el momento del sacrificio.

El hecho de que no se encontraran relaciones evidentes entre la presencia de otros parásitos del cerdo y los resultados por ELISA, indican que las sobradamente conocidas comunidades antigénicas entre *A. suum* y otros parásitos, (Iglesias *et al.* 1995, 1996; Zheleva, 1975) como la del epítipo fosforilcolina (Gutman & Mitchell, 1977), son cuantitativamente poco importantes mediante ELISA, o están enmascaradas por una respuesta específica generalizada en el grupo de cerdos naturalmente expuestos.

En los resultados relativos al análisis de la respuesta inmunitaria, según la presencia/ausencia de adultos de *A. suum* en el intestino, se evidencia que aquellos cerdos con infección patente mostraron niveles de densidad óptica más bajos que los que no presentaban el helminto a nivel intestinal.

Aunque *a priori* es obvio que los cerdos sin *A. suum* en el intestino pueden tener un grado de sensibilización diverso (ausencia de contacto, resistencia estéril, desparasitación reciente, con fases larvarias en hígado o pulmón, etc), es sorprendente que incluso excluyendo éstos, en el 49% restante sólo el APS presenta

DISCUSIÓN

una discreta relación con el número de *A. suum* en el intestino y una pobre especificidad relativa respecto a su presencia.

Sin embargo, hay dos puntos fundamentales a considerar a este respecto. En primer lugar, que los resultados coprológicos son igualmente ineficaces, si se compara la búsqueda de los nematodos en el intestino delgado, con casi un 19 % de falsos positivos y un 11,57 % de falsos negativos en nuestro estudio. Estos datos están en total acuerdo con los datos aportados por Bernardo *et al.* (1990b), Eriksen *et al.* (1992) y Boes *et al.* (1997), que indican que en presencia de animales parasitados, el resto del colectivo sufre un contacto con huevos de *Ascaris* continuado.

Desgraciadamente, aunque nuestro estudio no pudo realizar un examen detallado de los hígados, resultó evidente que sólo en casos aislados, se hubieran podido identificar claramente las típicas manchas de leche. Esto no es sorprendente ya que estas lesiones pueden desaparecer en pocas semanas (Bernardo *et al.* 1990; Buchwalder *et al.* 1984).

Bernardo *et al.* (1990), encuentran además, que la presencia de manchas de leche tiene una escasa relación con la presencia de adultos, para los que su presencia implica un 90,8%, 22%, 37,7% y 82,1% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, respectivamente.

En segundo lugar, es extremadamente difícil, incluso en condiciones experimentales, afirmar que una reacción positiva frente a antígenos de *Ascaris* no se debe a un estímulo antigénico. Urban *et al.* (1988), encuentran que incluso en un local libre de helmintos pero de escasa higiene, los cerdos alcanzan un alto grado de protección frente a una infección experimental. Para Eriksen *et al.* (1992), en cerdos SPF existe un fenómeno de resistencia edad-dependiente a la infección por *A. suum*,

DISCUSIÓN

no debida a contactos con este parásito, pero paralelo a un alto grado de reactividad por ELISA a extractos de adultos, APS y en menor medida a antígenos larvarios.

Mucho más consistentes son los indicios de que la aparente inespecificidad puede ser el resultado de una sensibilización continuada a *A. suum*. Así, existen numerosas evidencias (Buchwalder *et al.* 1984; Urban *et al.* 1988; Eriksen *et al.* 1992), de que dosis infectantes altas, en ausencia de resistencia adquirida, raramente resultan en infecciones patentes. De hecho, se ha observado que existe una relación inversa entre la dosis de inoculación y el número de vermes establecidos en el intestino (Andersen *et al.* 1973; Jorgensen *et al.* 1975).

Incluso simulando condiciones naturales, con dosis bajas y repetidas, varios autores (Urban *et al.* 1988; Eriksen *et al.* 1992; Roepstorff & Murrell, 1997) sólo han obtenido infecciones intestinales causadas por pocos adultos en un escaso número de cerdos. Así, por ejemplo, Eriksen *et al.* (1992), inoculando 25 ó 500 huevos dos veces por semana, durante más de tres meses, sólo obtiene nematodos adultos en un 25% de los casos. Paradójicamente, en esos mismos animales experimentales, Lind *et al.* (1993) encuentra que las respuestas serológicas más altas al APS, huevos eclosionados y antígenos larvarios, se producen en los animales que no presentan adultos, y sólo se correlacionan ligeramente con la presencia de manchas de leche.

Bogh *et al.* (1994), por su parte, indican que en la ascariosis natural porcina, la presencia de al menos 3 lesiones hepáticas se correlaciona con los resultados de ELISA. Igualmente, Furuya *et al.* (1995), observan una correlación positiva entre la reactividad por ELISA y la severidad de las manchas de leche, utilizando como antígenos huevos embrionados, extractos brutos larvarios y extractos brutos de adultos, concluyendo que el extracto bruto de hembras es el más sensible, lo que

DISCUSIÓN

concuera con la mayor sensibilidad del AUT y AOV encontrada por nosotros.

En los resultados de campo de nuestro estudio, más del 61% de los cerdos presentaban *A. suum* en el intestino o ingerían huevos de éste parásito, y al menos el 93,8 % (posiblemente el 100%) procedían de explotaciones que presentaban este parásito.

Así pues, hay razones consistentes para afirmar que, el simple contacto con los elementos infectantes, aún cuando no culmine en infecciones patentes, puede explicar completamente una reacción positiva por ELISA, aún utilizando extractos antigénicos de la fase adulta, cuya especificidad real debe ser en tal caso muy alta. Esta inmunización, principalmente ocasionada por las fases invasivas, posiblemente explique la alta reactividad de todos los antígenos en la totalidad de los animales, y especialmente, en los aparentemente negativos por técnicas directas (necropsia y coprología).

Mediante Western blotting, hemos observado que los niveles más altos de reconocimiento antigénico, se produjeron en los sueros de cerdos sin infección patente por *A. suum* y/o huevos del parásito en heces, confirmando de este modo los mismos resultados obtenidos por la técnica ELISA. Sin embargo, la intensidad de reconocimiento siempre presentó valores de correlación negativos respecto al número de adultos en intestino. Este resultado podría tener varias respuestas.

En primer lugar, es posible que aquellos cerdos que tengan un alto nivel de anticuerpos anti-*Ascaris* sean capaces de prevenir nuevas reinfecciones que produzca el desarrollo de adultos en el intestino. Este hecho explicaría que esos anticuerpos tuvieran un efecto protector en dichos animales.

En segundo lugar, es posible que la presencia de formas adultas en el intestino

DISCUSIÓN

delgado causen una inmunodepresión en el hospedador. Esta situación explica el menor porcentaje de densidad óptica por ELISA, y el menor reconocimiento de bandas proteicas por Western blotting. Si bien no existen datos conclusivos para corroborar este hecho, algunos autores como Soares & Mota (1992), han aislado dos componentes de 530 y 29 kDa en el extracto bruto de *A. suum*, los cuales produjeron inmunosupresión e inducción, respectivamente en algunos hamsters inmunizados con dichas fracciones. Finalmente, y en este mismo sentido, Stankiewicz & Froe (1995), Barta *et al.* (1986), Komatsu *et al.* (1979) y Crandall *et al.* (1978) también han detectado la presencia de sustancias inmunosupresoras en el parásito.

V.2.- EXPERIMENTO PREVIO DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL.

Como fue comentado, este experimento se planteó para determinar los parámetros más adecuados y el valor de los mismos, que habrían de ser utilizados con posterioridad en el 2º experimento, el cual constituye el cuerpo fundamental de este trabajo. En definitiva, estandarizar unas condiciones de trabajo *a posteriori*, con el fin de obtener el mayor éxito posible en cuanto a objetivos planteados en nuestro “reto de vacunación”.

No cabe duda que la amplia bibliografía disponible sobre diferentes pautas de infección y consiguientes resultados parasitológicos, orientaron en gran medida sobre las pautas de actuación a seguir en este primer ensayo; no obstante, las experiencias de estandarización y el trabajo llevado a cabo en la propia granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, previamente al ensayo de inmunización, validan aún más los resultados obtenidos.

Confirmando experimentos llevados a cabo en otras razas porcinas (Eriksen

DISCUSIÓN

et al. 1992; Stankiewicz *et al.* 1992), la alta frecuencia de parasitación natural del cerdo ibérico (42 % en este trabajo), contrasta drásticamente con la dificultad de producir infecciones patentes, incluso en animales que nunca han estado en contacto con el parásito.

La efectividad de los inóculos en este experimento, quedó demostrada constantemente por la presencia de lesiones hepáticas y de numerosas larvas pulmonares al 7 d.p.i.

A pesar de la exitosa migración larvaria, apenas se desarrollaron adultos en intestino, fenómeno que es explicado por varios factores, cuya causa última se desconoce; relación inversa entre dosis infectante y carga parasitaria intestinal (Andersen *et al.* 1973), expulsión masiva de formas larvarias tras su reentrada al intestino (Roepstorff *et al.* 1997) y un fenómeno de sobredispersión muy marcado (Boes *et al.* 1997).

El mayor número de manchas de leche se observó a la 3^a s.p.i., con una disminución progresiva de las mismas al cabo del tiempo. Por su parte, el mayor número de larvas recuperadas en pulmón fue a los 7 d.p.i. Ambos resultados están en plena concordancia con otros trabajos de similares características (Roepstorff *et al.* 1997), por lo que, a partir de los resultados de este experimento, tuvimos las bases suficientes para comenzar la siguiente fase de estudio sobre ascariosis experimental.

V.3.- EMBRIONAMIENTO E INFECTIVIDAD DE LOS HUEVOS.

Tal y como se expresó en el apartado de resultados, se realizó un estudio utilizando diferentes condiciones de embrionamiento, con el fin de concretar y estandarizar aquellas que desembocaran en un óptimo desarrollo embrionario que garantizara el

DISCUSIÓN

éxito en los trabajos de infección experimental de nuestros animales.

La mayor parte de los autores consultados sobre este particular, utilizan soluciones acuosas de formaldehído a muy diferentes concentraciones (Wong *et al.* 1976; Jablonowski *et al.* 1981; Urban *et al.* 1981; Buchwalder *et al.* 1984; Hale *et al.* 1985; Smith *et al.* 1983; Haswell-Elkins *et al.* 1992), de ácido sulfúrico (Hass & Todd, 1962; Sugane & Oshima, 1983; O'grady & Harpur, 1985; Eriksen, 1990), y otras soluciones como hidróxido sódico (Boroskova *et al.* 1974; Soltys *et al.* 1992; Benkova *et al.* 1992). Todos estos medios tienen como única función el establecer un pH disgenésico que evite el desarrollo de microorganismos, tanto bacterianos como fúngicos.

En el presente estudio se ensayan los 3 medios descritos anteriormente, con resultados similares a dichos autores, pudiendo comprobar que el medio utilizado no influyó, de manera importante, en la viabilidad y rapidez del desarrollo embrionario, de tal forma que decidimos utilizar NaOH 0,1N que evita la peligrosidad en el manejo del ácido sulfúrico y la fuerte irritación ocular que produce el manejo del formaldehído a altas concentraciones.

La mayor parte de los autores establecen un periodo de embrionamiento que oscila entre las 3 semanas y los 2 meses, independientemente del medio utilizado. No obstante, el factor más influyente, en cuanto a la rapidez del desarrollo embrionario es la temperatura. Las utilizadas por los distintos autores no concuerdan en muchas ocasiones, debido a que la temperatura ambiente varía proporcionalmente con los cambios estacionales y las distintas latitudes.

En nuestros ensayos, probamos una temperatura controlada de 37 °C, tanto en estufa con un 5 % de CO₂, como en baño María con agua atemperada, y finalmente

DISCUSIÓN

ensayos a temperatura ambiente.

El porcentaje de viabilidad de los huevos fue muy similar en todos los casos, si bien la rapidez de embrionamiento fue mayor a 37 °C que a temperatura ambiente (24-26 °C). Estos resultados están en plena concordancia con los obtenidos por muchos autores, entre los que mayoritariamente el tiempo de embrionamiento se situó, al igual en nuestro caso, en torno a las 5 semanas a temperatura ambiente y a las 3-4 semanas a 37 °C.

La existencia de discrepancias en nuestros resultados con algunos autores, se debieron, como ya se ha mencionado, a la diferente latitud geográfica y la estación meteorológica que provoca temperaturas ambientales muy diferentes de unos lugares a otros.

En el caso de huevos de *T. canis*, O'Lorcain (1995) estableció las condiciones óptimas de embrionamiento, indicando que entre 24 y 30 °C se produjo un aumento progresivo en la velocidad, pero a 37 °C los huevos no pudieron completar su desarrollo. Este mismo trabajo concluye que, con el fin de favorecer la supervivencia embrionaria por un mayor periodo de tiempo, lo mejor es embrionar a 24 °C o incluso a una temperatura menor, asegurando, en cualquier caso, un buen aporte de oxígeno. Precisamente basándonos en este trabajo, y con el fin de simular al máximo las condiciones de la naturaleza, se decidió cultivar los huevos a temperatura ambiente.

En cuanto a la disposición de oxígeno por parte de los huevos para el desarrollo embrionario, a pesar de no probar diferentes concentraciones de huevos en el cultivo, solo encontramos un estudio que recoge la influencia del oxígeno en el desarrollo de las larvas. Eriksen (1990) probó dos concentraciones (25 y 1250 huevos/ μ l de cultivo), llegando a la conclusión que a bajas concentraciones los

DISCUSIÓN

huevos embrionan perfectamente a partir de las 2 semanas de iniciado el cultivo hasta la 4ª semana, cuando alcanzan un 100 % de embrionamiento. En cambio, a altas concentraciones de huevos por ml no se produjo el desarrollo de la larva en el interior del huevo en ningún momento del ensayo. Por este motivo, en nuestros estudios seguimos la concentración sugerida en este trabajo, con cuyos resultados obtuvimos muy buenos porcentajes de viabilidad.

Con estos resultados, demostramos la capacidad de desarrollo y embrionamiento de los huevos de *Ascaris suum* a muy diferentes condiciones de temperatura, luz, oxígeno, etc, confirmando los resultados, ya expresados por otros autores, relativos a la enorme resistencia de los huevos de los ascáridos (*A. suum* y *A. lumbricoides*) a diferentes tratamientos. Así, por ejemplo, Johnson *et al.* (1998), alertaron de la resistencia de estos huevos a los tratamientos de digestión, que usualmente se practican en los restos de alcantarillado y en su almacenaje, para su posterior aplicación a la fabricación de productos tales como fertilizantes, composts y condicionadores de suelos, con el consiguiente peligro de salud pública que ello supone a la población. Similares resultados fueron observados por O'Donnell *et al.* (1984), Ghiglietti *et al.* (1995) o Gaspard *et al.* (1996, 1997).

Por último, con el fin de comprobar la perfecta infectividad de los huevos embrionados en las condiciones descritas, se infectó un cerdo con el mismo cultivo con el cual se infectarían, posteriormente, el resto de animales del ensayo de reinfección e inmunización. Del mismo modo, se infectaron 2 ratones con el mismo fin, observando la infectividad del cultivo. El número de larvas recuperadas en el pulmón del cerdo fue de 2656, lo que supuso un 26,56 % de la dosis inicial. La mayor parte de los autores consultados comprueban la infectividad de los huevos en ratones

DISCUSIÓN

a partir de las larvas recuperadas en sus pulmones. Sin embargo, no cabe duda, que los resultados más fiables son los obtenidos en el propio hospedador natural de *A. suum*, el cerdo.

Para conocer si el % de infectividad de nuestro cultivo era óptimo, se comparó nuestro porcentaje de recuperación en el cerdo con el obtenido por otros autores y así Urban & Tromba (1984) consiguieron un 30,63 % en cerdos utilizados como control tras un reto con 10.000 huevos larvados. Un año más tarde, Urban & Romanowski obtuvieron un 24,39 % de recuperación larvaria pulmonar, resultado muy similar al obtenido por Stankiewicz *et al.* (1990) con un 27,52 % y Stankiewicz & Froe (1995) con un 29,22 %. Eriksen *et al.* (1992) obtuvieron un 32 % de recuperación larvaria en cerdos SPF tras un reto con 10.000 huevos. Finalmente, en un trabajo más reciente, Roepstorff *et al.* (1997), alcanzaron hasta un 40,13 % de recuperación en un grupo control infectado con 10.000 huevos.

Así pues, nuestro resultado de infectividad del presente ensayo, que llegó al 26,56 % de recuperación respecto a la dosis administrada, creemos fue bastante adecuado, a tenor de la bibliografía consultada; posteriormente fue mejorado, al obtener un 34,3 % de recuperación en el lote 2 de los animales jóvenes, en el experimento de inmunización de este trabajo.

V.4.- EXPERIMENTO DE REINFECCIÓN E INMUNIZACIÓN.

V.4.1.- Resultados parasitológicos (manchas de leche, larvas pulmonares y adultos intestinales).

Las infecciones múltiples, con o sin tratamiento, circunscritas a los lotes 3 y 4 de nuestro experimento, produjeron el mayor grado de resistencia, que fue cercano al

DISCUSIÓN

98% al 7 d.p.i. Esta resistencia se reflejó en una reducción entre el 53-81% de las lesiones hepáticas y un 97-99% de las larvas pulmonares. Esto indica que la protección se produce en gran medida a nivel prehepático. Paradójicamente, esto es compatible con la existencia de una escasa población parásita adulta en el intestino, que no puede darse con dosis infectantes masivas (Eriksen *et al.* 1992), lo que sugiere que esta resistencia del hospedador es aprovechada por el parásito para regular su propia población en las infecciones naturales.

