

## MIASIS EXPERIMENTAL POR *PROTOPHORMIA TERRAENOVAE* EN OVINO

JUAN BLANCO CIUDAD<sup>1</sup>, DANIEL BRAVO BARRIGA<sup>2</sup>, DAVID REINA ESOJO<sup>2</sup>, LUIS GÓMEZ GORDO<sup>3</sup>, JUAN ENRIQUE PÉREZ MARTÍN<sup>2</sup>, FRANCISCO JAVIER SERRANO AGUILERA<sup>2</sup>, EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Veterinario y Profesor de Secundaria, Instituto Educación Secundaria Javier García Téllez, Cáceres.

<sup>2</sup> Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España.

<sup>3</sup> Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España.

## RESUMEN

Recientemente se ha determinado el asentamiento de la mosca invasora *Protophormia terraenovae* en condiciones naturales en Extremadura. Por tanto, quisimos determinar si esta especie es capaz de provocar miasis traumáticas en la ganadería ovina en las condiciones climáticas de la región. Para ello, se realizó una infestación experimental con distintas dosis de L1 de esta especie (obtenidas del asticot comercializado en tiendas de pesca) en ovejas merinas, para comprobar la patogenicidad de las mismas en el desarrollo de la posible miasis. Los resultados obtenidos determinaron que, en las condiciones experimentales de este proyecto, las L1 de *P. terraenovae* no provocaron una miasis traumática propiamente dicha, ya que no se produjeron alteraciones patológicas reseñables ni a nivel sistémico ni a nivel local. Más bien, aquellas larvas que fueron capaces de desarrollarse en la zona de la lesión provocaron una reducción significativa del número de bacterias y del tejido necrótico en esta localización, con lo que estos resultados incitan a pensar en el uso de estas larvas para la larvoterapia animal, previa esterilización y control de cría de las mismas.

## SUMMARY

Recently the establishment of the invasive fly *Protophormia terraenovae* in natural conditions in Extremadura has been confirmed. Therefore, we wanted to determine if this species is able to provoke traumatic myiasis in the ovine hut in the climatic conditions of the region. For this, an experimental infestation with different doses of L1 of this species (obtained from the asticot marketed in fishing shops) was carried out in merino sheep, to verify their pathogenic influence in the development of the possible myiasis. The results determined that, in the experimental conditions of this project, the L1 of *P. terraenovae* did not provoke a traumatic myiasis, since pathological alterations were observed neither at the systemic level nor at the local one. Rather than that, those larvae that were able to develop in the lesion area, caused a significant reduction in the number of bacteria and necrotic tissue at this location, so these results suggest the use of these larvae for maggot debridement therapy, prior sterilization and breeding control of the same ones.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

El término “miasis” se define como la infección de los animales vertebrados o seres humanos vivos con larvas de mosca del orden Diptera que se alimentan, durante un periodo variable de tiempo, de tejidos vivos o muertos del hospedador, sustancias que este segrega o de sangre (Zumpt, 1965). El término miasis fue originalmente propuesto por Hope en 1840 a partir del término griego “myia” que significa mosca (Hope, 1840).

En España se describen 32 especies de moscas productoras de miasis, de las cuales 2 poseen especial relevancia en el ganado ovino: *Oestrus ovis* agente causal de la miasis cavitaria que asienta en senos nasales, paranasales y a veces en frontales de

este tipo de ganadería, y Wohlfahrtia magnifica implicada en la mayoría de las miasis cutáneas, también conocidas en términos ganaderos como “gusaneras”, “bicheras”, “coqueras”, etc. de estos animales (Habela y cols., 2001).

La especie ganadera más susceptible a esta enfermedad y, por tanto, donde cobra mayor importancia desde un punto de vista económico es la ovina. Es de reseñar la importancia que el sector ovino tiene en España, el cual supuso el 8 % de la producción ganadera total en el año 2013, con un total estimado de 16. 573. 000 cabezas, siendo el 20 % del ovino europeo y sólo superado por la cabaña ovina de Reino Unido que es del 28 %. Como ejemplo, la Comunidad Autónoma de Extremadura tiene la mayor cabaña ovina de España con un total del 20,9 % de la producción total.

Esta enfermedad es ampliamente conocida en el sector, provocando considerables pérdidas económicas al ocasionar daños directos en el animal en el lugar donde se asienta la miasis, acompañados por una serie de síntomas generales que conducen a una pérdida de la condición orgánica del animal parasitado. Además, originan una serie de daños indirectos relativos al descenso productivo, predisposición a otros padecimientos e incluso a la muerte.

Con estos datos, es fácil deducir que los costes económicos de las miasis deben ser tenidos muy en cuenta. Respecto a esto, Grindle (2001) estima que los costes por miasis en un animal suponen en torno a 2,7 euros en medicamentos y gastos de trabajo y 2 euros por pérdidas de producción. Esto en España, donde W. magnifica es una especie endémica, supondría unos costes de 8,5 millones de euros de pérdidas económicas (estimando un 8 % de afectados con una sola miasis anual) (Ruiz-Martínez y cols., 1987, 1992, 1993; Ruiz-Martínez y Cruz-Mira, 1994). Si tenemos en cuenta que los casos de miasis normalmente son repetitivos y que hay que estar revisando los animales cada pocos días en las épocas de verano, si estimásemos 4 miasis por animal, los costes serían de 32,8 millones de euros en España.

En este sentido recientemente se ha planteado una nueva problemática, como es la introducción de la especie invasora Protophormia terraenovae en el medio natural (Blanco-Ciudad, 2017). Aunque es una especie de mosca usada fundamentalmente como cebo vivo en la pesca, posee una alta capacidad de producir miasis en zonas del centro y norte de Europa (Morris y Titchener, 1997), debido a su adaptación a temperaturas frías. Esto es especialmente interesante e importante para regiones con gran tradición de cabaña ovina, ya que en el caso de que lleguen a provocar lesiones, podrían producirse miasis en épocas en las que no son habituales, como podrían ser las épocas otoñales e invernales.

## 2. OBJETIVOS

En vista de ello, aclarar algunas características de las lesiones miásicas producidas por esta nueva especie invasiva (*Protophormia terraenovae*), puede ser de importancia a la hora de optimizar las medidas de control realizadas por los veterinarios y los propios ganaderos.

Por tanto, en vista de estos antecedentes y valorando la escasa información al respecto en España, nos planteamos realizar un estudio experimental de miasis en el ganado ovino, con el fin:

1. Determinar si *Protophormia terraenovae*, proveniente de los cebos comercializados en la región extremeña tiene capacidad de provocar lesiones miásicas en ovino en condiciones experimentales en Extremadura.

2. Valorar el grado de las posibles alteraciones significativas a nivel hematológico y de daño tisular que esta especie miásica pudiera provocar en el ganado ovino.

Nuestro estudio pretende aclarar algunas características de las lesiones miásicas, todo ello con el fin último de optimizar las medidas de control realizadas por los veterinarios y los propios ganaderos.

## 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. La mosca: *Protophormia terraenovae*.

*Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830)

Especie muy común en las zonas más frías de la región holártica (Erzinclioglu, 1988), perteneciente a un pequeño grupo de dípteros, que forman la tribu Phormiini. Es la única de su género presente en la península ibérica y junto a *Protophormia atricepp* son las únicas que conforma el género, ambas de distribución holártica (Rognes, 1991). Se ha encontrado incluso *Protophormia terraenovae* a 550 millas del polo norte (Smith, 1986).

Especie considerada como eusinantrópica (Gregor y Povolny, 1961), *P. terraenovae* está descrita por algunos autores como productora de miasis traumáticas sobre ovejas en Escocia y por ser portadora de salmonelosis en Finlandia (Zumpt, 1965; Nuorteva, 1971).

Estudios llevados a cabo en Centroeuropa y en el Norte de América ponen de manifiesto que *P. terraenovae* es una de las especies más comunes en la carroña (Grassberger y Frank, 2004; Mavárez-Cardozo y cols., 2005; Hobischak y cols., 2006), teniendo como característica una baja pérdida de agua, lo que le permite desarrollarse en sustratos bastante secos (Rivers y cols., 2013). Todo esto hace que sea una de las especies más utilizadas y estudiadas en entomología forense en las zonas geográficas donde se encuentra ampliamente distribuida (Nuorteva, 1971). Incluso se han realizado estudios para determinar el intervalo postmortem de esta especie en España. De manera que, si se produjera una expansión geográfica de *P. terraenovae* en nuestro país, esta especie podría ser utilizada en la entomología forense. Esto ya se hizo un caso producido en Madrid en el año 2005, donde se encuentran larvas de esta especie (Martínez-Sánchez y cols., 2015).

Hasta el momento, en España sólo se han encontrado algunos pocos ejemplares en el pirineo aragonés (González-Mora y Peris, 1988) y en áreas montañosas de la provincia de Alicante (datos sin publicar), lo que indica su escasa presencia en nuestro territorio.

Este díptero prefiere las bajas temperaturas para criar y es capaz de sobrevivir en condiciones climáticas extremas, lo cual explicaría su abundancia en las regiones más frías del planeta y su presencia en las zonas de elevada altitud en regiones templadas (Grassberger y Reiter, 2002).

Las hembras, al igual que todos los dípteros de la familia Calliphoridae, son ovovivíparas, y para la maduración ovárica necesita la ingesta de proteínas. Tras la cópula y fecundación, la hembra deposita masas de huevos de entre 150-200 por puesta sobre carroña fresca. Desde la puesta de los huevos hasta la salida de la L1 suelen transcurrir entre 8 y 24 horas. A partir de aquí, se inicia la fase de desarrollo larvario, pasando por tres estadios, con una duración de entre 3 y 19 días, dependiendo de los recursos alimenticios disponibles. Una vez alcanzada la L3, se forma la pupa, que en un periodo de 3-7 días completará la metamorfosis emergiendo el imago (Figura 1). Las variaciones en el tiempo de metamorfosis vienen determinadas por las condiciones climatológicas en las que se encuentren (Grassberger y Reiter, 2002), así como por el fotoperiodo (Shiga, 2007), pudiendo entrar en diapausa pupal si las condiciones no son favorables e incluso en una diapausa en el estado adulto aumentando el tiempo de desarrollo del ovario en la hembra (Matsuo y cols., 1997). Es una especie muy común en trabajos de fisiología animal, ya que es fácil de criar en laboratorio.



Figura 1. Ejemplar de *Protophormia terraenovae*. Fuente: Anónimo.

Además, esta especie es la más usada en la cría de asticot para la pesca en Extremadura y por tanto, de gran interés en esta zona (Porcel-Carreño, 2007). Desde el punto de vista sanitario, se debe tener en cuenta que se han detectado un 7 % de personas alérgicas a las larvas de esta especie en la provincia de Cáceres (Porcel-Carreño y cols., 2009), identificándose como la causa de esta alergia una banda en el IgE inmunoblot de 15,5 kDa que también se encontraba en la lombriz de tierra, pero que era diferente a las que se encontraban en otros califóridos como, *L. sericata* y *C. vomitoria* (Porcel-Carreño y cols., 2013).

### 3.2. Dosis infestantes en las miasis.

Existen pocos estudios acerca de la metodología de infestación experimental con larvas de mosca productoras de miasis traumáticas, destacando los trabajos de Sandeman y cols. (1985) y Sandeman y cols. (1986) por sus estudios sobre la caracterización de la respuesta inmune y resistencia a larvas de *L. cuprina* en ovejas. En el experimento de 1985, se eligieron 12 carneros de 2 años de edad de una zona en la que la frecuencia de las miasis era muy baja. Estos animales se dividieron en dos grupos; el experimental formado por 8 animales y el control formado por 4. El grupo experimental se infectó con 200-300 L1 de *L. cuprina* una vez a la semana durante cuatro semanas. En esta cuarta semana se realizaron determinaciones del nivel de anticuerpos y de histamina (mediador de la inflamación) y se dejó descansar a los

carneros durante 2 semanas. Finalmente, se infectó a ambos grupos con 500 L1 que pasados 3 días fueron recolectadas, cuantificadas y medidas para determinar la resistencia del hospedador. Estas larvas fueron recolectadas principalmente en forma de L3 y no existió diferencia significativa en el tamaño ni en el número de larvas aisladas. Sí que hubo relación clara entre el tamaño de la herida y el número de larvas aisladas y además es cierto, que los tres carneros con un menor número de larvas se encontraron entre los reinfestados y mostraron una respuesta cutánea a las L3, por lo que se cree que esta respuesta inflamatoria puede estar relacionada con la resistencia a las miasis. En el estudio del año 1986 el proceso fue el siguiente: previo al inicio del estudio las 30 ovejas fueron pesadas y se tomaron dos muestras de suero con una semana de diferencia. Se realizaron 3 lotes de 10 ovejas de la misma procedencia que los carneros del estudio de 1985, denominados H (High), L (Low) y C (Control), los cuales fueron dispuestos en corrales a prueba de moscas.

El lote H fue infestado cada 15 días con 500 L1, excepto por un intervalo de 4 semanas entre las infecciones número 3 y 4 hasta un total de 8 infecciones. El grupo L fue infestado una semana después del lote H, siguiendo el mismo proceso que el lote H, pero el número de L1 depositadas en piel fue de 50. Las infecciones siempre fueron protegidas con apósitos en la zona de la herida. Por último, el grupo C presentaba la misma zona sin lana, que dejaba libre la piel, procesándose de igual manera que las ovejas de los lotes H y L pero sin añadir las L1 en la piel. A las 72 horas post-inoculación en todos los grupos, se retiraron los apósitos, y las larvas fueron pesadas y contadas. Además, se midió la herida mediante un papel de calco. En las infecciones 7 y 8 a todos los grupos se les infectó con 500 L1. La toma de muestras de sangre se realizó semanalmente.

Los resultados de esta experiencia mostraban que en el grupo L solo se recogen larvas en la mitad de los animales infestados y además se recuperaron solo un 28 % de éstas, frente al 41 % del grupo H, lo que muestra que 50 L1 resultan escasas a la hora de generar una miasis. Además, no se encuentran diferencias de susceptibilidad entre los diferentes grupos, aunque es cierto, que en el grupo H si se encuentra cierta resistencia a la infestación.

La técnica de infestación que se siguió para ambos experimentos es el procedimiento estandarizado de la granja de investigación "Merridanle" del ICI (Imperial Chemica Industries) en Melbourne, que consiste en colocar las larvas entre la piel que había sido abundantemente humedecida y dos tapones dentales de algodón. Los algodones también se empaparon con agua destilada, evitando así la desecación de las larvas. Todo esto quedó anclado a la piel con una banda de goma para evitar su

movilidad (Sandeman y cols., 1985). Las L1 se originan del cultivo de larvas mantenidas en hígado o un medio artificial obtenidas a partir de larvas de una miasis en ovino (Singh y Jerram, 1976).

Entre los artículos más recientes de infestación experimental por agentes productores de miasis se encuentra el de Colditz y cols. (2005), quienes realizan una prueba con 5 carneros y cuya dosis infestante es la administración de 500 L1 de *L. cuprina* (35 mg) al día durante 8 días.

En los casos cuya metodología ha sido descrita, la infestación experimental está destinada a comprobar si las ovejas del estudio desarrollaban resistencia inmunitaria al ataque de las larvas de *L. cuprina*. La conclusión más destacada de estos estudios es que existe una ligera protección en los ovinos que han sido infestados previamente, debido posiblemente a una respuesta de hipersensibilidad que se produce cuando hay un contacto con un número elevado de larvas (ésta se produce con 500 L1, mientras que no se produce con 50 L1) (Sandeman y cols., 1985, 1986, 1992). En otros estudios, como los de Eisemann y cols. (1990) y Johnston y cols. (1992), se ha comprobado que los anticuerpos que se producen en el ovino en el que se ha provocado una infestación experimental son capaces de retardar el crecimiento de las larvas en un cultivo *in vitro*. En este sentido, Sandeman y cols. (1995), indican que a pesar de que un porcentaje de los anticuerpos producidos puedan ser destruidos por las larvas, esto no afectaría realmente a la eficacia de una vacuna frente a esta parasitosis. La infestación experimental realizada por Colditz y cols. (2005) estuvo destinada a comprobar el efecto que la miasis producía en los parámetros fisiológicos del animal, así como en comprobar el efecto sobre aspectos relacionados con la producción, especialmente la ganancia de peso. Pese a que no se demuestra una diferencia significativa frente al grupo control, si se puede identificar una pérdida considerable de peso en la primera semana de infestación, además de un proceso de aumento de temperatura corporal de alrededor de 2 °C entre los días 3 y 11 post-inoculación.

### **3.3. Efectos de las miasis en ovinos.**

#### *3.3.1. Daños tisulares.*

La histología de las lesiones producidas en las miasis en la especie ovina ha sido escasamente estudiada.

Debido a esto, realizaremos una revisión extendida de los daños tisulares que se han realizado también en otras especies diferentes.

### 3.3.1.1. *Pequeños rumiantes.*

Dentro de los pequeños rumiantes, el animal sobre el que se han realizado más estudios de miasis a nivel tisular es la cabra. En concreto, el estudio de Oryan y Bahrami (2012) se llevó a cabo en cabras sacrificadas en el matadero de Shiraz, en la provincia de Fars, sur de Irán. Los cadáveres de 16 250 cabras fueron examinados para detectar la presencia de larvas de *Przhevalskiana silenus* de octubre de 2008 a diciembre de 2010.

