

61674

37

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION ANIMAL Y DE LA SALUD ANIMAL

IDENTIFICACION DE POBLACIONES DE *Haemonchus contortus* RESISTENTES A BENICIMIDAZOLES EN OVINOS DE MEXICO POR MEDIO DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
BEATRIZ SALAS GARCIA

TUTOR:
DR. RUBEN DANILO MENDEZ MEDINA

COMITE TUTORAL:
DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
DR. JULIO V. FIGUEROA MILLAN



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: BEATRIZ SALAS GARCIA

FECHA: 02/03/2003

FIRMA: [Firma]

MEXICO, D. F.

MARZO DE 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

A Dios

A María del Consuelo y Roberto
Mis padres.

Por su amor, comprensión, respeto y apoyo.
Los amo, admiro y respeto, gracias por todo.

A Mónica y Oscar.
Mis hermanos.

De haber tenido la oportunidad,
no podría haber elegido
mejores personas para compartir y disfrutar la vida.
Los quiero mucho.

A "Doña José".
Abuelita, te quiero mucho.

A Zorra, Misho, Joshua, Uris, Memo, Max, Güero, Beto, Ana y Pepe.

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A los tutores de esta tesis, por su apoyo y paciencia en todo momento.

A los Doctores que formaron parte del Jurado, Rogelio Alonso, Julio Figueroa, David Herrera, Víctor Vázquez y Danilo Méndez.

A los profesores de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. que colaboraron en mi formación profesional.

A todos aquellos animales que dieron su vida para que yo pudiera aprender, espero que no haya sido en vano.

A Amanda Gayosso por el apoyo profesional y personal para la realización de esta tesis. Mil gracias.

A Refugio, Vero, Mario, Espiri, Toño, Amanda, Noe y todos los que estuvieron por alguna temporada en el laboratorio de Genética y Biología Molecular, por hacer ese tiempo en laboratorio tan agradable, aún cuando en ocasiones las sesiones eran largas.

A mis compañeros del Departamento de Parasitología, gracias por su apoyo, los extraño, no imaginan cuanto.

A Bety, Kenia, Manuel, Chava y Dina mil gracias por su amistad y apoyo incondicional.

INDICE

	Página
Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	4
I.1. Infecciones causadas por <i>Haemonchus contortus</i>	4
I.2. Antihelmínticos disponibles en México	7
I.3. Acción de los Bencimidazoles	9
I.4. Resistencia a los antihelmínticos	10
I.5. Pruebas para el diagnóstico de resistencia	13
III. Justificación	18
IV. Hipótesis	19
V. Objetivos	20
VI. Material y métodos	21
V.1 Procedimiento general	21
V.2 Material biológico	22
V.3 Estrategia para el uso de iniciadores	25
VII. Resultados	26
VI.1 Cuadro 1. Tabla general de muestreo (Individuos adultos de <i>H. contortus</i>)	28
VI.2 Cuadro 2. Tabla general de muestreo (Muestras de materia fecal)	29
VI.3 Cuadro 3. Resultados de las muestras de adultos de <i>H. contortus</i> de origen ovino	30
VI.4 Cuadro 4. Resultados de las muestras de larvas de Nematodos gastrointestinales de origen ovino	31
VI.5 Cuadro 5. Resultados de las muestras de huevos de Nematodos gastrointestinales de origen ovino	32
VI.6 Bandas observadas en geles de agarosa al 3%. <i>H. contortus</i> heterocigóticos	33
VI.7 Bandas observadas en geles de agarosa al 3%. <i>H. contortus</i> homocigóticos resistentes	34
VI.8 Bandas observadas en geles de agarosa al 3%. <i>H. contortus</i> homocigóticos susceptibles	35
VIII. Discusión y conclusiones	36
IX. Literatura consultada	39

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE IMÁGENES Y ANEXOS

	Página
Imágenes	
1. Adultos de <i>H. contortus</i> en abomaso	44
2. Adultos de <i>H. contortus</i>	45
3. Extremo anterior de <i>H. contortus</i>	46
4. Proceso vulvar de la hembra de <i>H. contortus</i>	47
5. Ovarios enrollados en el tubo digestivo la hembra de <i>H. contortus</i>	48
6. Bolsa copulatoria del macho de <i>H. contortus</i>	49
7. Huevo de nematodo gastrointestinal	50
8. Tercer estadio larvario de <i>Haemonchus contortus</i>	51
Anexos	
A. Extracción de DNA por la técnica de tejidos	52
B. Obtención y concentración de huevos de nematodos Gastrointestinales	54
C. Extracción de DNA por la técnica de extracto crudo	55
D. Técnica de cultivo para obtención del tercer estadio larvario	57
E. Técnica de migración larvaria	58
F. Modificación de la técnica de lavado de larvas III	59
G.1 Uso de iniciadores Ph1 y Ph2	61
G.2 Uso de iniciadores Ph1 y Ph4	62
G.3 Uso de iniciadores Ph2 y Ph3	63
H. Equipo empleado	64

IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE *Haemonchus contortus* RESISTENTES A BENCIMIDAZOLES EN OVINOS DE MÉXICO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Candidato: Beatriz Salas García*, **Tutores:** Rubén Danilo Méndez Medina*, Rogelio Alejandro Alonso Morales*, Julio Figueroa Millán*.

RESUMEN

Entre los parásitos que afectan a los ovinos encontramos a los nematodos gastrointestinales (NGI), de estos los pertenecientes al género *Haemonchus* son reconocidos como clínicamente importantes por ser capaces de producir anemia, aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades y muerte. La permanencia de esta nematodosis, se debe principalmente a una incorrecta rotación de praderas y a un inadecuado manejo antiparasitario. Los antihelmínticos empleados en México pertenecen a los siguientes grupos: bencimidazoles (BZ), imidazotiazoles, tetrahidropirimidinas, avermectinas y melbimicinas, siendo los primeros de mayor uso por su relativamente bajo costo. El uso indiscriminado y sistemático de estos compuestos a generado que las poblaciones parasitarias sobrevivientes a las dosis letales desarrollen resistencia, algunas poblaciones parásitas logran desarrollarla a uno o más grupos, en consecuencia el control se dificulta. Existen pruebas enfocadas al diagnóstico de nematodos resistentes a antihelmínticos (*In vitro*, *in vivo* y controladas). Actualmente existen nuevas tecnologías que presentan mayores y mejores alternativas, tal es el caso de la biología molecular, herramienta que provee información acerca del efecto de selección dentro de una población. El objetivo del presente estudio fue poner a prueba la técnica de reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR), que nos permite detectar la presencia del alelo que confiere resistencia a los BZ, la variación se localiza dentro del isótipo 1 del gen β tubulina donde el aminoácido 200 muta de fenilalanina a tirosina. Esta técnica se realizó empleando 3 pares de iniciadores; con Ph1 y Ph2 se obtuvo un fragmento de 750 pb, no específico de resistencia o susceptibilidad, pero exclusivo de *H. contortus*, el par Ph2 y Ph3 originó un fragmento de 250 pb, específico del alelo que confiere resistencia a los BZ y con Ph1 y Ph4 se obtuvo un fragmento de 550 pb, específico del alelo de susceptibilidad a los BZ. La técnica se realizó en diversas poblaciones parasitarias con individuos de *H. contortus* en estadio adulto, larvario y huevo. El 43.19% de las muestras de huevos de NGI evaluadas fue homocigótico susceptible (HS), el 15.90% heterocigótico (HE) y el 40.91% homocigótico resistente (HR). El 36% de las larvas en tercer estadio fue HS, el 16% HE y el 48% HR, el 25% de adultos fue HS y el 75% HR. La dominancia esta dada por los alelos resistentes, por lo que los individuos heterocigóticos, se manifiestan como resistentes en una población parasitaria.

Palabras clave: *Haemonchus contortus*, resistencia a bencimidazoles, PCR, ovinos.

* Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

* Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Genética y Bioestadística de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M.

* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID – Parasitología Veterinaria.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades parasitarias que afectan a los ovinos encontramos la provocada por *Haemonchus contortus*, este parásito es hematófago, por lo que, los animales infectados desarrollan anemia, el grado de la misma depende de la cantidad de parásitos presentes en el abomaso del individuo afectado.⁸

Las pérdidas causadas por las parasitosis representan solo parte del impacto económico total de la enfermedad en la producción animal. Una porción significativa de estas pérdidas, esta dada por la inversión en medidas de control antihelmíntico. El fracaso con el uso de antihelmínticos presenta gran repercusión económica, donde las poblaciones parásitas han logrado sobrevivir a las dosis letales de los antihelmínticos empleados. Por tanto, para llevar a cabo buen un programa de control parasitario es necesario establecer estrategias que minimicen el desarrollo de resistencia a los fármacos incluyendo el uso de los mismos con dosis adecuadas y con administración rotativa.³¹ Para evitar el desarrollo de resistencia, al realizar la rotación de desparasitante, debe considerarse el grupo químico al que pertenecen.²¹

Los antihelmínticos comercializados en México pertenecen a los siguientes grupos: bencimidazoles (BZ), imidazotiazoles, tetrahidropirimidinas, avermectinas y melbimicinas.²¹ de estas sustancias, la mas comúnmente empleada por los productores debido a su bajo costo son las del grupo de los BZ, la eficacia deeste compuesto ha sido evaluada en diversas nematodosis en ovinos, pero se ha detectado que *H. contortus* ha desarrollado resistencia a este fármaco.^{11,33}

El desarrollo de resistencia a los BZ por parte de los nematodos se ha relacionado con la subdosificación del antihelmíntico en los animales infectados. Su pobre o nula eficacia es principalmente observada en parásitos adultos, donde se detectó inhibición de la polimerización de microtúbulos.^{19,20}

Existen pruebas enfocadas al diagnóstico de nematodos resistentes a desparasitantes, estas son las pruebas "In Vivo", las "In Vitro" y las controladas. Estos métodos no detectan la resistencia hasta que se encuentra establecida en mas del 25% de la población y solo han sido realizados en un estadio evolutivo del nematodo.³²

Se han adaptado técnicas basadas en biología molecular para el diagnóstico de resistencia a BZ. El método mas recientemente empleado para la detección de resistencia a este compuesto incluye el análisis de la mutación del aminoácido 200 del isotipo 1 del gen β -tubulina. En *H. contortus*, se detectaron modificaciones en varios aminoácidos entre los individuos resistentes y susceptibles a BZ en el isotipo 1 de β -tubulina, el cambio en la posición 200 (fenilalanina en susceptibles por tirosina en resistentes) es una de las diferencias constantemente presentes entre el gen β -tubulina confiriendo resistencia o susceptibilidad dependiendo del aminoácido presente.¹⁸

La técnica propuesta por Silvestre et al, Reacción en cadena de la polimerasa alelo especifica (AS-PCR), sugiere la realización del diagnóstico de la resistencia a BZ a partir del análisis de la mutación del aminoácido 200 del isotipo 1 del gen β -tubulina, en larvas en tercer estadio.³⁴ En este trabajo se hicieron adecuaciones a la técnica de AS-PCR propuesta por Silvestre, realizando el diagnóstico de resistencia en varias poblaciones de *H. contortus* y con diferentes estadios de desarrollo (huevo, larva III y adulto). Ofreciendo así una técnica alternativa para el diagnóstico de resistencia a BZ, de forma más rápida y en cualquier estadio evolutivo del parásito.