Otros autores obtienen similares porcentajes de protección, con infecciones múltiples similares (Stankiewicz *et al.* 1990, 1992; Stankiewicz & Froe, 1995) si bien en estos trabajos, se describe una inmunosupresión provocada por la migración larvaria, que produce la implantación de adultos en el intestino, que nosotros no hemos encontrado en el lote 3. Esta diferencia podría deberse al efecto del azar, dado el patrón de sobredispersión de estas infecciones (Roepstorff *et al.* 1997).

Similares resultados obtienen Hill *et al.* (1994), mediante una infección natural durante un periodo de 6 semanas, si bien es variable dependiendo de la dosis y el ritmo de reinfección. En dosis bajas, la protección es insuficiente (Urban & Tromba, 1982). Southern *et al.* (1989) encuentran que 3 dosis de 2000 huevos producen una resistencia superior a la adquirida de forma natural, lo que coincide con nuestros resultados, donde las reinfecciones aumentan la resistencia natural de los cerdos con 4 meses de edad.

El grado de protección en los cerdos inmunizados con las fracciones antigénicas fue bastante elevado, en especial con la fracción de 14 kDa, con una reducción importante de las lesiones hepáticas (53-37 %) y las larvas pulmonares (90-88 %). No obstante, los cerdos inmunizados con la fracción de 97 kDa

DISCUSIÓN

presentaron mayor número de manchas de leche que los del lote control, indicando una nula inmunidad a nivel intestinal, pese a mostrar una intensa respuesta humoral, lo que sugiere que la respuesta a este antígeno puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta protectora.

La doble banda en torno a los 97 kDa detectada en nuestro estudio, fue debida, probablemente, a los polipéptidos de colágeno de 90 y 99 kDa, los cuales junto con una fracción de 65 kDa comprenden el 95 % del colágeno cuticular (Winkfein *et al.* 1985).

El colágeno de la cutícula del parásito induce anticuerpos, eosinófilos y respuesta de células plasmáticas (Archer *et al.* 1985). Haswell-Elkins *et al.* (1989) encontraron una única asociación negativa entre los niveles de infección en humanos por *A. lumbricoides* y el reconocimiento de la banda de 99 kDa en el antígeno excretor-secretor de larvas, sugiriendo un papel protector de estos antígenos.

Sin embargo, las envueltas de las larvas en migración, pueden ser una estrategia de los nematodos para dirigir la respuesta inmunitaria fuera de la superficie larvaria (Smith, 1991). La inmunización con la fracción de 97 kDa en los animales experimentales, produjo un reconocimiento de los antígenos larvarios, sin que esto influyera en la migración larvaria. Esto sugiere que este antígeno pudiera actuar como un engañoso “blanco” en estos estados larvarios, o bien, induciendo un inapropiado tipo de respuesta orgánica.

La inmunización oral de fluido pseudocelómico puede causar intensas lesiones hepáticas después de un reto sin protección contra la migración larvaria (Urban *et al.* 1988; Rhodes *et al.* 1986). Sin embargo, este fluido tiene numerosas fracciones antigénicas, incluyendo una que es reconocida por cerdos que habían sido

DISCUSIÓN

inmunizados con antígenos de huevos (Rhodes & Staudinger, 1983). No obstante, no existen actualmente datos en la bibliografía que establezcan el papel protector de antígenos obtenidos de este material del verme.

Usando WB, observamos que la fracción en torno a los 42-44 kDa, es repetidamente reconocida por cerdos infectados, probablemente de igual manera que similares bandas en extractos de L₂/L₃ y L₃/L₄. Así pues, los presentes resultados podrían indicar que la fracción de 42 kDa, obtenida del fluido pseudocelómico, tiene un efecto sensibilizador en los cerdos en vez de causar una respuesta protectora.

Como ya dijimos, la fracción de 14 kDa ha sido especialmente estudiada por su carácter altamente alergénico, denominada como alérgeno A, Asc-1 o como ABA-1 (McReynolds *et al.* 1993). Esta fracción no es reconocida normalmente en humanos infectados por *A. lumbricoides* ni en ratones infectados (Haswell-Elkins *et al.* 1989; Kennedy, 1991). Parece ser que la presentación de este antígeno al sistema inmune es crucial, ya que la resistencia de los animales a la infección no solamente depende de la genética del hospedador, sino de la vía de presentación de los antígenos (Christie *et al.* 1992).

Así, Lukes (1992) obtuvo un 89% de protección en ratones usando antígenos de extractos crudos de *A. suum* encapsulados en liposomas, mientras que la aplicación de esos antígenos solubles sin adyuvante, condujo a un aumento de larvas hepáticas y pulmonares. En nuestro estudio, el alto grado de protección alcanzado con la fracción de 14 kDa supone que, algunos componentes de los vermes adultos podrían ser útiles para inducir una importante inmunidad protectora contra la migración larvaria, al igual que los obtenidos con los antígenos larvarios y los de huevos del parásito.

DISCUSIÓN

Así pues, este estudio demuestra que determinados antígenos del parásito adulto, producen de forma cruzada, una respuesta protectora intensa contra las larvas. Una caracterización de la capacidad protectora individual de diversas fracciones antigénicas de los adultos, podría, en el futuro, permitir un protocolo de inmunización, a partir de antígenos seleccionados, mucho más eficaz de lo alcanzado hasta el momento con extractos antigénicos no purificados.

El número medio de larvas pulmonares en los animales más jóvenes fue mucho más alto que el de los animales viejos, que mostraron un 2,64 % del total de larvas detectadas en los animales de menor edad.

La gran diferencia encontrada en los parámetros parasitológicos entre los dos grupos de edad, quizás sea uno de nuestros resultados más sorprendentes. La existencia de una resistencia ligada a la edad no atribuible a una resistencia adquirida ha sido denunciada por Kelley & Nayak, (1964) y Eriksen *et al.* (1992). Estos últimos establecieron una ligera correlación entre la edad del cerdo, los niveles de anticuerpos y la resistencia frente al parásito, medida ésta por una menor aparición de manchas de leche en el hígado. En los animales de mayor edad, y mediante la técnica ELISA, aparecían unos niveles de anticuerpos más elevados que en animales de menor edad. Estos resultados hacen pensar que, incluso mínimos contactos inadvertidos o reacciones cruzadas con otro tipo de antígenos, pueden producir una resistencia elevada, al tiempo que una cierta respuesta serológica.

De esta forma, se ha observado que cerdos mantenidos en un local sucio, pese a la supuesta ausencia de *A. suum* en el medio, produce un 72% de resistencia (Urban *et al.* 1988). Según estos mismos autores, la exposición previa al parásito confiere una protección importante por el fortalecimiento de la inmunidad prehepática, que

DISCUSIÓN

sería equivalente a la resistencia obtenida con 3 dosis de 1.000 huevos (Urban & Tromba, 1982).

En nuestros estudios, los animales más viejos podrían haber estado expuestos de forma moderada al parásito, previamente al inicio del experimento, debido a la presencia de algunos vermes adultos en el lote 1 control.

Del mismo modo, algunos de estos animales de mayor edad presentaron *Oesophagostomum* y *Trichuris*, los cuales son en general más sensibles a los factores limitantes de la transmisión que *A. suum* (Roepstorff & Jorsal, 1989, 1990; Nansen & Roepstorff, 1999). Las altas cargas por *Oesophagostomum* provoca un incremento de la respuesta de anticuerpos frente a *A. suum*, aunque no provoca una reducción de la migración larvaria (Helwich *et al.* 1999).

Si bien una reducción gradual en el porcentaje de éxito de migración de las larvas de *A. suum*, podrían haberse debido al fenómeno de edad-resistencia que comentamos con anterioridad, es más probable que el menor número de manchas de leche en el hígado y larvas pulmonares encontradas en los animales viejos estuvieron causadas por un moderado nivel de resistencia adquirida homóloga, la cual, puede ser inducida experimentalmente, por altas dosis simples de huevos larvados (Helwich *et al.* 1999), o por una moderada dosificación múltiple durante 3 semanas (Jungersen *et al.* 1999), pero no por una muy baja dosificación simple (Roepstorff, com. pers.).

En cuanto a los resultados encontrados, según la presencia de adultos intestinales, podría especularse que, la presencia de una sola hembra entre todos los animales viejos de todos los lotes infectados (lotes 2 al 7), en comparación con los 5 vermes encontrados en el lote 1 sin infectar, indicaría que la inmunización con

DISCUSIÓN

antígenos de adultos o la inoculación de huevos infectantes habría tenido un efecto adverso en la supervivencia de los helmintos adultos. La eliminación de formas intestinales debido a la inmunidad por reinfecciones seriadas fue estudiada por Taffs (1968), pero conviene señalar la cuestionabilidad de estas conclusiones ya que ningún otro trabajo posterior ha podido demostrar ese hecho (Eriksen *et al.* 1992b; Roepstorff & Murrell, 1997).

V.4.2.- Análisis hematológico.

Los resultados de nuestro experimento han demostrado, como hecho más relevante y destacado, una importante eosinofilia, principalmente evidente en los lotes reinfestados, a partir de la 1ª y 2ª s.p.i., así como en los lotes inmunizados, en la última semana del ensayo, tras el reto al que fueron sometidos. Esta eosinofilia ha sido comúnmente observada en sangre y tejidos orgánicos, en la mayor parte de las infecciones producidas por helmintos (Butterworth & Thorne, 1993).

Estos resultados muestran, de una forma clara, que la eosinofilia producida tiene como causante esencial el paso y migración de las formas larvarias a través del organismo, y más concretamente en sus primeras fases. Esto explica el espectacular aumento de sus niveles en los lotes 3 y 4, con un pico máximo a la 3ª y 4ª s.p.i., respectivamente, que coincide con el periodo de migración de las larvas a través de los tejidos.

El ligero retraso en cuanto al pico eosinofílico del lote 4 respecto al lote 3, puede ser debido a que el tratamiento antihelmíntico de los animales del primer lote esté produciendo la muerte de parte de las larvas en su migración y se necesiten más dosificaciones para que produzca la elevación del porcentaje de estos granulocitos.

DISCUSIÓN

Numerosos autores han mencionado que, la migración larvaria de *A. suum* induce, en los cerdos, un pico de eosinófilos en sangre dosis-dependiente al día 10 p.i., regresando a niveles normales los días 20-30 p.i., independientemente del desarrollo o no de formas adultas en intestino (Ronéus, 1971; Copeman, 1971; Eriksen *et al.* 1980; Rhodes *et al.* 1982). Por su parte, Moncol & Batte (1967), tras la administración diaria de 4.500 huevos larvados a un grupo de cerdos, observaron un crecimiento progresivo del número de eosinófilos desde el día 6 p.i. manteniéndose en esos valores elevados hasta aproximadamente el día 53 p.i., cuando volvieron a los niveles fisiológicos.

En los lotes inmunizados, en cambio, la subida espectacular del porcentaje de eosinófilos se produce en los días posteriores al reto con los 10.000 huevos larvados. Esto nos permite comprobar que la inmunización con ciertas proteínas del parásito (14, 42 y 97 kDa) no son suficientes para producir el aumento del número de eosinófilos, que en cambio sí se produce una vez que ha comenzado la migración larvaria tisular.

Además, y en comparación con el lote 2, la subida del porcentaje de eosinófilos en los tres lotes inmunizados, desde un 0,5-1 % en el día del reto, hasta incluso un 10-11 % en el día del sacrificio, induce a pensar que la inmunización con dichas proteínas estimula, de algún modo, al organismo, para, tras el reto, llevar a cabo una producción exponencial y muy precoz de eosinófilos. Así pues, podemos decir que estos animales responden, a través de una reacción de hipersensibilidad, a la migración tisular larvaria. Se conoce que la estimulación y producción de eosinófilos está originada por la acción de la interleuquina-5, producida, a su vez, por linfocitos T colaboradores (Abbas *et al.* 1995), con lo cual, es de suponer que la

DISCUSIÓN

inmunización, vía intramuscular, con ciertas proteínas del parásito, no estimula suficientemente a estos subtipos linfocitarios, que en cambio, sí son convenientemente estimulados mediante el paso de las larvas migrantes a través de la mucosa intestinal y tejidos hepáticos y pulmonares.

En relación a este resultado, Moncol & Batte (1967) aseguran que la eosinofilia temprana, evidenciada previamente a los 10 d.p.i. en cerdos infectados con *A. suum*, es dependiente del nivel de dosificación y debida a una previa sensibilización. En nuestros estudios, esta sensibilización es causada por las inmunizaciones semanales a que fueron sometidos los cerdos experimentales.

En ratas, Archer *et al.* (1985), tras la inyección intraperitoneal de aislados cuticulares de *A. suum*, observan picos de eosinofilia a las 2 semanas tras la inyección. Lo mismo ocurrió en cobayas en experimentos realizados por Campbell (1942) con inyecciones de una fracción insoluble de queratina de *A. suum*.

Estudios *in vitro* han mostrado que algunos antígenos procedentes de helmintos, son capaces de estimular linfocitos sensibilizados y obtenidos de animales infectados. Posteriormente, estos linfocitos liberan linfoquinas que causan un incremento de eosinófilos en la médula ósea (Metcalf *et al.* 1974; Cline & Golde, 1979; Tanaka *et al.* 1979; Bartelmez *et al.* 1980a, 1980b).

Sugane (1988), realizó un ensayo con el fin de clarificar el mecanismo de la respuesta eosinofílica, en infecciones secundarias de ratones infectados con *A. suum*, observando que la respuesta es más precoz e intensa que la respuesta primaria. Concluyen, al igual que los autores anteriores, que esa respuesta secundaria se debe a la estimulación de linfocitos por antígenos del parásito, los cuales, desencadenan un rápido crecimiento y diferenciación de eosinófilos a nivel de la médula ósea.

DISCUSIÓN

Según Jungersen *et al.* (1999), parece probable que, en infecciones secundarias, los eosinófilos activados estén involucrados en reacciones de citotoxicidad celular específica, dependiente de anticuerpos contra la migración larvaria (Butterworth & Thorne, 1993; Rainbird *et al.* 1998) siendo ésta una forma de defensa del hospedador. Si bien esto no ha sido estudiado en la ascariosis en el cerdo, algunas evidencias *in vivo* de eosinófilos activados en la cámara anterior del ojo de cobayas, sugieren que la interacción de estos granulocitos con las L₂ *in vitro* es dependiente de factores solubles presentes en aspirados de ojos infectados (Rockey *et al.* 1983).

Este último trabajo menciona que los eosinófilos atacan la cutícula de *A. suum* y, además, sufren desgranulación y alteraciones morfológicas. La actividad larvicida de los eosinófilos no ha podido ser demostrada de modo concluyente, como sí se ha demostrado en parasitaciones por *Schistosoma mansoni*, por ejemplo (Mahmoud *et al.* 1975; David *et al.* 1980).

La respuesta eosinofílica es observada, tanto en cerdos recién nacidos como en lechones en crecimiento, mientras que los anticuerpos maternos evitan la respuesta sérica a la inoculación en lechones de 3 días de edad (Eriksen *et al.* 1980). En ratones, en cambio, el pico eosinofílico en infecciones primarias, ocurre más tardíamente, entre el 14 y 17 d.p.i., y entre el 12-14 d.p.i., tras infecciones secundarias (Nielsen *et al.* 1974; Eriksen *et al.* 1980).

Tanto la infección experimental como la inmunización con *A. suum*, no provoca alteraciones significativas en el resto de parámetros hemáticos abordados en este estudio. Este hecho también es señalado por otros autores (Eriksen *et al.* 1992; Roepstorff *et al.* 1997), aunque Eriksen (1982), detecta ligera basofilia en cerdos, tras

DISCUSIÓN

infecciones experimentales.

En nuestro estudio, solamente es destacable el aumento de linfocitos en las primeras semanas de infección, que puede ser producida por la migración larvaria a través de los tejidos, y que provocaría una estimulación policlonal de linfocitos B, desembocando en una hiperproducción de inmunoglobulinas, tanto específicas como inespecíficas frente al parásito.

V.4.3.- Respuesta inmunitaria humoral.

El estudio de esta respuesta revela, al igual que los recuentos de manchas de leche y larvas pulmonares, que los animales de mayor edad presentan unos niveles de inmunoglobulinas muy diferentes a los de menor edad. Estas diferencias no pueden ser achacables a factores genéticos de ambos grupos, ya que proceden de la misma línea reproductora, ni al efecto de los anticuerpos colostrales, dada la edad de los animales. En los primeros, es decir, en los animales mayores, siempre los niveles basales fueron más elevados que los anticuerpos presentes en los animales jóvenes el día 0 del estudio. Igualmente, la respuesta fue más precoz y sostenida en el tiempo, siendo una respuesta, como dijimos, típicamente de tipo secundaria. Esto explicaría la mayor resistencia adquirida por los animales viejos frente a los jóvenes, que como ya dijimos podría deberse a contactos previos con el parásito antes de llegar a nuestras instalaciones y/o al fenómeno de resistencia edad-dependiente.

Si analizamos la respuesta serológica general de todos los lotes frente a todos los antígenos, podemos descubrir que la mayor respuesta humoral se produce en los lotes inmunizados, y en concreto en los animales inmunizados con la fracción de 42 kDa.