Las zonas miásicas fueron aisladas de la piel y tejidos subcutáneos de cada canal, contadas, medidas, fotografiadas y almacenadas por separado en recipientes en solución salina tamponada al 0,9 % a 4 °C de temperatura, después de haber registrado su ubicación en los esquemas corporales de los animales. Además, secciones apropiadas del tejido subcutáneo de zonas infestadas fueron fijadas en un 10 % de formalina tamponada neutra para su posterior procesamiento. Estas secciones fueron deshidratadas en etanol, embebidas en parafina, seccionadas y teñidas y, finalmente, se estudiaron en un microscopio. Las larvas encontradas fueron fotografiadas usando un estereomicroscopio. Entre los resultados más relevantes se observó que la reacción de los tejidos al primer estadio larvario fue mínima. No se inició la degeneración celular y el tejido necrótico y la piel se mantuvo prácticamente intacta durante los meses en los que las L1 fueron dominantes. La respuesta del tejido infestado a la L1 viva estuvo compuesta fundamentalmente por células mononucleares con moderada infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. En algunos casos, una cápsula fibrosa de tejido conectivo rodeaba a la L1. Sin embargo, pocos eosinófilos se encuentran en el infiltrado en esta fase de infestación por L1.

En los casos en los que se observaba la muerte y degradación de las larvas, que era un hallazgo común en casos de infestación por L1, se encontraron zonas de necrosis de los tejidos con infiltración de neutrófilos y formación de pus en el centro, rodeado de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos, células gigantes y una cápsula de tejido conectivo fibroso de varios espesores, formando una reacción piogranulomatosa. En esta situación, cuerpos extraños y células gigantes de Langhans estaban presentes en las proximidades de la larva degradada. Además, restos de la cutícula fragmentada estaban presentes en el centro de algunas de estas reacciones piogranulomatosas, y el centro de estas lesiones se encontraba mineralizado.

Cuando la L1 muda a L2, fragmentos de pared exterior separados se añadían a la zona de la miasis, produciendo una severa reacción inflamatoria y necrosis masiva de los tejidos. El músculo de esta zona se tornó pálido, necrótico, fragmentado y con

cápsulas de tejido conectivo. Estas cápsulas poseían numerosos fibroblastos y haces de tejido conectivo infiltrados con gran cantidad de linfocitos y macrófagos. Junto a ello, también se hallaban neutrófilos y eosinófilos en esta área necrótica y en las proximidades de la larva viva.

Sin embargo, en las fases tardías de la infestación por L2, los neutrófilos fueron sustituidos por linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y células gigantes. La infiltración de eosinófilos también fue documentada en la etapa posterior a la infestación de L2. El área subcutánea, la dermis y la epidermis que se encontraban cerca de las L2 se transformaban en tejido necrótico con un infiltrado de células inflamatorias. Posteriormente, se produjo el cambio de L2 a L3. En algunos casos, un absceso se formó alrededor de la L3 viva con pus (consistente en neutrófilos junto con los restos de tejido). Además, una capa de tejido conectivo fibroso, en la mayoría de los casos infiltrado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos, rodeó diferentes partes de la larva, excepto la zona de la cabeza. Cuando la larva se separó, se observaron muchas cavidades que contenían restos de tejido y células inflamatorias que indican la reciente separación de la piel del tercer estadio de la larva, así como zonas de tejido cicatricial, que muestran que los distintos estadios de larvas han dejado la piel en la que estuvieron presentes, en la dermis y la epidermis.

El tejido de la cicatriz se encontraba desorganizado, muy vascularizado y numerosas células mononucleares estaban todavía presentes entre las fibras del tejido conectivo. En algunos casos, los capilares y arteriolas mostraban hiperemia y en algunos lugares la dermis está muy edematosa. La rotura de los vasos sanguíneos dando lugar a hemorragias en este tejido de granulación fue otro hallazgo bastante frecuente. Los apéndices de la piel como las glándulas sebáceas, folículos pilosos y otros, habían desaparecido en las proximidades de la localización larval, siendo reemplazados con tejido de granulación. Hasta 40 días después de que la última L3 abandonara a sus hospedadores, todavía quedaban algunas pústulas y abscesos cutáneos.

En otro tipo de miasis, como la oestrosis, se describe sobre todo un gran infiltrado de linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos (Tabouret y cols., 2003), destacando la exocitosis de estos últimos, siendo esto diferente a lo que veíamos para las miasis cutáneas. En otros trabajos como el de Cabanelas y cols. (2015) en el que se estudió otro tipo de miasis que tienen un desarrollo interno, como es el caso de *Hypoderma lineatum*, se determina que en la fase subcutánea existen tres estadios histológicos. El primero, en el que la larva se encuentra intacta y se visualizan principalmente células plasmáticas; en el segundo, en el que la cutícula de la larva ya se ha destruido y cuya

célula principal son los linfocitos y macrófagos, y un tercero, cuando solo queda la cicatriz en el que encontramos tejido de granulación.

Roedores.

Pereira y cols. (2001) realizaron un ensayo experimental en 60 ejemplares de *Ratus norvegicus* para estudiar el tejido lesionado ocasionado por la infestación de *Dermatobia hominis* en este hospedador. Los resultados más destacados son los siguientes:

Día 1: Se observó un discreto infiltrado de neutrófilos.

Día 2: Se observó un infiltrado inflamatorio predominantemente de neutrófilos.

Día 4: Se observó una fina capa necrótica alrededor la larva, con intenso infiltrado inflamatorio neutrofílico, así como linfocitos, macrófagos y un pequeño número de eosinófilos y mastocitos. En algunos casos, se produjo hiperqueratinización y presencia de neutrófilos y bacterias sobre la superficie de la piel.

Días 4 a 7: El proceso inflamatorio mostró un aumento, particularmente cuando la L1 muda (por lo general en el séptimo día) a L2.

Día 8: Se observó una capa necrótica gruesa adyacente. El tejido conectivo estaba invadido por neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos. Además, existe una proliferación de fibroblastos y células endoteliales y unas pocas hemorragias localizadas.

Día 10 a 12: La lesión fue similar a la del octavo día, con neoformación de capilares y la producción de fibras de colágeno.

Día 12: Se observó un infiltrado inflamatorio de células y bacterias, además de eosinófilos degranulados y mastocitos.

Día 15: Resultados muy similares a los del día 12, aunque también mostró neoformación capilar con producción de fibras de colágeno.

Días 18 a 20: Se produjo la muda a L3. Los resultados muestran neoformación capilar y producción de fibras de colágeno, que rodean la cavidad larval. El infiltrado inflamatorio mostró alta concentración de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, así como mastocitos y unas pocas células plasmáticas.

Días 25 a 30: No se observó una reducción de la capa necrótica ni en el número de neutrófilos y linfocitos, aunque sí se produce un aumento de eosinófilos y células plasmáticas, asociados con la producción de fibras de colágeno.

Día 32: El infiltrado de mastocitos se redujo y la producción de fibras de colágeno aumentó.

Día 39: La lesión ya fue residual, observándose, además, áreas dispersas de necrosis y un gran número de células plasmáticas.

Posteriormente, Leite y cols. (2011) realizaron un estudio similar utilizando larvas de *Dermatobia hominis*, en ratones como hospedadores. Los ratones se dividieron en tres grupos, cada uno infestado con una larva recién eclosionada, tomándose biopsias de piel para histopatología a los días 4, 12, y 20 post-inoculación (d.p.i). Se observó un discreto proceso inflamatorio a los 4 d.p.i, coincidiendo con el trabajo en ratas de Pereira y cols. (2001). Este consiste en una capa necrótica fina alrededor de la larva y en un proceso edematoso con gran cantidad de neutrófilos y pocos eosinófilos y mastocitos, así como una proliferación de fibroblastos. En el día 12 d.p.i, se observó una capa más gruesa necrótica, edema, muchos neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, además de una marcada neoformación de capilares, algo que en el trabajo de Pereira y cols. (2001) veíamos en el día 15 post-inoculación. También se detectó una gran proliferación del endotelio, con gran número de fibroblastos, así como las primeras etapas de fibrosis. Estas mismas características histopatológicas, junto con una mayor fibrosis sobre una gran área de la lesión, se observaron en el 20 d.p.i, siendo estos resultados similares a lo determinado por Pereira y cols. (2001).

### 3.3.2. Respuesta a nivel hematológico y bioquímico.

#### 3.3.2.1. Mediciones sanguíneas.

La sangre es un fluido rojo opaco compuesto por el plasma, de color amarillo pálido, en el que se encuentran diversos tipos de células en suspensión como son los glóbulos rojos, hematíes o eritrocitos, los glóbulos blancos o leucocitos y las plaquetas o trombocitos. Estas células se mantienen en suspensión, que es mantenida y facilitada por la circulación. La sangre juega un papel importante en los diagnósticos clínicos, porque es una muestra muy fácil de tomar y en muchas enfermedades la composición y propiedades se modifican de forma clara y específica.

Las funciones de la sangre se resumen en transporte, defensa y prevención de hemorragias.

Las propiedades físicas de la sangre son: volumen, velocidad de sedimentación, color y presión osmótica.

- Volumen: La sangre representa entre un 6-8 % del peso de un individuo adulto, siendo mayor en jóvenes; entre un 8-9 %. El volumen sanguíneo se conoce como volemia y supone la suma del volumen plasmático y el volumen eritrocitario. Este último viene determinado por un índice llamado hematocrito, que es el volumen ocupado por los eritrocitos partidos por el volumen sanguíneo total. Este índice varía con la edad y el sexo y estados fisiológicos. El hematocrito suele disminuir cuando disminuye la tasa de hemoglobina y aumenta cuando aumenta la misma.

- Velocidad de sedimentación: es la velocidad con la que se depositan los elementos formes de la sangre. Depende del tamaño y densidad de glóbulos rojos, temperatura ambiente, y sobre todo de la viscosidad plasmática. Las variaciones en este valor suelen ser indicativo de enfermedades, embarazo, envejecimiento y crecimiento.

- Color: rojo debido al contenido en hemoglobina, la sangre arterial tiene un color rojo brillante y la venosa más oscura.

- Presión osmótica: se debe fundamentalmente a la presencia de ClNa y en menor proporción a las proteínas.

Los análisis de sangre se usan como rutina para ayudar al diagnóstico de enfermedades o como control de salud. Mediante los análisis se pueden detectar la presencia de muchas enfermedades habituales y frecuentes como pueden ser la anemia, la diabetes, infecciones, pero también pueden dar a conocer otras menos frecuentes y más graves. La rutina habitual es un estudio hematológico o hemograma con velocidad de sedimentación globular y un estudio de bioquímica.

Los parámetros y medidas más utilizados en un análisis de sangre son:

*Glóbulos rojos o eritrocitos (eritrograma).*

El glóbulo rojo es una de las células más especializadas del organismo y la más abundante de la sangre.

Está presente en todos los vertebrados, en los mamíferos son discos bicóncavos sin orgánulos citoplasmáticos. En las aves los glóbulos rojos son nucleados. En función de la especie oscilan tanto en diámetro, entre 4 y 11  $\mu\text{m}$ , como en vida media, entre 90 y 140 días.

La concentración sanguínea de eritrocitos depende de diversos factores, como especie, sexo, estado nutricional o altitud. En los animales domésticos los valores oscilan entre 3-14 millones/ $\text{mm}^3$ .

La membrana del eritrocito es un componente muy importante por diversos motivos. En primer lugar, su forma bicóncava hace que aumente el cociente superficie/volumen y, por tanto, facilita los procesos de intercambio entre la célula y el plasma. Presenta gran capacidad de deformación permitiendo el paso del eritrocito por los capilares de la microcirculación sin que se rompan, a pesar de que muchos de estos capilares son de menor diámetro que el eritrocito. La membrana es permeable al agua; los eritrocitos son más sensibles a la osmolaridad del plasma que otras células, de modo que soluciones hipotónicas hinchan el eritrocito mientras que las hipertónicas le hacen perder agua y volumen.

Las funciones de los glóbulos rojos son el transporte sanguíneo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y colaborar en el mantenimiento del pH del plasma.

Para la cuantificación de los eritrocitos existe el hemograma. El hemograma es un estudio que nos va a permitir cuantificar y evaluar diferentes grupos celulares, los glóbulos rojos, los glóbulos blancos, las plaquetas, el contenido de hemoglobina y otros parámetros relacionados con su cantidad, forma y contenido.

El hemograma se realiza porque la cantidad de hematíes puede ofrecer datos de salud o la presencia de anemia o diferentes tipos de enfermedades. Como los glóbulos rojos son los encargados del transporte de la hemoglobina, su disminución produce cansancio y sensación de fatiga. La concentración de hemoglobina nos ofrecerá datos complementarios sobre la posible alteración del número de hematíes. Con esos datos son calculados los índices hematimétricos.

Estos índices son los parámetros que relacionan el índice hematocrito, la hemoglobina y el número de hematíes o glóbulos rojos.

El volumen corpuscular medio (VCM) es una forma de expresar el tamaño de los eritrocitos.

La hemoglobina corpuscular media (HCM) se corresponde con el contenido en hemoglobina de cada eritrocito (Hemoglobina/número de hematíes).

En el caso de las ovejas, los valores de referencia del eritrograma están representados en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de referencia Eritrograma ovino (Jain, 1993; Meyer y Harvey, 2004).

Eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8-16
Hb (g/dL)	8-16
Ht (%)	24-50
VCM (fL)	23-48
CHCM (%)	30-34

*Plaquetas.*

Las plaquetas son las células encargadas de parte de la coagulación. Por ello, si su número disminuye pueden aparecer cuadros de hemorragias que pueden deberse a diferentes patologías. El parámetro normal para el ovino se sitúa entre 3 y 8  $\times 10^3/\text{mm}^3$  (Meyer y Harvey, 2004).

*Glóbulos Blancos (leucograma).*

Son las células que defienden al organismo de agentes biológicos extraños, constituyendo, por tanto, el sistema inmune. Están presentes tanto en la sangre como en otros tejidos, no tienen hemoglobina y comprenden un sistema de células de origen y características morfológicas variadas. La sangre es la vía por la que acceden desde los sitios de formación hasta los tejidos donde se necesitan. Normalmente se encuentran en la sangre 5 tipos diferentes de leucocitos agrupados en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y agranulocitos (monocitos y linfocitos) según tengan o no gránulos en el citoplasma.

En el caso de los ovinos afectados con miasis, Colditz y cols. (2005) detalla un agudo aumento en el conteo total de glóbulos blancos entre los días 2 y 3 de la infestación, volviendo a valores normales en torno al día 5.

Dentro de los granulocitos distinguimos:

Neutrófilos: sus gránulos se tiñen con colorantes neutros, y contienen enzimas microbicidas. Duran solamente unas horas en circulación, y luego pasan a tejidos. Aproximadamente la mitad se encuentran adheridos a la pared vascular o muy cerca de ella (población marginal). Su función es fagocitar microorganismos y sustancias procedentes de lesiones celulares y reacciones inmunológicas. Colditz y cols. (2005)

detalla en los procesos miasígenos un incremento de estas células sanguíneas durante los días 2 y 3 y posteriormente en los días 11, 13 y 15 post-inoculación.

**Eosinófilos:** sus gránulos se tiñen por colorantes ácidos. Son un porcentaje muy bajo de los leucocitos totales, y tras pocas horas en la circulación permanecen varios días en los tejidos, sobre todo en piel, aparato digestivo y respiratorio. De escaso poder fagocítico, juegan un gran papel en la detoxificación de histamina y serotonina, sustancias liberadas en las inflamaciones y reacciones inmunes. Su número se encuentra elevado en infestaciones parasitarias y procesos alérgicos. Colditz y cols. (2005) señaló una ligera depresión de esta célula en ovinos infestados con miasis frente al control a partir del día 3 post-inoculación.

**Basófilos:** con numerosos gránulos teñidos por colorantes básicos. Duran unos 11-12 días en los tejidos. Su función es bastante desconocida. Se sabe que en su metabolismo libera heparina hacia la sangre, sustancia que evita la coagulación sanguínea y parece que pueden liberar histamina, por lo que pueden ser responsables de la sintomatología que acompaña a los procesos alérgicos. Sus sustancias producen vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular. Colditz y cols. (2005) indican que en ovinos con miasis se produce un aumento de estas células a partir del día 3 hasta el día 15 post-inoculación.

Dentro de los agranulocitos diferenciamos dos tipos:

**Monocitos:** son las células de mayor tamaño que existen en la sangre. Tras unas 10-20 horas en sangre suelen pasar a los tejidos, donde se transforman en macrófagos en unas 2-3 horas, permaneciendo así hasta 2-3 meses. Los macrófagos pueden tener rasgos morfológicos en función de su localización (histiocitos en tejido conectivo, células de kupffer en hígado, macrófagos alveolares en los pulmones), y tienen mayor cantidad de lisosomas y sustancias microbicidas que los neutrófilos, acompañados de una mayor capacidad de fagocitosis. Son fundamentalmente fagocíticos, y participan en la inflamación y la fiebre.

**Linfocitos:** son los responsables de la respuesta inmune celular y de la humoral, ya que son los que sintetizan anticuerpos, además de producir diversas señales químicas que promueven y organizan la respuesta inmune. Se diferencian de los demás porque no se forman en la médula ósea, sino en los ganglios linfáticos, timo y bazo. En general, se clasifican en linfocitos B, productores de anticuerpos, y linfocitos T, células defensivas y reguladoras de la respuesta inmune.

El leucograma es la fracción del hemograma que se refiere al conteo total de los leucocitos (glóbulos blancos) y de las diferentes clases de leucocitos. Los valores de referencia en la especie ovina se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de referencia (n/.l) del leucograma ovino (Pugh, 2005).