II. ANTECEDENTES

Las enfermedades parasitarias son afecciones con amplia distribución geográfica debido principalmente a las características propias de los parásitos de adaptarse a diferentes regiones climatológicas y a diferentes tipos de explotación.³⁵

Dentro de las enfermedades parasitarias que afectan a los rumiantes encontramos las provocadas por nematodos gastrointestinales manifestadas principalmente por una alteración en la ingesta y absorción de nutrientes; degradación de proteína, grasa y minerales, produciendo anemia, lo cual afecta la capacidad productiva, reproductiva e inmunitaria de los animales afectados.
10

Los principales nematodos gastrointestinales que afectan a los rumiantes domésticos son los siguientes: en el abomaso; *Haemonchus* spp, *Ostertagia* spp y *Trichostrongylus* spp. En el intestino delgado; *Cooperia* spp, *Nematodirus* spp, *Bunostomum* spp, *Trichostrongylus* spp, *Strongyloides* sp, y en el intestino grueso; *Oesophagostomum* spp, *Chabertia* sp y *Trichuris* sp.^{8, 36}

II.1 Infecciones causadas por *Haemonchus contortus*

El género *Haemonchus* esta constituido por varias especies de las cuales *H. placei* y *H. contortus* son las más comunes en los rumiantes, de estas *H. contortus* es considerada como la más importante por presentarse tanto en ovinos como en bovinos. Este género es diagnosticado por la presencia de huevos en heces, los cuales pueden ser diferenciados por características morfométricas. De manera más precisa el diagnóstico se efectúa por cultivos fecales con la obtención del tercer estadio larvario, las larvas obtenidas son identificadas por características estructurales específicas.¹⁵ La identificación de los parásitos adultos (machos y hembras) se realiza por características morfológicas.^{22, 36, 41}

Uno de los factores más importantes en la epidemiología de la hemoncosis, es la elevación posparto, la cual consiste en un incremento en la excreción fecal de huevos por parte de las ovejas que constituye una fuente importante de contaminación de los pastos, dando como resultado es un aumento en la ingesta de larvas infectantes por los animales.⁶ En condiciones de altiplano esto logra detectarse al iniciar la primavera, lo cual coincide con el crecimiento de los pastos y el destete de los corderos. Esta parasitosis puede cursar con una morbilidad del 100% y mortalidad variable, dependiendo de la capacidad inmunológica del animal afectado.³

H. contortus en estado adulto suele alimentarse varias ocasiones hasta 12 minutos por vez, consumiendo de 0.05 a 0.07 ml / día / parásito,³⁹ después de alimentarse, la hemorragia puede continuar por hasta 7 minutos.³ Relacionando esto con la cantidad de parásitos que pueden encontrarse con los diferentes tipos de infección, encontramos hasta 200,000 parásitos en la masiva y de 100 a 1 000 *H. contortus* en la leve, por lo que, el desarrollo de anemia puede ser variable.⁸

La presentación de signos clínicos esta relacionada con factores del parásito y del huésped. Con respecto al parásito debemos considerar los siguientes aspectos: *H. contortus* es hematófago en estado larvario y en estado adulto, la capacidad ovopositora de las hembras es de 5 000 a 10, 000 huevos / día por lo que la cantidad de huevos y en consecuencia de larvas infectantes presentes en el pasto puede ser elevada en zonas con condiciones climáticas ideales.³

Los aspectos relacionados con el huésped son: Edad, receptividad, estado nutritivo y estado inmunológico.⁶ Los signos clínicos pueden tener dos tipos de manifestación: La forma aguda encontrada más comúnmente en corderos, que consiste en gastroenteritis catarral con diarrea, deshidratación, anemia en grado variable, edema en las zonas ventrales (principalmente submandibular) y disminución en la ganancia de peso.⁶

La forma crónica, más frecuente en adultos se caracteriza por pérdida progresiva del apetito con disminución del peso corporal y anemia, ³ la anemia se acompaña con hipoproteinemia por un marcado descenso en la albúmina. ¹⁴

Las lesiones causadas por *H. contortus* producen una reacción inflamatoria progresiva con hiperemia y aumento en la producción de moco, como resultado de la hemorragia se presentan coágulos y erosión de la mucosa por descamación de las células epiteliales. Microscópicamente, comienza una infiltración con células mononucleares y eosinófilos, con úlceras poco profundas en los bordes de los pliegues abomasales, lo que aumenta el pH abomasal, por disminución en la producción del HCl, lo cual repercute negativamente en la digestión de proteína ya que el pepsinógeno no logra transformarse en pepsina. Esto altera el proceso digestivo y altera el poder bacteriostático del pH bajo, aumentando así el número de bacterias y dando origen a diarrea. ⁶

La disminución en la condición corporal es debida básicamente a la baja ingesta de alimentos y a la reducción en la eficacia de utilización de nutrientes. La síntesis de proteína muscular se encuentra disminuida y el catabolismo aumentado, ¹⁴ el nitrógeno se pierde desde el tejido porque el promedio de la síntesis es menor que la del catabolismo, no se encuentra afectada la capacidad hepática de síntesis proteica. ¹⁰

Una contribución importante a la pérdida de proteína es la salida de plasma al tracto alimentario, donde encontramos principalmente pérdida de albúmina. Otra fuente endógena de pérdida de proteína es el aumento en la producción de moco y la proliferación de células caliciformes como respuesta a la lesión causada por el parásito. ¹⁰

Las pérdidas por parasitismo clínico y subclínico representan solo parte del impacto económico total de la enfermedad parasitaria en la producción animal. Una porción significativa de estas pérdidas, esta dada por la inversión en medidas de control. La administración de antihelmínticos, es la principal medida control, su fracaso tiene importancia económica, donde las condiciones climáticas y las características de explotación extensiva o semi-extensiva

favorecen la elevada incidencia de estas enfermedades, ya sea por las condiciones ambientales o porque las poblaciones parásitas han desarrollado resistencia a los fármacos empleados. Por tanto, para llevar a cabo un programa de control parasitario es necesario establecer estrategias que minimicen el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos incluyendo el uso de los mismos con dosis adecuadas y con administración rotativa.³¹ Al realizar el cambio y la rotación de desparasitantes para evitar el desarrollo de resistencia debe considerarse el grupo químico al que pertenecen, por tanto es necesario conocer el comportamiento farmacológico de las sustancias antihelmínticas.²¹

II.2 Antihelmínticos disponibles en México.

Las sustancias antihelmínticas que están disponibles en la actualidad, corresponden a los siguientes grupos:³⁷

-Bencimidazoles (BZ).- Estos fármacos alteran la estructura microtubular al unirse a la tubulina del nematodo,^{2, 21} favoreciendo la despolimerización y alterando la estructura de los microtúbulos que están involucrados en los procesos vitales para la función celular como el transporte de nutrientes, mitosis y mantenimiento de la arquitectura celular.³¹ Además, actúan modificando el transporte de glucosa hacia el citosol del parásito y la actividad de enzimas mitocondriales como la fumarato reductasa, lo que implica una depresión del parásito y la inhibición en la producción de ATP.¹⁶ Este grupo de desparasitantes esta subdividido en:

-Tiazólicos.- Tiabendazole y cambendazole.

-Metilcarbamatos.- Parbendazole, mebendazole, flubendazole, ciclobendazole, oxibendazole, luxabendazole, albendazole, riconbendazole, fenbendazole y oxibendazole.

-Halogenados.- Triclabendazole.

-Pro-Bencimidazoles.- Tiofanato, febantel y netobimin.

-Imidazotiazoles.- Actúan inhibiendo la fumarato reductasa específicas de actividad neuromuscular en el parásito, induciéndolo a parálisis espástica con contracción muscular rápida y sostenida. ⁵

-Butamisol, tretamisol y levamisol.

-Tetrahidropirimidinas.- Su acción es similar a la producida por los imidazotiazoles, además inhiben la producción de energía a nivel mitocondrial. ^{5, 21}

-Morantel y pirantel.

-Avermectinas.- Actúan sobre la actividad neuromuscular del parásito, como agonistas de receptores neuronales GABAérgicos (mediados GABA ácido γ - amino butírico) que induce a la apertura de canales de cloro, hiperpolarización de membrana y parálisis flácida del helminto. ^{5, 37}

-Ivermectina, abemectina y doramectina.

-Milbemicinas.- Actúan sobre la actividad neuromuscular del parásito, siendo agonistas de receptores neuronales GABA induciendo la apertura de canales de cloro, hiperpolarización de membrana y parálisis flácida del helminto. ^{5, 37}

-Moxidectina.

II.3 Acción de los bencimidazoles

De estas sustancias, la mas comúnmente utilizada por los productores debido a su bajo costo son las del grupo de los BZ. La eficacia de los BZ ha sido evaluada en diversas parasitosis causadas por nematodos gastrointestinales en varias especies animales. El uso y potencia de este antihelmíntico (miligramos por kilogramo de peso vivo) esta basado en estudios *in vivo*, las dosis requeridas para tener eficacia contra nematodos son menores comparando las usadas para el control de cestodos y trematodos.

Como se mencionó anteriormente, el efecto de los BZ en *H. contortus* es en nivel de los microtúbulos, esto es, alterando su estructura al unirse a la tubulina del nematodo favoreciendo la despolimerización.^{2, 21}

Un microtubulo es un organelo tubular con diámetro aproximado de 15 nm con una longitud variable, se encarga del equilibrio metabólico del parásito.⁷ La estabilidad de los microtúbulos depende de la incorporación o extracción de unidades de tubulina solubles, estas variaciones son reguladas por varios factores, tales como la temperatura, ya que entre 30 y 37°C se mantiene un delicado equilibrio entre las incorporaciones y desincorporaciones de estas, la concentración de éstas tubulinas debe mantenerse con poca variación pues su pérdida en gran cantidad interfiere en el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos, de manera general las tubulinas se adhieren a las cadenas de microtúbulos en forma de dímeros formados por alfa y beta tubulinas.¹²

Para apreciar los mecanismos de inhibición de los microtúbulos debemos considerar el equilibrio natural formado por la tubulina y los microtúbulos, considerando que estos están presentes en cada célula eucariótica, debemos tomar en cuenta las funciones en las cuales participan: (I) formación de los centriolos durante la mitosis, (II) mantenimiento de la forma celular, (III) motilidad celular, (IV) secreción celular, (V) absorción de nutrientes y (VI) transporte intracelular.^{7, 20} La asociación intracelular de los microtúbulos y tubulinas incluye muchos organelos como las mitocondrias, aparato de Golgi,

ribosomas, lisosomas, membrana celular y el núcleo. ¹⁶ La estabilidad microtubular depende de una serie de procesos que obedecen directa o indirectamente a cambios fisiológicos o bioquímicos, que resultan con la pérdida de la homeostasis celular. Si estas condiciones de desequilibrio se mantienen constantes por un período prolongado sus efectos son letales, ya que se evidencia la disminución o el paro de divisiones celulares y se detiene el crecimiento celular. ⁷ Los BZ impiden la unión de las alfa y beta tubulinas al microtubulo por lo que pierde su continuidad y la célula no es capaz de desempeñar sus funciones vitales de forma óptima. Aún cuando se sabe que los BZ actúan inhibiendo la formación de microtúbulos, no se ha logrado comprobar si la muerte del parásito es por la disminución de sus procesos vitales o por intoxicación al quedar inhabilitado para desalojar sus excreciones. ¹⁶