DISCUSIÓN

Sin embargo, y según el número de lesiones en hígado y larvas en pulmón, ese nivel de anticuerpos séricos no se correlaciona con el nivel de protección, es decir, parece ser que la alta producción de inmunoglobulinas específicas en animales inmunizados, no tiene un efecto claramente protector a nivel prehepático, aunque sí en buena medida, a nivel posthepático. Esta ausencia de correlación ya ha sido citada por Hill *et al.* (1994), quienes observan que los fragmentos cuticulares de L₂, L₃ y adultos protegen frente a la migración larvaria, especialmente con el antígeno cuticular de las L₃, aunque el grado de protección es siempre inferior al 50%, no encontrando una correlación directa entre esa resistencia y los niveles de anticuerpos detectables mediante la técnica ELISA. Este resultado es comparable especialmente con el obtenido en el lote 7, donde el porcentaje de protección proporcionado por la fracción cuticular es muy bajo, mientras la respuesta humoral es evidente.

En este mismo sentido, Urban *et al.* (1988), citan a los extractos del parásito como inductores de una intensa reacción inmunitaria humoral, detectable por la técnica ELISA, que no logra detener la migración larvaria a nivel intestinal, al contrario de lo que ocurre cuando el cerdo es sometido a una inmunización mediante la exposición crónica al parásito.

Asimismo, Urban & Tromba (1982), comprueban en este trabajo, y otros posteriores, que la inmunización con huevos irradiados con rayos ultravioletas proporciona un alto grado de resistencia. Observan que tras la vacunación, los niveles de anticuerpos específicos se elevan, al tiempo que se logra una reducción considerable del número de larvas pulmonares. Sin embargo, con respecto al número de manchas de leche la relación no es tan clara, y además, un pequeño porcentaje de ellos puede continuar el ciclo evolutivo, produciendo adultos intestinales. Por tanto,

DISCUSIÓN

aunque el grado de protección es comparable al obtenido en nuestro estudio con la fracción de 14 kDa, ésta última evitaría la migración larvaria sin las consecuencias ya descritas.

Las respuestas inmunitarias de tipo primario son, en la mayor parte de los casos, de desarrollo lento, con un tiempo de latencia prolongado, de escasa intensidad y de duración breve (Roitt *et al.* 1986). Las respuestas secundarias, por el contrario, se desarrollan con tiempo de latencia mucho más corto, alcanzan niveles de intensidad más elevados y persisten más prolongadamente. Hay además, diferencias cualitativas entre los dos tipos de respuesta, ya que el anticuerpo formado en la respuesta primaria suele ser principalmente de la clase IgM, en tanto que el anticuerpo producido en el curso de una respuesta secundaria es en gran parte de la clase IgG (Roitt *et al.* 1986). En nuestros resultados, un aspecto digno de mención es la mayor rapidez de respuesta inmunitaria de los cerdos de mayor edad con relación a la de los cerdos de 2 meses de edad. Esto podría explicarse por el contacto previo con el parásito, que produce una respuesta secundaria.

Sin embargo, la intensidad de esta respuesta secundaria es similar o inferior a la respuesta primaria, que teóricamente presentarían los animales jóvenes. En los lotes 3 y 4 esto podría atribuirse a la resistencia preexistente a nivel intestinal, que supondría, a su vez, un freno para el estímulo antigénico durante la migración larvaria. No obstante, este razonamiento no es aplicable a los lotes 5, 6 y 7. Desde el punto de vista práctico, esto supone un serio inconveniente para el diagnóstico serológico, dado que en cerdos adultos, esta escasa respuesta a un estímulo débil pero continuo, puede producir un alto número de resultados falsos, tanto positivos como negativos.

DISCUSIÓN

Analizando las diferentes inmunoglobulinas, la respuesta inmunitaria basada en la IgG total parece que tiene mucho que ver con la reducción del número de larvas a nivel pulmonar, es decir, parece que dicha inmunoglobulina está implicada de una forma muy importante en el carácter protectorio a nivel posthepático.

En el caso de la IgM, se observa una fuerte correlación entre sus niveles y el nivel de protección alcanzado en los animales, siendo de forma más patente la correlación negativa con el número de manchas de leche ($r=-0,09$). Esta IgM podría originar una cierta protección frente a la migración larvaria, tanto a nivel prehepático como posthepático, impidiendo de algún modo que algunas de esas formas larvarias lleguen al hígado, y así evitar la formación de las manchas de leche.

Por último, y en cuanto a los diferentes antígenos utilizados (APS, ACU, ASL, AES, 14 kDa, 42 kDa y 97 kDa), debe señalarse que, los antígenos procedentes de las larvas, y especialmente los del componente excretor-secretor (AES), fueron los que presentaron, en general, un mayor nivel de reconocimiento mediante ELISA. En el sentido opuesto, es frente al antígeno de la fracción de 14 kDa donde se obtienen las respuestas inmunitarias más débiles en las dos inmunoglobulinas, siendo raramente visible por WB (Kennedy, 1988), por lo que el alto grado de protección y respuesta humoral que provoca la inmunización específica contra ésta indicaría que se trata de una proteína funcional, usualmente no reconocida.

V.4.4.- Análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

Las lesiones hepáticas, causadas por la migración de las larvas de *Ascaris suum*, son comúnmente conocidas como “manchas de leche”. Roneus (1966), realizó una descripción muy detallada de los diferentes tipos de manchas localizadas en el

DISCUSIÓN

hígado, a cuyas descripciones se adaptaron perfectamente las manchas halladas en nuestros estudios.

Tal y como fue señalado en el apartado IV.4.4, se visualizaron hasta 4 tipos diferentes de manchas de leche. Estas diferencias en cuanto a la morfología macroscópica de las lesiones hepáticas, pueden estar relacionadas con el tiempo transcurrido desde el momento en el que se produjo la migración a través del tejido hepático. Igualmente, podría existir un componente inmunomediado, como se demostró posteriormente, mediante el estudio inmunohistopatológico realizado en cada uno de los hígados de los cerdos del estudio.

Uno de los tipos de manchas más característico fue el que denominamos como reticulares. Estas manchas aparecieron, en mayor medida, en los lotes inmunizados y en el lote 2, mientras que los lotes re infectados tuvieron muy poca cantidad de ellas. Este hecho hace suponer que este tipo de manchas aparecen como resultado del paso reciente de las larvas a través del hígado. Algunos trabajos previos ya señalaron que las manchas reticulares pueden aparecer desde el día 3 p.i. (Oldham & White, 1944; Roneus, 1966) y que normalmente, tienden a desaparecer hacia el día 40 p.i. (Roneus, 1966); por lo tanto, nuestros resultados están en plena consonancia con los aportados por estos autores.

Es conveniente señalar que estos animales sensibilizados, podrían resultar falsos negativos mediante técnicas coprológicas, debido a que precisamente están en pleno contacto con las fases larvarias del parásito pero no tienen adultos intestinales, por lo que no puede haber eliminación de huevos. En este orden de cosas, creemos que la visualización de estas manchas por los inspectores veterinarios en matadero, debería ser motivo de alerta a los ganaderos propietarios de las explotaciones

DISCUSIÓN

afectadas, en orden a instaurar posibles tratamientos antihelmínticos estratégicos en sus animales.

Las manchas de leche de los dos lotes re infectados fueron sobre todo del tipo linfonodular, debidas probablemente a las reinfecciones semanales a las que fueron sometidos, porque estas manchas no aparecen normalmente hasta el día 10 p.i. (Roepstorff *et al.* 1997). Estas lesiones se caracterizaron por ser duras al tacto, circunscritas y de 1-2 mm de diámetro.

Según Roneus (1966) y Roepstorff *et al.* (1997), las lesiones linfonodulares son el resultado en la evolución temporal de las lesiones reticulares. Debido a que solamente aparecieron en los lotes que fueron infectados a lo largo de 2 meses de experimento, cabe suponer que la visualización de estas lesiones, es indicativo de una infección ya tardía, es decir, crónica, ya que los cerdos infectados recientemente (lotes 2, 5, 6 y 7) no las presentaron.

Estos resultados coinciden con los de Schwartz & Alicata, 1933 ya que según estos autores las manchas linfonodulares suelen aparecer a los 10-13 d.p.i., con una evolución progresiva y desapareciendo entre los 90-170 d.p.i. (Roneus, 1966).

Llama la atención la presencia de estas lesiones en los cerdos tratados con pirantel, sugiriendo que, un número suficiente de larvas migró a través del hígado, lo que obliga a cuestionar el beneficio de la utilización continua de piensos tratados con fines preventivos, en favor de tratamientos estratégicos.

Los estudios histopatológicos a nivel del hígado, pulmón e intestino han evidenciado una reacción inflamatoria en estos órganos. Esta inflamación estuvo caracterizada por una intensa infiltración, que fue especialmente intensa en los lotes inmunizados y seguidamente sometidos al reto, es decir, en aquellos animales que

DISCUSIÓN

teóricamente no presentaban resistencia previa a dicho desafío.

Es conocido que la respuesta inmunitaria frente a la ascariosis, en sus diferentes vertientes de infección e inmunización, tiene un componente celular muy importante (Jungersen, 1998). Cabe suponer que, si la protección alcanzada mediante reinfecciones o inmunizaciones seriadas no presenta gran relación con el nivel de anticuerpos, tal y como hemos comprobado en nuestro estudio, entonces cabría esperar que el factor inmunitario celular jugaría un papel primordial en la protección, sobre todo a nivel prehepático.

Como ya hemos mencionado, la respuesta inmunitaria celular ha sido especialmente notoria a nivel de los órganos de migración, siendo más patente en los cerdos de los lotes inmunizados. Esto podría explicarse porque la inmunización con diversas proteínas del parásito habría podido provocar, en estos cerdos, una estimulación antigénica a nivel de los órganos del sistema inmune, que al entrar en contacto con las fases larvianas desemboca en la activación policlonal de linfocitos B y T, de manera que se produce una invasión masiva de elementos celulares en los órganos migratorios. Es decir, la inmunización provoca en los animales, una reacción de hipersensibilidad al verse sometidos al reto posterior.

En los animales reinfectados (lotes 3 y 4) las lesiones histopatológicas más llamativas fueron la presentación de granulomas, con células predominantemente de tipo linfocitario que se correspondían con las lesiones macroscópicas de tipo linfonodular crónica en el hígado, las más abundantes en los hallazgos de matadero en infecciones naturales (Bindseil, 1969).

Es de suponer que la presentación de estas formaciones granulomatosas en el tejido hepático y pulmonar, son el resultado del atrapamiento de material

DISCUSIÓN

antigénico (larvas en migración) intentando aislar dicho material, como también es característico de otras patologías parasitarias e infecciosas (Abbas *et al.* 1995). Sin embargo, se ha observado, además de la abundante infiltración celular, una importante fibrosis tisular., la cual, como mecanismo de “curación y reparación”, pudiera sin embargo, provocar una interferencia frente a la función tisular normal.

El análisis inmunohistoquímico, con el fin de detectar la presencia de antígenos de *A. suum*, demostró la existencia de gran cantidad de los mismos, si bien la localización de cada uno de ellos fue diferente, sobre todo a nivel hepático. La presencia de estos antígenos favorecería la migración de todos los elementos celulares que detallamos con anterioridad, especialmente evidente en los lotes inmunizados con las fracciones proteicas de 42 y 14 kDa.

Es importante señalar que uno de los principales problemas de la técnica inmunohistoquímica es la posible aparición de resultados falsos positivos, debidos a la tinción de zonas tisulares donde no existe unión antígeno-anticuerpo.

Igualmente, podría darse la circunstancia de la aparición de resultados falsos negativos, por la falta de tinción tisular en regiones en las que verdaderamente sí exista depósito de antígenos. Para evitar todos estos problemas, se realizaron una gran cantidad de pruebas en cuanto a diluciones séricas de anticuerpos, tanto primarios como secundarios, tiempos de incubación, absorción de los sueros con el anticuerpo primario junto a seroalbúmina bovina, bloqueo de la peroxidasa endógena, etc.

En la exhaustiva revisión realizada de ascariosis porcina llevados a cabo hasta la fecha, no hemos podido encontrar estudios comparables a los nuestros, relacionados con la detección de productos antigénicos específicos de este parásito,

DISCUSIÓN

excepto a nivel intestinal, ya que los escasos trabajos en los que se ha aplicado la técnica inmunohistoquímica, han sido con el fin fundamental de detectar la presencia de inmunoglobulinas en los tejidos.

No obstante, De Brito *et al.* (1994), analizando biopsias de hígados humanos para la detección de antígenos de *T. canis*, observó depósitos fagocitados por macrófagos en la periferia de granulomas ricos en eosinófilos, en el infiltrado inflamatorio portal, entre las células epitelioides cercanas a las áreas de necrosis, así como en depósitos secuestrados en el colágeno de la región periportal.

En nuestros experimentos, la mayor cantidad de depósito antigénico de *A. suum* fue observada en la matriz extracelular a nivel de la sustancia colágena. Esto podría deberse probablemente, a la alta solubilidad de algunos componentes antigénicos del parásito, que por difusión serían secuestrados en esa matriz extracelular. Esto mismo, es decir, el depósito de antígenos en el tejido de fibrosis hepático, ha sido observado por De Brito *et al.* (1994) en biopsias hepáticas de personas infectadas por *T. canis*, y por Parsons *et al.* (1986), en toxocariosis experimental crónica en ratón.

Nuestros resultados concuerdan, igualmente, con los obtenidos por Marbella & Gaafar (1989), al demostrar que, las principales localizaciones antigénicas en el tejido intestinal de cerdos infectados por *A. suum*, son las regiones intercriptales de la lámina propia. Dichos depósitos se encuentran, normalmente, asociados a los lugares donde también se acumulan las células plasmáticas cargadas de inmunoglobulinas.

Otros antígenos, tales como el fluido pseudocelómico y los larvarios, han sido detectados en mayor medida en otras localizaciones, sobre todo en la luz de los

DISCUSIÓN

conductos biliares. Probablemente debido a que tales componentes del parásito presentan una mayor afinidad por los pigmentos biliares al ser más liposolubles, característica compartida por dichos pigmentos.

Respecto a la distribución de inmunoglobulinas porcinas en los diferentes órganos implicados en la migración tisular, el presente estudio demuestra un depósito casi exclusivo de IgA, tanto a nivel pulmonar como intestinal, si bien se localizó un moderado depósito de IgG a nivel hepático en ciertos lotes del estudio.

Esto concuerda con los escasos trabajos realizados hasta el momento a nivel de la mucosa intestinal, en cerdos infectados por *A. suum*, en los que se observa un predominio de células plasmáticas cargadas de IgA, sobre las otras dos inmunoglobulinas, IgG e IgM (Marbella & Gaafar, 1989).

Además, Pérez *et al.* (1999), también observan una moderada presencia de células IgA⁺ o IgG⁺ en lesiones hepáticas agudas del tipo reticular, siendo ocasionales las IgM⁺. No obstante, en este último trabajo, los estudios están basados en cerdos provenientes de matadero, sin que se conozca el tiempo de infección, la antigüedad de las lesiones analizadas y otros parámetros relativos al hospedador, hecho que limita enormemente la posibilidad de obtener conclusiones firmes.

V.4.5.- Parámetros productivos: ganancia de peso corporal y perfiles lipídicos en hígado y canal.

Debido a la gran prevalencia, y por tanto, enorme importancia que presenta *A. suum* en la cabaña porcina ibérica de nuestro país (Pérez-Martín *et al.* 1991; Frontera, 1998), quisimos comprobar, la influencia que este helminto ejerce en la producción porcina, determinando, en los animales experimentales, la ganancia media de peso

DISCUSIÓN

en función de los tratamientos utilizados en los distintos lotes.

Los resultados de este estudio revelan que los animales de mayor edad, los cuales suponemos habían tenido contacto previo con el parásito y por tanto, presentaban ya un cierto nivel de resistencia frente al mismo, no parecen mostrar un detrimento importante en la ganancia de peso tras la infección con huevos larvados o la inmunización con proteínas del parásito. Incluso, se detectaron porcentajes de crecimiento mayores en los lotes que habían mantenido un protocolo de tratamiento que en los cerdos pertenecientes a los grupos control. Solamente los cerdos del lote 7, inmunizados con la proteína cuticular de 97 kDa, presentaron ganancias de peso significativamente menores que los controles.

Estos hallazgos son muy similares a los obtenidos por Stankiewicz *et al.* (1990), quienes no encontraron diferencias significativas entre distintos grupos experimentales reinfectados, con y sin tratamiento con pirantel, y los lotes control. Del mismo modo, estamos en plena concordancia con los resultados obtenidos por Stewart *et al.* (1985), no observando diferencias significativas en la ganancia media diaria de peso de cerdos infectados y/o tratados con fenbendazol.

Igualmente, Stephenson *et al.* (1980) tras la infección de cerdos de 15 días de edad con huevos larvados de *A. suum*, no observaron diferencias en la ganancia media de peso ni en el índice de conversión o la absorción de nutrientes, respecto a cerdos control no infectados.

Algunos estudios de campo (Nilsson, 1982; Bernardo *et al.* 1990), sugirieron que si bien hay una cierta influencia negativa de la presencia de *A. suum* en cerdos en condiciones naturales, solamente las altas cargas por este helminto influyen de manera significativa.

DISCUSIÓN

Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos en los animales de 2 meses de edad, los cuales no habían tenido contacto previo con el parásito y por tanto, eran animales primo infectados y/o primo inmunizados, sin resistencia previa. En este caso, se detectó un menor porcentaje en la ganancia de peso de los animales reinfectados (sobre todo del lote tratado simultáneamente con pirantel) respecto a los lotes control, si bien estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos.

Posiblemente sea el hecho de la resistencia, previa al comienzo del experimento que presentaban los animales de mayor edad, lo que produjo que la influencia del parásito en la ganancia de peso de los cerdos no fuera evidente, e incluso fuera favorecedora.