Leucocitos	400-12000
Neutrófilos	700-6000
Linfocitos	2000-9000
Monocitos	0-750
Eosinófilos	0-1000
Basófilos	0-3

La fórmula leucocitaria determina la proporción o porcentaje de las principales clases de leucocitos dentro del conteo total de leucocitos.

Cada clase tiene un papel diferente en la defensa del organismo, la cantidad de cada clase de leucocito da información sobre el estado del sistema inmune. Cada animal tiene un recuento leucocitario diferente.

Así, los animales monogástricos como el caballo, el perro y el cerdo exhiben una fórmula leucocitaria tipo neutrófilo, esto significa que dichas células se acumulan en mayor porcentaje. Mientras que, los rumiantes como las ovejas, cabras y vacas presentan una fórmula tipo linfocitario, en la que los linfocitos representan más del 50 % del recuento leucocitario. Estas características son de naturaleza genética. La fórmula leucocitaria de referencia en la especie ovina se expone en la Tabla 3.

Tabla 3. Formula leucocitaria normal ovino (%) (Ramírez, 2006).

Neutrófilos	32
Eosinófilos	8
Basófilos	0,5
Linfocinos	60
Monocitos	3

### 3.3.2.2. Evolución hematológica en las miasis.

En el análisis sanguíneo, en todos los procesos de miasis se observa un incremento de los índices de inflamación, lo cual, se corresponde con la presencia de prurito y la zona inflamada y eritematosa en la sintomatología clínica.

Hay escasos estudios sobre la evolución y el estado de los parámetros sanguíneos en infecciones por miasis, pero en un caso de miasis humana, producida por la mosca de especie *W. magnifica* documentado por (Tuygun y cols., 2009), se describieron los siguientes valores: el hemograma presentó un conteo elevado de glóbulos blancos con una importante eosinofilia, hemoglobina 12,9 g/dl y 254 000/mm<sup>3</sup> plaquetas. En lo referente al suero sanguíneo, el paciente presentó niveles normales de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, pero niveles elevados de IgE, inmunoglobulina de infestaciones parasitarias y alergias. Tras la eliminación de la larva como parte del tratamiento, la eosinofilia y los niveles de IgE en suero fueron disminuyendo paulatinamente.

### 3.3.3. Respuesta inmunitaria celular y humoral.

Como ya veíamos en la sección de vacunas, la exposición de la especie ovina a larvas de dípteros de la familia Calliphoridae y más concretamente frente a la especie *L. cuprina*, que es la más estudiada por su importancia sanitaria y económica en Australia, produce un rápido aumento de anticuerpos, detectándose pequeños niveles de IgG tan sólo 6 horas después de la infestación (Sandeman y cols., 1995) frente al antígeno excretor-secretor de estas larvas. Sin embargo, parece que esta respuesta no es efectiva frente a sucesivas infecciones (Sandeman y cols., 1985; Eisemann y cols., 1990; Tellam y cols., 1994). En otros trabajos, se observan anticuerpos frente a *C. hominivorax* en torno a los 7 días, alertando además de posibles reacciones cruzadas, mediante la técnica ELISA, con otras larvas de diferentes especies de moscas que pueden producir miasis (Thomas y Pruett, 1992). Además, la respuesta inmune humoral va a depender de la zona corporal donde se produzca la miasis, así como del antígeno larvario, siendo el de las glándulas salivales de la larva más inmunógeno que el de cutícula, intestino o de la larva completa, como nos indica Farkas y Hall (1998) en un estudio realizado con *W. magnifica*.

La inmunidad en las miasis cutáneas en ovino es de escaso interés a la hora de realizar el diagnóstico, ya que normalmente es más sencillo el examen directo del animal. Por este motivo, el estudio de la respuesta inmune se realiza sobre todo como base para el desarrollo de vacunas.

Sin embargo, el estudio de anticuerpos sí es de mucho interés en el diagnóstico de miasis cavitarias como *Oestrus* sp., ya que además de poder realizar un diagnóstico, también nos ha permitido conocer la temporalidad del parásito y enfocar correctamente los posibles tratamientos (Suárez y cols., 2005). El análisis inmunológico también ha demostrado su efectividad en el diagnóstico etiológico y diferencial de *C. hominivorax*, lo que supone una importante herramienta para las campañas de erradicación de esta parasitosis (Figarola y cols., 2001).

Para detectar esta respuesta inmune, la técnica más empleada es el ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay), que sigue el protocolo de Eisemann y cols. (1990).

#### **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

##### **4.1. Diseño experimental.**

Durante los meses de junio y octubre de 2012, se llevó a cabo en las instalaciones de la granja de la Facultad de Veterinaria de Cáceres una infección experimental de ovejas de raza merina con larvas de *Protophormia terraenovae*, con el fin de comprobar si este díptero, especie propia de regiones frías, es capaz de desarrollar miasis en los animales de regiones cálidas. Para ello, se establecieron tres lotes de ovejas constituidos por 10 animales en cada lote. La estructura del experimento se expone a continuación y se resume en la Tabla 4.

LOTE 1 (n=10 ovinos). Las ovejas de este lote fueron infestadas seriadamente con dosis bajas de L1. En concreto, a las ovejas se les practicó una pequeña herida en la escápula derecha al día 0 y fueron infestadas seriadamente con 500, 200 y 200 L1 de *Protophormia terraenovae* a los días 0, 2 y 4 post-inoculación (p.i.), respectivamente. Se tomaron muestras de sangre y exudado de la herida 3 veces por semana durante los primeros 14 d.p.i (día post-inoculación). Posteriormente se tomaron muestras de sangre 2 veces por semana hasta el día 31 d.p.i y 1 vez por semana hasta el 45 d.p.i. Del mismo modo, se practicaron dos biopsias de piel en el foco de la lesión a los 4 y 14 d.p.i.

LOTE 2 (n=10 ovinos). Las ovejas de este lote fueron infestadas seriadamente con dosis altas de L1. Se procedió de modo similar a las del lote 1, pero en este caso la infestación fue con 2500, 1000 y 1000 L1 de *Protophormia terraenovae* a los días 0, 2 y 4 post-inoculación (p.i.), respectivamente. Las tomas de sangre, exudado y biopsias de piel se practicaron en los mismos d.p.i que en las ovejas del lote 1.

LOTE 3 (n=10 ovinos). Este lote fue el control no infestado con ninguna larva. Este grupo de animales se dividió a su vez en dos subgrupos; un grupo de 5 animales (Lote 3A) a los que no se les hizo ninguna herida y otro grupo de 5 animales (Lote 3B) a los que sí se le practicó una pequeña herida del mismo modo que a los animales de los lotes 1 y 2, pero sin infestación posterior por larvas. No obstante, al igual que se hizo con los lotes infestados, se tomaron muestras de sangre, de exudado de la herida (solo en el lote 3B) y biopsia (solo en el lote 3B) en los mismos días que en los lotes 1 y 2.

Tabla 4. Resumen de la cronología llevada a cabo en el diseño experimental.

Lote	Tipo de infestación	D.P.I de recogida	D.P.I de recogida de sangre	D.P.I de
		de exudado		biopsia
Lote 1	Dosis baja	2,4,7,9,11,14	2,4,7,9,11,14,17,21,24,31,38,45	4,14
Lote 2	Dosis alta	2,4,7,9,11,14	2,4,7,9,11,14,17,21,24,31,38,45	4,14
Lote 3 b	Control con herida	2,4,7,9,11,14	2,4,7,9,11,14,17,21,24,31,38,45	4,14
Lote 3	Control sin herida	--	2,4,7,9,11,14,17,21,24,31,38,45	--

#### 4.2. Obtención del inóculo.

Las L1 que utilizamos como agente infestante en el experimento, se obtuvieron completando el ciclo de vida de estos dípteros. Para ello, se compraron L3 procedente del asticot comercializado para la pesca deportiva. Estas L3 se dejaron pupar en el laboratorio y estas pupas se traspasaron a unos criaderos a la espera de su eclosión (Figura 2).

Tras la eclosión de los imagos, se identificaban varios ejemplares con el fin de confirmar que la especie comercializada se trataba de *P. terraenovae* y no otras especies de dípteros, también usados como cebos en la pesca deportiva.

Una vez eclosionados los imagos, se les proporcionaba un alimento consistente en una solución de agua y azúcar y además se incluía una bandeja con hígado de cerdo, que fue donde las hembras pondrían los huevos y así obtendríamos el inóculo de L1.

El inóculo exacto se calculó siguiendo las indicaciones de Colditz y cols. (2005), estableciendo que 35 mg suponen un número de 500 L1.

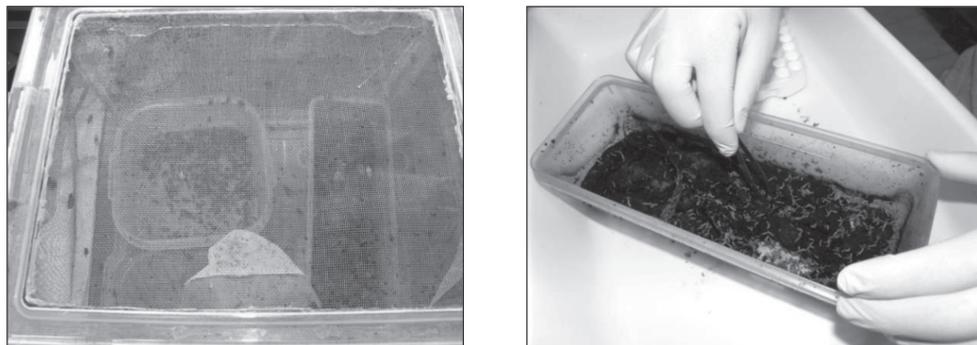


Figura 2. Criadero de dípteros y bandeja con hígado donde se obtienen las L1.

Fuente: Anónimo.

#### 4.3. Procedimiento de infestación.

El procedimiento de infestación consistió, en primer lugar, en la eliminación de la lana de una pequeña zona de piel localizada en la zona media de la espalda baja. A continuación, se raspó con una hoja de bisturí esa zona de piel sin llegar a visualizar sangre en la misma. Se colocaron las larvas directamente sobre la piel lacerada y se rodearon con una estructura de tal manera que impedía que se escaparan de la zona.

Además, se cubrieron con gasas con el fin de poder recoger el exudado producido. En la Figura 3 se puede observar la lesión con las L1 y la estructura y anejos añadidos para evitar su fuga de dicha herida.



Figura 3. Sistema de infestación con L1. Fuente: Anónimo.

#### 4.4. Animales de estudio.

En este estudio se han empleado ovejas de raza merina, raza autóctona que se adapta bien al medio. Es una oveja típica de Extremadura, que se encuentra ampliamente adaptada a la región y ampliamente extendida en las explotaciones ovinas de la comunidad, siendo de esta manera más fácil la interpretación de los resultados y su extrapolación posterior.

Las ovejas de este estudio fueron de edad adulta y presentaban una condición corporal entorno al 2,5



Figura 4. Ovejas de uno de los corrales del estudio. Fuente: Anónimo.

#### 4.5. Instalaciones de realización del experimento.

Como ya se indicó, el experimento se realizó durante los meses de julio a octubre en las instalaciones de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, donde se dispuso de un recinto habilitado para el desarrollo de este estudio. El recinto contaba con tres corrales que reunían las condiciones de espacio (unos 40 m<sup>2</sup> para 10 ovejas) y alimento suficiente para el desarrollo de la vida de las ovejas.

También presentaba las medidas de aislamiento para evitar el contacto de ectoparásitos y otros insectos durante el desarrollo del mismo, evitando de esta forma la alteración de los posibles resultados. Para ello, los corrales constaban de paredes de bloques de hormigón y en la parte superior fueron cubiertos con una tela mosquitera. Además, la puerta fue doble y diseñada con telas mosquiteras, de tal forma que una de las puertas siempre se encontrase cerrada evitando tanto la salida como la entrada de la mayoría de los dípteros. En el centro del corral se encontraba un comedero

donde se depositaba pienso y paja, esta última ad-libitum. Además, todos los corrales constaban de un bebedero automático.

#### 4.6. Recogida de muestras.

La toma de muestras se produjo desde el día siguiente a la infestación hasta el 45 d.p.i. Por tanto, se tomaron cada día muestras de sangre, exudado y biopsias de piel.

Se tomó sangre de la yugular empleando el sistema venoject (Figura 5). La sangre obtenida por venopunción fue recogida por dos tubos, uno de ellos para la obtención de suero para poder realizar las pruebas bioquímicas y otro heparinizado para la realización posterior del frotis sanguíneo

La biopsia se realizó en la herida mediante el uso de un punch cutáneo o sacabocados.



Figura 5. Toma de sangre. Fuente: Anónimo.

#### 4.7. Procesado y conservación de las muestras.

##### 4.7.1. Sangre.

Las muestras sanguíneas obtenidas fueron procesadas en los laboratorios del área de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Con el tubo de sangre sin heparina, se procedía a la realización de la hematología sanguínea mediante el empleo de una máquina para tal fin, obteniendo los datos referentes a la serie roja de elementos formes de la sangre. La sangre heparinizada se empleó para elaborar un frotis sanguíneo que nos permitirá cuantificar la serie blanca mediante la realización de la fórmula leucocitaria.

#### 4.7.2. Histología.

En primer lugar, el material obtenido en las biopsias, 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 portaobjetos y se sometieron a calentamiento suave para provocar su adherencia. Más tarde, se desparafinaron sometiendo el corte primero a 50 °C durante un mínimo de 1 hora. A continuación, se sometieron a dos baños de xilol, y posteriormente se rehidrataron mediante sucesivos baños de alcohol etílico de concentración decreciente (100°, 96° y 70°) y luego en agua destilada. Por último, se realizó la técnica de tinción con hetatoxilina-eosina. De forma resumida, constaría de los siguientes pasos:

- Hemalumbre de Hematoxilina de Mayer ..... 6 min
- Lavado con agua destilada
- Tampón ácido para diferenciación ..... 1 min
- Lavado con agua destilada
- Tampón básico de viraje ..... 2 min
- Lavado con agua destilada
- Eosina G ..... 5min
- Lavado con agua destilada
- Tampón neutro de diferenciación ..... 5 min

Una vez teñido, se realizó este mismo proceso, pero en sentido contrario, para lograr la deshidratación absoluta del tejido, y tras el último baño en xilol, se cubrió la preparación con medio de montaje permanente. Una vez teñido, podemos observar los núcleos celulares en color azul oscuro, mientras que el citoplasma aparece en distintas tonalidades de rosa.

Todas las tinciones fueron realizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Una vez procesadas las muestras, fueron analizadas mediante su visualización en un microscopio realizando un score que permitía dar un valor a los parámetros a estudiar.

#### 4.8. Análisis de las muestras.

##### 4.8.1. Estudio Hemático.

El análisis para el conteo de los eritrocitos y los valores referentes a la serie roja como el hematocrito, el volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media o el conteo de las células blancas se realizaron de forma automatizada mediante el empleo de una máquina de conteo de células sanguíneas, Animal Blood Counting.

La fórmula leucocitaria se realizó de forma manual mediante la observación de los frotis sanguíneos al microscopio. Se contabilizaron los distintos tipos de leucocitos, usando un “contador de saco” u otro cualquier artilugio que posibilite el conteo. Pueden cogerse varios campos del microscopio (los mejores, sin repetirlos) usando el sistema de conteo de dividir mentalmente el campo del microscopio en una esfera de reloj y ejecutar el conteo sistemáticamente. Se realizó recuento de 200 a 300 leucocitos.

Se realizaron los cálculos pertinentes y se pasaron a tanto por ciento. Se comparó lo obtenido con los valores normales.

##### 4.8.2. Estudio histopatológico.

Las muestras histopatológicas tras su procesado y tinción, son analizadas bajo el microscopio a diferentes aumentos. Las imágenes fueron interpretadas para calcular el grado de lesión, el estudio microscópico de las muestras incluyó un score basado en parámetros que, según la bibliografía consultada, son susceptibles de aparecer. Los parámetros utilizados y la graduación empleada en cada uno de ellos fueron los siguientes:

- Necrosis: extensión (0-3).
- Úlcera: extensión (0-3).
- Bacterias: Ausencia-presencia (0-1).
- Infiltrado.
- Cantidad: nulo-masivo (0-3).
- Extensión: Afección capas (0-3).
- Tipo: Macrófago (M), célula plasmática (pl), linfocito (l), eosinófilo (e), célula cebada o mastocito (cc).
- Fibroblastos: ausencia-presencia (0-1).
- Afección muscular: ausencia-presencia (0-1).
- Hemorragias: ausencia-presencia (0-1).

#### 4.9. Material para histología.

Para el análisis microscópico, utilizamos los siguientes elementos:

- Microscopio i80 Eclipse. (Nikon Instech Co., LTD., Kanagawa, Japan).
- Procesador automático de muestras Leica 1020. (Leica Microsystems Inc. Buffalo Grove, IL, USA).
- Cabina de filtración de gases horizontal Airnet.(CRUMA Material de Laboratorio, S.A., Barcelona, España).
- Dispensador de parafina Selecta. (J.P. Selecta S.A. Fábrica de Aparatos y Equipos para Laboratorio, Barcelona, España).
- Microtomo Leica.(Leica Microsystems Inc. Buffalo Grove, IL, USA).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Kit de tinción de hematoxilina-eosina.
- Cámara digital Nikon.(Nikon Instech Co., LTD., Kanagawa, Japan).
- Programa de captura de imágenes ACT-1 Nikon.(Nikon Instech Co., LTD., Kanagawa, Japan).
- Punks o Sacabocados de 8 mm usados para realizar las biopsias.