II.4 Resistencia a los antihelmínticos

La resistencia se define como: La habilidad de los individuos para sobrevivir a los efectos letales de un químico, lo que resulta en una selección de los mismos produciendo variantes genéticas dentro de la población. El problema radica cuando el número de individuos resistentes dentro de una población particular alcanza niveles muy altos por lo que ocurren fallas en el control con fármacos. ^{30, 43}

Pueden observarse 3 tipos de resistencia: La resistencia lateral, se observa en todos los antihelmínticos que poseen estructura química y modo de acción similar, y es el resultado del desarrollo de resistencia hacia uno de ellos. La resistencia cruzada involucra a grupos de antihelmínticos con diferencias en la estructura química y en el mecanismo de acción y la resistencia múltiple, ocurre cuando los parásitos son resistentes a dos o más grupos de antihelmínticos, por resultado de una selección independiente a cada uno de ellos. ²⁹

La resistencia a los antihelmínticos es una característica que se expresa genéticamente y por lo tanto se hereda a las generaciones siguientes, de forma común antes de la administración de algún antihelmíntico se encuentran individuos resistentes dentro de una población de parásitos. ²⁹

Wood describe a la resistencia como “un problema multidimensional, con propiedades fisiológicas y bioquímicas, que dan como resultado modificaciones genéticas que se heredan a los descendientes. Esta evolución a la resistencia, depende de factores ecológicos y de variación entre especies, poblaciones y localización”. ⁴³

Una forma común de desarrollo de la resistencia es la sobrevivencia de parásitos que tienen contacto con dosis subletales de algún compuesto. El uso continuo de un antihelmíntico elimina paulatinamente a todos los individuos susceptibles que de manera natural se encuentran dentro de una población, por lo que se incrementa de forma considerable el número de parásitos resistentes en las generaciones siguientes. ²⁹

El número de alelos resistentes, la frecuencia, dominancia y la extensión se integra al genoma incrementando la resistencia de manera rápida. La dominancia de alelos resistentes juega un papel importante para el desarrollo de resistencia. El efecto en la frecuencia de selección de alelos resistentes presentes en una población es influenciado por diversos factores, estos han sido clasificados en operacionales (de naturaleza química: frecuencia de aplicación, rotación de químicos y manejo de pastizales), genéticos (frecuencia, dominancia y número de alelos resistentes en una población) y biológicos o ecológicos (cambios generacionales, descendientes por generación, migración y sobrevivencia). ²⁷

Los tratamientos supresivos producen altos niveles de resistencia cuando son aplicados en períodos cortos de tiempo o a dosis bajas. ²⁶

En un modelo genético simple con selección continua del carácter de resistencia, la frecuencia génica se incrementa rápidamente por la tasa de

aumento que no es altamente influenciada por los bajos valores iniciales, pero debe considerarse cuando el efecto es marcado en el tamaño de la población. La baja frecuencia de genes resistentes se debe a que el número de sobrevivientes que se reincorporan a la población después de un tratamiento es baja por lo que la acción es retardada. La dominancia de alelos resistentes, tiene una importante influencia en el desarrollo de la resistencia. Con frecuencias bajas en genes recesivos, la selección es muy lenta porque el gene existe mayormente en los genotipos heterocigóticos.²⁷

El desarrollo de resistencia a los BZ por parte de los nematodos se ha relacionado con la subdosificación del antihelmíntico en animales infectados. La pobre o nula eficacia de los BZ es principalmente observada en parásitos adultos, donde se detectó inhibición de la polimerización de microtúbulos.^{19, 20}

Se han desarrollado técnicas que analizan la estructura genética y el efecto de presión de selección de las poblaciones de nematodos parásitos, una de estas técnicas es la de microsatélites, en donde se han caracterizado 13 microsatélites marcadores para *H. contortus*. La densidad de AC/GT microsatélites uno en 575 Kb que es menor que el de los mamíferos. Aunque en el aislado CG/GT la repetición es imperfecta, la mayoría de los microsatélites manifestó polimorfismo en una o más de las poblaciones y se ha establecido una gran diversidad entre y dentro de las poblaciones. Dos terceras partes de CA/GT microsatélites han tenido un número variable de 128 pb de elementos repetidos, este elemento repetitivo en *H. contortus* es el HcREP1.¹³

Lubega y Prichard, asocian la resistencia a los BZ con la reducción del número total de receptores a estos fármacos en los microtúbulos de tubulina α y β , perdiéndose así el principal medio de acción de este grupo de desparasitantes, esto fue comprobado con oxibendazole, mebendazole, oxfendazole, fenbendazole, albendazole y tiabendazole, comparando poblaciones de *Haemonchus contortus* caracterizadas como resistentes y susceptibles a estos fármacos.²⁴

El papel del gen beta tubulina en la resistencia hacia los BZ ha sido investigado por Lubega et al ²⁵ empleando una cepa susceptible (S) y dos cepas resistentes (Rt y Rc) de *H. contortus*. La cepa Rt fue aislada con base a la resistencia a Tiabendazole, la cepa Rc fue obtenida a partir de la cepa S que fue tratada con cambendazole. Los cDNAs, derivados de la cepa S, codificando 2 isoformas de beta tubulina (beta 12-16 y beta 8-9), alfa tubulina y fosfofructocinasa fue usada y probada por análisis de hibridación de DNA genómico digerido con enzimas de restricción. En el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la diferencia entre estas cepas depende de la enzima empleada. Se confirmó la reducida heterogeneidad entre las poblaciones asociadas con resistencia a BZ.

La dominancia es otorgada por los alelos resistentes, por lo que los alelos recesivos corresponden al carácter de susceptibilidad ²⁹, tomando en cuenta esta característica genética, los individuos heterocigóticos se manifiestan como resistentes en una población parasitaria. Por lo que debemos considerar la proporción y el efecto de ambos alelos en una población parasitaria. La dominancia de alelos resistentes, tiene una importante influencia en el desarrollo de la resistencia. Con frecuencias bajas en genes recesivos, la selección es lenta porque el gene existe mayormente en los genotipos heterocigóticos.

II.5 Pruebas para el diagnóstico de resistencia

Existen pruebas enfocadas al diagnóstico de nematodos resistentes a desparasitantes, estas son las pruebas "*In Vivo*", las "*In Vitro*" y las controladas. La primera se basa en la tasa de reducción del número de huevos en la materia fecal pos tratamiento (vías y dosis recomendadas por el fabricante), monitoreando los cambios en la eliminación de huevos durante el estudio (a los días -7, 0, 7, 14, 21, el efecto residual continua hasta los 42 días postratamiento) se toma en cuenta el porcentaje de efectividad (reducción de

número de huevos), el cual debe ser superior a 95%. En esta técnica es necesario realizar un cultivo fecal pre y pos tratamiento para conocer los géneros presentes en ambas situaciones, estos resultados no se relacionan con las cuentas parasitarias de vermes adultos obtenidos en el tracto gastrointestinal tras el sacrificio de animales elegidos, en esta prueba debe mantenerse un grupo control sin desparasitación.³⁸

La prueba "*In Vitro*" se realiza tras la administración del desparasitante que se esté estudiando (dosis y vías de administración recomendadas por el fabricante), después de transcurridos 10 a 14 días (período prepatente para *H. contortus*), se identifican los animales que eliminen huevos. Se realiza una colecta de materia fecal para obtener huevos, los cuales se ponen en contacto con diferentes concentraciones del antihelmíntico que se empleó en el ensayo durante 20 a 24 hrs a 27 – 30 °C. Se cuantifican los huevos desarrollados, huevos larvados y larvas eclosionadas en cada una de las concentraciones probadas. Se obtiene la dosis letal 50% (concentración media mínima para provocar la muerte en el 50% de los huevos y / o larvas), y se compara con la dosis letal 50% de una cepa susceptible (previamente aislada), obteniéndose así el índice de resistencia, que nos indica el número de veces que tiene que aumentarse la dosis letal 50% de la cepa susceptible para producir los mismos efectos en la cepa en estudio.⁴²

Una modificación de esta técnica se realiza analizándose el desarrollo larvario. En este ensayo se agregan aproximadamente 100 huevos por pozo de una placa de microaglutinación, posteriormente se incorpora a estos una dilución del antihelmíntico en cuestión, se incuba durante 7 días a 26 °C, se adiciona yodo a cada pozo y se contabilizan los huevos y larvas presentes además del estadio alcanzado por las últimas (primero, segundo o tercer estadio), obteniéndose la dosis letal 50%.¹⁹

La evaluación de viabilidad larvaria tras la administración de diversos antihelmínticos del grupo de los BZ puede efectuarse al realizar el ensayo de parálisis larvaria. En este, se analizan de 150 a 300 larvas en tercer estadio

contenidas en pozos a las cuales se les agregan diferentes soluciones de desparasitante. Tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente, se realiza la observación de los pozos, clasificando el contenido de los mismos como "movimiento normal" o "parálisis" (en este caso, no se observa movimiento durante 5 segundos) y se obtiene la dosis letal 50% (concentración media mínima para provocar parálisis en el 50% de las larvas). Debido a la baja confiabilidad de esta técnica, se recomienda repetirla cuatro veces.⁴⁰

En las pruebas controladas se requiere un previo aislamiento de la población parasitaria sospechosa de resistencia, con ella se inoculan (con dosis conocidas, generalmente 5 000 larvas infectantes) algunos animales, se conforman dos grupos, un testigo (sin tratamiento) y otro para evaluar el antihelmíntico, se permite que las larvas alcancen la madurez (de 25 a 30 días, esto depende de las características ambientales), los animales de ambos grupos se sacrifican, se aíslan los parásitos encontrados y se comparan los datos obtenidos, determinándose así la efectividad del producto.⁴

La resistencia es un rasgo heredado y por lo tanto requiere un control genético.²⁶ Martin *et al*, indican que deben tomarse en cuenta muchos factores para que una población parasitaria desarrolle resistencia. Debe considerarse que un antihelmíntico es letal para el 95 a 99% de la población, por tanto, la selección de individuos resistentes es normal, además debe tomarse en cuenta que los parásitos desarrollan una etapa durante la cual no son expuestos a los antihelmínticos (estadio hipobiótico).²⁷

Los métodos tradicionales no detectan la resistencia hasta que se encuentra establecida en mas del 25% de la población, solo han sido realizadas en individuos adultos o bien en larvas obtenidas tras una infección monoespecífica, solo identifican la resistencia cuando esta perfectamente establecida en la población parasitaria.³²

Silvestre y col realizaron modificaciones a la técnica de PCR utilizándola como prueba diagnóstica en la identificación de resistencia a BZ, la ventaja de estos ajustes es que se realizan en larvas en tercer estadio de las cuales no se

conoce el género, mismas que se obtienen fácilmente a partir de huevos de nematodos gastrointestinales puestos en cultivo larvario. ³⁴

Elard y col ⁹ indican que el isotipo 1 gen del β -tubulina esta altamente conservado en los nematodos tricostrongylidos, por lo cual se facilita su estudio, ya que no se encuentra variación genómica entre huevo, adulto y larva.