El estatus inmunitario más fuerte en los animales mayores (correlaciones significativamente positivas entre la ganancia de peso y los niveles de inmunoglobulinas G y M), pudo implicar que el daño producido por las larvas en estos cerdos fuera mucho menor que en los animales sin resistencia previa (animales jóvenes), como lo demuestra la gran diferencia del número de larvas pulmonares y manchas hepáticas encontradas en los dos grupos de edad. Esta hipótesis se ve reforzada en cuanto a que algunos autores han observado una relación inversa entre el número de vermes y/o larvas de *A. suum* y la ganancia media de peso de los mismos (Spindler, 1947; Hale *et al.* 1985).

En este sentido, hay autores que denuncian una significativa influencia de esta parasitosis en la ganancia media de peso. Así, Helwich & Nansen (1999), señalaron pérdidas significativas en la ganancia de peso corporal en cerdos infectados respecto a los controles, si bien dichos estudios se realizan en cerdos SPF, con monodosis simples.

DISCUSIÓN

Conclusiones similares obtienen otros autores, como Spindler (1947), Lindquist (1957), Brody & Wuest (1963), Forsum *et al.* (1981), Drummond *et al.* (1981) o Hale *et al.* (1985), si bien, en general, las dosificaciones y las cargas parasitarias halladas en dichos animales fueron muy elevadas, superando en muchas ocasiones, la dosificación y pautas de tratamiento seguidas en nuestros estudios.

En nuestro caso, la inmunización con ciertas proteínas del parásito (14 y 42 kDa) a lo largo del tiempo de estudio, produjo mayores porcentajes en la ganancia de peso corporal en relación a los animales infectados y los controles, tanto en los animales jóvenes como viejos, lo que podría indicar que la “vacunación” con estas proteínas tuvo un efecto estimulador del crecimiento, bien directamente, o bien de forma indirecta al frenar la migración y disminuir el daño que produjeron las larvas en su paso a través de los tejidos.

Junto a la ganancia de peso corporal, evaluamos los perfiles de ácidos grasos, tanto en el hígado como en la grasa muscular del *biceps femoris*.

La discusión de estos resultados, resulta muy difícil de abordar; por una parte debido a la ausencia de bibliografía específica sobre la influencia que ciertas patologías parasitarias, como la ascariosis, tienen sobre la composición de ácidos grasos del hígado y la canal de los cerdos. Las únicas citas recogidas se centran, sobre todo, en la influencia de la raza o la alimentación sobre los ácidos grasos corporales. Por otra parte, debido a que los resultados parecen indicar, tanto en el estudio de la grasa hepática como la intramuscular, una ausencia de efecto significativo de esta parasitosis sobre la composición de ácidos grasos de su grasa.

No obstante, hay un hecho llamativo, y es que los animales con mayor lesión en el hígado, es decir, los animales de los lotes 2 y 7, presentaron en este tejido un

DISCUSIÓN

menor porcentaje de ácidos grasos totales, y proporcionalmente de ácidos grasos saturados. En estos animales, la gran cantidad de lesiones hepáticas produce un daño considerable en la estructura normal de este órgano. De este modo, la superficie que ocupan las manchas de leche, respecto a la superficie total del hígado, es mucho mayor en los lotes 2 y 7 que en el resto. Histológicamente, esas lesiones se constituyen, fundamentalmente, de células infiltrativas y de tejido conectivo.

Todos estos datos nos hacen pensar que, posiblemente al haber menor cantidad de hepatocitos funcionales en los hígados dañados, podría haber una menor acumulación de ácidos grasos en los mismos, lo que explicaría la menor cantidad de grasa en los cerdos de los lotes más afectados. Es decir, al presentar hígados más fibrosos, porcentualmente, la cantidad de grasa será menor.

Sobre el mayor o menor porcentaje de ácidos grasos saturados, mono o poliinsaturados en cada uno de los lotes, no debemos obtener conclusiones dignas de mención, ya que las diferencias son escasas y tan sólo fueron analizados 3 animales de cada uno de los lotes, para la determinación de los perfiles lipídicos hepáticos y solamente 1 animal, para la determinación del perfil lipídico intramuscular. Por tanto, los resultados obtenidos, suponen una primera aproximación en el conocimiento de la influencia de esta parasitosis sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa corporal.

De este modo, estos resultados preliminares son el primer paso de una nueva línea, gestada en este proyecto de investigación, que, junto al análisis del perfil de aminoácidos de estos mismos animales, supondrá un buen conocimiento en cuanto a la influencia que esta parasitación produce en la composición tisular de su hospedador natural, el cerdo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- En la ascariosis natural porcina no se encuentra correlación entre la intensidad de infección o carga parasitaria de un hospedador y el resultado de los inmunoanálisis realizados, independientemente del antígeno ensayado.

- 2.- La optimización de las condiciones de embrionamiento *in vitro* de huevos de *A. suum*, permite conocer que una temperatura de 23-26 °C, unas condiciones ambientales de luz y humedad y una concentración de 25 huevos/ μ l en NaOH 0,1N, se obtiene una fase infectante a la 4-5 semanas, que tras su administración a los animales experimentales posibilita una recuperación larvaria pulmonar hasta del 34%.

- 3.- La técnica Western blotting demuestra que las bandas en torno a los 97 kDa, 54-58 y 42-44 kDa son las más reconocidas tanto en los sueros provenientes de cerdos de matadero como en los experimentalmente infectados.

- 4.- Los contactos reiterados con huevos infectantes de *A. suum* confieren un alto grado de protección para los animales experimentalmente retados. Entre las proteínas eluidas y usadas como inmunógenos, la de 14 kDa, obtenida del fluido pseudocelómico, produce igualmente una elevada protección, situándose entre el 81% y hasta el 99%, a nivel pre y posthepático, respectivamente.

CONCLUSIONES

- 5.- Los animales de mayor edad se muestran más protegidos que los más jóvenes, presentando una respuesta inmunitaria humoral típicamente secundaria.

- 6.- No existe relación entre el nivel de IgG con la protección prehepática, aunque sí con cierta resistencia a nivel pulmonar, ya que los animales jóvenes y los inmunizados con las proteínas de 42 y 97 kDa, si bien presentan los mayores niveles de IgG son los menos protegidos. Al contrario, los niveles de IgM, más elevados en los animales de mayor edad y los lotes re infectados, sí muestran una relación con la protección pre y posthepática.

- 7.- Se detecta una marcada eosinofilia en el colectivo experimental re infectado, especialmente durante las fases de migración hepática y pulmonar. Por su parte, los lotes inmunizados, si bien mantuvieron niveles basales previamente al reto, a partir de éste se produce una espectacular eosinofilia, debido posiblemente al fenómeno de hipersensibilización de dichos animales.

- 8.- La migración de *A. suum* produce un abundante depósito selectivo de antígenos en los órganos de tránsito, sobre todo en el tejido conectivo intersticial de los mismos. Además a nivel hepático, el fluido pseudocelómico y los larvarios se detectan marcadamente en la luz de conductos biliares, situándose además el excretor secretor larvario a nivel de colangiolo.

CONCLUSIONES

- 9.- En cuanto a la ubicación tisular de inmunoglobulinas, la IgA es la detectada en mayor cantidad, localizándose fundamentalmente en zonas secretoras, tales como luces bronquiales y mucosa intestinal, así como en células plasmáticas. Por su parte, la IgG se detecta de forma leve y únicamente en animales reinfectados e inmunizados con la proteína de 42 kDa. Finalmente, no se detectan depósitos de IgM en los órganos estudiados.
- 10.- Los parámetros productivos analizados muestran que las reinfecciones e inmunizaciones seriadas, no influyen de manera significativa en la ganancia de peso corporal de los animales experimentales. Del mismo modo, los animales con mayor número de manchas de leche presentan menor cantidad de ácidos grasos en los extractos hepáticos, posiblemente por la fibrosis que dichas manchas confieren.

RESUMEN

RESUMEN

Se realiza un estudio sobre la ascariosis en el cerdo ibérico, tanto en condiciones naturales como experimentales. Se pretende ampliar los conocimientos de esta frecuente parasitación en diferentes campos, englobando aspectos parasitológicos, inmunológicos, patológicos y zootécnicos, los cuales pudieran redundar en el control y la mejora sanitaria de las explotaciones ganaderas de esta peculiar raza porcina.

Con este objeto, se plantea por un lado, un estudio con 95 animales, de 12-14 meses y 130-180 Kg, sacrificados en matadero, a los que se les extrajeron los sistemas viscerales y el suero sanguíneo para su análisis, en aras a un mayor conocimiento de la ascariosis en condiciones naturales.

Por otro lado, se diseñan otros dos experimentos, temporalmente consecutivos, para el estudio de la ascariosis en condiciones experimentales. El primero de ellos consiste en el análisis de 13 animales de raza ibérica, que fueron sometidos a las más diversas pautas de infección y cuyos resultados constituirían la base para la realización del segundo experimento, y cuerpo fundamental de esta memoria. En este último, se utilizan 56 animales de ambos sexos divididos en 7 lotes. Cada lote se constituye por 5 animales, de 4 meses de edad y por 3 animales, de 2 meses de edad. Resumiendo, los dos primeros lotes se usan como controles, no infectado y control del reto (lotes 1 y 2, respectivamente). Otros dos grupos (lotes 3 y 4) reciben dosis, semanalmente crecientes, de huevos infectantes (500, 1000, 2000, 5000, 10000 y 20000), añadiendo al pienso del lote 4 pamoato de pirantel a lo largo de todo el periodo de estudio, y coincidiendo con las infecciones semanales. Los tres grupos restantes fueron inmunizados con sendas proteínas; a saber, de 14 y 42 kDa, obtenidas a partir del fluido pseudocelómico de los vermes adultos (lotes 5 y 6) y de

RESUMEN

97 kDa, obtenida a partir de la cutícula de los mismos (lote 7). Todas ellas fueron inoculadas semanalmente, a razón de 1 µg de proteína/Kg peso vivo. Finalmente, todos los lotes (excepto el control 1 no infectado) fueron retados con 10.000 huevos una semana antes de su sacrificio.

Para la obtención de elementos infectantes, a partir de los huevos aislados del útero de hembras adultas, se ensayan diferentes condiciones de cultivo.

El nivel de protección y resistencia en los diferentes lotes se determina en base al número, aspecto y configuración de manchas de leche en hígado y de larvas recuperadas en pulmón, utilizando los métodos de Baermann y de digestión péptica.

Además, semanalmente, se tomaron muestras de sangre para conocer el nivel de IgG e IgM mediante la técnica inmunoenzimática ELISA y frente a 7 antígenos diferentes del parásito (fluido pseudocelómico y cutícula de adultos, somático y excretor-secretor de larvas y las proteínas de 14, 42 y 97 kDa, antes mencionadas).

Para los estudios patológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos, se obtienen diferentes órganos de los cerdos experimentales, los cuales se fijan en formol tamponado al 10 % y se incluyen en parafina de bajo punto de fusión para su posterior procesamiento y tinción.

Por último, se determina la influencia de esta parasitosis en la ganancia de peso corporal en los diferentes lotes del estudio y el perfil lipídico de la grasa hepática y muscular.

El estudio de la ascariosis natural revela, por técnicas convencionales de necropsia y coprología, más de un 61 % de cerdos parasitados por *A. suum*. No obstante, las técnicas coprológicas presentaron un 18,94 % de falsos positivos y un

RESUMEN

11,57 % de falsos negativos respecto a la presencia de adultos intestinales. Utilizando la técnica ELISA, el 100 % de los cerdos resultaron ser serológicamente positivos al parásito, al menos frente a algún antígeno procedente de vermes adultos. No obstante, la intensidad de esa respuesta sérica no se correlaciona con el número de vermes en intestino ni con el número de elementos de diseminación parasitarios.

Las diferentes pruebas realizadas, con el fin de obtener las condiciones óptimas en el desarrollo embrionario de los huevos de *A. suum* con fines experimentales, muestran que las condiciones ambientales de temperaturas (23-26°C), luminosidad y humedad, con una concentración de 25 huevos/ μ l en medio NaOH 0,1N, durante 4-5 semanas de cultivo, son las más adecuadas, al menos en nuestras condiciones laborales.

Los niveles de protección alcanzados fueron extraordinariamente importantes en los cerdos reinfectados, consiguiendo evitar casi el 100 % de la migración larvaria a nivel pulmonar. En estos mismos animales, la resistencia prehepática también fue importante, al igual que la protección lograda con algunas fracciones proteicas ensayadas, que llega al 80 %, a nivel prehepático y hasta el 99 %, a nivel posthepático. Estos resultados abren un nuevo camino a la posibilidad del control de esta parasitosis mediante ensayos inmunoprotectores con extractos proteicos purificados obtenidos del propio parásito.

Los resultados demuestran que no existe una clara relación entre el nivel de IgG y el grado de resistencia a la migración larvaria a nivel hepático. Sin embargo, parece que los elevados niveles de esta inmunoglobulina confieren un cierto grado de protección a nivel pulmonar. Por su parte, la presencia de IgM demuestra un papel

RESUMEN

primordial en la resistencia pre y posthepática, previniendo la aparición de las manchas de leche.

En los dos tipos de inmunoglobulinas, los antígenos procedentes del componente excretor-secretor de las larvas fueron los que presentaron, en general, un mayor nivel de reconocimiento mediante la técnica ELISA. Por el contrario, las respuestas más débiles, en ambas inmunoglobulinas, se obtienen frente al antígeno obtenido de la fracción de 14 kDa.

En cuanto a la patología desencadenada tras la infección por *A. suum*, destaca la importante eosinofilia sanguínea y tisular, alcanzado las tasas hemáticas más elevadas a la 3^a-4^a s.p.i.

Las inmunizaciones con proteínas del parásito no provocan aumento de eosinófilos sanguíneos durante la fase de inmunización, aunque estimulan el sistema inmunológico, de forma que el contacto con las propias fases larvarias, tras el reto, da lugar a una activación policlonal de tipo secundario, con aumento exponencial del número de dichos eosinófilos.

En esta patología tisular se observan las típicas manchas de leche, provocadas por la migración larvaria, de 4 tipologías diferentes, en función del tiempo de infección y del componente inmunomediado de las mismas. Las de tipo reticular aparecen tempranamente, son grandes, no prominentes y su estudio inmunohistoquímico demuestra un abundante depósito de antígenos de *A. suum*. Otros dos tipos de manchas son, por un lado, las de tipo “foggy”, de 5-10 mm, visualizadas como una ligera opalescencia de la cápsula hepática y, por otro lado, las grandes manchas de más de 6-10 mm, duras y salientes, con centro definido. Por

RESUMEN

último, se denotan las de tipo linfonodular, las más tardías, de 1-2 mm, duras y prominentes al tacto.

El estudio inmunohistoquímico demuestra la existencia de abundante depósito de antígenos de *A. suum*, tanto de adultos como larvarios, así como de las fracciones proteica; su ubicación principal se sitúa a nivel del tejido conectivo intersticial. Además se encuentran depósitos en macrófagos, conductos biliares y colangiolos.

En cuanto a la detección de inmunoglobulinas a nivel tisular, la IgA es la que se evidencia en mayor cantidad y con mayor frecuencia, sobre todo, en la luz y epitelio bronquial, en la lámina propia de la mucosa intestinal y en gran cantidad de células plasmáticas. La detección de IgG fue escasa, solamente a nivel del intersepto pulmonar y de la mucosa intestinal, en los lotes re infectados y en el lote 6, mientras que la IgM no fue detectada en ninguno de los tejidos analizados.

La influencia de la infección experimental seriada con *A. suum*, así como la inmunización con ciertas proteínas del parásito, no tienen una significativa influencia en la ganancia de peso corporal de los animales del estudio. No obstante, los animales primoinfectados, experimentan un cierto detrimento en la ganancia de peso corporal, indicando que una inmunidad previa a la infección, que evitara fuertes parasitaciones, implicaría indirectamente, un mejor rendimiento en el crecimiento de los lechones.

El análisis de los perfiles lipídicos en extractos hepáticos y musculares, no evidencia claras diferencias, ni cuantitativas ni cualitativas, entre los distintos lotes experimentales. Únicamente se observó que, los lotes que presentaron mayor número de manchas de leche, mostraron una ligera menor cantidad de ácidos grasos totales

RESUMEN

hepáticos que el resto, posiblemente debido al mayor porcentaje de tejido fibroso en dicha localización.

SUMMARY

SUMMARY

A study has been carried out about swine ascariasis in both natural and experimental conditions. The purpose is to improve the knowledge of this parasitic disease in different fields, including parasitological, immunological, pathological and productive parameters. All these results were correlated among them and will entail new ways to control this frequent parasitosis.

The swine natural ascariasis was investigated in 95 Iberian pigs, 10-12 months old weighing 130-180 Kg. Samples from blood and visceral systems were analyzed in this study, in order to gain a greater knowledge of the ascariasis in natural conditions.

On the other hand, two experimental projects were designed in order to analyze the different parameters in the experimental ascariasis. In the first, a total of 13 Iberian pigs were infected by single and trickle doses and were killed at different weeks post-infection. In the second experiment, a total of 56 pigs were allocated into 7 groups on the basis of sex, litter and weight. Each group was composed of 5 pigs, all 15 weeks old and 3 pigs, all 4 weeks old. In short, 2 groups served as uninfected and challenged controls, respectively (group 1 and 2). The other 2 groups (group 3 and 4) received increasing infective doses of 500, 1000, 2000, 5000, 10000 and 20000 eggs at 7-day intervals. Medical feed (96 mg/Kg pyrantel pamoate) was provided 2 days before until 2 days after each prechallenge inoculation (only group 4). In this experiment, groups of pigs were immunized weekly with 1 μ g of 14 kDa (group 5) and 42 kDa (group 6) fractions of body fluid and 97 kDa (group 7) of body wall per Kg body weight. Pigs (excepting uninfected control group) were challenged with doses containing 10000 infective eggs and were given 7 days after the last prechallenge treatment. The animals were killed 7 days after challenge.