#### 4.10. Material para el análisis sanguíneo.

- Microscopio i80 Eclipse. (Nikon Instech Co., LTD., Kanagawa, Japan).
- Cámara digital Nikon.(Nikon Instech Co., LTD., Kanagawa, Japan).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Tubos de sangre heparinizados y sin heparinizar.
- Agujas venojet y adaptador empleados para la extracción de sangre.
- Agitador Rotatorio "Blood Mixer (Modelo. 683)" (Nahita, Beriáin, España).
- Vet abc (animal blood counting) (Scil, St Gurnee, Illinois, EEUU) empleada para cuantificar los parámetros de la serie roja.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Cantidad de larvas.

Como ya se comentó en material y métodos, se procedió a realizar una infección experimental con distintas dosis de L1 de *Protophormia terraenovae* en un rebaño de ovejas de raza merina, manteniendo un lote como control. La carga parasitaria media estimada inicialmente en la lesión fue entre moderada y elevada en los lotes 1 y 2 (Figura 6), con una media de 2,2 y 2,6, respectivamente, en una escala arbitraria de 0 (ausencia de larvas) a 4 (muy elevada). En los lotes control (3 y 3b) como era de esperar, no se encontró larva alguna. Analizando la evolución en el tiempo, en general hubo un marcado descenso hasta su desaparición entre los 2–14 d.p.i. (día post-inoculación) en ambos grupos, aunque al cuarto día post-inoculación, la carga estimada fue mayor (media de 3,1) en el lote 1. El lote 2 mantuvo inicialmente una carga ligeramente superior a éste, pero la situación se invirtió, aunque con escasa diferencia, entre los días 4 y 9 p.i. (post-inoculación).

De este modo, en el lote 1, sometido a un inóculo menor, la estimación media durante los días de estudio fue de 1,42, mientras en el lote 2, que recibió una dosis larvaria mayor, la media sólo fue de 1,00. Sin embargo, estas diferencias no fueron globalmente significativas mediante el test de suma de rangos de Wilcoxon ( $p=0,185$ ). Sólo en el 4º d.p.i la diferencia fue significativa entre los lotes infestados ( $p=0,017$ ), así como entre estos lotes y el lote 3b al 2 d.p.i ( $p=0,016$ ) y al 4 d.p.i ( $p<0,001$ ).

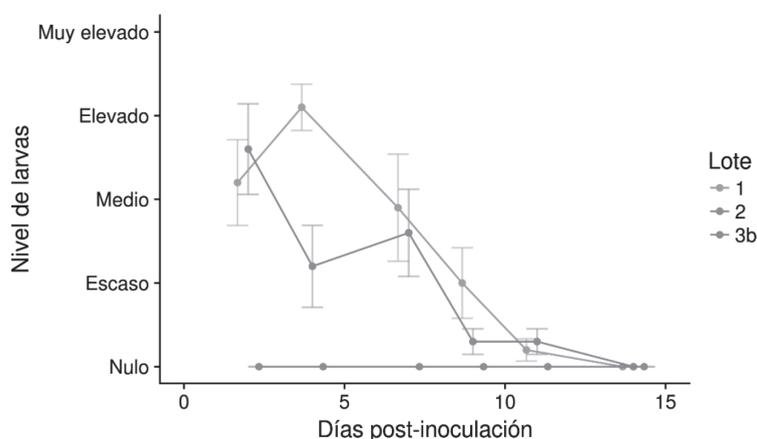


Figura 6. Cantidad de larvas estimada en la herida en una escala arbitraria (0-4) por lotes y d.p.i (días post-inoculación). Las medias se representan con un ligero desplazamiento horizontal para evitar la superposición de las barras de error, que representan el error estándar de la media. El lote 3 no se muestra dado que no existe lesión alguna.

## 5.2. Resultados hematológicos.

### 5.2.1. Glóbulos rojos.

La evolución de la concentración de eritrocitos en sangre se muestra en la Figura 7.

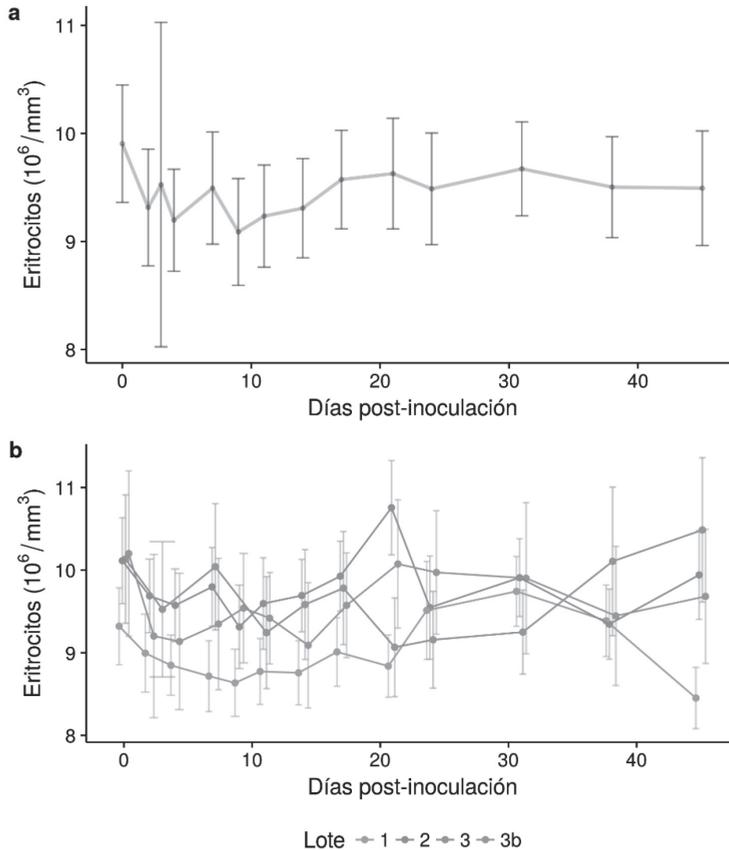


Figura 7. Evolución de la concentración de eritrocitos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % de todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

El promedio de eritrocitos de todos los animales durante el estudio se situó en  $9,47 \times 10^3/\text{mm}^3$ , con escasas fluctuaciones a lo largo del tiempo. Por grupos, este valor promedio fue de 9,00, 9,58, 9,61 y  $9,78 \times 10^3/\text{mm}^3$ , respectivamente en los lotes 1, 2, 3 y 3b.

En conjunto, los recuentos del lote 1 solo fueron significativamente inferiores a los del lote 2 ( $p < 0,0001$ ). Las diferencias en las tres primeras semanas y al 45 d.p.i son similares a las del día 0 d.p.i, no siendo significativas en ningún día en particular.

### 5.2.2. Hemoglobina.

La concentración de hemoglobina en sangre (Figura 8) en todos lotes del estudio fue de 9,24 g/dl, sin más fluctuación que un ligero descenso en las dos primeras semanas.

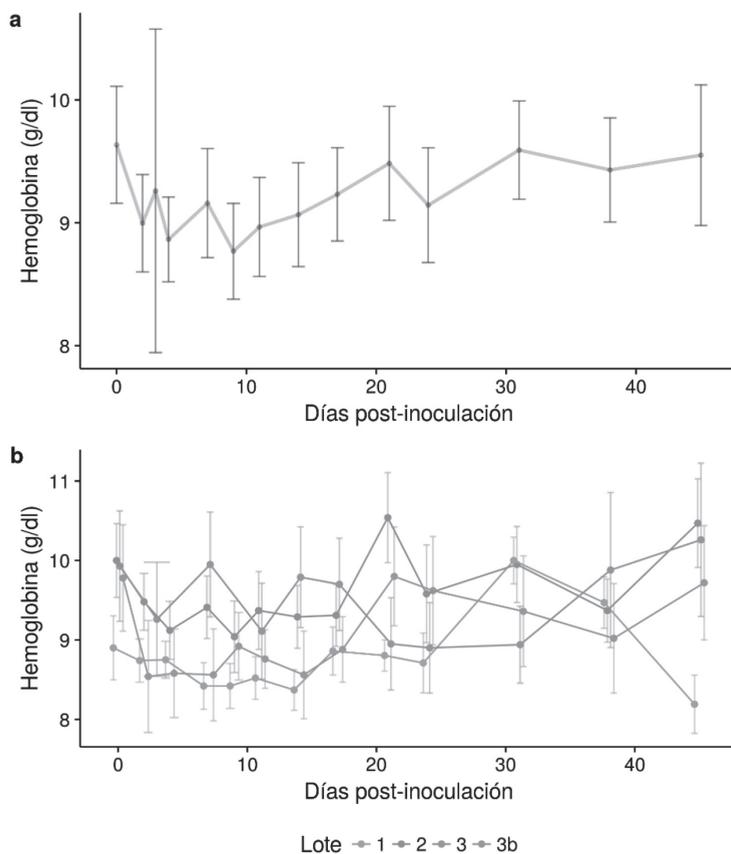


Figura 8. Evolución de la concentración de hemoglobina durante el periodo experimental  
 (a) Media e intervalo de confianza al 95 % de todos los ovinos.  
 (b) Media y error estándar por lote.

Por grupos, mediante el test de la suma de rangos de Wilcoxon y con valores de  $p$  ajustados por el método de Bejamini y Hochberg, la Hb en el lote 1, con una media de 8,78 g/dl, fue significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) a la del lote 2 (media = 9,61 g/dl) a lo largo del estudio y en menor medida ( $p < 0,05$ ), ambos lotes se diferencian significativamente del lote 3b (media 9,08 g/dl), así como el lote 2 con el lote 3 (media de 9,46 g/dl).

Analizando la evolución por grupos, se aprecia que, en todos los lotes, excepto el lote 3 (control sin herida), la ligera disminución de la Hb antes mencionada, respecto al día 0, se mantuvo hasta el 17 d.p.i (lotes 2 y 3b) o hasta el 24 d.p.i (lote 1), pero las diferencias solo llegaron a ser dignas de consideración puntualmente entre el lote 1 y 2, concretamente al 21 d.p.i ( $p = 0,024$ ) y 45 d.p.i ( $p = 0,0168$ ).

### 5.2.3. VCM.

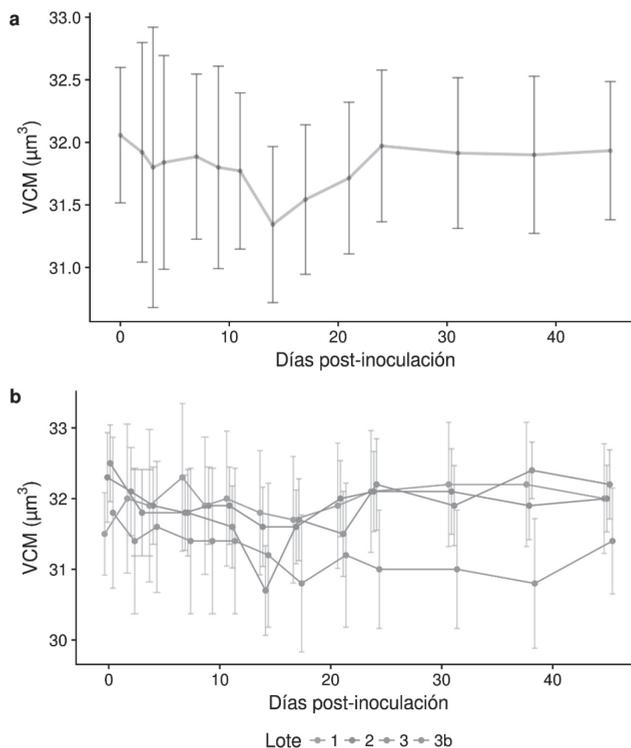


Figura 9. Evolución del VCM durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

El volumen corpuscular medio (VCM) en el conjunto de todos lotes alcanzó un valor medio de 31,81 .m3 (fl), con escasas fluctuaciones (Figura 9), siendo bastante similar al observado en los lotes 1, 2, 3 y 3b (respectivamente, 31,96, 31,94, 31,80 y 31,26 .m3). Aunque en este último, los valores fueron generalmente los más bajos, en ningún caso las diferencias entre lotes fueron significativas.

#### 5.2.4. HCM.

La hemoglobina corpuscular media (HCM) en los lotes del estudio (Figura 10) alcanzó un valor medio de 9,81 pg. Si lo analizamos por grupos, podemos ver que el lote 1 tenía una media de 9,84 pg, el lote 2 una media de 9,85 pg, el lote 3 de 9,92 pg y el lote 3b de 9,54 pg. Este último mostró la diferencia más clara respecto a los lotes 2 y 3 ( $p < 0,001$ ) pero fueron significativas todas las diferencias entre los grupos ( $p < 0,05$ ), excepto entre el lote 2 y 3.

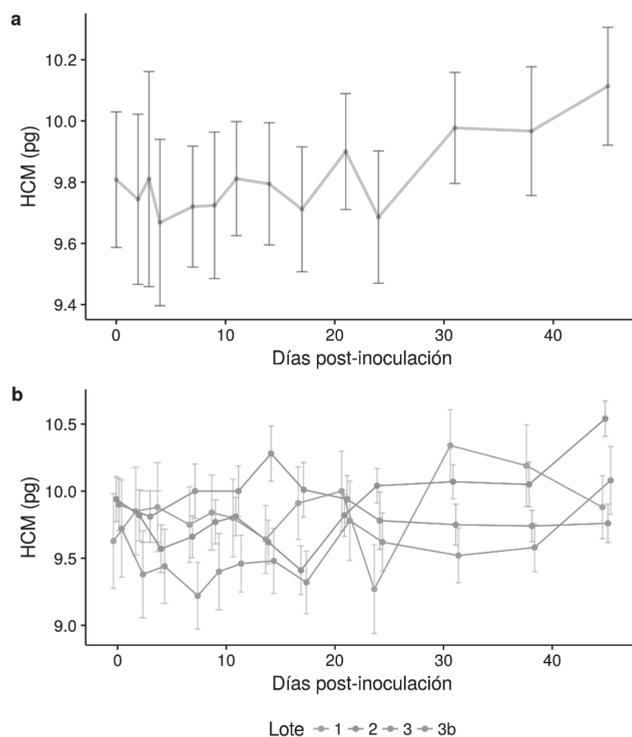


Figura 10. Evolución del HCM durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

En cuanto a su evolución, en los cuatro grupos se aprecia una similar tendencia al aumento de los valores medios, de modo que las diferencias no fueron significativas, excepto al final (45 d.p.i) entre los lotes 1 y 2, así como entre los lotes 2 y 3 ( $p=0,0268$ ).

### 5.2.5. CHCM.

El promedio total de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM o CCMH) en los lotes del estudio fue del 30,89 %. Por grupos, (Figura 11) observamos que las medias en los lotes 1,2,3 y 3b fueron respectivamente 30,77 %, 30,93 %, 31,23 % y 30,52 %, existiendo una diferencia significativa sólo entre los dos últimos ( $p=0,0013$ ).

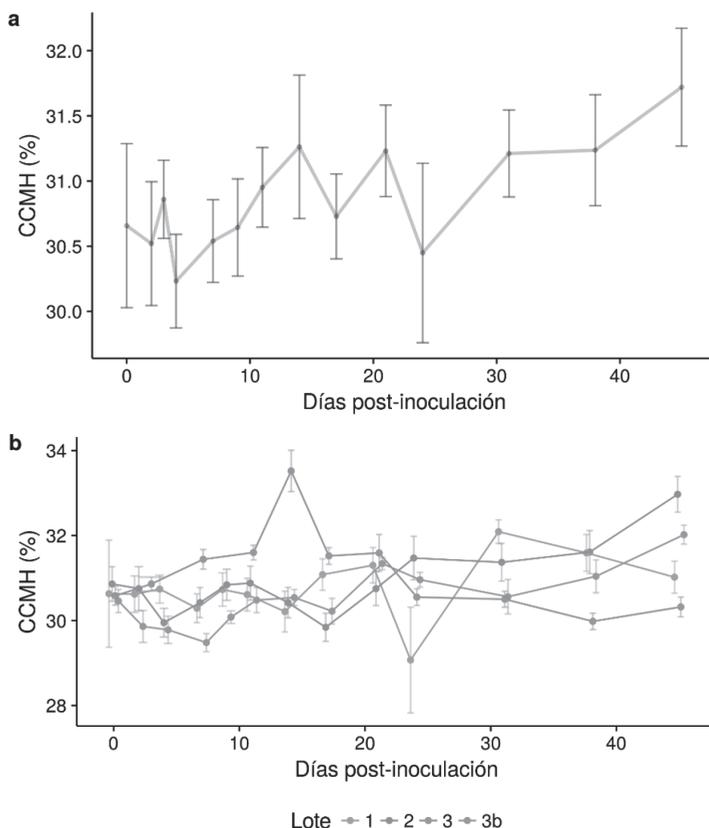


Figura 11. Evolución del CHCM durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

Analizándolo temporalmente, se aprecia que los valores medios en el 0 d.p.i fueron muy similares y muestran una tendencia ligeramente ascendente con fluctuaciones, salvo en el grupo 3. Al 14 d.p.i se produce un pico aislado en los valores del lote 3, de modo que se diferenció claramente del resto ( $p < 0,01$ ), mientras al 24 d.p.i no se encontraron diferencias significativas a pesar de un brusco descenso en el lote 1.