El método mas recientemente empleado para la detección de resistencia a BZ incluye el análisis de la mutación del aminoácido 200 del isotipo 1 del gen β -tubulina, ¹⁸ donde se demostró que la resistencia presente en *H. contortus* esta relacionado con la selección de los individuos de una población que poseen el gen específico del isotipo 1 de β -tubulina. En 1993, Kwa y col, ¹⁷ indican que el genoma de *H. contortus* presenta un locus único para el isotipo 1 de β -tubulina con variantes alélicas en poblaciones susceptibles a BZ. El incremento en la resistencia a BZ estuvo siempre relacionado con el incremento de la frecuencia de uno de los alelos presentes en la población susceptible. Se encontraron tres cambios de aminoácidos entre los individuos resistentes y susceptibles a BZ en el isotipo 1 de β -tubulina, en las posiciones 76, 200 y 368, indicando que el cambio en la posición 200 (fenilalanina en susceptibles por tirosina en resistentes) es una de las diferencias constantemente presentes entre el gen β -tubulina confiriendo resistencia o susceptibilidad dependiendo del aminoácido presente, por lo que la presencia de tirosina interfiere en la polimerización y estabilidad de los microtúbulos. Esta sustitución de aminoácido fue evaluada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR) en adultos de *H. contortus*. ¹⁸

La técnica de PCR consume poco tiempo (máximo 36 horas) comparativamente con las técnicas tradicionales (21 a 49 días) ya que se utilizan iniciadores específicos que detectan la mutación en el fragmento mencionado, provee una estimación inmediata y no requiere de manejo de animales como la técnica de tasa de reducción del número de huevos en la materia fecal pre y pos tratamiento (prueba *In Vivo*). ²⁵

En este trabajo se hicieron adecuaciones a la técnica propuesta por Silvestre³⁴, realizando el diagnóstico de resistencia en varias poblaciones parasitarias y con diferentes estadios de desarrollo (huevo, larva III y adulto).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido al uso indiscriminado de desparasitantes pertenecientes al grupo de los bencimidazoles (BZ) y a que el género *H. contortus* ha desarrollado poblaciones resistentes a este antihelmíntico, es necesario establecer técnicas de detección sensibles, específicas y rápidas que permitan diferenciar cepas resistentes, para un diagnóstico exacto y el establecimiento de tratamientos específicos y efectivos para el control de estos parásitos.

IV. HIPÓTESIS

La mutación en el gen que confiere resistencia a Bencimidazoles (BZ) en *H. contortus* esta presente en poblaciones de parásitos en México.

V. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Disponer de un método basado en técnicas de biología molecular para la identificación de poblaciones de *H. contortus* resistentes a bencimidazoles (BZ).

Objetivos Específicos

1. Establecer un método basado en AS-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa- alelo específica) para la identificación de poblaciones de *H. contortus* resistentes a BZ.
2. Evaluar la presencia de resistencia a BZ en huevos, larvas e individuos adultos provenientes de diferentes poblaciones de *H. contortus*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Procedimiento general

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Parasitología y de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se realizó la colecta de especímenes adultos de *H. contortus* a partir de abomaso de origen ovino en los estados de Morelos, Oaxaca, Puebla, Estado de México y Veracruz, con el material colectado se efectuó la extracción de DNA.

Se colectaron muestras de materia fecal para la obtención de huevos y la realización de cultivos larvarios, para la posterior extracción de DNA. Las muestras provenían de los estados de Morelos, Puebla, Sinaloa, Sonora y Veracruz.

Una cepa de *H. contortus* caracterizada como resistente a benzimidazoles se inoculó en dos corderos para obtención de huevos y larvas.

Para la estandarización de las condiciones de PCR y el cálculo (concentración) de cada uno de los componentes empleados en la reacción de PCR (taq polimerasa, dNTP, Buffer Cr, MgCl₂ y cantidad de cada primer) se empleó el DNA proveniente de 100 mg de *H. contortus* frescos, caracterizados como resistentes a benzimidazoles.

VI.2 Material biológico

VI.2.1 *Haemonchus contortus* en estadio adulto.

Los muestreos se realizaron en los rastros de la Aurora (en Ciudad Nezahualcoyotl) y en el Municipal de Tlalnepantla, se incluyeron especímenes colectados en el Cenzontle (perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la FMVZ en Martínez de la Torre, Veracruz), en dicho centro se ha detectado la presencia de este género parasitario y sé diagnóstico resistencia a BZ por la técnica de reducción de huevos tras la administración de tratamiento.^{11, 33} Se colectaron muestras de contenido abomasal de ovinos, se extrajeron los parásitos adultos presentes (Imágenes 1 a 6), aquellos identificados como *H. contortus*,^{22, 28} se lavaron y se conservaron en congelación para posterior extracción de DNA por la técnica de "tejidos". (Anexo A). Las muestras de contenido abomasal (adultos) analizadas procedían de los estados de Morelos (n = 4), Oaxaca (n = 2), Puebla (n = 4), Estado de México (n = 4) y Veracruz (n = 2).

VI.2.2 Huevos de nematodos gastrointestinales.

Se recolectaron muestras de materia fecal de ovinos de algunas poblaciones de México, el 50 % de cada muestra se sometió a concentración-extracción de huevos de nematodos gastrointestinales (Imagen 7),¹ (Anexo B) para realizar la obtención de DNA por la técnica de extracto crudo (Anexo C). Además de las muestras obtenidas en diversas explotaciones se contó con una cepa de *H. contortus* caracterizada como resistente, perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (Pavet-Inifap), localizado en Jiutepec, Morelos, misma que fue inoculada a dos corderos (menores de 6 meses) cruce de Ramboulliet-Suffolk (5000 larvas / animal). Para la recuperación de la cepa inoculada se realizó la obtención de

materia fecal realizándose en este material el procedimiento anteriormente descrito, por lo que se analizaron muestras de los estados de Morelos (n = 20), Puebla (n = 9), Sinaloa (n = 4), Sonora (n = 6) y Veracruz (n = 5).

VI.2.3 Larvas en tercer estadio (Imagen 8):

El 50% de las muestras de materia fecal se remitió a cultivo larvario para la obtención de larvas en tercer estadio ¹ (Anexo D), tras la realización de esta técnica se efectuó la de migración larvaria (Anexo E) ⁴¹, las larvas colectadas fueron lavadas por medio de la técnica descrita por López (Anexo F) ²³ con las cuales se obtuvo DNA por la técnica de extracto crudo (Anexo C). Además de la cepa de *H. contortus* del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria inoculada a dos corderos. Para la recuperación de la cepa inoculada se realizó la obtención de materia fecal y se efectuó el procedimiento para obtención de larvas. Teniendo de esta forma larvas provenientes de los estados de Morelos (n = 11), Puebla (n = 2) Sinaloa (n = 2), Sonora (n = 4) y Veracruz (n = 6).

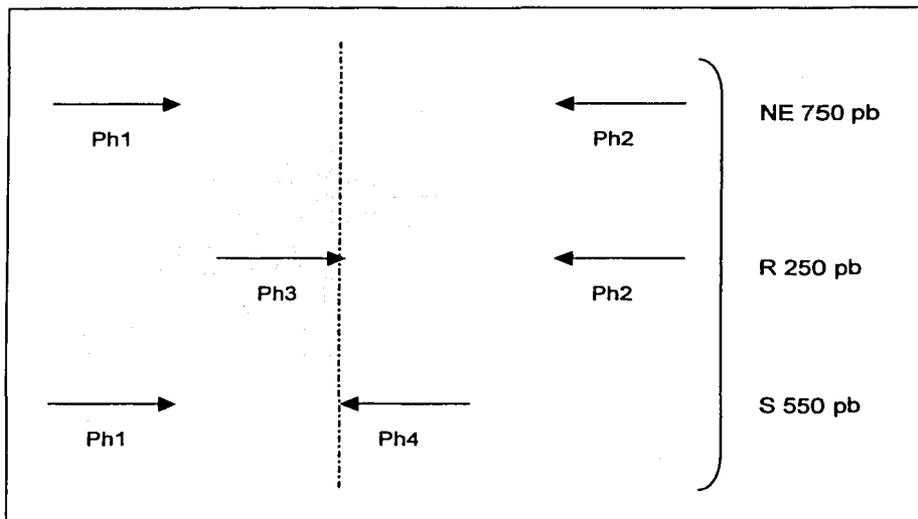
VI.2.4 Extracción del DNA Genómico:

Inicialmente se obtuvo DNA genómico a partir de 100 mg de nematodos en peso húmedo (Anexo A), este procedimiento se efectuó para realizar la estandarización de las condiciones de AS-PCR (Allelo Specific Polimerase Chain Reaction). Una vez estandarizada la técnica de AS-PCR, se procedió a la extracción de DNA genómico a partir de individuos adultos de *H. contortus*, huevos y larvas en tercer estadio por la técnica de obtención de extracto crudo (Anexo C).

VI.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa Alelo Especifica (AS-PCR) ³⁴

Para realizar la identificación de resistencia o susceptibilidad de las muestras analizadas se efectuó la técnica de AS-PCR, empleando 4 iniciadores para las reacciones de amplificación en 3 combinaciones distintas. Con el par formado por Ph1 (5' → 3' - GGA ACG ATG GAC TCC TTT CG) y Ph2 (5' → 3' - GAT CAG CAT TCA GCT GTC CA) se obtuvo un fragmento de 750 pb que es no específico de resistencia o susceptibilidad, pero exclusivo de *H. contortus* por lo que se tomó como control. El par formado por los iniciadores Ph2 y Ph3 (5' → 3' - CTG GTA GAC AAC ACC GAT GAA ACA TA) originaron un fragmento de 250 pb, específico del alelo que confiere resistencia a los BZ y tras el uso de los iniciadores Ph1 y Ph4 (5' → 3' - ATA CAG AGC TTC GTT GTC AAT ACA GA) se produjo un fragmento de 550 pb, específico del alelo de susceptibilidad a los BZ. Las condiciones de PCR empleadas para los tres pares de iniciadores se muestran posteriormente.

VI.3 ESTRATEGIA PARA EL USO DE INICIADORES



PCR específica para identificación del punto de mutación que indica la resistencia o susceptibilidad a BZ en *Haemonchus contortus* (DNA de origen huevo, larva y adulto).

- NE. Fragmento no específico de mutación, específico de *H. contortus*.
- R. Fragmento específico a resistencia en BZ.
- S. Fragmento específico de susceptibilidad a BZ.

VII. RESULTADOS

En el cuadro 1 se observa el muestreo realizado en abomasos de ovino, para la colecta de individuos de *H. contortus* en estadio adulto; indicándose el nombre del estado de procedencia del material biológico y el número de individuos muestrados.

En el cuadro 2 se observan los muestreos de materia fecal realizados para la obtención-concentración de huevos de nematodos gastrointestinales y para la realización de la técnica de cultivo larvario.

Después de la colecta del material biológico, las muestras fueron procesadas como se describió en el apartado de material y métodos. Para la obtención del DNA genómico a partir de huevos y larvas se realizaron ensayos con diferentes cantidades de los mismos, los mejores resultados para las reacciones se obtuvieron cuando el DNA provenía de concentrados de 10 a 12 huevos o larvas.

Para la estandarización de las condiciones de AS-PCR, se obtuvo DNA genómico a partir de 100 mg de nematodos en peso húmedo, por la técnica de tejidos. Con el mismo material biológico se realizaron varios ensayos hasta obtener las concentraciones de los diferentes componentes empleados en la reacción de PCR (*taq* polimerasa, dNTP, Buffer Cr, MgCl₂ y cantidad de cada iniciador).