SUMMARY

The level of resistance in different groups was established by the number of white spots in the livers and the number of larvae in the lung. Also, the level of IgG and IgM were tested by ELISA against 7 different antigens of *A. suum* (body fluid and body wall from the adult worms, somatic and excretory-secretory from the larvae and proteins of 14, 42 and 97 kDa). The infected eggs were obtained from female *Ascaris* and were embrionated in NaOH 0,1N at room temperature at 25 eggs/ μ l.

Biopsies from different organs were fixed in 10% buffered formalin, routinely embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin. The material was then stained with Masson's trichrome. For the immunohistochemical procedures, thick sections from the paraffin blocks were used according to the peroxidase anti-peroxidase technique.

Finally, the influence of this parasite was determined in the weight gain of different groups. Profiles of fatty acids were investigated in livers and muscle extracts from the animals.

By necropsy and coprological methods, 61% of naturally Iberian pigs were found positive to *A. suum*. However, 18,94% were false positive and 11,57% were false negative, respective to the presence of intestinal *Ascaris*, as discovered by coprological techniques. Using the ELISA test, 100% of the pigs were positive against some adult antigens, yet the level of optical density did not correlate with the number of adult worms in the small intestine nor with the eggs in the feces.

The optimal conditions, for in vitro embrionation of the infective eggs were the following: room temperature (23-26°C), light, room humidity and a concentration of 25 eggs/ μ l in NaOH 0,1N for 4-5 weeks.

SUMMARY

The levels of protection were very high in reinfected pigs, avoiding migration of almost 100 % of the larvae through the lung. The prehepatic resistance was also very important; the obtained protection in some immunized groups reached very high levels in both prehepatic localizations (80 %) and posthepatic localizations (99 %). This result will open new doors for the immune control of swine ascariasis by immunoprotection assays with some purified protein extracts from the parasite.

There was not any significative correlation between the level of IgG and the degree of resistance against the migration of larvae at a prehepatic level. However, it seems that the high levels of IgG confer some resistance in a posthepatic localization. The IgM could play an important role in the resistance against the migration of *A. suum* in a pre- and post- hepatic localization.

The excretory-secretory antigen from larvae was the most recognized from animal sera. However, the 14 kDa protein was the least recognized.

A. suum produces an important eosinophilia in the blood and tissues. A great difference was observed between the two reinfected groups (3 and 4) and the remaining groups. In these reinfected animals, the greatest indexes of blood eosinophilia were observed 3-4 weeks post-infection. The immunization does not produce a significant rise of eosinophils during all experiment, except between the challenge and sacrifice days. The explanation could be a secondary response against the migrating larvae, which produce a polyclonal activation of different cells in the immune organs.

According to previous studies, four different white spots have been seen in livers of different animals. The earliest spots were big and flat, like a mesh, with a great deposit of *Ascaris* antigens in this area. The “foggy” spots were 5-10 mm in

SUMMARY

diameter, like light opalescence. The “big spots” were more than 4-10 mm, hard and protruding, with a defined centre. Finally, the spots seen last were linfonodular, 1-2 mm in diameter, hard and protruding, .

The immunohistochemistry studies showed a great deposit of *A. suum* adult and larvae antigens, which were located in connective tissues of the different analyzed organs. Besides, there were some body fluid and somatic larvae antigens in biliary conducts and cholangiols. The IgA was the most abundant immunoglobulin in the tissues. It was located in secretory areas, like bronchial epithelium and the *lamina propria* of the intestine. The detection of IgG was very low, only found in the pulmonary connective tissue and intestinal mucous from reinfected and immunized pigs with the 42 kDa protein. The IgM was not observed in any analyzed tissue.

There was no significative influence of experimental infections or immunization on body weight gain. However, it seems that reinfected pigs (without previously immunity to *A. suum*), have a light loss in weight gain comparison to the remaining pigs. This fact explains that a previously immunization in pigs, which avoided the migration of the *Ascaris* larvae, produces an improvement in the weight of infected piglets.

The fatty acids profiles do not show differences, neither quantitative nor qualitative differences, among different experimental groups. However, it was observed that the groups with the greatest number of white spots showed the smallest quantity of fatty acids in the liver. It is possible that these damaged livers have a greater percentage of fibre and, indirectly they have a smaller percentage of fat.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. & POBER, J. S. (1995). *Inmunología celular y molecular*. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. New York.
- AGUILA, C.; CUELLAR, C. & GUILLEN, J. L. (1988a). Excretory/secretory antigen of *Toxocara canis*: recognition profiles of polyclonal and larvicidal monoclonal antibodies. *Parasitol. Immunol.*, 10, 237-241.
- AGUILA, C.; CUELLAR, C. & GUILLEN, J. L. (1988b). Anticuerpos monoclonales frente al antígeno excretor/secretor de *Toxocara canis*. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 48 (2), 209-220.
- AJAYI, J. A.; ARABS, W. L. & ADELEYE, G. A. (1988). Helminths and protozoa of pigs on the Jos plateau, Nigeria: occurrence, age, incidence and seasonal distribution. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.*, 36, 47-54.
- AMBLER, J.; DOE, J. E.; GEMMELL, D. K., ROBERTS, J. A. & ORR, T. S. (1972). Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes. I. Detection of allergenic components in *Ascaris suum* extracts. *J. Immunol. Methods*, 1, 317-328.
- AMERASINGHE, P. H.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; LLOYD, S. & FERNANDO, S. T. (1992). Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. *Parasitol. Res.*, 78, 643-647.
- ANDERSEN, S.; JORGENSEN, J.; NANSEN, P. & NIELSEN, K. (1973). Experimental *Ascaris suum* infection in piglets. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 81 B, 650-656.
- APARICIO SÁNCHEZ, G. (1960). *Zootecnia Especial*. Imprenta Moderna, Córdoba.
- APARICIO MACARRO, J. B. (1987). *El cerdo Ibérico*. Premio de Investigación Sánchez Romero Carvajal. Jabugo. S.A.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCHER, G.; COULITS, N.; JINDRA, J. & ROBSON, J. (1985). Eosinophilia, mast cell hyperplasia and antibody production in rats following an intraperitoneal injection of ascaris cuticle including in-vitro studies of immune eosinophil granule lysis. *Pathol.*, 17, 101-107.
- AREAN, V. M. & CRANDALL, C. A. (1962). Experimental ascaridic endophthalmitis. *Archs Opthal.*, 69, 585.
- ASHRAF, M.; URBAN, J. F.; LEE, T. D. & LEE, C. M. (1988). Characterization of isolated porcine intestinal mucosal mast cells following infection with *Ascaris suum*. *Vet. Parasitol.*, 29, 143-158.
- BANGHAM, A. D. (1980). Development of the liposome concept. In : G. Gregoriadis and A. C. Allison (Editors), *Liposomes in biological systems*. John Wiley, New York, 1-24.
- BARDON, M. R. (1992). Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- BARDON-GADE, P. A. (1987). Meat and fat quality in boars, castrates and gilts. *Livestock Production Science*, 16, 187-196.
- BARTA, O.; STEWART, T. B.; SHAFFER, L. M.; HUANG, L & SIMMONS, L. A. (1986). *Ascaris suum* infection in pigs sensitizes lymphocytes but suppresses their responsiveness to phytoantigens. *Vet. Parasitol.*, 21, 25-36.
- BARTELMEZ, S. H.; DODGE, W. H. & BASS, D. A. (1980a). Differential regulation of spleen cell-mediated eosinophil and neutrophil-macrophage production. *Blood*, 55, 489-493.
- BARTELMEZ, S. H.; DODGE, W. H.; MAHMOUD, A. A. F. & BASS, D. A. (1980b). Stimulation of eosinophil production *in vitro* by eosinophilopoietin

BIBLIOGRAFÍA

- and spleen cell-derived eosinophil growth-stimulating factor. *Blood*, 56, 706-711.
- BEAVER, P. C.; JUNG, R. C. & CUPP, E. W. (1986). *Parasitología Clínica*. 2ª Ed. Salvat.
- BENKOVA, M. (1982). The immunizing effect and dynamics of circulating antibodies after treating pigs with antigens from *Ascaris suum*. *Helminthol.*, 19, 47-49.
- BENKOVA, M.; BOROSKOVA, Z. & POPLUHAR, L. (1986). Non-specific increase of cellular immunity by BCG-vaccine during experimental ascariidiosis of guinea pigs. *Folia Veter.*, 30 (1), 59-70.
- BENKOVA, M.; BOROSKOVA, Z.; DUBINSKY, P. & SOLTYS, J. (1992a). Immunomodulative effect of glucans in experimental Ascariosis. VI European Multicolloquium of Parasitology, The Hague (Netherlands), P258, 7-11 September.
- BENKOVA, M.; BOROSKOVA, Z.; SOLTYS, J. & KRUPICER, I. (1992b). Variations in the number of T and B cells and in the macrophage activity of guinea pigs with experimental ascariosis after subchronic intoxication with industrial immision. *Helminthol.*, 29, 211-215.
- BERNARDO, T. M. ; DOHOO, I. R. & DONALD. A. (1990a). Effect of Ascariasis and Respiratory Diseases on Growth Rates in Swine. *Can J Vet. Res.*, 54, 278-284.
- BERNARDO, T. M.; DOHOO, I. R.; DONALD.; OGILVIE, T. & CAWTHORN, R. (1990b). Ascariasis, respiratory diseases and production indices in selected prince Edward Island swine herds. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 267-273.

BIBLIOGRAFÍA

- BERNARDO, T. M.; DOHOO, I. R. & OGILVIE, T. (1990c). A critical assessment of abattoir surveillance as a screening test for swine Ascariasis. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 274-277.
- BHALLA, S.; CHOWDHURY, N. & JUYAL, P. D. (1992). Double immunodiffusion (Did) and larval precipitin (Lp) tests against adult and larval *Toxocara canis* antigen. *J. Vet. Parasitol.*, 6 (1), 11-14.
- BINDSEIL, E. (1967). Larvae of ascarides as the cause of liver lesions in pigs. *Nord Vet.-Med.*, 19, 209-235.
- BINDSEIL, E. (1969a). Immunity to *Ascaris suum*. 1. Immunity induced in mice by means of material from adult worms. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 77, 218-222.
- BINDSEIL, E. (1969b). Immunity to *Ascaris suum*. 2. Investigations of the fate of larvae in immune and non-immune mice. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 77, 223-234.
- BINDSEIL, E. (1981). Pathogenesis of liver lesions in mice following a primary infections with *Ascaris suum*. *Vet. Pathol.*, 18, 804-812.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Fisiology*, 37, 911-917.
- BOES, J.; NANSEN, P. & STEPHENSON, L. (1997). False-positive *Ascaris suum* egg counts in pigs. *Int. J. Parasitol.*, 27 (7), 833-838.
- BOES, J.; MEDLEY, G. F.; ERIKSEN, L.; ROEPSTORFF, A. & NANSEN, P. (1998). Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. *Parasitol.*, 117 (6), 589-596.

BIBLIOGRAFÍA

- BOGH, H. O.; ERIKSEN, L.; LAWSON, L. G. & LIND, P. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay and a histamine release test system for the detection of pigs naturally infected with *Ascaris suum*. *Preventive Vet. Med.* 21, 201-214.
- BOROSKOVA, Z.; BENKOVA, M. & CERMAN, J. (1974). Isolation of somatic antigen from second stage larvae of *Ascaris suum*. *Folia Parasitol.*, 21, 329-331.
- BOTERO, D. & CASTAÑO, A. (1973). Comparative study of pyrantel pamoate, bephenium hydroxynaphthoate and tetrachloroethylene in the treatment of *Necator americanus* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 45-52.
- BRODY, G. & WUEST, E. C. (1963). Larvicidal activity of dithiazine iodide administered in feed to pigs with artificial infections of *Ascaris suum*. *Am. J. Vet. Res.*, 24, 460-466.
- BROW, H. D.; MATZUK, A. R.; ILVES, J. R.; PETERSON, L. H.; HARRIS, S. A.; SARETT, L. H.; EGERTON, J. R.; YAKSTIS, J. J.; CAMPBELL, W. C. & CUCKLER, A. C. (1961). Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, A new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1764-1765.
- BROW, H. W. & CORT, W. M. (1927). The egg production of *Ascaris lumbricoides*. *J. Parasitol.*, 14, 88-90.
- BROW, D.; HINTON, H. & WRIGHT, A. I. (1984). Parasitic damage in lambs with particular reference to the migrating larvae of *Ascaris suum*. *Vet. Rec.*, 115, 300-303.
- BROW, A. R. & CRANDALL, C. A. (1976). A phosphorylcholine idio type related to TEPC 15 in mice infected with *Ascaris suum*. *J. Immunol.*, 116, 1105.

BIBLIOGRAFÍA

- BUCHWALDER, R.; HIEPE, TH.; RIBBECK, R. & RUMMEL, CH. (1984).
Investigations into the course of experimental *Ascaris suum* invasions in pigs
under field conditions. Helminthol., 21, 221-229.
- CAMARGO, E.; NAKAMURA, P.; VAZ, A. J.; SILVA, M. V.; CHIEFFI, P. P. &
MELO, E. O. (1992). Standardization of dot-ELISA for the serological
diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev. Inst.
Med. trop. Sao Paulo, 34 (1), 55-60.
- CAMERON, N. D.; WARRISS, P. D.; PORTER, S. J. & ENSER, M. (1990).
Comparison of Duroc and British Landrace pigs for meat an eating quality.
Meat Science, 27, 227-247.
- CAMERON, N. D. & ENSER, M. B. (1991). Fatty acid composition of lipid in
Longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its
relationship with eating quality. Meat Science, 29, 295-307.
- CAMPBELL, W. C. & BENZ, G. W. (1984). Ivermectin: A review of efficacy and
safety. J. Vet. Pharmacol. Ther., 7, 1-16.
- CAMPBELL, W. C. & REW, R. S. (1986). Chemotherapy of parasitic diseases.
Plenum Press, New York.
- CAMPBELL, W. C. & TIMINSKI, S. F. (1965). Immunization of rats against
Ascaris suum by means of nonpulmonary larval infections. J. Parasitol., 51,
712-716.
- CAMPOS, M.; GOMEZ, V.; MAÑAS, I.; LOZANO, J. & RODRIGUEZ, M. (1981).
Investigación de comunidades antigénicas de extractos antigénicos de
trematodes y nematodes con seroproteínas de especies hospedadoras y no
hospedadoras. Rev. Ibér. Parasitol., 41 (1), 83-92.

BIBLIOGRAFÍA

- CASAROSA, L.; GHELARDONI, E.; LUGETTI, G.; BIGINI, M. & SBRANA, L. (1983). Ricerche sull'efficacia terapeutica dell'ivermectina nella microascaridiosi sperimentale del topo da larve L2 di *Toxocara canis*. Ann. Fac. Med. Vet., 36, 181-186.
- CAVA, R.; RUIZ, J.; LÓPEZ-BOTE, C. J.; MARTÍN, L.; GARCÍA, C.; VENTANAS, J. & ANTEQUERA, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscle of the Iberian pig. Meat Science, 45, 263-270.
- CLINE, M. J. & GOLDE, D. W. (1979). Controlling the production of blood cells. Blood, 53, 157-162.
- CONCELLÓN, A. (1991). Tratado de porcicultura. Tomo III. La canal y la carne porcina. Ed. AEDOS. Barcelona.
- COONS, A. H.; CREECH, H. J. & JONES, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47, 200-202.
- COPEMAN, D. B. (1971a). The pathology and pathogenesis of porcine hepatic Ascariosis. Dissert. Abstr. Int., 32B, 1045.
- COPEMAN, D. B. (1971b). Immunopathological response of pigs in Ascariasis. Pathology of Parasitic Disease, 135-145.
- CÓRDOBA, J. J.; ANTEQUERA, T.; VENTANAS, J.; LOPEZ-BOTE, C.; GARCÍA, C. & ASENSIO, M. A. (1994). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. J. Agric. Food Chem., 42, 2296-2301.
- CRANDALL, R. B.; CRANDALL, C. A. & JONES, J. F. (1978). Analysis of

BIBLIOGRAFÍA

- immunosuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. Clin. Exp. Immunol., 33, 30-37.
- CROMPTON, D. W. T. (1989). Prevalence of ascariasis. In: *Ascariasis and its prevention and control* (Edited by Crompton, D. W. T.; Nesheim, M. C. & Pawlowski, Z. S.). Taylo & Francis, London.
- CHAN, M. S.; MEDLEY, G. F.; JAMISON, D. & BUNDY, D. A. P. (1994). The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. Parasitol., 109, 373-387.
- CHANG, J. H.; LUNT, D. K. & SMITH, S. B. (1992). Fatty acid composition and fatty acid enlongase and stearoyl-CoA desturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. Journal of Nutrition, 122, 2074-2080.
- CHANDLER, A. C. & READ, C. P. (1965). Introducción a la Parasitología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- CHRISTENSEN, O. & NANSEN, P. (1979). The preparation and use of radiolabelled parasites and biological substances for studies on host-parasite relationship, with special reference to trematodes. A review. Int. Atom. Energ. Agen. Advisory Group Meeting, Animal Parasitology. Cambridge, 10th-11th September.
- DE BRITO, T.; CHIEFFI, P. P.; PERES, B. A.; SANTOS, R. T.; GAYOTTO, L. C.; REGINA VIANNA, M.; PORTA, G. & ALVES, V. A. (1994). Immunohistochemical detection of toxocaral antigens in human liver biopsies. Int. J. Surgical Pathol., 2 (2), 117-124.
- DEL CASTILLO, J.; DE MELLO, W. C. & MORALES, T. (1963). The physiological role of *Ascaris lumbricoides*. Arch. Int. Physiol., 71, 741-757.