Menos evidentes, las diferencias por días en las sumas de rangos fueron también puntualmente significativas entre los lotes 3 y 3b al 7 d.p.i ( $p = 0,0160$ ), entre los lotes 1 y 2 ( $p = 0,0460$ ) y los lotes 2 y 3 ( $p = 0,0059$ ) al 17 d.p.i. Al 31 d.p.i, el lote 1 muestra una diferencia con ambos grupos controles ( $p = 0,0075$  y  $p = 0,0301$ , respectivamente). Sin embargo, al final de la experiencia (45 d.p.i), las diferencias volvieron a estar entre los lotes 1 y 2, 2 y 3 ( $p = 0,0171$ ), así como entre los lotes control ( $p = 0,0233$ ), aunque ya en sentido contrario a la inicial.

#### 5.2.6. Leucocitos.

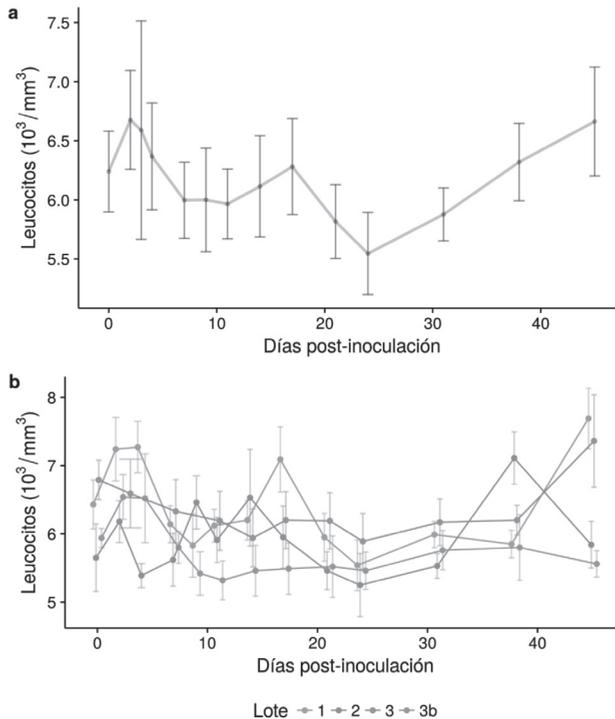


Figura 12. Evolución de la concentración de leucocitos durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

Respecto a la concentración de leucocitos en sangre (Figura 12), encontramos un promedio de  $6,13 \times 10^3 / \text{mm}^3$  en el conjunto de los animales. Los valores medios en los lotes 1, 2, 3 y 3b fueron respectivamente de  $6,41 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ,  $5,91 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ,  $6,30 \times 10^3 / \text{mm}^3$  y  $5,73 \times 10^3 / \text{mm}^3$ .

Aunque los valores medios fueron bastantes similares, el análisis no paramétrico arrojó diferencias significativas entre los lotes 1 con el lote 2 ( $p=0,0042$ ) y 3b ( $p=0,0010$ ), pero también entre ambos controles ( $p=0,0112$ ).

El análisis temporal nos muestra que, en todos los grupos, excepto en el lote 3, se produjo aumento inicial de la concentración de leucocitos, así como picos posteriores excepto el lote 3b. Sin embargo, a través del análisis no paramétrico sólo resultó significativa la diferencia entre los lotes 1 y 2 a los 4 y 45 d.p.i ( $p=0,0022$  y  $p=0,0344$ , respectivamente).

### 5.2.7. Neutrófilos.

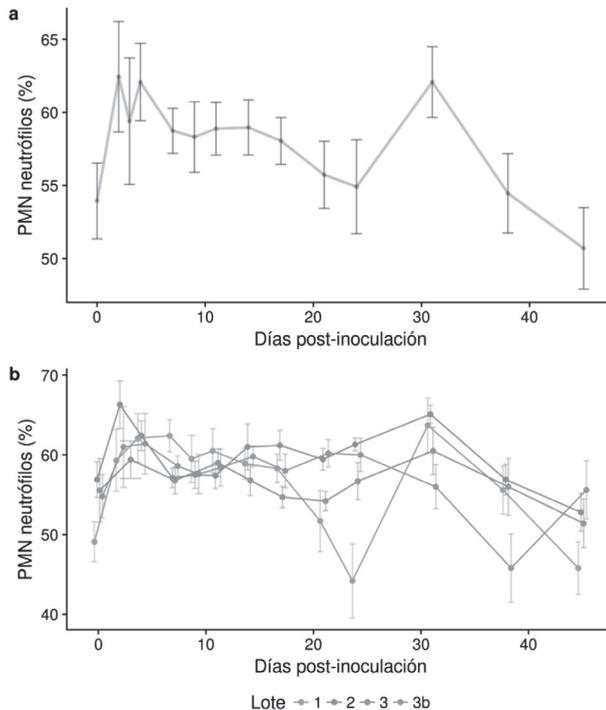


Figura 13. Evolución del porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

El porcentaje de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos medio (Figura 13), en los lotes del estudio es de 57,58 %. Los porcentajes en los lotes 1, 2, 3 y 3b fueron respectivamente 56,24 %, 59,63 %, 56,75 % y 57,48 %.

Solo se encontró una diferencia significativa entre el lote 2 y 3 ( $p=0,0115$ ) en los recuentos totales. En cambio, por día de estudio, se aprecia un ascenso inicial significativo al 2 y 4 d.p.i ( $p=0,01$ ) y un descenso final, sólo comparable a los valores del 0 y 38 d.p.i. Sin embargo, estas fluctuaciones de los valores no son achacables al distinto tratamiento de los lotes, ya que sólo se encontró cierta significación ente lotes 1 y 2 el 24 d.p.i ( $p=0,0234$ ) por un descenso puntual de los valores en el lote 1.

### 5.2.8. Basófilos.

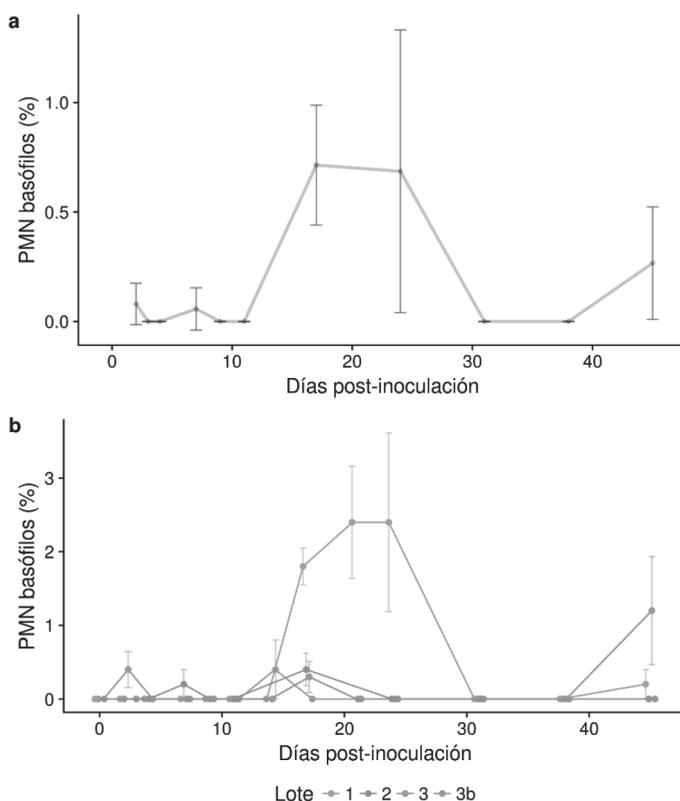


Figura 14. Evolución del porcentaje de polimorfonucleares basófilos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

El promedio total de PMN basófilos medio en el estudio fue del 0,20 %. En general, no se observaron estas células o los recuentos medios por grupo y día fueron claramente inferiores a este promedio en todo el periodo experimental (Figura 14), pero el recuento medio del lote 1 fue del 0,52 %, debido a recuentos anormalmente altos los 14, 17 y 21 d.p.i, significativamente diferentes de los observados en el resto de los lotes ( $p < 0,05$ ). En el lote 2, la media fue del 0,05 % a lo largo del estudio, similar a la del lote 3b (0,06 %) y el lote 3 (0,09 %) algo más elevado, ya que alcanzaba un promedio del 1,2 % al 45 d.p.i, aunque sin suficiente significación respecto a los otros grupos ( $p = 0,055$  en el mejor de los casos)

### 5.2.9. Eosinófilos.

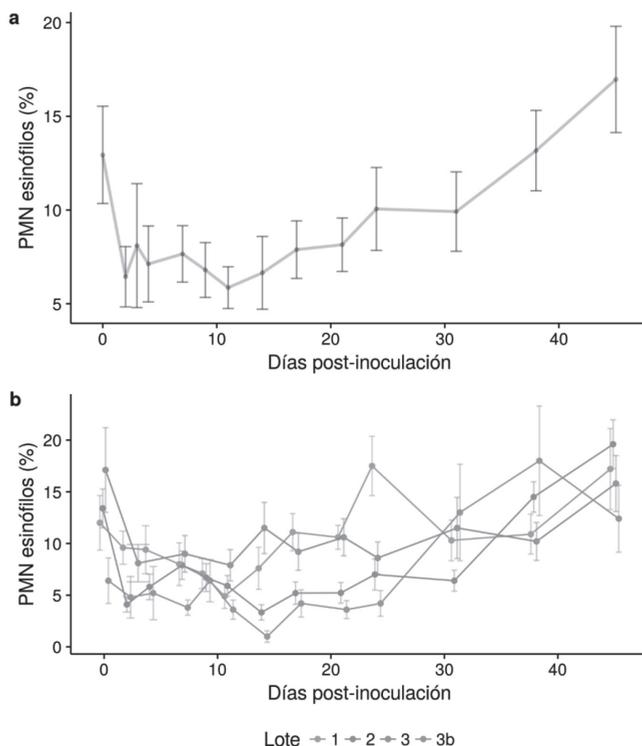


Figura 15. Evolución del porcentaje de polimorfonucleares eosinófilos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

El porcentaje de PMN eosinófilos medio en los lotes del estudio fue del 9,2 %. Por grupos, el lote 1 tiene una media ligeramente más alta (10,48 %), pero similar a la del lote 3 (10,59 %), mientras el lote 2 tuvo una media más baja (8,14 %), pero superior a la del lote 3b, que mostró la media más baja (6,66 %). Las diferencias totales entre lotes fueron siempre significativas ( $p < 0,01$ ) excepto entre los lotes 1 y 3. En relación a la evolución temporal, podemos ver que con escasas fluctuaciones y diferencias entre grupos, existió una tendencia general descendente hasta el 11 d.p.i, con valores significativamente más bajos que los del día 0 ( $p = 0,0002$ ) y un paulatino ascenso de los porcentajes hasta el 45 d.p.i, que mostró diferencias significativas con el resto de los días ( $p < 0,01$ ), excepto con los valores de partida. También al 38 d.p.i las diferencias fueron significativas. Sin embargo, en cuanto a las diferencias entre grupos, solamente resultó de importancia un pico hacia las tres semanas en el lote 1, siendo en concreto significativas las diferencias entre el lote 1 y 3b a los 14-21 d.p.i, así como entre los lotes 1 y 2 a los 21-24 d.p.i (Figura 15).

#### 5.2.10. Linfocitos.

El porcentaje de linfocitos medio en los lotes del estudio a lo largo del estudio fue del 29,15 %. Por grupos, este promedio fue del 26,78 %, 29,43 %, 29,78 % y 32,43 % respectivamente en los lotes 1, 2, 3 y 3b. Las diferencias entre los cuatro grupos fueron todas significativas ( $p < 0,01$ ) excepto entre los lotes 2 y 3 ( $p = 0,8156$ ).

En cuanto a su evolución, destacó el descenso de los valores medios entre el 31-45 d.p.i (Figura 16).

Por grupos, al 0 d.p.i, el lote 3b tuvo valores inferiores al lote 2 y 3 ( $p < 0,05$ ), siendo más suave su diferencia respecto al lote 1 ( $p = 0,0614$ ), aunque se igualan posteriormente, siendo lo más destacable el descenso del porcentaje en los últimos muestreos. Al 45 d.p.i, las diferencias fueron significativas respecto a los días 0 y el periodo 7-24 d.p.i, excepción hecha del día 21, debido al marcado descenso del lote 1. La abrupta fluctuación el 21-24 d.p.i en este lote hace sospechar de un sesgo accidental, pero los recuentos siguientes sugieren que existió realmente un descenso marcado en este lote, que se inició el 17 d.p.i, donde se diferencia de ambos lotes control ( $p < 0,05$ ) y se acentuaron el 38 d.p.i, donde llegó a distanciarse de forma significativa también del lote 2. Sin embargo, el descenso de los demás lotes anuló esta significación al 45 d.p.i.

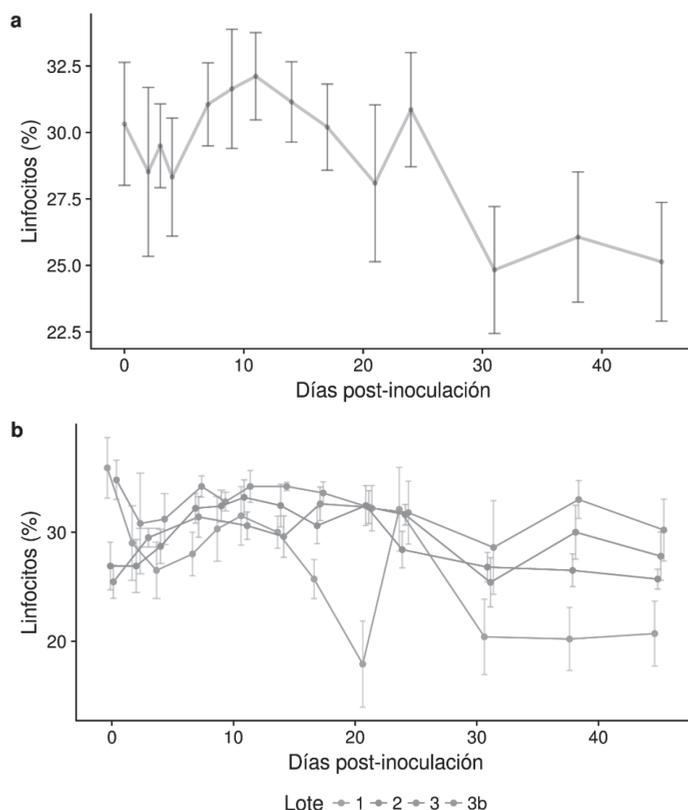


Figura 16. Evolución del porcentaje de linfocitos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

### 5.2.11. Monocitos.

El porcentaje de monocitos en general se mantuvo por debajo del 5 %, con mínimas diferencias entre grupos y días, a excepción del lote 1 en el 17 d.p.i y entre el 38-45 d.p.i (Figura 17). De este modo, los promedios se elevaron al 3,85 % para el total de los animales y al 5,97 % para el lote 1, mientras que fue del 2,75 %, 2,80 % y 3,36 % en los lotes 2, 3 y 3b, respectivamente. Esos valores anormales hicieron que las diferencias del lote 1 sean significativas ( $p < 0,01$ ) incluso considerando todo el periodo experimental.

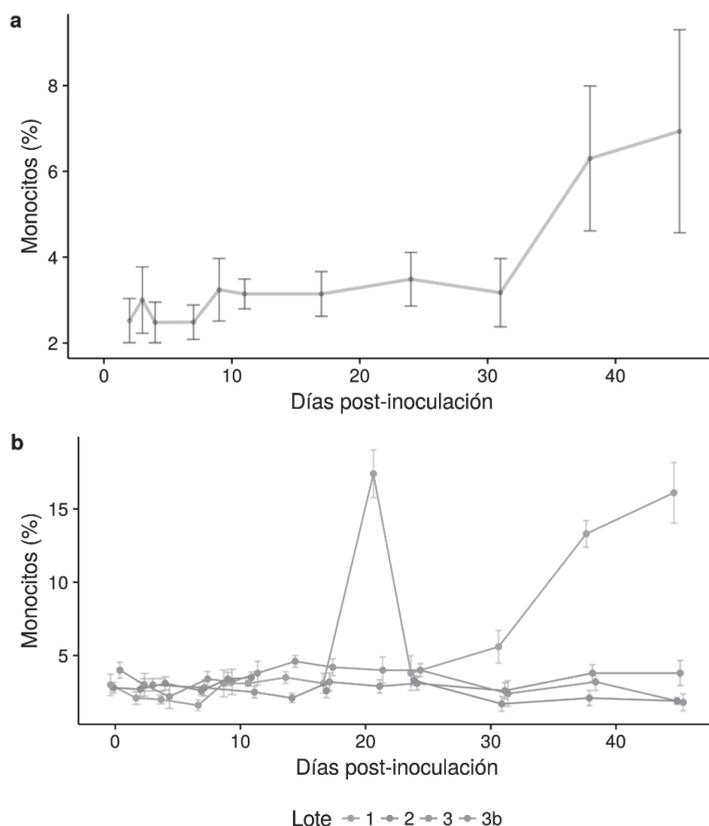


Figura 17. Evolución del porcentaje de monocitos en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

### 5.2.12. Plaquetas.

El promedio de plaquetas a lo largo del estudio en todos los lotes fue de  $483 \times 10^3 / \text{mm}^3$ . Por lotes, estos valores fueron similares, en concreto  $497 \times 10^3 / \text{mm}^3$  en el lote 1,  $1,488 \times 10^3 / \text{mm}^3$  en el lote 2,  $402 \times 10^3 / \text{mm}^3$  en el lote 3 y  $571 \times 10^3 / \text{mm}^3$  en el lote 3b. Excepto entre el lote 1 y 2, las diferencias globales entre grupos fueron significativas ( $p < 0,02$ ).