Tras conocer las condiciones óptimas para el funcionamiento de la AS-PCR y las concentraciones de los componentes para la reacción, se procedió a la extracción de DNA genómico a partir de individuos adultos de *H. contortus*, huevos y larvas en tercer estadio por la técnica de obtención de extracto crudo

Para las reacciones de amplificación, se emplearon 4 iniciadores en 3 combinaciones distintas, Ph1 y Ph2 para la obtención del fragmento de 750 pb, específico de *H. contortus*, Ph2 y Ph3 para la observación de la banda de 250 pb, fragmento específico a resistencia en BZ y el par formado por los iniciadores

Ph1 y Ph4 para la observación de una banda de 550 pb que corresponde al fragmento específico de susceptibilidad a BZ.

La técnica de AS-PCR se realizó en diversas poblaciones parasitarias con individuos de *H. contortus* en estadio adulto, larvario o huevo. Estos procedimientos funcionaron como ensayos para la comprobación del funcionamiento de la técnica, de ninguna manera pretende ser un estudio epidemiológico.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de especímenes adultos fueron los siguientes, el 25% fue homocigótico susceptible (HS) y el 75% homocigótico resistente (HR) (Cuadro 3), el 36% de las larvas en tercer estadio fue HS, el 16% heterocigótico (HE) y el 48% HR (Cuadro 4), con respecto a las muestras de huevos de nematodos gastrointestinales evaluadas el 43.19% HS, el 15.90% HE y el 40.91% HR (Cuadro 5).

En el esquema 1 se muestra un gel de agarosa al 3% con bandas que corresponden a un individuo HE. En el extremo izquierdo encontramos al marcador de alto peso molecular Lambda DNA-BstE II, en la banda A se observa el fragmento de 750 pb específico de individuos de *H. contortus*, en la banda B se detectó un fragmento de 550 pb exclusivo de susceptibilidad y en la banda C se distingue la presencia de la banda característica de resistencia con un peso de 250 pb. En el extremo derecho se colocó el marcador de bajo peso molecular pBR322/Mspl.

En el esquema 2, se muestra un gel de agarosa al 3% en el cual las bandas corresponden a uno HR en este esquema las bandas de los extremos izquierdo y derecho corresponden a los marcadores de peso molecular, se encuentra la banda A y la banda C con las mismas características que las descritas en el párrafo inmediato superior, cabe señalar que al tratarse de un individuo HR carece de la banda B.

Las bandas presentes en un espécimen HS (esquema 3), se observaron en un gel de agarosa al 3%, donde los marcadores moleculares se encuentran en los extremos, encontramos el fragmento de 750 pb específico de individuos

de *H. contortus*, en la banda B se detectó un fragmento de 550 pb exclusivo de susceptibilidad se percibe la ausencia de la banda C, característica exclusiva de los individuos resistentes.

VII.1 Cuadro 1

Muestreos realizados en abomasos de origen ovino para la colecta de *H. contortus* en estadio adulto

Estado	Poblaciones o municipios	Número de animales muestreados
Edo. de México	2	4
Morelos	4	4
Oaxaca	1	2
Puebla	1	2
Veracruz	1	2

VII.2 Cuadro 2

Muestreos de materia fecal realizados para la obtención-concentración de huevos de nematodos gastrointestinales y para la realización de la técnica de cultivo larvario

Estado	Poblaciones o municipios	Número de animales muestreados	Estadio evolutivo Colectado
Morelos	5	20	20 Huevos 11 Larvas ₃
Puebla	3	3	3 Huevos 1 Larvas ₃
Sinaloa	2	4	4 Huevos 2 Larvas ₃
Sonora	2	6	6 Huevos 4 Larvas ₃
Veracruz	1	6	5 Huevos 6 Larvas ₃

Nota : los huevos y el tercer estadio larvario provienen de la materia fecal de los mismos animales, ya que 50% de la muestra fue empleada para la concentración de huevos y 50% para el cultivo larvario. En todas las muestras colectadas se realizó la concentración de huevos, pero solo una parte de las mismas fue procesada para la obtención de larvas en tercer estadio.

VII.3 Cuadro 3

**Resultados de las muestras usadas en este estudio:
Adultos de *Haemonchus contortus* de origen ovino**

Estado	Número de Poblaciones	Número de Muestras	Resultado
Morelos	1	4	Homocigótico Resistente
Puebla	1	2	Homocigótico Susceptible
	1	2	Homocigótico Resistente
Oaxaca	1	2	Homocigótico Susceptible
Edo. de México	2	4	Homocigótico Resistente
Veracruz	1	2	Homocigótico Resistente
Total	7	16	

Homocigótico Susceptible: 25.00 %
Heterocigótico: 0.00 %
Homocigótico Resistente: 75.00 %

VII.4 Cuadro 4

**Resultados de las muestras usadas en este estudio:
Larvas de nematodos gastrointestinales de origen ovino.**

Estado	Número de poblaciones	Número de muestras	Resultado
Morelos	2	7	Homocigótico Susceptible
	1	4	Homocigótico Resistente
Puebla	1	2	Homocigótico Resistente
Sonora	1	2	Homocigótico Susceptible
	1	2	Heterocigóticos
Sinaloa	1	2	Heterocigóticos
Veracruz	1	6	Homocigótico Resistente
Total	8	25	

Homocigótico Susceptible: 36.00 %
Heterocigótico: 16.00 %
Homocigótico Resistente: 48.00 %

VII.5 Cuadro 5

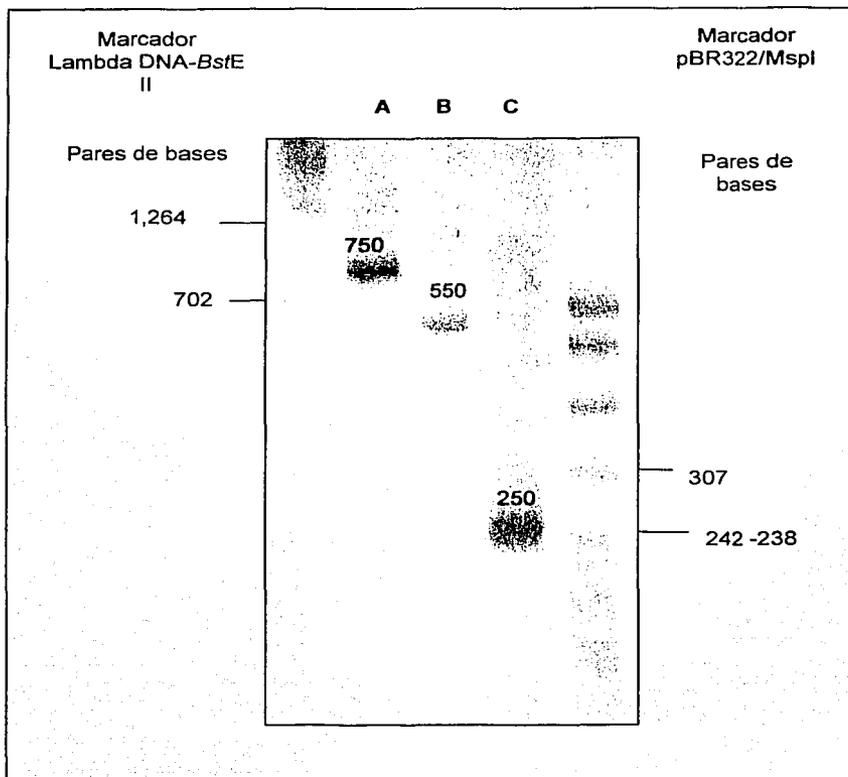
**Resultados de las muestras usadas en este estudio:
Huevos de nematodos gastrointestinales de origen ovino**

Estado	Número de Poblaciones	Número de Muestras	Resultado
Morelos	4	12	Homocigótico Susceptible
	1	8	Homocigótico Resistente
Puebla	1	4	Homocigótico Susceptible
	2	5	Homocigótico Resistente
Sinaloa	2	4	Heterocigóticos
Sonora	1	3	Homocigótico Susceptible
	1	3	Heterocigótico
Veracruz	1	5	Homocigótico Resistente
Total	13	44	

Homocigótico Susceptible: 43.19 %
Heterocigótico: 15.90 %
Homocigótico Resistente: 40.91 %

VII.6 Esquema 1

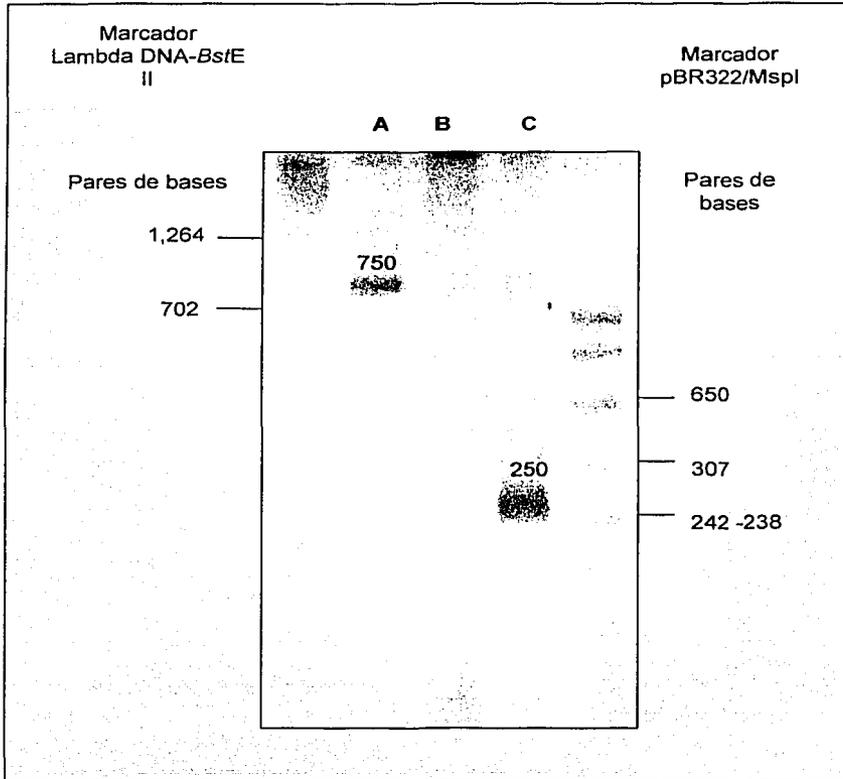
Bandas observadas en geles de agarosa al 3% Individuos de *H. contortus* heterocigóticos



Resultados de la reacción de PCR de Individuos de *Haemonchus contortus* heterocigóticos que presentan: Banda control **A** (750 pb) obtenida tras el uso de los iniciadores Ph1 y Ph2, Banda de susceptibilidad **B** (550 pb) usando Ph1 y Ph4 y Banda de resistencia **C** (250pb) empleando iniciadores Ph2 y Ph3.