BIBLIOGRAFÍA

- DENNIS, R. D.; BAUMEISTER, S.; SMUDA, C.; LOCHNIT, C.; WAIDER, T. & GEYER, E. (1995). Initiation of chemical studies on the immunoreactive glycolipids of adult *Ascaris suum*. *Parasitol.*, 110, 611-623.
- DIÉGUEZ, E. (1992). Historia, evolución y situación actual del cerdo Ibérico. El cerdo Ibérico, la naturaleza, la dehesa. Simposio del cerdo Ibérico. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Zafra, pp.: 9-35.
- DOBINSON, A. R.; JAMES, E. R.; CHRISTENSEN, N. O. (1980). *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 7, 195-196.
- DOUCH, P. G. C. (1978). L-leucyl-¹⁴C-naphthylamidases of the cestode, *Moniezia expansa*, and the nematode, *Ascaris suum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B, 63-66.
- DOUVRES, F. W.; TROMBA, F. G. & MALAKATIS, G. M. (1969). Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine. *J. Parasitol.*, 55, 689-712.
- DRUMMOND, J. G.; CURTIS, S. E.; SIMON, J. & NORTON, H. W. (1981). Effects of atmospheric ammonia on young pigs experimentally infected with *Ascaris suum*. *Am. J. Vet. Res.*, 42 (6), 969-974.
- DUBINSKY, P.; RYBOS, M. & TURCEKOVA, L. (1982). Electrophoretic characteristics of the proteins in growing oocytes of *Ascaris suum*. *Helminthol.*, 19, 289-297.
- DUNSMORE, J. D.; THOMPSON, R. C. A. & BATES, I. A. (1983). The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *Int. J. Parasitol.*, 13 (5), 517-521.
- EDITORIAL (1989). Ascariasis. *The Lancet*, 1, 997-998.

BIBLIOGRAFÍA

- ERIKSEN, L. (1981). Host parasite relations in *Ascaris suum* infection in pigs and mice. Royal Veterinary and Agricultural University. Commissioned by Carl F. Mortensen, Copenhagen.
- ERIKSEN, L. (1982). Experimentally induced resistance to *Ascaris suum* in pigs. Nord. Vet.-Med., 34, 177-187.
- ERIKSEN, L. (1990). *Ascaris suum*: Influence of egg density on in vitro development from embryonated egg to infective stage. Acta Vet. Scand., 31, 489-491.
- ERIKSEN, L.; ANDERSEN, S.; NIELSEN, K.; PEDERSEN, A. & NIELSEN, J. (1980). Experimental *Ascaris suum* infection in pigs. Serological response, eosinophilia in peripheral blood, occurrence of white spots in the liver and worm recovery from the intestine. Nordisk Veterinærmedicin, 32, 233-242.
- ERIKSEN, L.; LIND, P.; NANSEN, P.; ROEPSTORFF, A. & URBAN, J. (1992a). Resistance to *Ascaris suum* in parasite naïve and naturally exposed growers, finishers and sows. Vet. Parasitol., 41, 137-149.
- ERIKSEN, L.; NANSEN, P.; ROEPSTORFF, A.; LIND, P. & NILSSON, O. (1992b). Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. I. Studies on worm population kinetics. Parasitol. Res., 78, 241-246.
- EYRE, P. (1970). Some pharmacodynamic effects of the nematocides: Methyridine, tetramisole and pyrantel. J. Pharm. Pharmacol., 22, 26-36.
- FAIRBAIRN, D. (1960). In Stauber L.A. Ed. Host influence on parasite physiology. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, N.J., 50-64.
- FAIRBAIRN, D. (1961). The "in vitro" hatching of *A. lumbricoides* eggs. Can. J.

BIBLIOGRAFÍA

- Zool., 39, 153-162.
- FALINI, B. & TAYLOR, C. R. (1983). New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. Arch. Pathol. Lab. Med., 107, 105-117.
- FENOY, S.; CUELLAR, C. & GUILLEN, J. L. (1987). Estudio comparativo de la influencia de la luz en el embrionamiento experimental de huevos de *Toxocara canis* y *Toxascaris leonina*. Rev. Ibér. Parasitol., Vol. extraordinario, 173-177.
- FENOY, S.; CUELLAR, C. & GUILLEN, J. L. (1988). Estudio comparativo de la influencia de la luz en el embrionamiento experimental de los huevos de *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* y *Ascaris suum*. Rev. Ibér. Parasitol., 48 (4), 395-401.
- FETTERER, R. H. & URBAN, J. F. (1988). Development changes in cuticular proteins of *Ascaris suum*. Comp. Biochem. Physiol. (B), 90, 321-327.
- FINKLEMAN, F.; SHEA-DONNOHUE, D. T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W. C. & URBAN, J. F. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes. Ann. Review of Immunology, 15, 505-534.
- FORSUM, E.; NESHEIM, M. C. & CROMPTON, D. W. T. (1981). Nutritional aspects of *Ascaris* infection in young protein-deficient pigs. Parasitol., 83, 497-512.
- FRONTERA, E. (1998). Obtención de antígenos de *Ascaris suum*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Extremadura.
- FURUYA, T.; YANO, Y.; YOSHIHARU, S.; SAEKI, H. & ISHII, T. (1995). Diagnosis of hepatic milk spots in swine using enzyme-linked

BIBLIOGRAFÍA

- immunosorbent assay with adult female *Ascaris suum* antigen. J. Vet. Med., 48 (3), 191-195.
- GAAFAR, S. M.; DUGAS, S. & SYMENSMA, R. (1973). Resistance of pigs recovered from transmissible gastroenteritis against infection with *Ascaris suum*. Am. J. Vet. Res., 34, 793-795.
- GAMBLE, H. R.; PURCELL, J. P. & FETTERER, R. H. (1989). Purification of a 44-kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. Molecular and Biochemical Parasitology, 33, 49-58.
- GANDEMER, G.; CARITEZ, J. C. & LEGAULT, C. (1992). Lipid composition of adipose tissue and muscle in pigs with and increasing proportion on Meishan genes. Meat Science, 32, 105-121.
- GARCÍA-REGUEIRO, J. A.; DIAZ, I.; DAVIS, F. & SANDRA, P. (1989). Changes in the composition of neutral lipids in subcutaneous and muscle fat during the elaboration process of spanish cured ham. 35th IcoMST. Copenhagen, Dinamarca, 719.
- GASPARD, P.; WIART, J. & SCHWARTZBROD, J. (1996). A method for assessing the viability of nematode eggs in sludge. Environmental Technology., 17, 415-420.
- GÁZQUEZ, A. (1987). La técnica de necropsia en los mamíferos domésticos. Ed. Interamericana. McGraw-Grill. Madrid.
- GEENEN, P.L.; BRESCIANI, J.; BOES, J.; PEDERSEN, A.; ERIKSEN, L.; FAGERHOLM, H-P. & NANSEN, P. (1999). The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third stage larvae within the egg. J Parasitol., 85 (4), 616-22.

BIBLIOGRAFÍA

- GERMÁN, P. (1993). Estudios electroforéticos en Nematodes parásitos de ganado de interés económico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- GOEZE, J. A. E. (1782). Versuch einer Naturgeschichte der eingeweidewarmer thierischer korper. XI 71 pp. Blankenburg.
- GREENSPON, L. W.; WHITE, J.; SHIELDS, R. L.; FUGNER, A. & GOLD, W. M. (1986). Purification of *Ascaris suum* antigen: its allergenic activity in vitro and in vivo. J. Allergy Clin. Immunol., 77, 443-451.
- GUERRERO, J. & SILVERMAN, P. H. (1969). *Ascaris suum*: immune reactions in mice. I. Larval metabolic and somatic antigens. Exp. Parasitol., 26, 272-281.
- GUTMAN, G. A. & MITCHELL, G. F. (1977). *Ascaris suum*: location of phosphorylcholine in lung larvae. Exp. Parasitol., 43, 161-168.
- HALE, O. M.; STEWART, T. B. & MARTI, O. G. (1985). Influence of an experimental infection of *Ascaris suum* on performance of pigs. J. Anim. Sci., 60 (1), 220-225.
- HALL, M. C. (1924). Worm parasites of domesticated animals. Parasites of swine. L. A. Merillat, Chicago.
- HASS, D.K. & TODD, A. C. (1962). Extension of a technique for hatching Ascarid eggs "in vitro". Am. J. Vet. Res., 1, 169-170.
- HASWELL-ELKINS, M. R.; KENNEDY, M. W.; MAIZELS, R. M.; ELKINS, D. B. & ANDERSON, R. M. (1989). The antibody recognition profiles of humans naturally infected with *Ascaris lumbricoides*. Parasite Immunol., 11, 615-627.
- HASWELL-ELKINS, M. R.; LEONARD, H.; KENNEDY, M. W.; ELKINS, D. B. & MAIZELS, R. M. (1992). Immunoepidemiology of *Ascaris lumbricoides*:

BIBLIOGRAFÍA

- relationships between antibody specificities, exposure and infection in a human community. *Parasitol.*, 104, 153-159.
- HELWIGH, A. B.; CHRISTENSEN, C. M.; ROEPSTORFF, A. & NANSEN, P. (1999). Concurrent *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* infections in pigs. *Vet. Parasitol.* 82, 221-234.
- HELWIGH, A. B. & NANSEN, P. (1999). Establishment of *Ascaris suum* in the pig: Development of immunity following a single primary infection. *Acta Vet. Scand.*, 40, 121-132.
- HILL, D. E.; FETTERER, R. H.; ROMANOWSKI, R. D. & URBAN, J.F. (1994). The effect of immunization of pigs with *Ascaris suum* cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42, 161-169.
- HUSSAIN, R.; BRADBURY, S. M. & STREJAN, G. (1973). Hypersensitivity to *Ascaris* antigens, VIII. Characterization of a highly purified allergen. *J. Immunol.*, 111, 260-268.
- IGLESIAS, R.; LEIRO, J.; UBEIRA, F. M.; SANTAMARINA, M. T. & SANMARTIN, M. L. (1995). *Anisakis simplex*: stage-specific antigens recognized by mice. *J. Helminthol.*, 69, 319-324.
- IGLESIAS, R.; LEIRO, J.; UBEIRA, F. M.; SANTAMARINA, M. T.; NAVARRETE, I. & SANMARTIN, M. L. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.*, 82, 378-381.
- IZZAT, N.N. & OLSON, L.J. (1970). Resistance of mice to *T. canis*: effect of prechallenge infections and injections of worm extracts. *Can. J. Zool.*, 48,

BIBLIOGRAFÍA

1063-1066.

- JABLONOWSKI, Z.; ZEBROWSKA, T. & DZIEKONSKA, J. (1981). The effect of glycerol, paraffin, rape oil and aqueous solutions on the development of eggs of *Ascaris suum* Goeze, 1782. W. Parazyt., 27 (1), 17-23.
- JESKA, E. L. & STANKIEWICZ, M. (1989). Responses of NFR/N inbred mice to very low-dose infections with *Ascaris suum*. Int. J. Parasitol., 19 (1), 85-89.
- JOHNSTONE, C.; LEVENTHAL, R. & SOULSBY, E. J. L. (1978). The spin method for recovering tissue larvae and its use in evaluating C57BL/6 mice as a model for the study of resistance to infection with *Ascaris suum*. J. Parasitol., 64 (6), 1015-1020.
- JOHNSON, C. & STRETTON, A. (1980). Neural control of locomotion in *Ascaris*: Anatomy, Electrophysiology and Biochemistry, in: Nematodes as biological models (B. Zuckerman, ed.), Academic Press, New York, 159-196.
- JOHNSON, P. W.; DIXON, R. & ROSS, A. D. (1998). An in-vitro test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes. Int. J. Parasitol. 28, 627-633.
- JORGENSEN, R. J. (1983). Integrated control of helminth parasitism in livestock. In: J. D. Dunsmore (Editor), Tropical Parasitoses and Parasitic Zoonoses. Perth, Australia, pp. 31-40.
- JORGENSEN, R. J.; NANSEN, P.; NIELSEN, K.; ERIKSEN, L. & ANDERSEN, S. (1975). Experimental *Ascaris suum* infection in the pig. Population kinetics following low and high levels of primary infection in piglets. Vet. Parasitol., 1, 151-157.
- JUNGERSEN, G. ; ERIKSEN, L. ; NIELSEN, C. G. ; ROEPSTORFF, A. &

BIBLIOGRAFÍA

- NANSEN, P. (1996). Experimental transfer of *Ascaris suum* from donor pigs to Helminth naive pigs. J. Parasitol., 82(5), 752-756.
- JUNGERSEN, G.; FAGERHOLM, H.-P.; NANSEN, P. & ERIKSEN, L. (1999). Development of patent *Ascaris suum* infections in pigs after intravenous administration of larvae hatched in vitro. Parasitol., 119 (5), 503-8.
- JUSTUS, D. E. & IVEY, M. H. (1969). *Ascaris suum*: Immunoelectrophoretic analysis of antigens in developmental stages. Exp. Parasitol., 26, 290-298.
- KANO, S.; KASUYA, S. & OHTOMO, H. (1989). Eosinophilia in mouse regulated by multiple factors following repeated stimulations with *Ascaris* eggs into the peritoneal cavity. Int. Arch. Allergy Appl. Immun., 89, 54-59.
- KELLEY, G. W. & NAYAK, D. P. (1965a). Passive immunity to *Ascaris suum* transferred in colostrum from sows to their offspring. Am. J. Vet. Res., 26, 113, 948-950.
- KELLEY, G. W. & NAYAK, D. P. (1965b). Passive immunity to migrating *Ascaris suum* transmitted by parenterally administered immune serum or immune globulins. Cornell Vet., 55, 607-612.
- KENNEDY, T. J. (1988). Prevalence of swine parasites in major hog producing areas in the United States. Agri-Practice, 9, 25-32.
- KENNEDY, N. W.; GORDON, A. M. S.; TOMLINSON, L. A. & QURESHI, F. (1986). Genetic (major histocompatibility complex?) control of the antibody repertoire to the secreted antigens of *Ascaris*. Parasite Immunology, 9, 269-273.
- KERR, K. B. (1938). The cellular response in acquired resistance in guinea pigs to an infection with pig *Ascaris*. Am. J. Hyg., 27, 28-51.

BIBLIOGRAFÍA

- KOIZUMI, T.; HAYAKAWA, J. & KONDO, K. (1983). *Toxocara canis*: Immunogenic sources of *Toxocara canis* in infected rats. Jpn. J. Parasitol., 32 (5), 379-386.
- KOLB, E. (1975). Fisiología Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza.
- KOMATSU, T.; NISHIMURA, T.; SANO, R. & SHINKA, S. (1979). *A. suum* suppression of reaginic and haemagglutinating antibody responses in the mouse by crude extract and maintenance fluid. Exp. Parasitol., 47, 158-168.
- KOMATSU, T.; YAMATODANI, A.; NAGATA, K.; OKAMURA, H.; TAMURA, T.; NAGAI, K.; SAEKI, N. & SHINKA, S. (1996a). Physiological reactions induced by larval *Ascaris suum* infection. Jpn. J. Parasitol., 45 (2), 85-92.
- KOMATSU, T.; YOSHIMOTO, T.; OKAMURA, H.; YAMATODANI, A.; SAEKI, N. & SHINKA, S. (1996b). Immunological parameters affected by larval *Ascaris suum* infection. Jpn. J. Parasitol., 45 (1), 31-42.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- LARSEN, M. N. & ROEPSTORFF, A. (1999). Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. Parasitol., 119 (2), 209-220.
- LAUBACH, H. E. (1984). Lysophospholipase activation with *Ascaris suum* extract. J. Parasitol., 70 (1), 157-158.
- LAUBACH, H. E. (1990). Effect of dietary zinc on larval burdens, tissue eosinophil numbers, and lysophospholipase activity of *Ascaris suum* infected mice. Acta Trop., 47, 205-211.
- LEE, D. L. (1962). The histochemical localization of leucine aminopeptidase in

BIBLIOGRAFÍA

- Ascaris lumbricoides*. Parasitol., 52, 533-538.
- LEE, K. T.; MIN, H. K. & SOH, C. T. (1976). Transparental migration of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice. J. Parasitol., 62 (3), 460-465.
- LEJKINA, E. S. (1965). Research on Ascariasis Immunity and Immunodiagnosis. Bull. Wld. Hlth Org. 32, 699-708.
- LEVENTHAL, R. & SOULSBY, E. J. L. (1976). Cuticular reactivity of the early larval stages of *Ascaris suum*: adhesion and degranulation of polymorphonuclear leukocytes on the surface of opsonized larvae of *A. suum*. Int. J. Parasitol., 6, 279-283.
- LIND, P. ; ERIKSEN, L. ; NANSEN. P. ; NILSSON, O. & ROEPSTORFF, A. (1993). Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattenig period. II. Specific IgA, IgG, and IgM antibodies determined by enzyme -linked immunosorbent assay. Parasitol. Res., 79, 240-244.
- LINDQUIST, W. D. (1957). The use of low-level piperazine on pigs experimentally infected with *Ascaris lumbricoides*. Am. J. Vet. Res., 18, 119-120.
- LUKES, S. (1992). *Ascaris suum*- vaccination of mice with liposome encapsulated antigen. Vet. Parasitol., 43, 105-113.
- LUNNEY, J. K.; URBAN, J. F. & JOHNSON, L. A. (1986). Protective immunity to *Ascaris suum*: analysis of swine peripheral blood subsets using monoclonal antibodies and flow cytometry. Vet. Parasitol., 20, 117-131.
- LUSTIGMAN, S.; MCKERROW, J. H.; SAH, K.; LUI, J.; HUIMA, T.; HOUGH, M. & BROTMAN, B. (1997). Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. J. Biol. Chem., 271,

BIBLIOGRAFÍA

30181-30189.

- MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T.; GRIEVE, R. B., CARRIERE, G. & DUBLY, E. (1986). Intérêt de l'immunoélectrophrèse utilisant des extraits d'organes génitaux d'*Ascaris suum* dans le diagnostic de la toxocarose. Bull. Soc. Path. Ex., 79, 634-641.
- MAKI, J. & YANAGISAWA, T. (1986). Demonstration of carboxyl and thiol protease activities in adult *Schistosoma mansoni*, *Dirofilaria immitis*, *Angiostrongylus cantonensis* and *Ascaris suum*. J. Helminthol., 60, 31-37.
- MALMFORS, B.; LUNDSTROM, K. & HANSSON, I. (1978). Fatty acid composition of porcine backfat and muscle lipids as affected by sex, weight and anatomical location. Swedish Journal of Agricultural Research, 8, 25-38.
- MARBELLA, C. O. & GAAFAR, S. M. (1989). Production and distribution of immunoglobulin bearing cells in the intestine of young pigs infected with *Ascaris suum*. Vet. Parasitol., 34, 63-70.ç
- MARRETA, J. & CASEY, F.B. (1979). Effect of *A. suum* and other adjuvants on the potentiation of the IgE response in guinea pigs. Immunol., 37, 609-613.
- MATOFF, K. & TERSIJSKI, A. (1967). Besteht eine Darmphase dar erworbenen immunitat gegen *Ascaris suum*? Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie, 18, 343-353.
- McGIBBON, A. M. & LEE, T. D. (1990). The major *Ascaris* allergen. VII Congres International de Parasitologie, París, S5-A42, 20-24 August.
- McKERROW, J. H. (1989). Minireview: Parasite proteases. Exp. Parasitol., 68, 111-115.
- McREYNOLDS, L. A.; KENNEDY, M. W. & SELKIRK, M. E. (1993). The

BIBLIOGRAFÍA

- polyprotein allergens of nematodes. *Parasitol. Today.*, 9 (11), 403-406.
- METCALF, D.; PARKER, J.; CHESTER, H. M. & KINCADE, P.W. (1974). Formation of eosinophilic-like granulocytic colonies by mouse bone marrow cells *in vitro*. *Journal of Cell Physiology*, 84, 275-290.
- MICHEL, J. F. (1972). Economic effects of nematode infections and their control. *Proc. 7th Int. Meeting on Diseases of cattle, Worl Association for Buiatrics, London*, pp. 168-174.
- MICHEL, J. F. (1976). The hazard of nematode infection as a factor in the management of cattle. *ADAS Q. Rev.*, 20, 162-177.
- MIKULIKOVA, L. (1976). Studies on species specificity of proteins in *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Folia Parasitol.*, 23, 45-50.
- MILLER, M. F.; SHACKELFORD, S. D.; HAYDEN, K. D. & REAGAN, J. O. (1990). Determination of the alteration in fatty acid profile, sensory characteristics and carcass traits of swine fed of elevated levels of monounsaturated fat in the diet. *Journal and Animal Science*, 68, 1624-1631.
- MITCHELL, G. F. (1976). Studies on immune responses to parasite antigens in mice. II. Aspects of the T cell dependence of circulating reagin production to *Ascaris suum* antigens. *Int. Archs. appl. Immun.*, 52, 79-94.
- MONCOL, D. J. & BATTE, E. G. (1966). Peripheral blood eosinophilia in porcine ascariasis. *Cornell Vet.*, 57, 96-107.
- MORLEY, F. H. W. & DONALD, A. D. (1980). Farm management and systems of helminth control. *Vet. Parasitol.*, 6, 105-134.
- MOSMANN, T. R. & COFMANN, R. L. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.*, 46, 111-147.

BIBLIOGRAFÍA

- MOTTRAM, D. S. & EDWARDS, R. A. (1983). The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. *Journal Science Food and Agriculture*, 34, 517-522.
- MOZGOVOI, A. A. (1968). Ascaridata of animals and man and the diseases caused by them. In *essentials of Nematodology*. Ed. By Skrjabin, K.I. Vol. II.
- MUÑOZ, A. (1993). La explotación de la agrupación racial del cerdo Ibérico en sistemas extensivos. En: *El Sector Porcino: Aspectos básicos*. Ed. Mundi Prensa, 149-159
- MURRAY, P. D.; MCKENZIE, D. T.; SWAIN, S. L. & KAGNOFF, M. (1987). Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.*, 15, 139 (8), 2669-2674.
- MURRELL, K.D. (1986). Epidemiology, pathogenesis and control of major swine parasites. *Vet. Clin. N Amer-Food Anim. Pr.*, 2, 439-454.
- MURRELL, K. D. ; ERIKSEN, L. ; SLOTVED, H. -C. & RASMUSSEN, T. (1997a). *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. *J. Parasitol.* 83(2), 255-260.
- MURRELL, K. D. ; SLOTVED, H. -C. ; ERIKSEN, L. ; BJERREGAARD, J. ; NANSEN, P. & ROEPSTORFF, A. (1997b). Improved method for the recovery of *Ascaris suum* larvae from pig intestinal mucosa. *J. Parasitol.*, 83(2), 321-324.
- MWEGOHA, W. H. & JORGENSEN, R. J. (1977). Recovery of infective 3rd stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia ostertagi* by migration in agar gel. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 18, 292-299.
- NAKAGAWA, M. ; YOSHIHARA, S. ; SUDA, H. & IKEDA, H. (1983).

BIBLIOGRAFÍA

- Pathological studies on white spots of the liver in fattening pigs. Natl. Inst. Anim. Health. O (Jpn.) 23, 138-149.
- NANSEN, P. & ROEPSTORFF, A. (1999). Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. Int. J. Parasitol., 29, 877-891.
- NICHOLAS, W. L.; STEWART, A. C. & MITCHELL, G. F. (1984). Antibody responses to *Toxocara canis* using sera from parasite-infected mice and protection from toxocariasis by immunisation with ES antigens. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 62 (5), 619-626.
- NICHOLS, R. L. (1956). The etiology of visceral larva migrans. II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. J. Parasitol., 42 (4), 363-399.
- NIELSEN, K. ; FOGH, L. & ANDERSEN, S. (1974). Eosinophil response to migrating *Ascaris suum* larvae in normal and congenitally thymus- less mice. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 82: 919-920.
- NILSSON, O. (1982). Ascariasis in the pig. An epizootological and clinical study. Acta Vet. Scan., 79, 1-108.
- O'GRADY, R. T. & HARPUR, R. P. (1985). Growth and form of the fourth-stage larvae and early adults of *Ascaris suum* Goeze, 1782 (Nematoda: Ascaridoidea) developing in pigs. J. Helminthol., 59, 137-141.
- OHTAKE, Y.; HOSHINO, Y.; AOKI, T.; OHGANE, T.; OHNUKI, M. & FUKUMORI, Y. (1975). Changes in fatty acid composition and triglyceride compositions of porcine tissue lipids associated with growth of pigs. Japanese Journal of Zootechnical Science, 46, 460-468.

BIBLIOGRAFÍA

- OLDHAM, J. N. & WHITE, E. G. (1944). Chronic focal interstitial hepatitis in the pig: Its experimental production by feeding *Ascaris* eggs. J. Comp. Path. Ther., 54, 1-15.
- O'LORCAIN, P. (1995). The identification of the optimum conditions for the embryonation of *Toxocara canis* ova. Int. J. Environ. Health Res., 5, 143-148.
- OLSEN, L. S.; KELLEY, G. W. & SEN, H. G. (1958). Longevity and egg-production of *Ascaris suum*. Transactions of the American Microscopy Society, 77, 380-383.
- ORDÓÑEZ, J. A. & DE LA HOZ, L. (1992). Alimentación y calidades de carne del cerdo Ibérico. El cerdo Ibérico, la naturaleza, la dehesa. Simposio del cerdo Ibérico. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Zafra. p.p.: 9-35.
- PALMER, D. R.; HALL, A.; HAQUE, R. & ANWAR, K. S. (1995). Antibody isotype responses to antigens of *Ascaris lumbricoides* in a case control study of persistently heavily infected Bangladeshi children. Parasitol., 111, 385-393.
- PARSONS, J. C.; BOWMAN, D. D. & GRIEVE, R. B. (1986). Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35, 974-981.
- PAUL, W. E. (1987). Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: One lymphokine, many functions. Faseb J., 1, 456-461.
- PEARSON, A. M. & DUTSON, T. R. (1988). Edible meat by-products. Advances in meat research. Vol. 5. Elsevier Applied Science. London y New York.
- PÉREZ, J.; MOZOS, E.; BAUTISTA, M. J.; MORENO, T. & CARRASCO, L. Estudio inmunohistoquímico del infiltrado inflamatorio de lesiones hepáticas

BIBLIOGRAFÍA

- causadas por *Ascaris suum* en cerdos. VI Congreso Ibérico de Parasitología, Córdoba.
- PÉREZ-MARTÍN, E.; SERRANO, F.; REINA, D.; BREÑA, M. & NAVARRETE, I. (1991). Efecto de la climatología sobre la parasitofauna del cerdo Ibérico de montanera en el sur de Extremadura (España). I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología, 1-5 julio, Valencia (España).
- RHOADS, M. L. & FETTERER, R. H. (1998). Purification and characterisation of a secreted aminopeptidase from adult *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.*, 28, 1681-1690.
- RHOADS, M. L.; FETTERER, R. H. & URBAN, J. F. (1997). Secretion of an aminopeptidase during transition of third- to fourth- stage larvae of *Ascaris suum*. *J. Parasitol.*, 83 (5), 780-784.
- RHODES, M. B.; MARSH, C. L. & FERGUSON, D. L. (1966). Studies in helminth enzymology. V. An aminopeptidase of *Ascaris suum* which hydrolyzes L-leucyl- γ -naphthylamide. *Exp. Parasitol.*, 19, 42-51.
- RHODES, M. B.; MARSH, C. L. & FERGUSON, D. L. (1969a). *Ascaris suum*: Purification and characterization of an intestinal aminopeptidase. *Exp. Parasitol.*, 26, 150-155.
- RHODES, M. B.; MARSH, C. L. & FERGUSON, D. L. (1969b). Studies in helminth enzymology. VI. Amino-peptidases from uterine extracts of *Ascaris suum*. *Exp. Parasitol.*, 26, 140-149.
- RHODES, M. B. & STAUDINGER, L. A. (1983). Antigens in perienteric fluid of *Ascaris suum* as detected through antibodies in pigs orally inoculated with

BIBLIOGRAFÍA

- fully embryonated eggs. *Vet. Parasitol.*, 12, 179-186.
- RHODES, M. B.; KERALIS, M. B. & STAUDINGER, L. A. (1982). Immune responses of swine to oral inoculation with embrionated eggs of *Ascaris suum*. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 9, 1604-1607.
- RHODES, M. B.; BAKER, P. K.; CHRISTENSEN, D. L. & ANDERSON, G. A. (1988). *Ascaris suum* antigens incorporated into liposomes used to stimulate protection to migrating larvae. *Vet. Parasitol.*, 26, 343-349.
- RHODES, M. B.; KERALIS, M. B.; STAUDINGER, L. A. & BAKER, P. K. (1986). Immunity of swine to *Ascaris suum*. *Vet. Parasitol.*, 22, 87-94.
- ROBERTS, F. H. S. (1934). The large roundworm of pigs, *Ascaris lumbricoides* L., 1758, its life history in Queensland, economic importance and control. *Bull. Anim. Hlth. Stn. Yeerongpilly*, 1, 1-81.
- ROBERTS, J. A. (1990). The life cycle of *Toxocara vitulorum* in asian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Int. J. Parasitol.*, 20 (7), 833-840.
- ROE, J. M.; PATEL, D. & MORGAN, K. L. (1993). Isolation of porcine IgE, and preparation of polyclonal antisera. *Vet. Immunol. Immunop.*, 37, 83-97.
- ROEPSTORFF, A. & JORSAL, S. E. (1989). Prevalence of helminth infections in swine in Denmark. *Vet. Parasitol.*, 33, 231-239.
- ROEPSTORFF, A. & JORSAL, S. E. (1990). Relationship of the prevalence of swine helminths to management practices and anthelmintic treatment in danish sow herds. *Vet. Parasitol.*, 36, 245-257.
- ROEPSTORFF, A. & MURRELL, K. D. (1997). Transmission dynamics of helminth parasites of pigs on continuous pasture: *Ascaris suum* and *Trichuris suis*. *Int. J. Parasitol.*, 27 (5), 563-572.

BIBLIOGRAFÍA

- ROEPSTORFF, A. & NANSEN, P. (1994). Epidemiology and control of helminth infections in pigs under intensive and non-intensive production systems. *Vet. Parasitol.*, 54, 69-85.
- ROEPSTORFF, A.; ERIKSEN, L.; SLOTVED, H.-C. & NANSEN, P. (1997). Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: worm population kinetics following single inoculations with three doses of infective eggs. *Parasitol.*, 115, 443-452.
- ROGERS, W. P. (1958). *Nature*, 181, 1410-1411.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. (1986). *Inmunología*. Ed. Gower Medical Publishing. Londres.
- RONEUS, O. (1966). Studies on the aetiology and pathogenesis of white spots in the liver of pigs. *Acta Vet. Scand.*, 7 supplementum, 16, 7-112.
- RONEUS, O. (1971). Studies on the inter-relationship between the number of orally administered *A. suum* eggs, blood eosinophilia and the number of adult intestinal ascarids. *Pathology of parasitic diseases*. Ed. Gaafar, S. M., Purdue University Studies, 339-343.
- RUIZ, J. (1993). Influencia de la alimentación sobre las características y composición de la grasa subcutánea y hepática del cerdo ibérico. Tesis de Licenciatura. Universidad de Extremadura.
- RUIZ, J.; CAVA, R.; ANTEQUERA, T.; MARTÍN, L.; VENTANAS, J. & LÓPEZ-BOTE, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49, 155-163.
- SANATI, A. & GHADIRIAN, E. G. (1971). Treatment of enterobiasis with pyrantel

BIBLIOGRAFÍA

- pamoate in Iran. J. Trop. Med. Hyg., 74, 160-161.
- SÁNCHEZ-MORENO, M.; ENTRALA, E.; JANSSEN, D. & OSUNA, A. (1994). Copper-zinc superoxide dismutase from *Ascaris suum* (Nematoda): Purification and Characterization. Bioscience Reports, 14 (2), 83-90.
- SBIHI, Y. (1996). Contribución al conocimiento de la respuesta inmune humoral frente a *Echinococcus granulosus*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- SCHMIDT, G. D. & ROBERTS, L. S. (1984). Fundamentos de parasitología. Comp. Ed. Continental. Méjico.
- SCHWARTZ, B. (1959). Experimental infection of pigs with *Ascaris suum*. Am. J. Vet. Res., 20, 74.
- SCHWARTZ, B. & ALICATA, J. E. (1963). *Ascaris* larvae as a cause of liver and lung lesions in swine. J. Parasitol., 19, 17-24.
- SLOTVED, H. -C. ; ROEPSTORFF, A. ; BARNES, E. H. ; ERIKSEN, L. & NANSEN, P. (1996). Comparison of two methods for recovering migrating *Ascaris suum* larvae from the liver and lungs of pigs. J. Parasitol., 82 (4), 612-615.
- SLOTVED, H. -C. ; BARNES, E. H. ; ERIKSEN, L. ; ROEPSTORFF, A. ; NANSEN, P. & BJORN, H. (1997a). Use of an agar-gel technique for large scale application to recover *Ascaris suum* larvae from intestinal contents of pigs. acta Vet. Scand., 38, 207-212.
- SLOTVED, H.-C. ; ERIKSEN, L. ; MURRELL, K. D. & NANSEN, P. (1997b). Comparison of methods for recovery of *Ascaris suum* larvae from tissues of mice. Int. J. Parasitol., 27 (11), 1305-1310.
- SINNIAH, B. (1982). Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: the distribution

BIBLIOGRAFÍA

- of eggs in the faeces and the variability of egg counts. *Parasitol.*, 84, 167-175.
- SMITH, H.V.; QUINN, R.; BRUCE, R.G. & GIRWOOD, R.W.A. (1983). Antigenic heterogeneity in some *Ascarioidea* (nematoda) of medical importance. I. Analysis of adult nematodes. *Act. Parasitol. Pol.*, 23 (48), 459-465.
- SMITHARD, R. R.; SMITH, W. C. & ELLIS, M. (1980). A note on the fatty acid composition of lard from boars in comparison with gilts and barrows. *Animal Productions*, 32, 217-219.
- SOARES, M. F. & MOTA, I. (1992). Effect of purified components of *Ascaris suum* extracts on IgE antibody response in guinea pigs. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25 (11), 1137-1140.
- SOLTYS, J.; BENKOVA, M. & BOROSKOVA, Z. (1992). Influence of glucan on the complement level in experimental ascariasis. *Helminthol.*, 29, 93-96.
- SOTILLO, J. L. & SERRANO, V. (1985). *Producción Animal. Etnología zootécnica. Tomos I y II.* Ed. Tebar Flores, Madrid.
- SOULSBY, E. J. L. (1957). Some immunological phenomena in parasitic infections. *Vet. Rec.*, 69, 1129-1139.
- SOULSBY, E. J. L. (1963). The nature and origin of the functional antigens in helminth infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 113, 492-509.
- SOULSBY, E. J. L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* 7ª ed. Interamericana.
- SOUTHERN, L. L. ; STEWART, T. B. ; BODAK-KOSZALKA, E. ; LEON, D. L.; HOYT, P. G. & BESSETTE M. E. (1989). Effect of fenbendazole and pyrantel tartrate on the induction of protective immunity in pigs naturally or experimentally infected with *Ascaris suum*. *J. of Anim. Science*, 67, 628-634.