En la Figura 18 se aprecia que el recuento de plaquetas tendió a aumentar hasta el 9 d.p.i y a mantenerse elevado, aunque en el lote 3 se produjeron escasos cambios. El aumento respecto al día 0 es significativo desde el 7 d.p.i, excepto el día 24. Por

grupo y día, solo se apreciaron diferencias significativas entre el lote 3b frente a los lotes 1 y 3, en concreto a los 14, 21 y 45 d.p.i ( $p < 0,05$ ) aunque la no significación al 31 d.p.i en este sentido fue dudosa ( $p = 0,0580$ ).

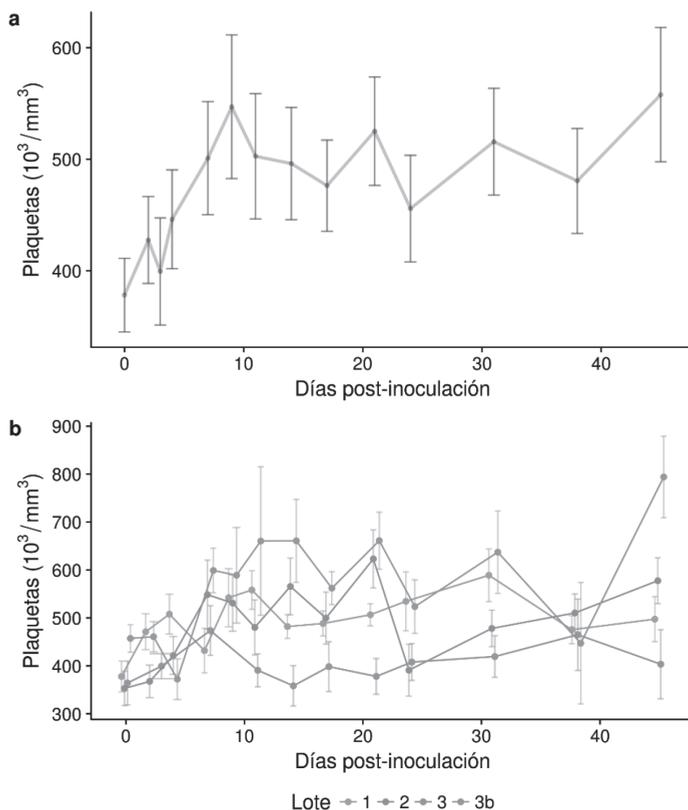


Figura 18. Evolución del porcentaje de plaquetas en sangre durante el periodo experimental (a) Media e intervalo de confianza al 95 % en todos los ovinos. (b) Media y error estándar por lote.

### 5.3. Resultados histológicos.

#### 5.3.1. Descripción general.

Con el fin de valorar el daño histopatológico provocado por la infestación experimental de las larvas de *Protophormia terraenovae*, se realizó un estudio pormenorizado de dichas lesiones al día 4 y al día 14 p.i., en cada uno de los animales del

estudio. En los tres lotes estudiados (cabe recordar que en el lote 3 no existió lesión alguna ya que no se infectó y no se le practicó “herida”), se observó bastante homogeneidad lesional, aunque varía considerablemente en función del tiempo:

#### 5.3.1.1. Lote 1.

##### *Día 4 p.i.*

En estos animales, se observó una zona de necrosis extensa, unida a una úlcera de similar calibre. En algunos animales llegó a afectar al total de la superficie de la muestra. Se apreciaron gran cantidad de bacterias de morfología cocoide, normalmente integrada en la zona de necrosis-úlceras. Hubo una gran cantidad de infiltrado inflamatorio, en las tres capas de la piel, que solía estar formado por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, y en algunos casos eosinófilos, unido a una gran presencia de neutrófilos en la zona de necrosis y ulceración. Los fibroblastos se presentaron en escaso número. El folículo piloso también pareció verse afectado en algunos animales. Presentaron una foliculitis, normalmente con células plasmáticas, conformando el infiltrado inflamatorio presente. Las hemorragias, si bien pudieron evidenciarse, no fueron muy frecuentes.

##### *Día 14 p.i.*

Se observó una disminución considerable de la zona ulcerada y necrosis, llegando a ser la primera en algunos animales casi inexistente y el material necrótico apareció expulsado en superficie. En ningún caso se apreciaron elementos bacterianos. La epidermis pareció encontrarse reactiva, con engrosamiento de las capas más profundas y falta de queratina en superficie. El infiltrado inflamatorio se mostró en menor cantidad y solía circunscribirse a la dermis. En este caso, estuvo formado por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, apareciendo también mastocitos y eosinófilos, en algunos animales. Los fibroblastos destacaron en todos los animales, así como la afección pilosa, con plasmocitos en el interior del folículo. No se apreciaron hemorragias ni alteración de la musculatura circundante.

#### 5.3.1.2. Lote 2.

##### *Día 4 p.i.*

De patrón similar al descrito en el lote 1, quizás destacó una menor extensión de la úlcera y de la necrosis, aunque sólo en algunos animales, y mayor presencia de

hemorragias. La presencia de eosinófilos y mastocitos en el infiltrado inflamatorio fue habitual.

*Día 14 p.i.*

Se apreció casi la total restauración de la piel. En el infiltrado, escaso o moderado, predominaron linfocitos, células plasmáticas, y algunos eosinófilos y macrófagos.

#### 5.3.1.3. Lote 3b.

*Día 4 p.i.*

Le lesión, en este caso fue de menor cuantía que en los lotes anteriores. Se observaron úlceras y material necrótico de menor cuantía y la presencia de bacterias fue más ocasional. El infiltrado inflamatorio, de carácter como máximo moderado, estuvo formado por linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y macrófagos. Dos animales mostraron mastocitos, los mismos que lo evidencian también a los 14 d.p.i. Tanto la afección pilosa como las hemorragias hacen presencia en algunos animales. Se apreció también destrucción de células musculares y proliferación fibroblástica.

*Día 14 p.i.*

Las muestras presentaron una estructura casi normal de la piel. La epidermis se encontró reactiva, sobre todo por el engrosamiento de las capas profundas. El infiltrado inflamatorio fue escaso, localizado en la dermis y compuesto por linfocitos, plasmáticas y macrófagos. La proliferación fibroblástica fue constante.

En definitiva y como resumen general del daño lesional, se puede afirmar que las lesiones en el día 4 p.i. fueron más graves que en el día 14 p.i. Según la gravedad de las lesiones iniciales, parece que las más importantes se desarrollaron en el lote 1 y en menor medida el lote 2, siendo de menor importancia en el lote 3b.

#### 5.3.2. Análisis por variables.

Los diversos aspectos de la lesión de cada animal se recogieron como variables categóricas (presencia-ausencia) u ordinales (con categorías según una escala preestablecida), lo que nos permite complementar la anterior descripción histopatológica con un análisis cuantitativo:

### 5.3.2.1. Nivel de exudado.

El nivel de exudado inicial de todos los lotes con herida (incluido el lote control 3b) fue moderado, con una estimación media de 2,2–2,7 en una escala 0 a 4, sin diferencias significativas entre lotes. Este exudado prácticamente desapareció en la mayoría de los animales hacia el 11 d.p.i y de forma definitiva a los 14 d.p.i (Figura 19).

Sin embargo, mientras que este descenso fue ostensible ya al día 4–7 p.i. en el lote 3b, en el lote 2 fue más discreto e incluso aumentó en los primeros días en el lote 1, siendo la diferencias con los primeros significativas ( $p=0,0198$  y  $p=0,073$ , respectivamente).

Al 9 d.p.i, las diferencias entre los tres grupos llegaron a ser significativas ( $p=0,0365$ ), a pesar de que el exudado ya era escaso, siendo más elevado en el lote 1, con una cantidad mínima de exudado en el lote 2 y prácticamente nula en el lote control 3. Las diferencias entre días contiguos no fueron significativas, pero a excepción del par 2–7 d.p.i, cualquier otra comparación fue significativa ( $p<0,05$ ).

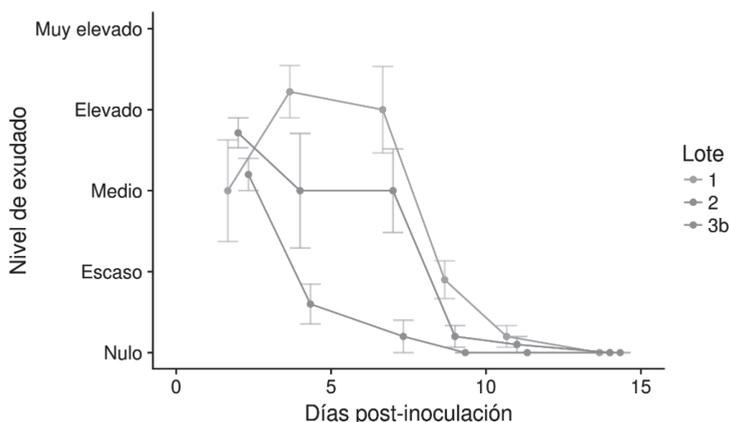


Figura 19. Nivel exudado en la lesión, en una escala arbitraria (0–4) por lote y día post-inoculación. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

### 5.3.2.2. Extensión de la necrosis.

En una escala arbitraria de 0 a 3, en función de si la extensión de la necrosis fue nula, escasa, media o elevada, (Figura 20) y asumiendo el mismo peso numérico a cada categoría, podemos decir que la extensión de la necrosis en las heridas fue inicialmente media-elevada en los lotes 1 y 2 (puntuación media de 2,5 y 2,6, respecti-

vamente), mientras que fue escasa en el lote 3b (puntuación media de 1,0). El análisis no paramétrico de las diferencias al 4 d.p.i respecto al grupo control fue significativa ( $p=0,02$ ). Al día 14 d.p.i estas diferencias se anularon ya que sólo aparece de forma escasa en un animal del lote 1 (puntuación media de 0,1), siendo siempre inapreciable en los lotes 2 y 3.

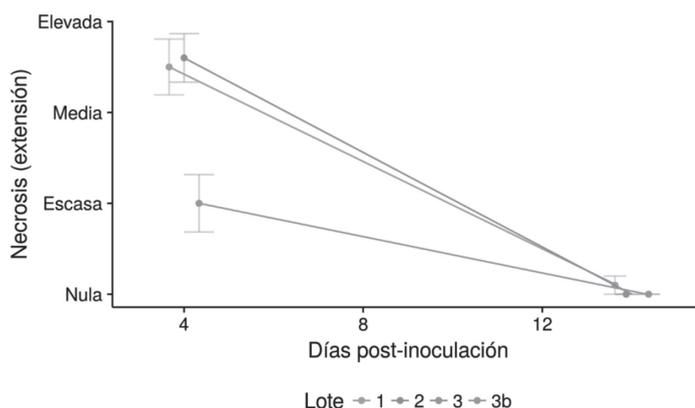


Figura 20. Extensión de la necrosis en una escala arbitraria (0-3) por lote y día post-inoculación. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

### 5.3.2.3. Ulceración.

La valoración de la ulceración, igualmente en una escala de 0 a 3, mostró una evolución similar a la de la necrosis (Figura 21). Inicialmente fue escasa en el lote 3b (media de 1,0), moderada en el lote 1 (media de 2,1) y generalmente elevada en el lote 2 (media de 2,9). Persistió, sin embargo, aunque de forma escasa al 14 d.p.i, en tres ovejas del lote 1 (en una de ellas con intensidad media) y en un animal del lote control 3b. En el lote 2, a pesar de alcanzar la mayor puntuación inicial, desapareció completamente a partir de las 2 semanas p.i. Solo las diferencias al 4 d.p.i entre los lotes 2 y 3b fueron significativas ( $p=0,0026$ ).

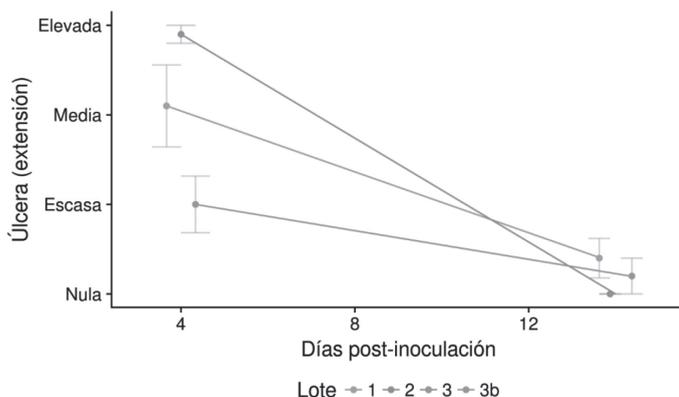


Figura 21. Extensión de la ulceración en una escala arbitraria (0-3) por lote y día post-inoculación. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

#### 5.3.2.4. Infiltrado.

La cantidad de infiltrado celular, al igual que los dos parámetros anteriores, fue mayor en los lotes 1 y 2 (puntuación media de 2,4 y 2,6 respectivamente), pero apareció también con escasa o media intensidad en todos los ovinos del lote control 3b (puntuación media de 1,4), de modo que las diferencias entre lotes no fueron significativas. Asimismo, el infiltrado descendió de un modo significativo al 14 d.p.i ( $p < 0,0001$ ), sin embargo, aunque escaso, no desapareció en ningún animal, incluidos los del lote control (Figura 22).

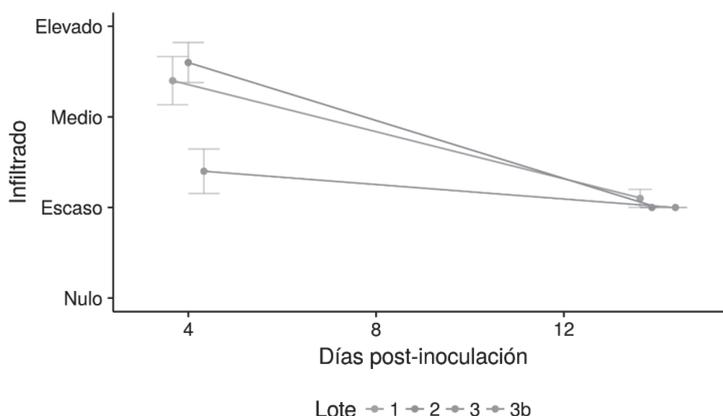


Figura 22. Cantidad de infiltrado en la lesión, en escala arbitraria (0-3) por lote y día post-inoculación. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

5.3.2.5. *Afección de las capas dérmicas.*

La afección de la capa media fue omnipresente en los tres grupos al 4 y al 14 d.p.i, y sin diferencias entre los lotes. Por su parte, el porcentaje de afección de las capas externa e interna en general fue alta, pero desapareció por completo al 14 d.p.i. La frecuencia de la afección de las capas externa, media e interna de la piel por lote y día post-inoculación se detalla en la Tabla 5.

	Día 4 p.i			Día 14 p.i		
Lote	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)
Externa	90 %	100 %	40 %	0 %	0 %	0 %
Media	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Interna	70 %	100 %	60 %	0 %	0 %	0 %

Tabla 5. Afección de las capas dérmicas.

Respecto a la capa externa, la afección del lote 3b fue mucho menor que los lotes infestados, de modo que la diferencia de las proporciones al 4 d.p.i fue significativa ( $p=0,0092$ ). Por parejas de grupos, mediante el test de Fisher, solamente la diferencia entre el lote 2 y 3b fue clara ( $p=0,0220$ ). La reducción de la afección al 14 d.p.i fue significativa sólo en los lotes 1 y 2 ( $p<0,0001$ ).

En la capa interna, las diferencias ocurrieron en el mismo sentido, pero las diferencias respecto a los animales control fueron menores, de modo que no fue posible rechazar la hipótesis nula ( $p=0,1122$ ). La reducción del 70 % al 0 % al 14 d.p.i en el lote 1 siguió siendo significativa ( $p=0,0031$ ) pero no la del lote 3b, ya que estaba formado por sólo 5 animales.

5.3.2.6. *Bacterias.*

La presencia de bacterias fue habitual en ambos lotes inoculados con larvas (Tabla 6), claramente mayor que en el lote control 3b ( $p<0,01$ ). La reducción de esta presencia al 14 d.p.i fue claramente significativa ( $p<0,001$ ), de modo que sólo se apreció en 1 animal del lote 1. Por lotes, la reducción del lote 1 siguió siendo claramente significativa ( $p=0,0011$ ).

Lote	Día 4 p.i.			Día 14 p.i.		
	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)
Bacterias	90 %	100 %	20 %	10 %	0 %	0 %
Macrófagos	40 %	100 %	80 %	50 %	50 %	60 %
Plasmocitos	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Linfocitos	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Eosinófilos	0 %	70 %	40 %	30 %	40 %	10 %
Mastocitos	0 %	40 %	40 %	80 %	40 %	60 %
Neutrófilos	0 %	40 %	40 %	80 %	40 %	60 %
Fibroblastos	80 %	60 %	100 %	90 %	100 %	100 %

Tabla 6. Frecuencia de la presencia de bacterias y células del infiltrado inflamatorio en las lesiones, por día y lote experimental.

### 5.3.2.7. Células inflamatorias.

La frecuencia de la presencia de células inflamatorias en los tejidos de la herida, expresada en porcentajes, se resume en la Tabla 6.

#### *Macrófagos.*

La presencia de macrófagos en las heridas de los animales en el día 4 p.i. mostró una menor presencia de estas células en el lote 1 que en el lote 2 ( $p=0,0108$ ), pero ninguno de ellos mostró diferencias significativas respecto al lote control 3b, donde se observaron con una frecuencia intermedia. Al 14 d.p.i, los tres grupos mostraron una frecuencia media similar ( $p=0,4817$ ). La diferencia respecto al 4 d.p.i solo fue significativa para el lote 2 ( $p=0,0325$ ).

#### *Célula plasmáticas y linfocitos.*

Ambos tipos de células estuvieron omnipresentes en las lesiones, tanto al 4 d.p.i como al 14 d.p.i, de modo que como variables categóricas no fueron útiles para establecer comparación alguna.

*Eosinófilos.*

Contrastó la ausencia de eosinófilos en el lote 1 respecto al lote 2 ( $p=0,0031$ ) e incluso del lote control 3b, aunque no de forma clara en este caso ( $p=0,0952$ ). Sin embargo, estas diferencias se anularon al 14 d.p.i, aunque ningún cambio alcanzó suficiente significación respecto al 4 d.p.i.

*Mastocitos.*

Al igual que anteriormente, destacó la ausencia de células cebadas o mastocitos en el lote 1 al 4 d.p.i, mientras que fueron relativamente frecuentes en el lote 2, aunque su significación fue dudosa dado el reducido número de animales ( $p=0,0867$ ). Fue llamativa la presencia posterior (al 14 d.p.i) de estas células en 8 de las 10 ovejas del lote 1 ( $p<0,001$ ), aunque no fue significativo este cambio respecto a los otros lotes ese mismo día, que apenas cambiaron.

*Neutrófilos.*

Se obtuvieron los mismos resultados que con los mastocitos, siendo por tanto idéntica la significación de sus frecuencias.

*Fibroblastos.*

La presencia de fibroblastos fue relativamente alta en los tres grupos, tanto al 4 d.p.i como el 14 d.p.i. Aunque inicialmente este porcentaje fue algo más bajo en el lote 2, en ningún caso las diferencias fueron significativas.

*Afección del folículo piloso.*

La frecuencia con que se observó la alteración del folículo piloso, y en concreto la presencia de plasmocitos y neutrófilos en el mismo, se resumen en la Tabla 7.

Como podemos ver, la alteración y afección del folículo piloso se produjo aproximadamente en la mitad de los animales, con escasas diferencias entre grupos. Aunque eso conllevó que esta lesión ya no fuese apreciable en el lote 3b, las diferencias entre grupos o días no fueron significativas en ningún caso.

Lote	Día 4 p.i.			Día 14 p.i.		
	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)
Afección	60 %	50 %	40 %	50 %	50 %	0 %
Plasmocitos	50 %	40 %	0 %	40 %	30 %	0 %
Neutrófilos	0 %	0 %	0 %	10 %	0 %	0 %

Tabla 7. Frecuencia lesiones en folículo piloso, por día y lote experimental.

Las células plasmáticas solo se observaron inicialmente en 9 de los 20 animales de los lotes 1 y 2, reduciéndose a sólo 7 al 14 d.p.i, de modo que no se observaron diferencias significativas en ningún sentido. La ausencia de diferencias fue aún más obvia respecto a la presencia de neutrófilos en el folículo piloso, ya que sólo se observaron en una oveja del lote 1 al 14 d.p.i.

#### 5.3.2.8. Otras lesiones.

La frecuencia en que se observaron alteraciones del tejido muscular y hemorragias se resume en la Tabla 8. Las alteraciones de las fibras musculares fue una constante al 4 d.p.i y solo se mantiene en uno de los controles, de modo que la reducción fue significativa incluso en el lote 3b ( $p=0,0476$ ) pero no existieron diferencias significativas entre los grupos de animales.

Lote	Día 4 p.i.			Día 14 p.i.		
	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)	1 (n=10)	2 (n=10)	3b (n=5)
Daño muscular	100 %	100 %	100 %	0 %	0 %	20 %
Hemorragias	30 %	30 %	60 %	20 %	0 %	0 %

Tabla 8. Frecuencia de daño muscular y hemorragias, por día y lote experimental.

Las hemorragias se apreciaron en casi la mitad de los animales al 4 d.p.i, concretamente en el 30 % de los animales de los lotes 1 y 2 y en el 60 % del lote control. Curiosamente al 14 d.p.i, estas hemorragias sólo se observaron en dos ovejas del lote 1, pero en ningún caso se pudo constatar ninguna diferencia significativa entre los grupos a los 4 d.p.i ( $p=0,339$ ) ni a los 14 d.p.i ( $p=0,1954$ ). La disminución del porcentaje sólo fue significativa en el lote 2 ( $p=0,0108$ ).

## 6. DISCUSIÓN.

### 6.1. Resultados parasitológicos.

#### 6.1.1. Nivel de larvas.

Como ya comentamos, se realizó una infección experimental con L3 de *P. terraenovae* a distintas dosis, en ovejas de raza merina en ambiente controlado. Nuestro estudio mostró que la cantidad de larvas en la lesión apenas difiere entre los lotes infestados a las 48 horas de la infestación y posteriormente, incluso, se apreciaron menos larvas en el grupo que recibió el mayor inóculo. Esta falta de correspondencia entre la dosis inicial de larvas y la cantidad de larvas que siguieron desarrollándose en los días siguientes, podría ser un reflejo de una diferente respuesta del hospedador, ya que una mayor dosis infestante podría inducir una respuesta de hipersensibilidad más rápida e intensa, capaz de reducir el número de larvas que pueden desarrollarse, estando esta hipótesis de acuerdo con los estudios de Sandeman y cols. (1985, 1986, 1992), si bien estos autores encuentran que en dosis de 50 L1, el porcentaje de larvas recuperado fue muy inferior al de las infecciones con 500 L1 (Sandeman y cols., 1986). Otro factor a considerar en este sentido es la competencia entre larvas en el área de la herida, que podría impedir el correcto desarrollo de éstas, y finalmente a su supervivencia. Esta hipótesis se apoya en los resultados de Smith y Wall (1997), quienes encuentran que en infestaciones con más de 300 larvas se incrementa la mortalidad y disminuye el tamaño de éstas, y concuerda también con Pérez y cols. (1997) que encuentran generalmente un número de larvas menor, con una media de 127 L3 por foco larvario.

### 6.2. Resultados hematológicos.

Nuestros datos sobre la serie roja fueron en general bastante comparables a los valores normales en ovinos (Jain, 1993; Meyer y Harvey, 2004). En cuanto a la densidad de eritrocitos, además de estar entre valores normales, no existió una clara

tendencia a lo largo del estudio, ni grandes diferencias entre grupos. No obstante, el lote 1 mostró un cierto descenso inicial y globalmente fueron significativamente inferiores a los valores del lote 3. En cualquier caso, fueron diferencias comparables a la variabilidad inherente al método analítico y la toma de muestras.

Como era previsible, la hemoglobina en sangre mostró una evolución bastante similar, y si bien existieron diferencias significativas entre diferentes lotes, éstas se encontraron desde el primer día, por lo que podemos descartar que se trate de un efecto del reto experimental, aunque el ligero descenso (pero significativo) en los lotes 1 y 2 podría ser un reflejo de la agresión larvaria. En todo caso, este parámetro se encontró también dentro de los valores normales de las referencias antes citadas. También concuerda con estudios como el de Tuygun y cols. (2009), que observan valores normales de hemoglobina en una persona con una miasis producida por *W. magnifica*.

Aún merecen menos consideración los cambios en los valores de VCM, siempre dentro del rango normal y sin diferencias significativas; la HCM con algunas diferencias entre los lotes del estudio, pero que se mantuvieron durante todo el estudio, por lo que no cabe achacarlas a la infestación experimental, o la CHCM, que mostró cierta tendencia a aumentar, dando algunas diferencias al final de la experiencia, pero dentro del rango normal para el ganado ovino.

Si bien la densidad de glóbulos blancos se mantuvo dentro de valores normales, al analizar la evolución temporal podemos ver un claro pico del número de leucocitos en los grupos infestados en los primeros días de infestación, que también se ha visto en otros ensayos experimentales en ovino como el de Colditz y cols. (2005), así como en infecciones naturales en el ser humano (Tuygun y cols., 2009). Sin embargo, no está claro en nuestras observaciones que se debieran a la infestación larvaria realmente, ya que también se produjo en el lote control con lesión y no se produjo en el lote control sin lesión. También se observan elevaciones posteriores de leucocitos en los lotes infectados que podrían estar relacionadas con una respuesta más tardía, si bien es difícil de confirmar con los resultados y hallazgos obtenidos.

Respecto a la fórmula leucocitaria normal en ovinos aportada por Ramírez (2006), el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos se encontró elevado en todos los grupos, aunque esto ocurrió desde antes de realizar el experimento y en los grupos control. En cuanto a su evolución temporal, existió una clara elevación a partir del día 2 en los grupos infestados, concordando con los hallazgos de Colditz y cols. (2005), aunque también observamos un repunte del porcentaje de neutrófilos en ambos grupos en el día 30, mientras Colditz y cols. (2005) lo aprecian los días 11, 13 y 15.

El porcentaje de basófilos fue prácticamente normal en todos los lotes, si bien cabe reseñar un aumento significativo en el lote 1 los días 14, 17 y 21. Colditz y cols. (2005) también encuentran un aumento del número de basófilos, pero de forma más precoz, entre los días 3 a 15. Que sólo ocurra en el lote 1 este aumento podría estar relacionado la mayor dosis infestante, pero estando dentro de valores considerados normales, y sin más referencias al respecto, esta relación es bastante dudosa.

Los valores de eosinófilos encontrados en el experimento, se hallan cerca del límite superior de la forma leucocitaria de Ramírez (2006). Llama la atención que alrededor del día 21 se produzca un pico de eosinófilos en el lote 1 (significativo respecto al resto de grupos) que concuerda con el aumento observado en miasis humanas (Tuygun y cols., 2009). En general, se observa que los eosinófilos tendieron a descender durante el experimento, lo que concuerda con lo que ocurre en el estudio de Colditz y cols. (2005), pero al menos en nuestro estudio no cabe asociar este descenso a la presencia de las larvas, ya que ocurrió de forma similar en los grupos controles.

El porcentaje de linfocitos en la fórmula leucocitaria fue inferior en todos los lotes al observado por Ramírez (2006) en ovinos sanos, si bien, en cuanto a su número absoluto, los valores se encuentra en torno al margen inferior de los valores normales según Pugh (2005). En cuanto a la evolución temporal, debemos reseñar una tendencia a disminuir el porcentaje de linfocitos, especialmente en el lote 1. Sin embargo, nose han encontrado referencias a que las miasis puedan producir linfopenia.

Finalmente, los monocitos se mantuvieron en porcentajes normales, excepto en el lote 1, a partir del día 21 del experimento. Esto no está descrito en otros estudios, pero pudo ser debido a una respuesta inflamatoria tardía más intensa, ya que se produce en el lote con mayor número de larvas.

La densidad de plaquetas mostró una tendencia significativa al aumento a partir del día 7 en todos los lotes con lesiones de piel, es decir en todos excepto en el lote 3, y por tanto podría estar ligado a la estimulación de la herida y la realización de las biopsias. Las diferencias entre los lotes con larvas en este caso son difíciles de explicar, salvo considerando que, pese a ellas, los parámetros de plaquetas se encontraron dentro del rango normal determinado para el ganado ovino por Meyer y Harvey (2004).

### **6.3. Resultados histológicos.**

En cuanto a los hallazgos histológicos, cabía esperar que las larvas agravaran la lesión dérmica inicial, y que esta gravedad estuviera en relación con la dosis inicial, pero los resultados encontrados, en general, no apoyan esta suposición.

En el grupo control con herida (lote 3b), se observó un menor número de bacterias inicial y un proceso de cicatrización normal, aunque con una cierta cantidad de infiltrado a las 2 semanas.

En cambio, en el lote infectado con menor dosis de L3 (lote 1), se observa inicialmente extensas zonas de necrosis en la lesión, con gran cantidad de bacterias e infiltrado inflamatorio en las tres capas de la piel (con fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, algunos eosinófilos y abundantes neutrófilos) y acaba, sin embargo, con una disminución considerable de la zona ulcerada y con la necrosis, así como la práctica desaparición de elementos bacterianos, reducción del infiltrado inflamatorio, generalmente circunscrito a la dermis y desaparición de las hemorragias.

La evolución en el lote 2 fue similar al anterior, y aunque parte con una mayor extensión de la úlcera, de la necrosis y de las hemorragias que podemos achacar al mayor número de larvas inicial, sin embargo, el grado de restauración de la piel a las dos semanas es mayor. Esto podría deberse a que la mayor cantidad de L1 han podido causar un desbridamiento más efectivo del tejido necrótico, y simultáneamente un efecto multitudinario, limitando el crecimiento y supervivencia posterior, cuando potencialmente puede ser más dañinas, dado el considerable tamaño que puede alcanzar respecto a la L1, lo que también podría haber propiciado una curación más rápida.

En general, esta evolución no encaja con las observaciones en miasis naturales de Pereira y cols. (2001), Leite y cols. (2011) y Oryan y Bahrami (2012) que encuentran sobre todo bacterias, gran cantidad de necrosis e infiltrado inflamatorio en estadios más avanzados, sobre el día 12-15 p.i., por lo que conviene analizar con mayor detenimiento los distintos aspectos histológicos, comparando tanto los grupos experimentales como lo observado en miasis naturales.

El nivel de exudado de las heridas parece estar claramente relacionado con la cantidad de larvas que se desarrollaron en la lesión a lo largo del experimento. Aunque el día posterior a la formación de la herida el exudado fue evidente en todos los lotes, en ausencia de larvas, éste se redujo rápidamente, mientras en el lote 1, en el que se desarrollaron más larvas, se produjo un exudado mayor que en el lote 2. Una posible explicación podría ser la reacción inflamatoria que provocó la contaminación bacteriana, sin embargo, nuestros resultados no apoyan estas hipótesis, sino la contraria.

En nuestro estudio se encontraron bacterias sobre todo en los lotes infestados al 4 d.p.i, pero su presencia fue prácticamente nula en todos los grupos al 14 d.p.i, Una posible explicación es la presencia de las proteasas que producen las larvas (Valachova y cols., 2014) o que éstas puedan alimentarse directamente de las bacterias,

reduciendo así su número (Whitaker y cols., 2007). Sin embargo, Pereira y cols. (2001) encuentran abundantes bacterias desde los 4 a 14 d.p.i, por lo que posiblemente la carga bacteriana final esté muy influenciada por otros factores físicos y biológicos.

Tampoco el nivel de exudado parece estar relacionado con el nivel de necrosis, que se hizo prácticamente nulo al 14 d.p.i. Esto contrasta bastante con lo observado en otros estudios, que mencionan un mayor nivel de necrosis a partir del estadio de L3 (Oryan y Bahrami, 2012), a partir del 12 d.p.i (Pereira y cols., 2001) o del 15 d.p.i (Leite y cols., 2011). El grado de ulceración siguió una evolución muy similar a la necrosis, siendo más elevado al 4 d.p.i, mientras que en otros estudios como el de Oryan y Bahrami (2012) lo es a partir del estadio de L3. La afección de capas dérmicas, en contra de lo que ocurre en miasis naturales, donde la afección de todas las capas no se producía hasta la ecdisis de L2 a L3 (Oryan y Bahrami, 2012). En nuestro estudio, la afección de las capas es máxima en el 4 d.p.i, siendo mayor en las capas externa e interna en los lotes experimentales.

Esto probablemente es debido a la acción mecánica de las larvas, sin embargo, al 14 d.p.i solo permanece afectada la capa media en todos ellos, pudiendo estar esto relacionado con una regeneración más lenta de esta capa. Esta discrepancia puede ser debida a que dichos estudios observan el desarrollo de miasis naturales, en el que las larvas inician el daño tisular, mientras en nuestro ensayo las larvas accedían a una lesión previa ya formada manualmente y con disponibilidad inmediata para su alimentación, iniciando en ese mismo momento el desbridamiento del tejido, y por tanto, promoviendo el proceso de regeneración, en cierta medida comparable a la que ocurre cuando se utilizan larvas estériles en biocirugía para la eliminación del tejido necrótico en heridas de difícil curación (Church, 1995). En el lote 2, con una carga parasitaria inicial más elevada, pero con menor desarrollo posterior, la desaparición de la necrosis fue total, mientras el lote 1, con un menor número de larvas inicial, pero con mejor grado de supervivencia, persistía cierto grado de necrosis en algunos animales. Esto sugiere que el posible efecto de limpieza podría estar más relacionado con la fase de L1, mientras que las L3 seguramente no tienen esta función o incluso pueden tener un efecto mecánico adverso sobre la herida. La reducción de la ulceración también pudo estar relacionado con la liberación de promotores del crecimiento por parte de las larvas, que pudieron estimular la regeneración de la herida (Prete, 1997).

Al analizar la cantidad de infiltrado, vemos que sigue una tendencia similar a la que describen los estudios de Oryan y Bahrami (2012), de Pereira y cols. (2001) o de Leite y cols. (2011), en los que como en nuestro caso, se produce una gran cantidad de infiltrados los primeros días del estudio, que posteriormente se reduce a partir

del día 12–14. Esto parece más relacionado con la respuesta del organismo al trauma inicial, aunque sin duda la presencia de larvas estimula en gran medida la formación del exudado, como se ha visto. Pese a esto, en el 14 d.p.i prácticamente no hubo diferencias en los lotes experimentales, por lo es razonable pensar que, salvo quizás en los momentos iniciales, las larvas estimularon de forma marcada la presencia de un infiltrado inflamatorio.