VII.7 Esquema 2

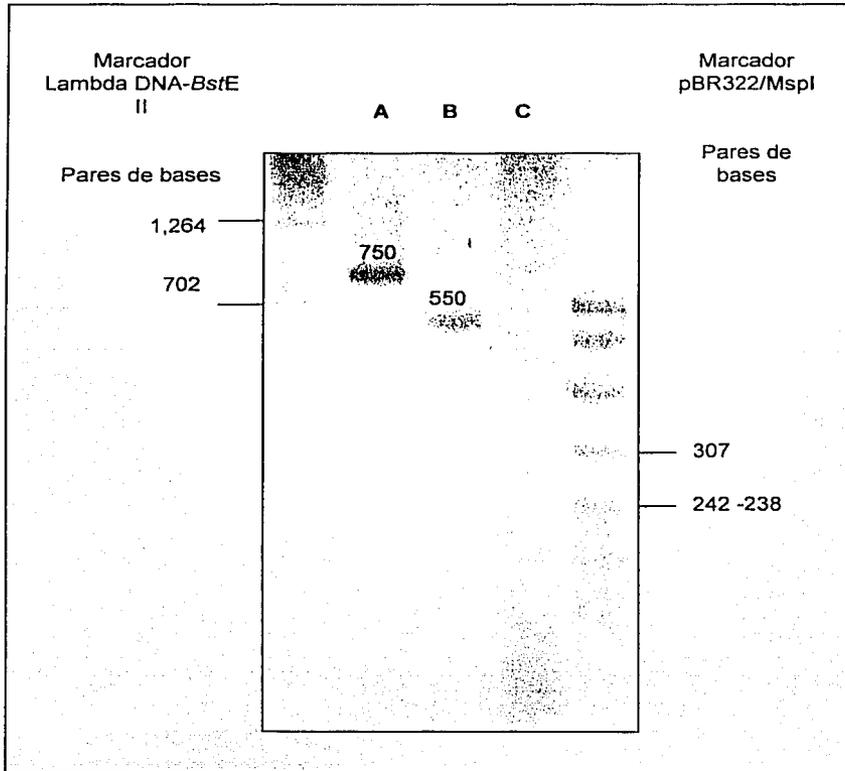
Bandas observadas en geles de agarosa al 3% Individuos de *H. contortus* homocigóticos resistentes



Resultados de la reacción de PCR de Individuos de *Haemonchus contortus* homocigóticos resistentes presentan: Banda control A (750 pb) usando los iniciadores Ph1 y Ph2 y Banda de resistencia C (250pb) empleando iniciadores Ph2 y Ph3. **No** presenta la banda de susceptibilidad B (550 pb) usando Ph1 y Ph4.

VII.8 Esquema 3

Bandas observadas en geles de agarosa al 3% Individuos de *H. contortus* homocigóticos susceptibles



Resultados de la reacción de PCR de Individuos de *Haemonchus contortus* homocigóticos susceptibles presentan: Banda control **A** (750 pb) empleando los iniciadores Ph1 y Ph2 y Banda de susceptibilidad **B** (550 pb) usando Ph1 y Ph4. **No** presenta la Banda de resistencia **C** (250pb) empleando iniciadores Ph2 y Ph3.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las muestras analizadas se encontró que el 75% de los adultos de *H. contortus*, el 64% de las larvas en tercer estadio y el 56.81% de los huevos eran heterocigóticos o bien homocigóticos resistentes (Cuadros 3 a 5), independientemente de cual sea la expresión genética, debemos considerar que los individuos heterocigóticos se manifiestan como resistentes en la población, lo cual nos indica que aún cuando el estudio realizado no es epidemiológico, el carácter de resistencia a bencimidazoles (BZ) esta ampliamente distribuido en las poblaciones de *H. contortus* mexicanas.

En todos los estados (Morelos, Oaxaca, Puebla, Estado de México, Sinaloa, Sonora y Veracruz), a partir de los cuales se obtuvieron muestras para el desarrollo del presente estudio se encontró la presencia del gen que confiere resistencia a los BZ.

Por lo anterior, consideramos que ahora que esta estandarizada la técnica de AS-PCR, se podría realizar un estudio epidemiológico para conocer el comportamiento real del carácter que confiere resistencia a los BZ en las poblaciones de *H. contortus* presentes en México.

La técnica propuesta por Silvestre et al (AS-PCR) ³⁴, sugiere la realización del diagnóstico de la resistencia a BZ solo en tercer estadio larvario, con las modificaciones realizadas en este estudio se logró realizar el diagnóstico de resistencia en muestras de huevos y adultos de *H. contortus*, contribuyendo de esta forma con una técnica que nos permita realizar el diagnóstico de resistencia los BZ en cualquier estadio evolutivo del parásito, ofreciendo así una técnica alternativa para el diagnóstico de resistencia a BZ, de forma más rápida, confiable y en cualquier estadio evolutivo. En el caso de adultos y larvas puede desarrollarse de manera individual o con un grupo de ellos, por otra parte cuando la muestra a procesar es de huevos, se realiza con un concentrado de 10 a 12.

La variación en la mezcla de iniciadores ensayada en este estudio, dio resultados similares a las combinaciones sugeridas por Silvestre et al ³⁴.

Al realizar estos ensayos nos percatamos que bajo las condiciones de PCR descritas para los diferentes pares de iniciadores, se pueden reproducir los resultados citados en este trabajo.

Para la reforzar lo obtenido en el presente, se recomienda hacer la secuenciación de las bandas de 550 y 250 pb obtenidas, para confirmar la mutación en el aminoácido 200 del isotipo 1 del gen β tubulina.

Al disponer de la AS-PCR como una técnica para el diagnóstico de resistencia, tenemos la ventaja de poder realizar el diagnóstico en un máximo de 36 horas a partir del momento en que la muestra es remitida al laboratorio, con una gran confiabilidad ya que los resultados que se obtienen a partir de su aplicación, nos indican las características genéticas de los individuos analizados y no solo muestran su comportamiento en una población parásita.

La AS-PCR es una alternativa diagnóstica de fácil realización, cuando se tiene el equipo necesario y el personal capacitado, ofrece muchas ventajas sobre las técnicas tradicionales ya que no se necesita el manejo de animales, además, las técnicas tradicionales implican mayor inversión de tiempo.

El costo de la técnica de AS-PCR hace que no se encuentre al alcance de muchos productores (aproximadamente \$40.00 por reacción, se realizan 3 reacciones de PCR para llevar a cabo el diagnóstico de resistencia), pero al proporcionar información acerca de la resistencia a BZ, evitará la compra de medicamentos que no sean efectivos contra los parásitos resistentes, evitándose así, el gasto en medicamentos inútiles para una población parásita en específico.

Al contar con esta técnica para el diagnóstico de resistencia a BZ, podemos emplearla para realizar estudios epidemiológicos para conocer el comportamiento de resistencia a este compuesto en poblaciones de *H. contortus* de México.

Es indispensable que en México se adapten y desarrollen tecnologías basadas en biología molecular que nos permitan conocer el comportamiento genético de resistencia hacia los diferentes compuestos químicos que se encuentran disponibles para el control de parásitos. Pues por el momento en nuestro país, no se tiene este tipo de información.

Por lo tanto, el uso de la AS-PCR como técnica diagnóstica de resistencia a BZ, es recomendable para dar una aproximación al comportamiento de una población parasitaria dentro de un ambiente específico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. LITERATURA CONSULTADA

1. Anónimo. Manual de Técnicas de Parasitología Veterinaria. Zaragoza, España: Acribia, 1971.
2. Barrowman MM, Marriner SE and Bogan JA. The Binding and Subsequent Inhibition of Tubulin Polimerization in *Ascaris suum* (*In Vitro*) by Benzimidazole Anthelmintics. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 3037-3040.
3. Boughton JB And Hardy WT. Stomach Worms (*H. contortus*) of Sheep and Goats. Report of the Texas Agricultural Experimental Station 1995; 48: 236-239.
4. Coles GC. Strategies for Control of Anthelmintic Resistance Nematodes of Ruminants. *JAVMA* 1988; 3: 330-334.
5. Coles MA. Anthelmintics for Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1986; 2: 2.
6. Cordero CM y Rojo VFA. Parasitología Veterinaria. España: McGraw-Hill Interamericana, 1999.
7. Dawson PJ, Gutteridge WE and Gull K. Purification and Characterisation of Tubulin From the Parasitic Nematode, *Ascaridia galli*. *Mol and Biochem Parasitol.* 1983; 7: 267-277
8. Dunn MA. Helminología Veterinaria. 2ª Edic. México: Manual Moderno, 1983.
9. Elard L, Comes AM and Humbert JF. Sequences of β -tubulin cDNA from Benzimidazole-Susceptible and -Resistant Strains of *Teladorsitia circumcincta*, a Nematode Parasite of Small Ruminants, *Mol Biochem Parasitol* 1996; 79: 249-253.
10. Entrocasso C. Fisiopatología del Parasitismo Gastroentérico. en: Nari A y Fiel C. Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Uruguay: Editorial Hemisferio Sur, 1996: 3-18.
11. Figueroa CJA, Méndez MRD, Berruecos VJM, Álvarez LJA, Detección de Resistencia en *Haemonchus contortus* al Sulfóxido de Albendazol

- Inyectado Mediante la Prueba de Campo de Reducción de Huevos en Ganado Ovino. *Vet Mex* 2000; 31 (4).
12. Friedman PA, Platzer EG and Carrol EJ. Tubulin Characterisation During Embryogenesis of *Ascaris suum*. *Developmental Biol* 1980; 76: 47-57.
 13. Hoekstra R, Criado-Fornellio A, Fakkeldij J, Bergman J and Roos MH. Microsatellites of Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*: Polymorphism and Linkage with a Direct Repeat. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 89: (1): 97-107.
 14. Holmes PH. Pathophysiology of Helminth Infections. en: Chowdhury N & Tada I. *Helminthology*. New Delhi: Narosa Publishing House, 1994: 234-242.
 15. Hulínská I. Die Determinations Mer/Male Invasions Larvem Bei Schafdarmlhelminthen. *Acta Sc. Nat. Brno*. 1969; 3: (8): 1-35.
 16. Köhler JA and Bachmann R. Intestinal Tubulin as a Possible Target for Chemotherapeutic Action of Mebendazole in Parasitic Nematodes. *Mol and Biochem Parasitol*. 1981; 4: 325-336.
 17. Kwa MS, Veenstra JG and Ross MH. Molecular Characterisation of β -Tubulin Genes Present in Benzimidazole-Resistant Populations of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60: 133-144.
 18. Kwa MS, Veenstra JG and Ross MH. Benzimidazole Resistence in *Haemonchus contortus* is Correlated with a Conserved Mutation at Amino Acid 200 in β -tubulin Isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63: 299-303.
 19. Lacey E and Snowdon KL. A Routine Diagnostic Assay for the Detection of Benzimidazole Resistance in Parasitic Nematodes Using Tritiated Benzimidazole Carbamates. *Vet Parasitol* 1988; 27: 309-324.
 20. Lacey, E. The Role of the Cytoeskeletal Protein, Tubulin, in the Mode of Action and Mechanism of Drug Resistance to BZ. *Int. J. Parasitol* 1998; 18: 885-936.
 21. Lanusse CE. Bases Farmacológicas de la Terapéutica Antihelmíntica. en: Nari A y Fiel C. *Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos*. Uruguay: Editorial Hemisferio Sur, 1996: 33-66.