BIBLIOGRAFÍA

- SPINDLER, L. A. (1947). The effect of experimental infections with ascarids on the growth of pigs. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 14 (2), 58-63.
- SPRENT, J. F. A. & CHENT, H. H. (1949). Immunological studies in mice infected with the larvae of *Ascaris lumbricoides*. I. Criteria of immunity and immunizing effect of isolated worm tissues. *J. Infect. Dis.*, 84, 111-124.
- STANKIEWICZ, M. & FROE, D. L. (1995). Unabbreviated *Ascaris suum* immunizing infections of piglets lead to immunosuppression and increased numbers of intestinal parasites. *Acta Parasitol.*, 40(3), 152-155.
- STANKIEWICZ, M. & JESKA, E. L. (1990). Evaluation of pyrantel-tartrate abbreviated *Ascaris suum* infections for the development of resistance in young pigs against migrating larvae. *Int. J. Parasitol.*, 20 (1), 77-81.
- STANKIEWICZ, M.; JESKA, E. L. & FROE, D. L. (1990). Acquired resistance to migrating larvae of *Ascaris suum* in young pigs by repeated drug-abbreviated infections. *J. Parasitol.*, 76 (3), 383-388.
- STANKIEWICZ, M.; JONAS, W. & FROE, D. L. (1992). Patent infections of *Ascaris suum* in pigs: effect of previous exposure to multiple, high doses of eggs and various treatment regimes. *Int. J. Parasitol.*, 22 (5), 597-601.
- STEPHENSON, L. S.; POND, W. G.; NESHEIM, M. C.; KROOK, L. P. & CROMPTON, D. W. T. (1980). *Ascaris suum*: nutrient absorption, growth, and intestinal pathology in young pigs experimentally infected with 15-day old larvae. *Exp. Parasitol.*, 49, 15-25.
- STERNBERGER, L. A. (1979). In: *Immunocytochemistry*. Wiley, New York, 130-169.
- STEWART, T. B. (1996). Losing millions to the insidious invaders. *Pigs-Misset*,

BIBLIOGRAFÍA

June, 8-9.

- STEWART, T. B. & HALE, O. M. (1988). Losses to internal parasites in swine production. *J. Anim. Sci.*, 66, 1548-1554.
- STEWART, T.; SOUTHERN, L.; GIBSON, R. & SIMMONS, L. (1984). Immunization of pigs against *Ascaris suum* by sequential experimental infections terminated with fenbendazole during larval migration. *Vet. Parasitol.*, 17, 319-326.
- STROMBERG, B. E. (1979a). Ig E and Ig G1 antibody production by a soluble products of *Ascaris suum* in the guinea-pig. *Immunology*, 38, 489-495.
- STROMBERG, B. E. (1979b). The isolation and partial characterization of a protective antigen from developing larvae of *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.*, 9, 307-311.
- STROMBERG, B. E. & SOULSBY, E. J. L. (1976). The protective effect of developmental stages in an *Ascaris suum* infection in the guinea pig. *Vet. Parasitol.*, 2, 197-208.
- STROMBERG, B. E. & SOULSBY, E. J. L. (1977). *Ascaris suum*: Immunization with soluble antigens in the guinea pig. *Int. J. Parasitol.*, 7, 287-291.
- STRYER, L. (1988). En: Biosíntesis de lípidos de membrana y hormonas esteroideas. *Bioquímica*. Ed. Reverté. Barcelona.
- SUGANE, K. (1988). Eosinophilia in *Ascaris suum*-reinfected mice. *J. Helminthol.*, 62, 51-57.
- SUGANE, K. & OSHIMA, T. (1984). Interrelationship of eosinophilia and IgE antibody production to larval ES antigen in *Toxocara canis* infected mice. *Par. Immunol.*, 6, 409-420.

BIBLIOGRAFÍA

- TAFFS, L. F. & M.R.C.V.S. (1961a). The in vitro action of immune pig serum on second- and third -stages *Ascaris suum* larvae. Parasitol., 51, 327-334.
- TAFFS, L. F. & M.R.C.V.S. (1961b). Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. I. An introduction with a review of the literature and the demonstration of complement-fixing antibodies in the serum. J. Helminthol., 35 (3/4), 319-344.
- TAFFS, L. F. (1963). Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. II.- The use of the conglutinating complement absorption test for the demonstration of *Ascaris* antibody. J. Helminthol., 37 (4), 369-380.
- TAFFS, L. F. (1964a). Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. III.-The antibody response and acquired immunity. J. Helminthol., 38 (1/2), 129-150.
- TAFFS, L. F. (1964b). Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. IV. -The primary antibody response. J. Helminthol., 38 (1/2), 151-158.
- TAFFS, L. F. (1964c). Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. V.- The antibody response to the oral administration of third -and third- and fourth-stages larvae. J. Helminthol., 38 (1/2), 159-170.
- TAFFS, L. F. (1968). The immunology of *Ascaris* as indicated by immunofluorescence. Vet. Med. Review, 224-241.
- TANAKA, J.; BABA, T. & TORISU, M. (1979). *Ascaris* and eosinophil. II: Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil

BIBLIOGRAFÍA

- chemotactic factor of parasite in *Ascaris* antigen. J. Immunol., 122 (1), 302-308.
- TANAKA, K.; KAWAMUR, H.; TOHGI, N.; TSUJI, M.; MIYACHI, Y. & MIYOSHI. (1983). The measurement of *Ascaris suum* protein by radioimmunoassay in sera from patients with helminthiasis and with gastrointestinal diseases. Parasitol., 86, 291-300.
- TEJEDA, J. F. (1999). Estudio de la influencia de la raza y la alimentación sobre la fracción lipídica intramuscular del cerdo ibérico. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- TORRES, P. & BARRIGA, O. O. (1974). Análisis antigénico de *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara mystax* y *Ascaridia galli*, mediante difusión doble en agar e inmunolectroforesis. Bol. Chile. Parasit., 29, 79-85.
- TROMBA, F. G. (1978). Immunization of pigs against experimental *Ascaris suum* infection feeding ultraviolet-attenuated eggs. J. Parasitol., 64 (4), 651-656.
- URBAN, J. F. & DOUVRES, F. W. (1981). In vitro development of *Ascaris suum* from third to fourth stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture systems. J. Parasitol., 67 (6), 800-806.
- URBAN, J. F. & ROMANOWSKI, R. D. (1985). *Ascaris suum*: Protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae. Exp. Parasitol., 60, 245-254.
- URBAN, J. F. & TROMBA, F. G. (1982). Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet-attenuated eggs. Vet. Immunol. and Immunopath., 3, 399-409.
- URBAN, J. F. & TROMBA, F. G. (1984). An ultraviolet-attenuated egg vaccine for

BIBLIOGRAFÍA

- swine Ascariasis: Parameters affecting the development of protective immunity. *Am. J. Vet. Res.*, 45 (10), 2104-2108.
- URBAN, J. F.; DOUVRES, F. W. & TROMBA, F. G. (1981). A rapid method for hatching *Ascaris suum* eggs in vitro. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 48 (2), 241-243.
- URBAN, J. F.; ALIZADEH, H. & ROMANOWSKI, R. D. (1988). *Ascaris suum*: Development of intestinal immunity to infective second-stage larvae in swine. *Exp. Parasitol.*, 66, 66-77.
- URBAN, J. F.; GAMBLE, H. R. & KATONA, I. M. (1989). Intestinal immune responses of mammals to nematode parasites. *Amer. Zool.*, 29, 469-478.
- URBAN, J. F.; FAYER, R.; SULLIVAN, C.; GOLDHILL, J.; SHEA-DONOHUE, T.; MADDEN, K.; MORRIS, S. C.; KATONA, I.; GAUSE, W.; RUFF, M.; MANSFIELD, L.S. & FINKELMAN, F. D. (1996). Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4. *Vet. Immunol. and Immunopath.*, 54, 337-344.
- UVNÄS, B. & WOLD, J. K. (1967). Isolation of a mast cell degranulation polypeptide from *Ascaris suis*. *Acta Physiol. Scand.*, 70, 269-276.
- VAN WYK, J. A.; GERBER, G. M. & GROENEVELD, H. T. (1980). A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastrointestinal ingesta gelled in agar: Large scale application. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 47, 147-158.
- WADE, S. E. & GEORGI, J. R. (1987). Radiobelling and autoradiographic tracing of *Toxocara canis* larvae in male mice. *J. Parasitol.*, 73 (1), 116-120.
- WILLIAMS, J. F. & SOULSBY, J. L. (1970). Antigenic analysis of developmental

BIBLIOGRAFÍA

- stages of *Ascaris suum*. Exp. Parasitol., 27, 150-162.
- WINKFEIN, R. J.; PASTERNAK, J.; MUDRY, T. & MARTIN, L. H. (1985). *Ascaris lumbricoides*: characterization of the collagenous components of the adult cuticle. Exp. Parasitol., 59 (2), 197-203.
- WONG, H. S. W.; EMBIL, J. A. & OZERE, R. L. (1976). *Ascaris suum* and *Toxocara canis*: egg extract antigens in guinea pigs and the macrophage migration inhibition test. Exp. Parasitol., 40, 421-426.
- WOOD, J. D.; JONES, R. C. D.; FRANCOMBE, M. A. & WHELEHAN, O. P. (1986). The effects of fat thickness and sex on pig meat quality with special reference to the problems associated with overleanness. 2. Laboratory nad trained panel results. Animal Productions, 43, 535-538.
- WU, Y. J. & FOOR, W. E. (1982). Immunological studies of the relationship between the antigenic change of *Ascaris* oocytes and the junctional fluid of the fertilization chamber. J. Parasitol., 68 (6), 1048-1052.
- YANG, C. & SEPÚLVEDA, F. (1985). Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by high-performance liquid chromatography on spherisorb octadecylsilane columns. Cromatography, 346, 413.
- YANG, S.; GAAFAR, S. M. & BOTTOMS, G. D. (1990). Effect of multiple dose infections with *Ascaris suum* on blood gastrointestinal hormone levels in pigs. Vet. Parasitol., 37, 31-44.
- YOSHIHARA, S. ; NAKAGAWA, M. & SUDA, H. (1987). Detection of complement fixation antibody against *Ascaris suum* antigen in pigs with white spots in the liver. Jpn. J. Vet. Sci., 49 (3), 559-561.
- YOSHIHARA, S. ; NAKAGAWA, M. ; SUDA, H. & KOBAYASHI, K. (1987).

BIBLIOGRAFÍA

- Enhancement of white spot lesions in the liver of pigs repeatedly infected with *Ascaris suum*. J. Tokyo Vet. Anim. Sci., 35 (1,2), 64-71.
- XU, Y. & DRESDEN, M. H. (1986). Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. J. Parasitol., 72, 507-511.
- ZENKA, J. & PROKOPIC, J. (1983). Activities of some enzymes in the perienteric fluid of *A. suum*. Fol. Parasitol., 30, 373-376.
- ZHELEVA, R. T. (1975). Comparative studies on the antigenic structure of *T. canis* Werner, 1782 and *A. suum* Goeze, 1782 in immunodiffusion and immunoelectrophoretic tests. Med. Parazitol. Parazitar. Bol., 44 (3), 293-298.
- ZIMMERMANN, D. R.; SPEER, V. C.; ZIMMERMANN, W. & SWITZER, W. P. (1971). Effects of pyrantel salts on *Ascaris suum* infection in growing pigs. J. Anim. Sci., 32, 874-878.
- ZIMMERMANN, D. R.; SPEAR, M. L. & SWITZER, W. P. (1973). Effect of *Mycoplasma hypopneumoniae* infection, pyrantel treatment and protein nutrition on performance of pigs exposed to soil containing *Ascaris suum* ova. J. Anim. Sci., 36, 894-897.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

¿A quién agradecer este trabajo?. Son tantas las personas que han participado de una u otra forma en la consecución de esta tesis, que seguramente muchas de ellas no sean reflejadas por olvido, nunca por voluntad. Pido disculpas a las que aquí no aparezcan; todos, unos y otros, son merecedores de toda mi gratitud.

En primer lugar, quiero agradecer el enorme apoyo y colaboración recibido por el Dr. D. Ignacio Navarrete. Cuando empecé a formar parte del equipo de trabajo de la Cátedra de Parasitología, he de decir que si alguien supo contagiarme el interés y entusiasmo por esta materia, ese fue Ignacio. A lo largo de los años, ha sabido inculcarme conocimientos, inquietudes y sobre todo, ese espíritu de amistad entre los que formaron, y aún forman, este equipo. Por todo ello, muchas gracias.

De igual modo, existen dos personas a las que he de agradecer todo el tiempo que han dedicado para que, lo que hoy está aquí reflejado, haya sido una realidad. Esas dos personas son los Dres. D. David Reina y D. Francisco Serrano. Ellos, como supervisores de gran parte del trabajo laboratorial y escrito, han sido un continuo soporte científico y moral, inspiración y coraje, y aunque con sus respectivas ocupaciones, siempre tuvieron el tiempo necesario para discutir resultados y nuevas ideas.

Al Dr. D. Enrique Pérez Martín porque, como parte integrante del grupo de profesores de esta Cátedra, ha sido un constante ejemplo a seguir de sus alumnos, entre los que he formado parte. Él, además, ha sido un importante partícipe activo del trabajo laboratorial y lo más importante es que ha sido, por encima de todo, un gran amigo.

A D. Jose Ángel Mora, compañero y amigo, casi “coautor” de este trabajo ya que he de resaltar su enorme apoyo científico y moral desde que, en 1993, entré como alumna interna de Parasitología.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. D. Carlos Gómez Nieto y D. Miguel Ángel Habela; dos profesores a los que admiro y aprecio por todo lo que, día a día, han conseguido y siguen consiguiendo inculcar a los alumnos con su conocimiento. Además, gracias por vuestra amistad.

A D. Manuel Gómez Blázquez, por su asistencia técnica y por los buenos momentos que me ha hecho pasar a lo largo de estos años. Gracias Manolo.

Al resto de compañeros de la Cátedra de Parasitología, Mercedes, Cristina, Isabel, Esperanza, Paco, Virginia, Benjamín, María, Jesualdo y tantos otros, por hacer que los bajos momentos pudieran superarse con un poco de su aliento. Y en especial a Javi y Alonso, por su ayuda laboratorial y, sobre todo, porque han sabido conquistarme con la calidez de su amistad.

Al Dr. D. Antonio Gázquez, por la ayuda recibida en la interpretación de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos y a la Dra. Dña. Carmen García, por su ayuda en cuanto a la interpretación de los resultados de perfiles lipídicos.

A Dña. Pilar Parra, por el procesamiento de las muestras histológicas y a Dña. Ana Galaz por el procesamiento de las muestras para perfiles lipídicos.

A los alumnos internos de esta Cátedra de Parasitología, porque han sido una de las más valiosas “herramientas” en la consecución de este trabajo, ya que sin su ayuda, muchas de las experiencias no habrían podido llevarse a cabo. Ha sido un verdadero placer contar con la amistad de todos ellos en el transcurrir de los años.

Al CENSYRA de Extremadura, en la figura del Dr. D. Rafael Calero, por su contribución al conocimiento de la producción porcina de ibéricos, así como por el abastecimiento de parte de los animales de esta tesis.

A los mataderos “RESTI” de Alcuéscar (Cáceres), a “MAFRESA” de Fregenal

AGRADECIMIENTOS

de la Sierra (Badajoz) y al Matadero Municipal de Deleitosa (Cáceres), por ceder sus dependencias en la obtención del material biológico. He de resaltar la colaboración de sus veterinarios, sobre todo a D. Francisco Duque, porque ellos fueron los que realmente “perdieron” parte de su tiempo por dedicárnoslo a nosotros.

Al Ministerio de Educación y Cultura, por la concesión de la Beca de Formación del Personal Investigador, de la cual he disfrutado durante este tiempo.

A todos los integrantes del Danish Centre for Experimental Parasitology de Copenhague, en especial al recordado Prof. Peter Nansen, cuyo espíritu, estoy segura, perdurará siempre a través de sus numerosos discípulos. He de agradecer la calurosa acogida del resto de componentes de dicho centro, en particular al Dr. Allan Roepstorff, por su extraordinaria coordinación y entrega en cada una de mis visitas a Dinamarca. A Lis Eriksen, Jaap Boes, Gregers Jungersen, Peter Lind y Helena Mejer por sus opiniones y consejos en los diferentes trabajos enviados para su publicación. Y a tantos colegas, en especial a la Dra. Silvina Fernández, que con su experiencia y amistad hicieron que la lejanía de “la tierra” se sobrelleva mucho mejor.

A todos mis amigos, porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado.

Por último, y ciertamente no por ello menos agradecida, a toda mi familia, en especial a mi madre y mi hermano por su amor, su apoyo y su entrega expresada con la mayor de las sinceridades. A mi padre, que a pesar de su ausencia, para mí siempre estuvo, está y estará presente, al haber sido el verdadero artífice de toda esta realidad. Y a Karl por su paciencia, amor y comprensión en todo momento a lo largo de estos años.

A todos, **GRACIAS.**