El lote 2 mostró el mayor número de macrófagos en todos sus animales al 4 d.p.i, siendo esto comparable observado en los estudios de Oryan y Bahrami (2012), de Pereira y cols. (2001) o de Leite y cols. (2011), además persisten al 14 d.p.i en menor número coincidiendo con lo que describen Cabanelas y cols. (2015) para Hypoderma.

Esto sugiere que la presencia de estas células se estimuló con una carga larvaria elevada. No obstante, las células plasmáticas y linfocitos se encontraron en el total de animales de los tres lotes en ambos días. Esto concuerda con estudios de Oryan y Bahrami (2012), de Pereira y cols. (2001), de Leite y cols. (2011) o de Cabanelas y cols. (2015) respecto a la presencia de linfocitos. Sin embargo, estos estudios encuentran células plasmáticas sólo en fases tempranas (Oryan y Bahrami, 2012; Cabanelas y cols., 2015) o muy tardías (Pereira y cols., 2001). De todas formas, no podemos establecer ninguna relación con la presencia de larvas, ya que se encontraron también en todos los animales del lote control.

La presencia de larvas, sin embargo, sí parece estimular la presencia de eosinófilos, que aparecieron en el lote 2 ya a los 4 d.p.i, y en menor número en ambos grupos infestados en el 14 d.p.i. Un aumento de estas células en torno al 12 d.p.i también se ha observado en los trabajos de Oryan y Bahrami (2012), de Pereira y cols. (2001) o de Leite y cols. (2011). En nuestro caso, al ser más precoz e intensa con un mayor número de larvas, sugiere que el estímulo es dosis-dependiente. Gran cantidad de eosinófilos también se han encontrado en la oestrosis (Tabouret y cols., 2003).

Ocurre otro tanto con los mastocitos. De forma similar al estudio de Pereira y cols. (2001), que detectan estas células sobre todo a partir del día 12, en el lote 1 aumentan tardíamente, pero en el lote 2 se detectaron antes, posiblemente debido al mayor número de larvas inoculadas.

Los neutrófilos siguen una evolución parecida, aunque al 4 d.p.i su porcentaje fue bajo incluso en el lote 2, lo que discrepa con todos los estudios antes citados (Pereira y cols., 2001; Leite y cols., 2011; Oryan y Bahrami, 2012) que encuentran que los neutrófilos son unas de las primeras células en aparecer en la lesión, quizás a consecuencia de miasis más traumáticas.

La presencia de fibroblastos se encontró en gran medida en todos los grupos con lesión a partir del día 4, indicando que la regeneración tisular comienza desde fases tempranas. Esto concuerda con el trabajo de Oryan y Bahrami (2012) que encuentran fibroblastos ya en el cambio de L1 a L2, aunque otros como Pereira y cols. (2001) o de Leite y cols. (2011) solo los observan a partir del 8 d.p.i.

Al margen de los hallazgos sobre el infiltrado inflamatorio, cabe mencionar que la afección de los folículos pilosos ya al 4 d.p.i no fue relevante, dado que se observó también en las heridas del lote control, pero a los 14 días sólo persistía en los ovinos parasitados. Esto concuerda parcialmente con los estudios de Oryan y Bahrami (2012), que sólo detectan esta lesión en fases tardías de la infestación. Otro tanto ocurre con la presencia de hemorragias, que encontramos principalmente al inicio del experimento en todos los lotes y, por tanto, no cabe relacionarlas con la actividad larvaria, pero fueron mayores en el lote 1 al 14 d.p.i, donde al final se encontraban más larvas, por lo que podrían relacionarse las erosiones causadas por las L3, como ya indicaban Oryan y Bahrami (2012), con hemorragias en etapas tardías y Pereira y cols. (2001), que aprecian esta lesión al 8 d.p.i.

Finalmente, entre los artículos que se han consultado, solo se relata cierto daño muscular en el de Oryan y Bahrami (2012) en etapas tempranas. En nuestros resultados, este daño fue común en todos los animales con lesión, incluidos el lote control, por lo que no cabe atribuirlo a la presencia de larvas. En cambio, es llamativo que este daño persistía al 14 d.p.i solo en dicho lote control, pero no en los animales con larvas, lo que podría sugerir que éstas tienen un cierto efecto regenerador sobre la herida.

En suma, observamos en varios aspectos que los efectos de la parasitación larvaria no son totalmente negativos. Esta reducida patogenicidad pudo ser debida al origen de nuestras larvas de *P. terraenovae*, adquiridas comercialmente de una tienda de pesca, que pudieron tener ligeras diferencias genéticas con las del norte de Europa, algo que puede afectar a su capacidad como productoras de miasis, como ya describen Martínez-Sánchez y cols. (2007) para *L. sericata*. Además, hay numerosas referencias históricas sobre la creencia de que las larvas de moscas pueden ayudar a la recuperación de heridas. Estas observaciones empíricas, especialmente de cirujanos que atendían heridas de guerra, fueron la base para el desarrollo de la actual terapia larvaria, basada en que el desbridamiento del material necrótico y la actividad antibacteriana que ejercen las larvas puede ayudar en la cicatrización de ciertas heridas. Sin embargo, en sus inicios, el empleo de larvas no estériles podía tener consecuencias tan graves como el tétanos y en el ámbito veterinario, especialmente con el ganado ovino, no es posible olvidar el efecto devastador que las miasis cutáneas pueden tener

a partir de heridas que de otro modo carecerían de mayor importancia. En general, los resultados de la miasis experimental de la presente memoria, sin causar alteraciones sistémicas de importancia, y alteraciones locales variables, parecen ser un reflejo de esta ambivalencia de las miasis.

Esto sin duda dificulta la comprensión de este proceso parasitario, pobremente estudiado. Un mejor entendimiento de los efectos destructivos y regeneradores de las larvas es importante, ya que podría conducirnos tanto a nuevos enfoques en el tratamiento y control de las miasis, como al desarrollo de la larvoterapia, y la terapia regenerativa.

## 7. CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio posibilita las siguientes conclusiones:

1. La infestación experimental cutánea de ovinos con L1 de *Protophormia terraenovae* procedentes del asticot para la pesca deportiva, no desencadenó alteraciones significativas ni a nivel hematológico ni de daño tisular. Por tanto, puede confirmarse que estas larvas a priori no tienen la capacidad de provocar miasis traumáticas en las condiciones controladas del estudio.
2. La acción de las L1 de *Protophormia terraenovae* en las lesiones durante la infestación experimental, provocaron una rápida eliminación bacteriana y de tejido necrótico, por lo que podrían ser utilizadas en terapia larvaria controlada, tras su esterilización y control.
3. Pese a que *Protophormia terraenovae* no produce una lesión miásica traumática en las condiciones experimentales de nuestro estudio, no podemos descartar que esta especie sea capaz de producir miasis en condiciones naturales en Extremadura, ya que ha sido descrita como productora de esta patología en países de norte y centro de Europa.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Blanco-Ciudad, J. (2017). Distribución de dípteros vectores en el suroeste español y consecuencias sanitarias debido a especies productoras de miasis invasoras y autóctonas. Universidad de Extremadura.
- Cabanelas, E., Panadero, R., Fuertes, M., y cols. (2015). Histological and immunohistochemical characterization of *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae) warbles. *Veterinary Parasitology* 212, 361–367. doi:10.1016/j.vetpar.2015.06.017.

- Church, J. (1995). Larvatherapy: biosurgery. *European Tissue Repair Society Bulletin* 2, 109–110.
- Colditz, I. G., Walkden-Brown, S. W., Daly, B. L. y Crook, B. J. (2005). Some physiological responses associated with reduced. *Australian veterinary journal* 83, 695–699.
- Eisemann, C. H., Johnston, L. A. Y., Broadmeadow, M., y cols., (1990). Acquired resistance of sheep to larvae of *Lucilia cuprina*, assessed in vivo and in vitro. *International journal for parasitology* 20, 299–305. doi:10.1016/0020-7519(90)90143-B.
- Erzincinoglu, Y. Z. (1988). The morphology of the egg of the bird-parasite *Protocalliphora azurea* (Diptera: Calliphoridae). *Medical and veterinary entomology* 2, 95–97.
- Farkas, R. y Hall, M. J. (1998). Prevalence of traumatic myiasis in Hungary: a questionnaire survey of veterinarians. *The Veterinary record* 143, 440–443.
- Figarola, J. L., Skoda, S. R., Berkebile, D. R. y Foster, J. E. (2001). Identification of screwworms, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), with a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (MAB-ELISA). *Veterinary Parasitology* 102, 341–354. doi:10.1016/S0304-4017(01)00538-6.
- González-Mora, D. y Peris, S. V (1988). Los Calliphoridae de España: I: Rhiniinae y Chrysomyinae (Díptera). *Eos (Revista Española de Entomología)* 64, 91–139.
- Grassberger, M. y Frank, C. (2004). Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *Journal of Medical Entomology* 41, 511–523.
- Grassberger, M. y Reiter, C. (2002). Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 128, 177–182. doi:10.1016/S0379-0738(02)00199-8.
- Gregor, F. y Povolny, D. (1961). Resultate stationärer Untersuchungen von synanthropen Fliegen in der Umgebung einer Ortschaft in der Ostslowakei. *Zoologica Listy* 10, 17–24.
- Grindle, J. (2001). Economic assessment of the screw-worm fly problem in Malaysia. IEAE-TCR-00526 International Atomic Energy Agency Technical Report.
- Habela, M., Sevilla, R.G. y Peña, J. (2001). Principales miasis que afectan al ganado ovino. *Mundo Ganadero*.
- Hobischak, N. R., VanLaerhoven, S. L. y Anderson, G. S. (2006). Successional patterns of diversity in insect fauna on carrion in sun and shade in the Boreal Forest Region of Canada near Edmonton, Alberta. *Canadian Entomologist* 138, 376–383.
- Hope, F. (1840). On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 2, 256–271.
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Johnston, L. A. Y., Eisemann, C. H., Donaldson, R. A., Pearson, R. D. y Vuocolo, T. (1992). Retarded growth of *Lucilia cuprina* larvae on sheep and their sera following production of an immune response. *International journal for parasitology* 22, 187–193. doi:10.1016/0020-7519(92)90100-Y.
- Leite, A. C. R., Nascimento, M. F. a, Leite, L. H. R. y Leite, V. H. R. (2011). Histopathology of experimental myiasis in mice as a result of infestation and experimental implantation of *Dermatobia hominis* larvae. *Journal of Medical Entomology* 48, 680–686. doi:10.1603/ME10237.
- Martínez-Sánchez, A. I., Smith, K. E., Rojo, S., Marcos García, M. Á. y Wall, R. (2007). Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blow fly, *Lucilia sericata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122, 93–98. doi:10.1111/j.1570-7458.2006.00497.x.
- Martínez-Sánchez, A. Magaña, C., Toniolo, M., Gobbi, P. y Rojo, S. (2015). *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera, Calliphoridae) a new forensic indicator to South-western Europe. *Ciencia Forense* 12, 141–156.
- Matsuo, J., Nakayama, S. y Numata, H. (1997). Role of the Corpus Allatum in the Control of Adult Diapause in the Blow Fly, *Protophormia terraenovae*. *Journal of insect physiology* 43, 211–216.

- Mavárez-Cardozo, M. G., Espiona de Ferreira, A. I., Barrios-Ferrer, F. A. y Ferreira-Paz, J. L. (2005). The Forensic Entomology and the Neotropic. Cuadernos de Medicina Forense 11, 23–33.
- Meyer, D. J. y Harvey, J. W. (2004). Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis. 2nd ed. Saunders, Philadelphia.
- Morris, O. y Titchener, R. (1997). Blowfly species composition in sheep myiasis in Scotland. Medical and veterinary entomology 11, 253–256.
- Nuorteva, P. (1971). Annoying mass occurrence of *Phormia terraenovae* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) in the surroundings of a rendering plant in southwestern Finland. Annales Zoologici Fennici 8, 336–339.
- Oryan, a. y Bahrami, S. (2012). Pathology of natural *Przhevalskiana silenus* infestation in goats. Tropical Biomedicine 29, 524–531.
- Pereira, M. C. T., Leite, V. H. R. y Leite, a. C. R. (2001). Experimental skin lesions from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. Medical and veterinary entomology 15, 22–27. doi:10.1046/j.1365-2915.2001.00273.x.
- Porcel-Carreño, S. L. (2007). Estudio descriptivo de alergia a larvas de Calliphoridae y lombriz de tierra en pescadores de Cáceres. Identificación de especies y caracterización alérgica. Universidad de Alcalá. Tesis doctoral.
- Porcel-Carreño, S., de la Losa, F. P., Carrión, E. F., y cols. (2009). *Protophormia terraenovae*. A new allergenic species in amateur fishermen of Cáceres, Spain. Allergologia et immunopathologia 37, 68–72.
- Porcel-Carreño, S. L., Pineda de la Losa, F., Frontera-Carrión, E. M., y cols. (2013). Allergen profile of *Protophormia terraenovae*, other species of calliphoridae, and *Lumbricus terrestris* in anglers allergic to maggots in Cáceres, Spain. Journal of investigational allergology & clinical immunology 23, 176–182.
- Prete, P. E. (1997). Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. Life sciences 60, 505–510.
- Pugh, D. (2005). Clínica de ovinos e caprinos. Roca. Sao Paolo.
- Ramírez, L. (2006). Los leucocitos en mamíferos domesticos. Mundo Pecuario 2, 37–39.
- Rivers, D. B., Yoder, J. a., Jajack, A. J. y Rosselot, A. E. (2013). Water balance characteristics of pupae developing in different size maggot masses from six species of forensically important flies. Journal of insect physiology 59, 552–559. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.03.002.
- Rognes, K. (1991). Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomológica Escandinavica 24, 1–272.
- Ruiz-Martínez, I. y Cruz-Mira, M. (1994). Biogeografía de la mosca *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) en el Sur de España (Diptera: Sarcophagidae). Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. 91, 123–128.
- Ruiz-Martínez, I., Soler-Cruz, M. D., Benítez-Rodríguez, R., y cols. (1987). Myiasis caused by *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) (Diptera: Sarcophagidae) in Southern Spain. Israel Journal of Veterinary Medicine 43, 34–42.
- Ruiz-Martínez, I., Soler-Cruz, M. D., Díaz-López, M., Pérez-Jiménez, J. y Cruz-Mira, M. (1992). Classification of the wohlfahrtioses affecting sheep and goats in southern Spain. Investigación Agraria y Producción Animal 7, 31–45.
- Ruiz-Martínez, I., Pérez-Jiménez, J. M. y Cruz-Mira, M. (1993). Epidemiology of wohlfahrtiosis in sheep and goats. Investigación Agraria y Producción Animal 8, 299–311.
- Sandeman, R. M., Dowse, C. a y Carnegie, P. R. (1985). Initial characterisation of the sheep immune response to infections of *Lucilia cuprina*. International journal for parasitology 15, 181–185. doi:10.1016/0020-7519(85)90085-2.

- Sandeman, R. M., Bowles, V. M., Stacey, I. N. y Carnegie, P. R. (1986). Acquired resistance in sheep to infection with larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *International journal for parasitology* 16, 69–75. doi:10.1016/0020-7519(86)90067-6.
- Sandeman, R. M., Chandler, R. A., Collins, B. J. y O'Meara, T. J. (1992). Hypersensitivity responses and repeated infections with *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *International journal for parasitology* 22, 1175–1177. doi:10.1016/0020-7519(92)90038-M.
- Sandeman, R. M., Chandler, R. A., Turner, N. y Seaton, D. S. (1995). Antibody degradation in wound exudates from blowfly infections on sheep. *International journal for parasitology* 25, 621–8.
- Shiga, S. (2007). Photoperiodic control of reproduction in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148, 341. doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.029.
- Singh, P. y Jerram, E. (1976). Rearing housefly larvae in polythene bags. *New Zealand Journal of Zoology* 3, 57–58.
- Smith, K. G. V (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. (ed. London, B. M. (Natural H. of) Cornell Universitu Press, Ithaca, NY.
- Smith, K. E. y Wall, R. (1997). Asymmetric competition between larvae of the blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* in carrion. *Ecological Entomology* 22, 468–474. doi:10.1046/j.1365-2311.1997.00093.x.
- Suárez, J. L., Scala, A., Romero, J. A., Paz-Silva, A., y cols. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology* 134, 153–8. doi:10.1016/j.ve-tpar.2005.06.009.
- Tabouret, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., y cols. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research* 34, 231–241. doi:10.1051/vetres:2002070.
- Tellam, R. L., Eisemann, C. H. y Pearson, R. D. (1994). Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae. *International journal for parasitology* 24, 757–764.
- Thomas, D. B. y Pruett, J. H. (1992). Kinetic development and decline of antiscrewworm (Diptera: Calliphoridae) antibodies in serum of infested sheep. *Journal of Medical Entomology* 29, 870–873.
- Tuygun, N., Taylan-Ozkan, A., Tanir, G. y Mumcuoğlu, K. Y. (2009). Furuncular myiasis in a child caused by *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) associated with eosinophilia. *The Turkish journal of pediatrics* 51, 279–281.
- Valachova, I., Majtan, T., Takac, P. y Majtan, J. (2014). Identification and characterisation of different proteases in *Lucilia sericata* medicinal maggots involved in maggot debridement therapy. *Journal of Applied Biomedicine* 12, 171–177. doi:10.1016/j.jab.2014.01.001.
- Whitaker, I. S., Twine, C., Whitaker, M. J., y cols. (2007). Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgraduate medical journal* 83, 409–413. doi:10.1136/pgmj.2006.055905.
- Zumpt, F. (1965). *Myiasis in man and animals in the old world: a Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists*. Butterworths, London.