22. Lichtenfels JR, Pilitt PA and Hoberg EP. New Morphological Characters for Identifying Individual Specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and Key to Species in Ruminants of North America. J. Parasitol. 1994; 80 (1): 107-119.
23. López AME, Determinación de la Respuesta Inmune Celular y Humoral en Ovinos Infectados Experimentalmente con *Haemonchus contortus*, Tesis de Maestría, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, México 1990, Págs. 18-20).
24. Lubega GW, and Prichard RK, Specific Interaction of Benzimidazole Anthelmintics with Tubulin: High-affinity Bonding and Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus*, Mol. and Biochem. Parasitol. 1990, 38: 221-232 .
25. Lubega GW, Klein RD, Geary TG, and Prichard RK. *Haemonchus contortus*: the Role of Two Beta-tubulin Gene Subfamilies in the Resistance to Benzimidazole Anthelmintics, Biochem. Pharmacol. 1994; 47 (9): 1705-1715.
26. Martin PJ, Anderson N, Lwin T, Nelson G and Morgan TE. The Association Between Frequency of Thiabendazole Treatment and The Development of Resistance in Field Isolates of *Ostertagia* spp of Sheep. Int. J. Parasitol. 1984; 14:177-181.
27. Martin PJ. Development and Control of Resistance to Anthelmintics. Int. J. Parasitol. 1987: 493-501.
28. Mejía-García RA y Díaz-Benítez A. Variación Morfológica del Apéndice Vulvar de *Haemonchus contortus* y *H. Similis* en Bovinos y Caprinos. Rev Ibérica de Parasitol 1987; 47 (4): 365-375.
29. Presidente PJA. Method for Detections of Resistance to Anthelmintics Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs. Australia: CSIRO, Division of Animal Health Australian Wool Corporation, 1985.
30. Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martin ICA and Donald AD. The Problem of Anthelmintic Resistance in Nematodes. Australian Vet. J 1980; 56: 239-251.

31. Prichard RK. The Pharmacology of Anthelmintics in Livestock. *Int. J. Parasitol.* 1987; 473-482.
32. Roos MH, Kwa MSG & Grant WN. New Genetic and Practical Implications of Selection for Anthelmintic Resistance in Parasitic Nematodes. *Parasitol Today* 1995; 11: 148-150.
33. Salas GB, Méndez MD, Figueroa CJA, Quiroz RH. Eficacia de Antihelmínticos en Ovinos de la Raza Tabasco en Trópico Húmedo. *Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología*; 1998 Octubre; Zacatecas (Zacatecas) México. Sociedad Mexicana de Parasitología A. C.
34. Silvestre A and Humbert JF. A Molecular Tool for Species Identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in Larval Communities of Small Ruminant Parasites. *Exper Parasitol* 2000; 95: 271-279.
35. Smith G. Population of The Parasitic Phase of The Trichostrongylid Nematode Parasites of Cattle and Sheep. *Int. J. Parasitol* 1994; 24: 167-178.
36. Soulsby EJ. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos*. 3ª Edic. México: Interamericana, 1987.
37. Sumano LH y Ocampo CH. *Farmacología Veterinaria*. México: Mc Graw Hill: 1998.
38. Tarazona JM. A Method for the Interpretation of Parasite Egg Count in Faeces of Sheep. *Vet. Parasitol* 1980; 11: 9-24.
39. Tarazona VJM. *Etiopatogenia y Control de la Gastroenteritis Parasitaria Ovina*. Madrid, España: Instituto Nacional de investigaciones Agrarias y Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid, 1980.
40. Várady M and Corba J. Comparison of Six in Vitro Tests in Determining Benzimidazole and Levamisole Resistanse in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of Sheep. *Vet. Parasitol* 1999; 80: 239-249.
41. Vázquez PV. Necropsia e Identificación de Helmintos del Tracto Gastrointestinal en Rumiantes. en: Campos RR y Bautista GR. *Diagnóstico*

de Helmintos y Hemoparásitos de Rumiantes. México: Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A. C.

42. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL and Martin ICA. In Vitro Field Screening for Anthelmintic Resistance in *Strongyloides* of Sheep and Horses. Vet. Parasitol. 1980; 7: 215-232.
43. Wood RJ. Insecticide Resistance: Genes and Mechanisms. London, England: Academic Press, 1981.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen 1

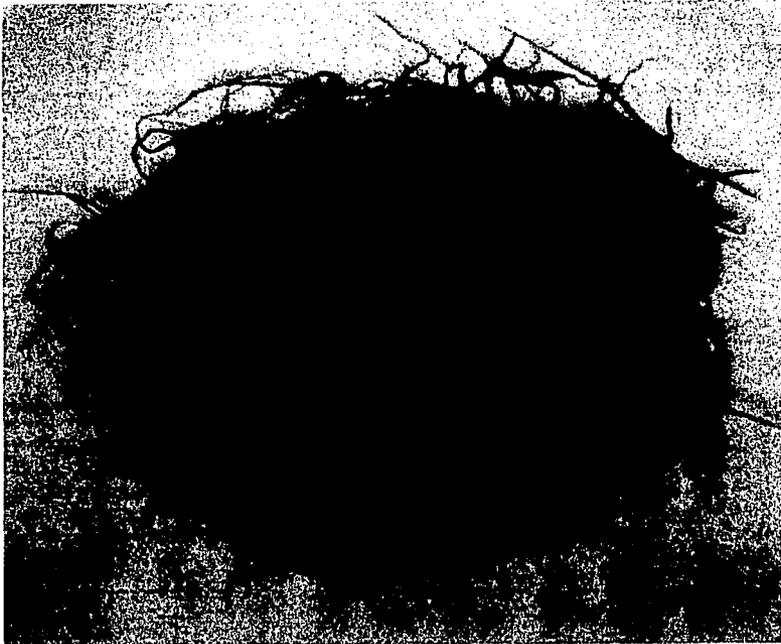
**Especímenes adultos de *Haemonchus contortus*
en un abomaso de ovino**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen 2

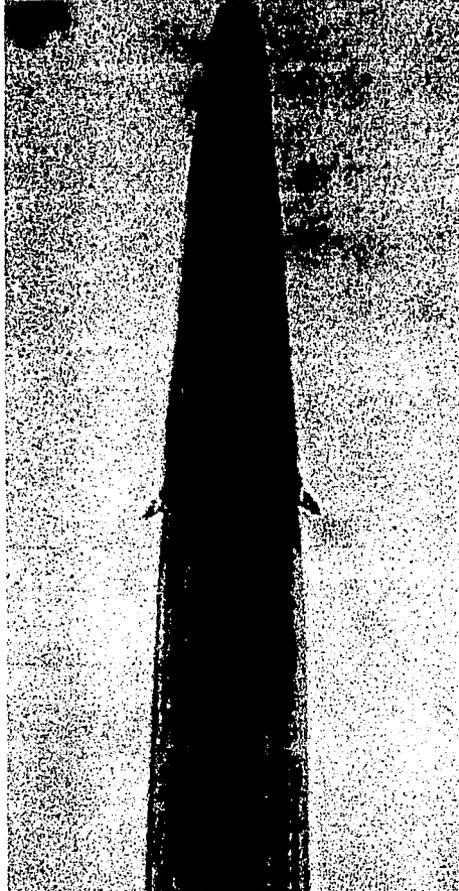
Especimenes frescos adultos de *Haemonchus contortus* obtenidos de ovinos a la necropsia



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen 3

**Extremo anterior de *Haemonchus contortus*
Alas cervicales en forma de espina de rosal**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen 4

**Proceso vulvar de la hembra de *Haemonchus contortus*,
característica morfológica distintiva**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen 5

Ovarios enrollados en el tubo digestivo, característica morfológica de las hembras de *Haemonchus contortus*



Imagen 6

Bolsa copulatoria de un macho de *Haemonchus contortus*, lóbulo dorsal asimétrico, característica morfológica distintiva del parásito



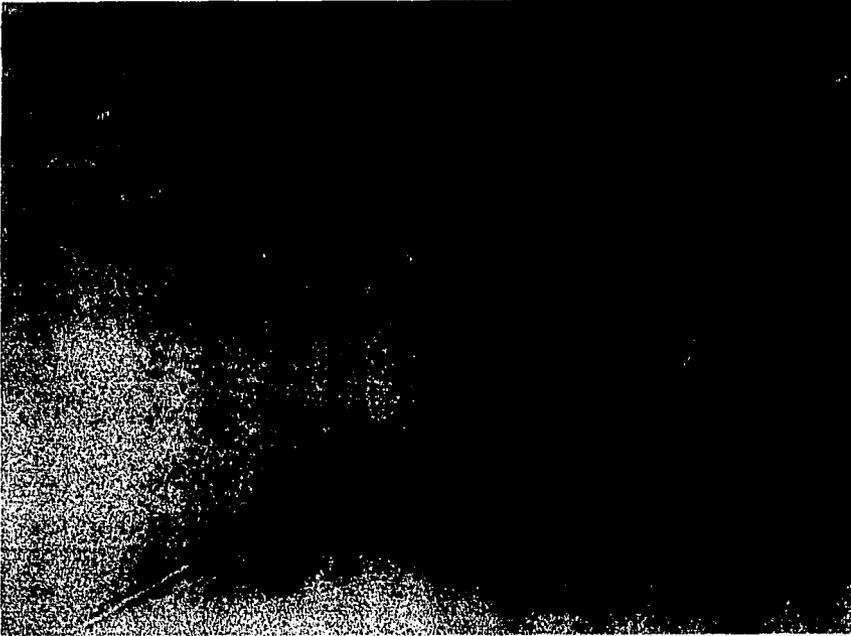
Imagen 7

Huevo de nematodo gastrointestinal en muestra de heces de ovino



Imagen 8

Tercer estadio larvario de *Haemonchus contortus*



Anexo A

EXTRACCIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE TEJIDOS

1. Colocar en un mortero 100 mg de adultos de *Haemonchus contortus*.
2. Agregar nitrógeno líquido y proceder a la maceración de los mismos.
3. Colocar el pulverizado en un tubo y agregar 10 volúmenes de solución de lisis para tejidos.
4. Depositar el lisado con RNAasa a 37°C durante una hora para que se digiera.
5. Agregar proteinaza K al lisado con RNAasa e incubar 2 a 3 horas a 55°C.
6. Sin agregar ninguna solución, cambiar la temperatura de incubación a 65°C durante una hora o bien, a 50°C durante toda una noche.
7. Adicionar Cloruro de Sodio 5M (molar) para que quede en una concentración final de 2M y agitar por 15 segundos.
8. Centrifugar a 10 000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
9. Recuperar el sobrenadante y precipitar con 2 volúmenes de etanol puro (poner en el congelador por 30 minutos).
10. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 minutos.
11. Resuspender la pastilla en el menor volumen posible de solución de lisis para tejidos (200 µl) y mezclar perfectamente sin agitar demasiado (para facilitar el mezclado se recomienda colocar el tubo en un baño maría a 37°C durante 20 minutos).
12. A la mezcla de solución de lisis se coloca un volumen de fenol preparado, se agita durante 5 segundos y se centrifuga a 12 000 rpm durante 10 minutos.
13. Se extrae la parte superior con una micropipeta, se coloca en un tubo y se agrega un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcla y se centrifuga a 12 000 rpm por 10 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. Se obtiene el sobrenadante y repite el procedimiento anterior.
15. Se obtiene el sobrenadante y se le agregan 2 volúmenes de etanol, la mezcla se deja en refrigeración toda la noche.
16. Se centrifuga a 12 000 rpm por 10 minutos.
17. Se decanta todo el líquido (escurrir en papel secante), a la pastilla se le agregan 200 μ l de etanol de 70° y se centrifuga a 12 000 rpm durante 10 minutos.
18. Se repite el procedimiento anterior.
19. Se decanta la totalidad del líquido y se pone el tubo en un termoblock a 50 °C durante 20 a 25 minutos para secar la pastilla.
20. Se agregan 20 μ l d agua bidestilada y se homogeniza perfectamente.
21. Se corre la muestra en un gel de agarosa al 1%.

SOLUCIONES EMPLEADAS

EXTRACCIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE TEJIDOS

Solución de lisis para tejidos

0.05 M Tris-HCl pH 8

0.1 M EDTA (Etilen Diamino tetra acético)

0.5% Sarkosyl.

RNAasa

Concentración del Stock 2 000 μ g/ml

Se busca una concentración final de 20 μ g/ml

Proteinaza K

Concentración del Stock 50 000 μ g/ml

Se busca una concentración final de 100 μ g/ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cloruro de Sodio

Concentración del Stock 5 M

Se busca una concentración final de 2 M

Anexo B

OBTENCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES.¹

1. Se realiza la técnica de flotación de manera tradicional
2. Tras cerciorarse que la muestra es positiva, se obtiene el sobrenadante en tubos para centrifuga con una capacidad de 50 ml
3. Se centrifuga durante 10 minutos a 3500 rpm
4. Se obtiene el sobrenadante
5. Mismo que se coloca en otro tubo y se afora a 50 ml con agua bidestilada, se centrifuga nuevamente a 3500 rpm durante 10 minutos
6. El contenido de este tubo se vacía en otros dos tubos 25 ml por cada uno y se aforan 25 ml de agua bidestilada
7. Se obtiene el sedimento y se transfiere a tubos Eppendorf de 2 ml, se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos, los huevos contenidos se resuspenden en solución salina fisiológica.
8. El número de huevo por μl varia dependiendo de la cantidad de huevos por gramo de heces. Para hacer un calculo mas acertado se colocan 5 μl del concentrado en una cámara hematológica de conteo empleando la zona para glóbulos blancos. Se cuentan los huevos contenidos en los cuadrantes de los extremos y el central.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo C

OBTENCIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE EXTRACTO CRUDO

PREPARACIÓN DE LISADO CRUDO DE DNA A PARTIR DE NEMATODOS INDIVIDUALES, LARVAS Y HUEVOS DE NEMATODOS.

1. A un nematodo lavado, larvas o huevos en suspensión, se le agregan 100 μ l de una solución de Buffer K que contiene proteinasa K (200 μ g/ ml)
2. Se incuban 2 horas a 37°C
3. Incubar a 95°C por 15 segundos para inactivar la proteinasa K
4. Se saca la muestra de incubación y se deja enfriar a temperatura ambiente
5. Se adiciona 1 μ l de RNAasa (1 μ g/ ml)
6. Se incuba a 37°C durante 15 minutos
7. Se guarda la muestra a - 20°C

REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA EXTRACCIÓN DNA POR LA TÉCNICA DE EXTRACTO CRUDO

Buffer K

Buffer E 10X 5 ml

Tween 20 250 μ l

Agua estéril 45 ml

(Concentración final del Tween 1/20 ó 0.05%)

Proteinasa K más buffer K

Buffer K 1 ml

Proteinasa K

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SOLUCIONES DE TRABAJO PARA CORRIDA Y GELES DE AGAROSA

Buffer TBE 5X

Tris base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5M pH 8	20.0 ml
Agua destilada cbp	1000 ml

Geles Para Corrida En Electroforesis

Agarosa al 1% (100 ml)

Agarosa	1 g
Buffer TBE 5X	20 ml
Agua destilada	80 ml

Agarosa al 2.5% (100 ml)

Agarosa	2.5 g
Buffer TBE 5X	20 ml
Agua destilada	80 ml

Agarosa al 3% (100 ml)

Agarosa	3 g
Buffer TBE 5X	20 ml
Agua destilada	80 ml

Bromuro de Etidio en Solución Acuosa (100ml)

Concentración del Stock de Bromuro de etidio 10 mg / ml

Bromuro de etidio	50 μ l
Agua bidestilada	100 ml

Quedando una concentración final de 5 μ g / ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo D

CULTIVO FECAL PARA LA OBTENCIÓN DE LARVAS EN TERCER ESTADIO

Con esta técnica se obtienen larvas en tercer estadio, al proporcionar a los huevos de nematodos gastrointestinales presentes las condiciones optimas para su desarrollo (humedad, oxigenación y temperatura).¹

1. Tras la realización de la técnica de flotación con solución saturada con cloruro de sodio o la técnica de McMaster se realiza la técnica de cultivo fecal
2. Se coloca la muestra positiva a nematodos gastrointestinales en un recipiente limpio y seco, se agrega un poco de agua purificada (para evitar que la presencia de cloro inhiba el desarrollo larvario), se homogeniza el contenido.
3. Se realiza la identificación de la muestra y se coloca en una estufa de cultivo con una temperatura de 27 a 30 °C.
4. La muestra debe ser revisada y oxigenada diariamente cuidando las condiciones de humedad y temperatura.
5. Transcurridos de 10 a 12 días se extrae el contenido del recipiente, se coloca en una gasa y procede a realizarse la técnica de Baermann para la obtención de las larvas III

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo E

TÉCNICA DE MIGRACIÓN LARVARIA (BAERMANN)

Esta técnica se realiza para la obtención de larvas de nematodos pulmonares o larvas III de nematodos gastrointestinales a partir de cultivos fecales, se aprovechan los tactismos biológicos de estas para realizar la colecta (hidrotropismo y termotropismo).¹

1. Se coloca la muestra del cultivo fecal en una gasa, misma que se pone en un tamiz que forma parte del aparato de Baermann (soporte universal, anillo metálico, pinzas Mohr, Embudo, manguera de hule látex, vidrio de reloj y tamiz).
2. Se vierte agua tibia purificada por las paredes del embudo, hasta que cubra la malla del tamiz.
3. Se deja reposar por 8 a 10 horas y se obtiene el contenido en el vidrio de reloj.
4. Se realiza la inspección con un microscopio estereoscópico.
5. Se colectan las larvas con la ayuda de una pipeta Pasteur.
6. Las larvas colectadas se colocan en un portaobjetos y se realiza la identificación de las mismas por sus características morfológicas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo F

MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAVADO DE LARVAS A PARTIR DE UN CULTIVO FECAL. ²³

1. El líquido colectado de la técnica de migración larvaria se distribuye en tubos (15 ml) y se somete a centrifugación por 5 min. a 3,000 rpm a 4°C.
2. Se deja sedimentar en refrigeración durante 30 min.
3. Se decanta el sobrenadante y se aforan los tubos a 15 ml con agua destilada y se homogeniza el contenido.
4. Se repite este procedimiento hasta que el sobrenadante quede claro.
5. Se concentra el líquido en un tubo de centrifuga.
6. Se agrega solución de sacarosa al 37% en proporción 1:5.
7. Se centrifuga a 4,000 rpm por 10 min.
8. Las larvas quedan resuspendidas en la parte media y superior del tubo, en el fondo se localizan los detritus fecales.
9. Se colectan las larvas con una pipeta Pasteur.
10. Las larvas se resuspenden en solución salina amortiguadora de fosfatos con pH 7.2 para eliminar el exceso de sacarosa.
11. Se continúan haciendo lavados por centrifugación hasta observar que el sobrenadante quede claro, esto es 5 min. a 4,000 rpm.
12. Se deja sedimentar el contenido a 4 °C durante 30 min. , entre cada centrifugación.
13. El material obtenido puede ser cuantificado o utilizado directamente para cualquier procedimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TÉCNICA DE
LAVADO DE LARVAS A PARTIR DE UN CULTIVO FECAL**

Solución de sacarosa al 37%

Para la preparación de 100 ml

37 g de sacarosa

Aforar a 100 ml

Solución Amortiguadora

Buffer fosfato comercial Sigma Diagnostics: 8.3 mmol / L, pH 7.2 a 25°C.

Formula por 1 vial

Fosfato de sodio y potasio

Disolver el contenido del vial en 3.8 l de agua destilada

Refrigerar a 2-6°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo G USO DE INICIADORES Ph1 y Ph2

El Ph1 es el iniciador no específico sentido 5'-3' y Ph2 es el iniciador no específico antisentido 5'-3'. Al emplearlos se obtiene un fragmento de 750 pb, fragmento específico para la identificación del género *Haemonchus contortus*.

Para esta reacción se emplearon las siguientes sustancias: 3 µl de DNA (de origen huevo, larva o adulto de *H. contortus*), 2.5 U de *taq* polimerasa (biotecnologías universitarias), 0.2 mM dNTP (biotecnologías universitarias), 2 µl de Buffer Cr 10X con 1.5 mM de MgCl₂ (biotecnologías universitarias) y 10 mM de cada primer (Ph1 y Ph2).

Condiciones de PCR para los Iniciadores Ph1 y Ph2

Desnaturalización inicial	94 °C / 3 minutos	30 ciclos
Desnaturalización	94 °C / 30 segundos	
Alineación	60 °C / 30 segundos	
Síntesis	72 °C / 30 segundos	
Polimerización final	72 °C / 3 minutos	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo G1 USO DE INICIADORES Ph1 y Ph4

El Ph1 es el iniciador no específico sentido 5'-3' y Ph4 es el iniciador específico antisentido 5'-3' de alelos susceptibles, con su uso se obtiene un fragmento de 550 pb, que es el fragmento específico de susceptibilidad a BZ.

La mezcla de reacción de PCR consta: 3 μ l de DNA (de origen huevo, larva o adulto de *H. contortus*), 2.5 U de *taq* DNA polimerasa (biotecnologías universitarias), 0.2 mM dNTP (biotecnologías universitarias), 2 μ l de Buffer Cr 10X con 1.5 mM de MgCl₂ (biotecnologías universitarias) y 10 mM de cada primer (Ph1 y Ph4) y llevar a 20 μ l con agua destilada estéril.

Condiciones de PCR para los iniciadores Ph1 y Ph4

Desnaturalización inicial	94 °C / 3 minutos	
Desnaturalización	94 °C / 30 segundos	30 ciclos
Alineación	60 a 62 °C / 30 segundos	
Síntesis	72 °C / 30 segundos	
Polimerización final	72 °C / 3 minutos	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo G2 USO DE INICIADORES Ph2 y Ph3

Ph2 es el iniciador no específico antisentido 5'-3', Ph3 es el iniciador alelo específico para resistencia sentido 5'- 3'. Se obtiene un fragmento de 250 pb que es específico de cepas de *Haemonchus contortus* resistentes a BZ.

Para la reacción se emplearon las siguientes sustancias: 3 µl de DNA (de origen huevo, larva o adulto de *H. contortus*), 2.5 U de *taq* polimerasa (biotecnologías universitarias), 0.2 mM dNTP (biotecnologías universitarias), 2 µl de Buffer Cr 10X con 1.5 mM de MgCl₂ (biotecnologías universitarias) y 10 mM de cada primer (Ph2 y Ph3)

Condiciones de PCR para los Iniciadores Ph2 y Ph3

Desnaturalización inicial	94 °C / 3 minutos	30 ciclos
Desnaturalización	94 °C / 30 segundos	
Alineación	62 °C / 30 segundos	
Síntesis	72 °C / 30 segundos	
Polimerización final	72 °C / 3 minutos	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo H EQUIPO EMPLEADO

Termociclador

Hybaid limited PCR

Omn-E

Termociclador

Hybaid limited PCR Express

Termoblock

Dry bath incubator

Fisher scientific

Fuente de Poder

E-C Apparatus corporation

Cámara para electroforesis

Microcentrifuga

Eppendorf 5417C

Centrifuga para tubos tipo Falcon (15 – 50 ml)

IEC – Centra GP8R

Baño Húmedo

Isotemp waterbath

Fisher scientific 2I-M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Transiluminador

UVP

Transluminator White/UV

GDS 7500 Dark room

Impresión de imágenes

Digital graphic printed

Sony UP D860

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN