



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE UNA
PROTEASA EXTRACELULAR DE *Arthrobotrys musiformis* CON EFECTO *in vitro*
CONTRA LARVAS 3 DE *Haemonchus contortus*.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
PERLA MARÍA DEL CARMEN ACEVEDO RAMÍREZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
HÉCTOR QUIROZ ROMERO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTOR:
PEDRO MENDOZA DE GIVES
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM**

MÉXICO D. F., FEBRERO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“Del Pueblo a la Universidad y de la Universidad al Pueblo”

David Alfaro Siqueiros.

Eso intentamos. 9

“In ixtli, in yólotl”

El hombre maduro: corazón firme como la piedra,

corazón resistente como el tronco de un árbol;

rostro sabio.

Dueño de un rostro y un corazón

hábil y comprensivo.

Agradecimientos

Al Dr. Héctor Quiroz Romero por la confianza y enseñanza académica, profesional y personal que me ha brindado a lo largo de este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca.

A los Proyectos PAPIIT PE205712 y PAPIIT IT230011.

Al Sistema Nacional de Investigadores por la beca otorgada.

Al Dr. Mendoza por su apoyo, sus enseñanzas y abrirme las puertas de su laboratorio y su casa.

Al Dr. Rendón por su dedicación y guía.

A la M. en C. Rosa Ofelia Valero Coss, por su valiosa aportación, transmisión de conocimientos y su experto manejo de este tema.

A la Biól. Gisela Martínez García por todas las recomendaciones por tu apoyo infinito en todos aspectos.

Al Dr. Alberto Guevara Flores, por su esfuerzo, dedicación y paciencia.

Al Dr. Raúl Ulloa, por su apoyo en el desarrollo estadístico.

Al M. en C. Enrique Liébano (qepd) y al Dr. Juan Antonio Figueroa por su donación de larvas de *Haemonchus contortus*.

Al Dr. Cervantes y a la Dra. Carolina Segundo del laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

A la Dra. Del Arenal por sus recomendaciones y por su calidez en todo momento.

Al Cenid-Pavet-INIFAP, al Rancho Margaritas-INIFAP, al CEIEGT-UNAM, FES-Zaragoza-UNAM, FMVZ-UAS, por permitir la colecta de muestras para realizar este estudio.

A los miembros honorables del Jurado que muy amablemente me hicieron revisión y aportaciones bastante acertadas:

- Dr. Fernando Alba Hurtado
- Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo
- Dra. Martha Ponce Macotela
- Dr. Sigfrido Sierra Galván.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al Depto. de Parasitología, al Posgrado de la misma Facultad, a Clara Aguillón García, Mercedes Arriaga Gutiérrez, Araceli Moreno Cortés y al Dr. Librado Torres Melo y todas las secretarías que siempre han sido muy atentas y amables.

Sobre todo a mi alma mater, mi querida

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ORGULLOSAMENTE UNAM

Corazón Azul y Piel Dorada.

Dedicatoria

A Dios y a la vida por darme otra oportunidad... Gracias infinitas...

Este doctorado más allá del crecimiento académico para mí ha sido una etapa de crecimiento personal en la que he conocido a bastantes personas que han contribuido a mi formación en todos los aspectos, cada uno de ustedes me ha aportado bastante con sus comentarios, jalones de orejas o simplemente con escucharme, les doy gracias por siempre.

Este proceso no fue fácil, me ha enseñado que la constancia y resistencia son elementos fundamentales para lograr llegar a la meta, en el camino quedó mucho esfuerzo, risa, alegría, llanto y tristeza pero también grandes satisfacciones...

Sin ustedes no habría sido posible nada: Beni porque me diste la vida y día a día me apoyas en todo. David y Fabián que son los mejores hermanos que me hubieran tocado. Gracias Noel y Ame por todo lo que han traído, por la felicidad y cariño incondicional que me han dado, son lo más grandioso e importante. Sin ustedes no habría llegado hasta aquí, son mi más grande tesoro.

Gracias apá por estar al pendiente de mí, Reyna, Cami, Vero, Xime, Angélica.

A los Navarro Ramírez y Muñoz Ramírez y a toda la numerosa familia Ramírez Suaste que me han demostrado que están en todo momento y que tengo a la mejor familia que pude haber tenido.

¡¡ GRACIAS POR SIEMPRE CREER EN MI !!

A Max, Antonio García López y Mónica, entre otras personas anónimas que me apoyaron en el evento más difícil, gracias por estar ahí, por su sensibilidad y apoyo, no tengo como agradecer lo que hicieron por mí.

A las grandes amigas Rosa Ofelia Valero Coss y Gisela Martínez García, gracias por su entusiasmo y ese gran apoyo, fueron factores fundamentales en la realización de este proyecto.

A la Dra. Martha Ponce Macotela por enseñarme tanto de esta área a querer a la parasitología y que sea una más de mis pasiones.

Pueblo: Sofía (pareja 3.14) Arenas Castillo, Isabel (Xabe Huitzil) Plata Zamora, Liliana (Lili wild) Gaytán Cruz, Elva Domínguez Torres, Noé Pacheco Coronel, son de mis imprescindibles

A Mario Gordillo por sus sugerencias y ánimos. Aarón Rodríguez Caballero, no tengo palabras para hasta las patadas para empujarme (bueno esas no, jeje). Por el inicio de Parasítate: Elia y Mandy: parasitatie@gmail.com

A Deyanira Jiménez, Elba Rodríguez, Fer Lara por sus comentarios y tips.

A mis comadres y compañeras del laboratorio de Parasitología: Karina Hernández, Belinda Ortiz, Liz Xico, Dra. Irene Cruz Mendoza, Irma Hernández, Nely, Maru, Samuel y Mercedes.

A mis grandes amig@s de siempre Claus Guerra, Adriana Ramírez, Gume Corona, Blanca González, Fer Lara, Miguel Marín, Jimmy Cisneros.

Oriana, Monse, Jacqueline, Paty, Emmanuel, Toño y todo In-Cem.

A mis compañeros del INIFAP: Ivonne, Fitz.

A Jesús Martínez, por tus frases mañaneras que eran un motivo más para sonreír.

A mi grupo de danza, que además de la relajación hemos formado un muy buen equipo y sobre todo he encontrado amigas: Erika, Greta, Natalia, Gloria, David.

A Mirta Cano, amiga por todas las dificultades que hemos pasado y que pasaremos juntas. Memo Ángulo, Mary López por esta nueva amistad, espero sea duradera...Gracias por mostrarme y enamorarme de Sinaloa ...

A los estudiantes de verano: Kary, Ana, Elvia y Esauí, aprendí de ustedes y me ayudaron a darme cuenta que este es mi camino.

Gracias CEIEPA, especialmente Dra. Yesmín Domínguez y al súper equipo: Anyx, Kari y Husim, un equipo super requeté eficiente.

Brianda Landeros (compañera llanta) y Jesús Campos por lo que nos tocó vivir, y estamos para contarlo.

Y a Heriberto Landeros López, por cambiar el mundo de color, por todo lo que has traído, aportas y porque la vida te puso aquí y tú has hecho lo posible por permanecer...9

A todos mis compañeros y amigos que siempre han estado conmigo en las buenas, en las malas y en las súper malas, no me dejaron caer en ningún momento y siempre se mantuvieron firmes conmigo en todas mis loqueras. A todas las personas que se han aparecido y compartido un tiempo conmigo, que me han dado la satisfacción de platicar intercambiar ideas, pensamientos, sentimientos.

A TODOS USTÉDES

iii GRACIAS POR SER, GRACIAS POR ESTAR!!!

Publicaciones

Acevedo-Ramírez, P.M.C., Quiroz-Romero, H., Valero-Coss, R.O., Mendoza-De Gives, P., Rendón-Gómez, J.L. (2011). Nematophagous fungi from Mexico with activity against the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 70 (1), 101-108.

Acevedo-Ramírez, P.M.C. Los hongos nematófagos como control biológico contra nematodos de rumiantes. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editado por: Quiroz R.H, Figueroa CJA, Ibarra VF, López AME. México, 2011. pp. 354-366.

Acevedo Ramírez, P.M.C., Quiroz Romero, H., Mendoza de Gives, P., Rendón Gómez, J.L. Una red microscópica, en la lucha por la sobrevivencia. *Ciencia y Desarrollo*, 39(268), 26-33.

Resumen

El hongo nematófago *Arthrobotrys musiformis* es una alternativa con potencial para el control biológico contra *Haemonchus contortus*. El objetivo fue identificar, purificar y caracterizar al menos una proteasa extracelular de *A. musiformis* con actividad *in vitro* contra larvas 3 (L₃) de *H. contortus*. Se recolectaron muestras (materia orgánica en descomposición, tierra y heces de rumiantes (bovinos y ovinos) y de cerdos) de algunas entidades federativas de la República Mexicana para identificar, aislar y purificar *A. musiformis*. Una vez identificado el hongo, se realizaron pruebas de atrapamiento contra L₃ de *H. contortus*. Para la obtención de proteasas se empleó el medio líquido, con incubación de dos semanas. Posteriormente, el medio se filtró, se descartó el micelio y se realizaron bioensayos para determinar la actividad nematocida contra L₃ de *H. contortus*. El medio líquido se pasó a través de una cromatografía de intercambio iónico seguido de una cromatografía de interacción hidrofóbica. Se colectaron las fracciones con actividad proteolítica, se concentraron y se establecieron las condiciones óptimas de la misma (temperatura, pH, inhibidores). *A. musiformis* fue colectado en Puebla y Veracruz, tuvo un porcentaje del 44% de atrapamiento contra L₃ de *H. contortus*. Se identificó actividad proteolítica en el medio líquido filtrado. Los concentrados obtenidos de las cromatografías de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica mostraron efecto nematocida del 85% y 77% de las L₃ de *H. contortus*, a las 48 horas, hubo diferencia con el testigo (medio sin hongo). Existe al menos hay una proteasa extracelular con actividad con gelatina y albúmina. La actividad proteolítica fue mayor en pH 8/37°C. El fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) inhibió la actividad por lo que puede tratarse de proteasas dependientes de serina. El conocimiento de *A. musiformis*, permite que se cuente con información más precisa para un posible empleo como agente de control contra nematodos con alternativas que disminuyan los efectos adversos contra la salud animal, humana y ambiental.

Palabras clave: hongos nematófagos, nematodos gastrointestinales, proteasas.

Abstract

The nematophagous fungus *Arthrobotrys musiformis* is an alternative with potential for biological control against *Haemonchus contortus*. The objective was to identify, purify and characterize at least one extracellular protease of *A. musiformis* with *in vitro* activity against larvae 3 (L₃) of *H. contortus*. Samples (decaying organic matter, soil and feces of ruminants (cattle and sheep) and pigs) in some states of Mexico to identify, isolate and purify *A. musiformis* were collected. Having identified the fungus, entrapment tests against *H. contortus* L₃ were performed. To obtain proteases, the fungus was cultured in liquid medium with two-week incubation. Subsequently, the medium was filtered, the mycelium was discarded and bioassays were conducted to determine the nematicidal activity against L₃ of *H. contortus*. The liquid medium is passed through an ion exchange chromatography followed by hydrophobic interaction chromatography. Fractions with proteolytic activity were collected, concentrated and optimal conditions (temperature, pH, inhibitors) were established. *A. musiformis* was collected in Puebla and Veracruz, had a percentage of 44% of entrapment against L₃ of *H. contortus*. Proteolytic activity was identified in the liquid medium filter. Concentrates obtained from ion exchange chromatography and hydrophobic interaction nematicidal showed 85% and 77% of L₃ of *H. contortus*, at 48 hours, there was difference from the control (medium without fungus). There was at least an extracellular protease activity with gelatin and albumin. Proteolytic activity was highest at pH 8/37°C. The phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) inhibited the activity of which can be dependent serine proteases. The knowledge of *A. musiformis*, allowed to count more accurate information for possible use as a control agent against nematodes with alternatives that reduce the adverse effects against the animal, human and environmental health.

Key words: nematophagous fungi, gastrointestinal nematodes, proteases.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	16
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE LA OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE AL MENOS UNA PROTEASA DE <i>Arthrobotrys</i> <i>musiformis</i>	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSIÓN.....	43
6. CONCLUSIONES.....	48
7. LITERATURA CITADA.....	49
8. APÉNDICE 1.....	61
9. APÉNDICE 2.....	67

Índice de Abreviaturas

A. musiformis: *Arthrobotrys musiformis*

c/n: con nematodos

BSA: Albúmina de suero bovino

CEIEGT: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical

CEIEPASP: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo-Pastoril

CENID-PAVET: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria-Parasitología Veterinaria

EDTA: ácido etilaminotetraacético

E-64: *N*-[*N*-(*L*-3-*trans*-carboxirano-2-carbonil)-*L*-leucil]-agmatina; [1-[*N*-[(*L*-3-*trans*-carboxioxirano-2-carboniyl)-*L*-leucil]amino]-4-guanidinobutano]: inhibidor de proteasas dependientes de cisteína.

FES-Z: Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza

GS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con sustrato de gelatina

H. contortus: *Haemonchus contortus*

IH: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

II: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de intercambio iónico.

kDa: kilodaltones

K_m : concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_m

L₃: larvas 3

MF: medio líquido filtrado antes de pasar por la columna.

NGI: Nematodos gastrointestinales

PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

rpm: revoluciones por minuto

s/n: sin nematodos

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TCA: ácido tricloroacético

UAS: Universidad Autónoma de Sinaloa

V_m : valor máximo al que tiende la curva experimental

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. *Arthrobotrys musiformis* identificado en muestras recolectadas en distintas los estados de Puebla y Veracruz, México.

Cuadro 2. Actividad nematocida medida a través de las medias marginales de los productos extracelulares del cultivo en medio líquido de *Arthrobotrys musiformis*.

Literales distintas dentro de columnas indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.002$.

Cuadro 3. Actividad proteolítica de los productos extracelulares de *Arthrobotrys musiformis* registrada a las 72 h.

Cuadro 4. Especies de hongos nematófagos aislados en distintas entidades federativas de México.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema y fotografía del ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Figura 2. Microfotografías de *Arthrobotrys musiformis* que muestran los conidios (A) (40X) y anillos atrapando a nematodos (B) (10X). Microscopia de luz.

Figura 3. Representación fotográfica del ciclo biológico de *Arthrobotrys musiformis*. *A. musiformis* es un hongo saprobio que en presencia de nematodos desarrolla anillos y redes para capturarlos y alimentarse de ellos.

Figura 4. Sitios de recolecta de muestras de tierra, heces y materia en descomposición. Mapa tomado de INEGI. <http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/nacional.aspx?tema=M>

Figura 5. Microfotografías de *Arthrobotrys musiformis* (40X) que muestran conidios, clamidospora y un anillo. Microscopía de luz.

Figura 6. Porcentaje de atrapamiento de distintas especies de hongos nematófagos después de cinco días de incubación con L₃ de *Haemonchus contortus*. 1: Testigo, 2: *Arthrobotrys brochophaga*, 3: *Microsporium gephyropagum*; 4: *Arthrobotrys musiformis*; 5: *Arthrobotrys kirghizica*; 6: *Arthrobotrys oligospora*; 7: *Arthrobotrys conoides*.

Figura 7. Fotografías que muestran la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* crecido en A: medio líquido. B: medio agar-agua. C: medio papa dextrosa agar, a temperatura ambiente, en ausencia (s/n) o en presencia de nematodos (c/n). La corrida se detuvo hasta que el frente llegó al borde del gel. Las zonas claras en cada gel indican actividad proteolítica (proteólisis de la gelatina).

Figura 8. Microfotografías que muestran larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* expuestos a A: medio líquido sin hongo. B: medio filtrado. Microscopía de luz.

Figura 9. Mortalidad de larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* expuestas a distintos tratamientos: Testigo; MF: medio líquido filtrado antes de pasar por la columna. II: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de intercambio iónico. IH: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Hubo diferencia estadística (P=0.002) entre el número de larvas muertas en el testigo con los demás tratamientos a las 24 y 48 h.

Figura 10. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* cultivado en medio líquido. T: testigo (medio sin hongo). MF: medio filtrado. II: fracción concentrada de la cromatografía de intercambio iónico. 1-4: fracciones colectadas de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Figura 11. Cursos temporales de la actividad proteolítica de la fracción eluida de la cromatografía de interacción hidrofóbica del cultivo de *Arthrobotrys musiformis* en medio líquido. A: Albúmina (200 μ M). B: Gelatina (1%).

Figura 12. Cinética de saturación de la proteasa extracelular de *Arthrobotrys musiformis* con albúmina bovina como sustrato. Cada punto representa el promedio de tres experimentos. La línea continua muestra el ajuste obtenido mediante regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

Figura 13. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* después de dos cromatografías (columna de intercambio iónico e hidrofóbica) empleando albúmina de suero bovino como sustrato (500 μ M) en diferentes temperaturas. Cada punto es resultado de tres repeticiones por triplicado.

Figura 14. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* después de dos cromatografías (columna de intercambio iónico e hidrofóbica) empleando albúmina de suero bovino como sustrato (500 μ M) en diferente pH a 37°C. Cada punto es resultado de tres repeticiones por triplicado.

Figura 15. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* cultivado en medio líquido en presencia de inhibidores. FC: fracción eluida y concentrada sin inhibidores. PMSF (Fenilmetil-sulfonil-fluoruro) específico de serinas proteasas. E-64, específico de cisteína proteasas. EDTA (ácido etilaminotetraacético) para identificar metaloproteasas.

Figura 16. *Arthrobotrys oligospora*. A: conidios (40X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* atrapada (40X). Microscopía de luz.

Figura 17. *Arthrobotrys kirghizica*. A: conidios (40X). B. Red tridimensional (10x). Microscopía de luz.

Figura 18. *Arthrobotrys brochopaga* A: conidios, anillos constrictores (10X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* (40X). Microscopía de luz.

Figura 19. *Monacrosporium gephyropagum* A: conidios (40X). B: Red escaleriforme (40X).
Microscopía de luz.

Figura 20. *Arthrobotrys superba* conidios (40X). Microscopía de luz.

Figura 21. *Arthrobotrys conoides* A: conidios (40X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* (10X). Microscopía de luz.

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (NGI) tienen gran relevancia económica, ya que son responsables de la disminución en la producción en bovinos, ovinos y caprinos en pastoreo, especialmente en los trópicos y en zonas templadas, donde las condiciones ambientales favorecen su proliferación, (Waller y Chandrawathani, 2005).

En México, como en otros países del mundo, los NGI son el mayor problema de salud para los ovinos, ya que deterioran la calidad de vida del animal y provocan pérdidas económicas considerables. En especial *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) que es el parásito más prevalente y con mayor importancia económica en México (García, 2003). La prevalencia de los nematodos se incrementa por las condiciones ambientales y de manejo zootécnico, por lo que las pérdidas son consecuencia de un proceso epidemiológico previo, favorecido por el sistema de manejo, que determina el aumento o disminución de las posibilidades de infección (Nari y Fiel, 1994).

Descripción de *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803).

La clasificación taxonómica de *Haemonchus contortus* (según Anderson, 2000) es la siguiente:

Reino Animal
 Phylum Nematoda
 Orden Strongylida
 Superfamilia Trichostrongyloidea
 Familia Trichostrongylidae
 Género *Haemonchus*
 Especie *H. contortus*

El nombre de *Haemonchus contortus* (del griego haima: sangre y oncos: gancho; del latín contortus: retorcido) hace referencia al aparato genital femenino de color blanco enrollado en torno al intestino rojizo, lo que ha hecho que se le denomine en lengua

inglesa como palo de barbero. La cavidad bucal es pequeña, tiene tres labios inconspicuos, posee un diente delgado o lanceta, presenta papilas cervicales, son prominentes y parecidas a espinas. Los machos adultos miden de 10 a 20 mm de longitud y las hembras hasta 30 mm. Los huevos son elípticos, regulares y anchos, contienen blastómeros, miden 74 por 44 μm (Thienpont *et al.*, 1979). Las larvas en estadio 3 (L_3) son delgadas, miden de 630 a 790 μm ; el esófago mide menos de un cuarto de la longitud corporal, la vaina es de tamaño medio, afilada en punta y frecuentemente tiene una curvatura ligera parecida a una bayoneta, en promedio hay una distancia de 70 μm entre la cola y la vaina (Niec 1968).

En el ciclo biológico de *H. contortus* los parásitos adultos se localizan en el abomaso, se reproducen y los huevos salen en las heces del huésped infectado; en el ambiente externo, en 24 horas a 22 - 26°C, el embrión se desarrolla a larva 1 (L_1) y eclosiona. La L_1 se convierte en L_2 ésta crece y se desarrolla a L_3 que es la etapa infectiva. Las L_3 no se alimentan, pero subsisten de las reservas almacenadas en las células intestinales, son muy activas y se desplazan verticalmente en la superficie húmeda de los pastos, mostrando termotropismo e higrotropismo positivo, así como geotropismo y fototropismo negativo. La combinación de estos tropismos hace que las L_3 suban a la punta del pasto cuando hay rocío, lo que favorece la ingestión de las larvas por los ovinos que pastan (Quiroz 1999).

Los ovinos se infectan al ingerir pastura contaminada con L_3 , por lo que el número de larvas ingeridas es proporcional a la cantidad de alimento consumido (Gray, 1995). Las L_3 son deglutidas, se desenvainan en el rumen, después pasan al abomaso y se sitúan cerca de las glándulas, en donde mudan dos veces y alcanzan la fase de adultos: hembras y machos (Figura 1).

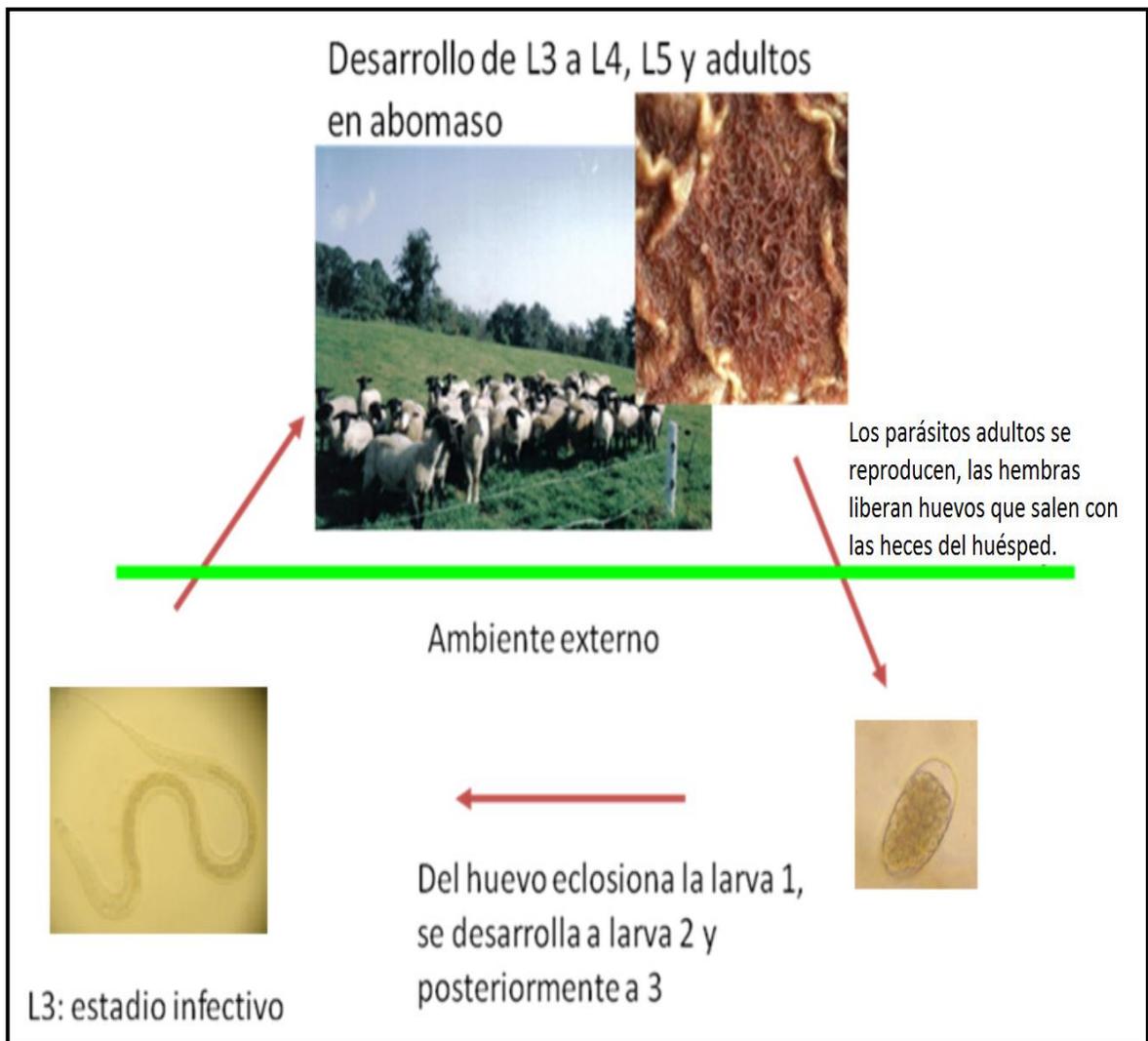


Figura 1. Esquema y fotografía del ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Superficie corporal: cutícula de *H. contortus*

Los nematodos establecen contacto con el medio que lo rodea en primera instancia con la parte más externa de su cuerpo: su cutícula. La cutícula de los nematodos es una estructura compleja formada por una capa no celular producida por la hipodermis, compuesta principalmente de cuticlina (Fujimoto *et al.*, 1973), queratina, colágena y fibras que corren diagonalmente en direcciones opuestas una de otra. La cuticlina con un peso de aproximadamente 40 kDa (Sebastiano *et al.*, 1991) tiene composición de aminoácidos y un patrón de difracción de rayos X diferente a las colágenas cuticulares, además presenta

una cantidad significativa de enlaces cruzados de ditirosina y puentes disulfuro (Betschart *et al.*, 1990). La cutícula también posee carbohidratos, la parte más externa llamada epicutícula está cubierta de una vaina o llamada glicocálix que contiene glicoproteínas. La superficie tiene carga negativa y contiene residuos de azúcares. La cutícula en su mayor parte está compuesta por proteínas del tipo de las colágenas. Las colágenas son una familia heterogénea de proteínas fibrosas estructurales con un arreglo estructural de triple hélice formada por cadenas peptídicas con una secuencia repetida $(\text{Gly-X-Y})_n$ donde X y Y pueden ser prolina o hidroxiprolina. En L_3 de *H. contortus*, se identificaron colágenas de 108, 88 y 53 kDa. Asimismo hay proteínas en la epicutícula que no han sido identificadas. En *Panagrellus redivivus* se han identificado manosa/glucosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina como receptores a lectinas además de la presencia de ácido siálico (Tunlid *et al.*, 1992).

Control parasitario

El control de los NGI se basa en el uso de una estrategia química terapéutica que se puede complementar con prácticas de pastoreo y otras alternativas de manejo. El uso periódico de antihelmínticos disminuye el parasitismo masivo y previene la muerte a los animales más afectados, pero no previenen reinfecciones. Los antihelmínticos de amplio espectro disponibles contra NGI son los bencimidazoles, tetrahidropirimidinas, salicilanilidas, organofosforados y lactonas macrocíclicas (López-Arellano, 2010). Sin embargo, el uso frecuente de antihelmínticos, el uso irracional de las drogas, la administración de dosis subterapéuticas y periodos de aplicación cortos, así como a la escasa alternancia de fármacos de distinta familia conlleva a que se presenten parásitos resistentes a los antiparasitarios nuevos (Coop y Kyriazakis, 2001; Torres *et al.*, 2003). El primer caso de resistencia a tiabendazol se describió en 1968, al levamisol en 1975 y a las ivermectinas en 1985 (Gray, 1995). Actualmente hay poblaciones de *H. contortus*

resistentes a bencimidazoles, imidazotiasoles y lactonas macrocíclicas en especial a la ivermectina (Aumont, 1995; Coronado *et al.*, 2003).

En México se han registrado casos de *H. contortus* resistentes a los bencimidazoles (Campos *et al.*, 1992; Figueroa *et al.*, 2000; García, 2003; Torres *et al.*, 2003) y a la ivermectina (Montalvo *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003; Encalada *et al.*, 2008; Torres-Acosta *et al.*, 2012).

Otro efecto importante del uso de antihelmínticos sintéticos, además de la toxicidad en los animales, es el efecto económico indirecto que ocasionan, por el periodo de retiro de la carne y de la leche, y la ecotoxicidad (Beynon, 2012). La OMS en el 2000 y la FAO en el 2001 confirmaron el impacto de la ivermectina sobre productos de origen animal y al ambiente. Algunas lactonas macrocíclicas como la ivermectina, doramectina y abamectina causan daño al ambiente a través de su excreción directa en las heces y orina de los animales tratados, y por la eliminación inadecuada de frascos vacíos, porque impactan en poblaciones de insectos coprófagos, lombrices de tierra, en el ecosistema de pastizal y factores edáficos, incluso en ecosistemas acuícolas (Webb *et al.*, 2007; Kolar *et al.*, 2008; Martínez y Cruz, 2009; Aparicio-Medina *et al.*, 2011). Si la carne o subproductos de animales tratados con ivermectina llega a ser consumida por el ser humano, suele constituirse un problema de salud pública ya que la ingestión prolongada puede producir efectos tóxicos relacionados con el sistema nervioso, coma y muerte (Yang, 2012).

El reto radica en encontrar estrategias de control que permitan una combinación del uso prudente de los antiparasitarios disponibles, combinado con estrategias no químicas, alternativas de control como el empleo de hongos nematófagos, que aseguren mantener las poblaciones parasitarias bajas, que no produzcan residuos en carne y leche y que tengan un mínimo impacto ambiental.

Medidas complementarias para el control de nematodos gastrointestinales (NGI)

Para combatir a los NGI se han desarrollado medidas complementarias como son el pastoreo rotacional, el mejoramiento nutricional, el empleo de plantas con propiedades antihelmínticas e incluso el control biológico.

La rotación de praderas es una medida complementaria del control parasitario ya que mantiene en niveles bajos las cantidades de larvas en la pastura (Niezen *et al.*, 1998) lo que permite que haya una contaminación ligera de formas infectantes, así disminuye la densidad y como consecuencia hay una diversidad menor de larvas en comparación con áreas de libre pastoreo (Villegas, 1986; Morales y Pino, 2004).

Otra opción es el pastoreo mixto entre distintos tipos de rumiantes, particularmente de bovinos y ovinos. Además del mejor aprovechamiento del recurso forrajero, el pastoreo mixto favorece una disminución de la contaminación con larvas infectantes de NGI en la pradera reduciendo el riesgo de adquisición de estos parásitos por parte de los ovinos (Cuéllar, 2007).

El sulfato de cobre se empleó para el control de los NGI; las partículas o agujas de óxido de Cu^{2+} , son colocadas en cápsulas de gelatina y administradas por vía oral, pasan a través del rumen y se alojan en los pliegues del abomaso donde liberan los iones de Cu^{2+} , los cuales tiene efecto antiparasitario (Waller *et al.*, 2004). En ovinos y cabras se ha registrado una reducción alta (>90%) contra *H. contortus*. Las agujas de óxido de Cu^{2+} , pueden representar una opción estratégica para el control de los NGI que permite reducir las pérdidas causadas, especialmente cuando se asocia a otro tipo de control. La gran desventaja de este método alternativo es que es necesario determinar el efecto de las dosis repetidas de agujas de Cu^{2+} , sobre el estado de salud de los ovinos con el fin de prevenir intoxicaciones debido a que esta especie es muy susceptible a la intoxicación crónica por Cu^{2+} (Cuéllar, 2007).

Por otra parte, desde hace muchos años se han empleado los recursos vegetales que cada población tiene para obtener plantas con actividad antihelmíntica. El uso de plantas que contienen compuestos bioactivos para el control de helmintos del tracto digestivo y las opciones fitoterapéuticas y nutricionales han sido motivo de control en los años recientes. La mayoría de los datos disponibles se refieren a trabajos *in vitro*, y aún no se conoce la biodisponibilidad en animales parasitados. En general, los compuestos vegetales han mostrado una baja eficacia y difícilmente igualan a los antihelmínticos sintéticos disponibles. Entre los principios activos de algunas plantas, se han identificado enzimas (cisteína proteasas) y metabolitos secundarios como alcaloides, glicósidos y taninos; por ejemplo, los extractos de pino y castaña tienen efecto (90%) sobre el desenvainamiento de L₃ de *H. contortus*. Se notificó que se evaluaron diferentes esquemas de aplicación de tres plantas (*Zanthoxylum zanthoxyloides*; *Newbouldia lawei*, *Carica papaya*) en ovejas infectadas con NGI y se obtuvo del 87% - 95% de reducción en la eliminación de huevos (Cuéllar, 2007).

En un trabajo de campo en México, se evaluó el efecto de extractos de plantas medicinales (estafiate, epazote, semilla de calabaza, semilla de papaya y ajo) en ovinos infectados con NGI y obtuvieron una acción antiparasitaria muy variable y con eficacias de moderadas a bajas (Hernández y López, 2000).

Se demostró que *Lysiloma latisiliquum* afectó la longitud y fertilidad de las hembras de *H. contortus*. *Schinopsis spp.* disminuyó la población de *H. contortus* y *T. colubriformis* y fecundidad de *T. colubriformis* además *Onobrychis viciifolia* afectó la fecundidad de *H. contortus* (Martínez-Ortiz de Montellano, 2010). Los efectos de los taninos condensados de *Onobrychis viciifolia*, *Lotus pedunculatus* y *L. corniculatus* fueron probados *in vitro* contra otros tricostrongilidos como *Cooperia oncophora* y *Ostertagia ostertagi* con buenos resultados (Martínez-Ortiz de Montellano *et al.*, 2013) y el extracto acuoso de *Ananas comosus* disminuyó un 42% el conteo de huevos de *H. contortus* (Domingues *et al.*, 2013).

Por otra parte, el control biológico, es decir, el empleo de organismos vivos ha recibido atención, entre los agentes potenciales se encuentran virus, bacterias, protozoarios y el grupo más prometedor que son los hongos. Por ejemplo, los hongos de los géneros *Arthrobotrys sp.*, *Monacrosporium sp.* y *Duddingtonia flagrans* se alimentan de larvas de nematodos recién eclosionadas, por lo que son buenos candidatos para el control de las larvas de NGI en su etapa de vida libre (Mendoza y Valero, 2009).

Antecedentes del empleo de hongos nematófagos

El control de nematodos parásitos de animales y de plantas se ha concentrado en el grupo de los *Ascomycetes* ya que son saprobios y solo son depredadores facultativos cuando crecen en condiciones *in vitro*; así que para que muestren esta condición el medio de cultivo debe ser pobre en nutrientes. Además, de que presentan esa capacidad nematocida, tienen la característica de que pueden resistir el estrés del paso a través del tracto digestivo (Waller y Larsen, 1993). Se ha demostrado que no tienen efecto tóxico en los animales, también pueden tener efecto contra las especies no blanco, como nematodos de vida libre, pero solamente cuando las concentraciones de clamidosporas son elevadas (Paraud *et al.*, 2012).

Los hongos nematófagos se caracterizan por la capacidad de capturar y utilizar a los nematodos como fuente de alimento principal o complementario a su existencia saprofita. En este sentido, los hongos depredadores producen estructuras atrapadoras de nematodos sobre el micelio (asas o anillos adhesivos), con las cuales capturan e inmovilizan a los nematodos, penetran en el cuerpo y finalmente consumen el contenido (Mendoza de Gives y Torres-Acosta, 2012).

Los primeros estudios sobre el empleo de los hongos nematófagos como control contra NGI se realizaron en 1939 con el hongo *Dactylella ellipsozona* que exhibió

actividad nematofaga contra *Strongyloides sp.* y *Ancylostoma* (Waller y Larsen, 1993). Desde entonces se han realizado múltiples estudios con resultados exitosos contra los estados de vida libre de nematodos parásitos bajo condiciones experimentales, seminaturales y naturales empleando hongos de los géneros *Arthrobotrys*, *Trichotecium*, *Dactylaria*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium* en contra de NGI como *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia*, *Nematodirus spp.*, *Strongyloides sp.* y *Oesophagostomum spp.* (Nansen et al., 1988).

La eficacia de los hongos nematófagos se ha demostrado en la reducción de larvas de nematodos gastrointestinales en ovinos en cultivos fecales en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Kahn et al., 2007; Fontenot et al., 2003; Larsen, 2006; Waller et al., 2006; Gómez-Rincón et al., 2006; Paraud y Chartier, 2003; Paraud et al., 2006).

En años recientes se ha puesto atención en *A. musiformis* porque tiene la capacidad de superar el estrés del tracto gastrointestinal en terneros y mantiene sus cualidades nematófagas contra larvas de *H. contortus* (Saumell et al., 2008).

***Arthrobotrys musiformis*: candidato con potencial para su uso contra *Haemonchus contortus*.**

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Orbiliomycetes

Orden: Orbiliales

Familia: Orbiliaceae

Género: *Arthrobotrys*

Especie: *A. musiformis*

Arthrobotrys musiformis Dreschler 1937

Es un hongo nematófago con conidióforos erectos hasta de 900 μm de longitud, proliferan subapicalmente hasta 12 veces para producir un sistema de enramamiento candelabriforme, cada rama tiene un conidio terminal. Los conidios son elongados obovoidales a elipsoidales, ligeramente curvos con un septo ligeramente arriba de la mitad; miden 19.0-42.5 x 7-14 μm . Hay presencia de clamidosporas. El atrapamiento de los nematodos se da mediante anillos y redes adhesivas (Figura 2) (Van Oorschot, 1985).

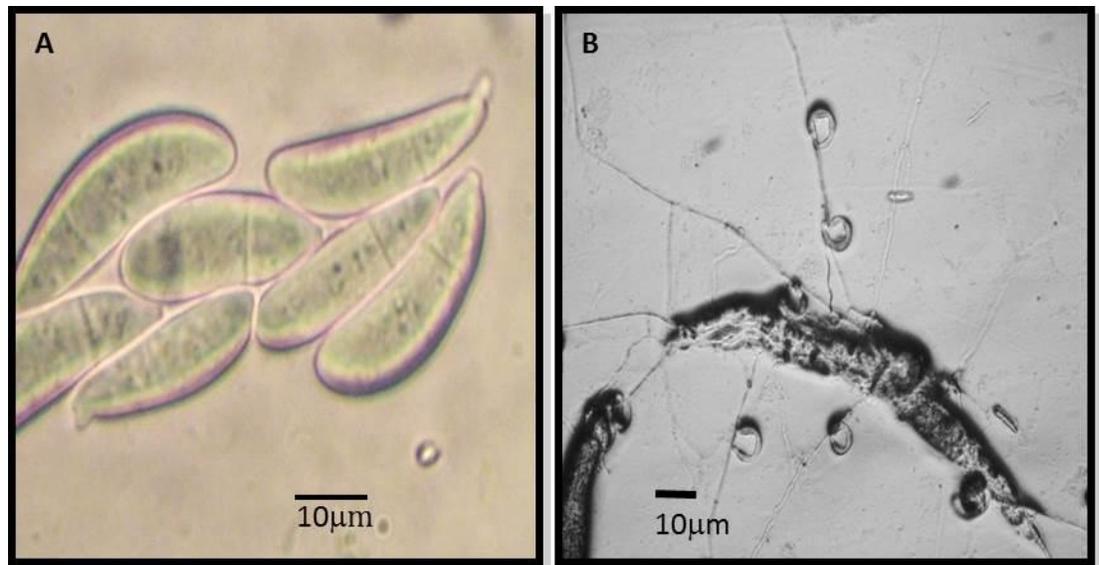


Figura 2. Microfotografías de *Arthrobotrys musiformis* que muestran los conidios (A) (40X) y anillos atrapando a nematodos (B) (10X). Microscopia de luz.

El ciclo biológico de *A. musiformis* se inicia cuando las esporas o conidios germinan y producen hifas, que a su vez forman el micelio. En dicho micelio se forman los conidióforos que producen nuevamente conidios. Sólo cuando entran en contacto con nematodos, las células del micelio se diferencian y empiezan a formar redes adhesivas (Figura 3). Las clamidosporas son estructuras de resistencia por lo que una vez que se forman pueden resistir condiciones adversas en estado de latencia hasta que las condiciones favorables permitan la germinación de las mismas (Herrera y Ulloa, 1998).

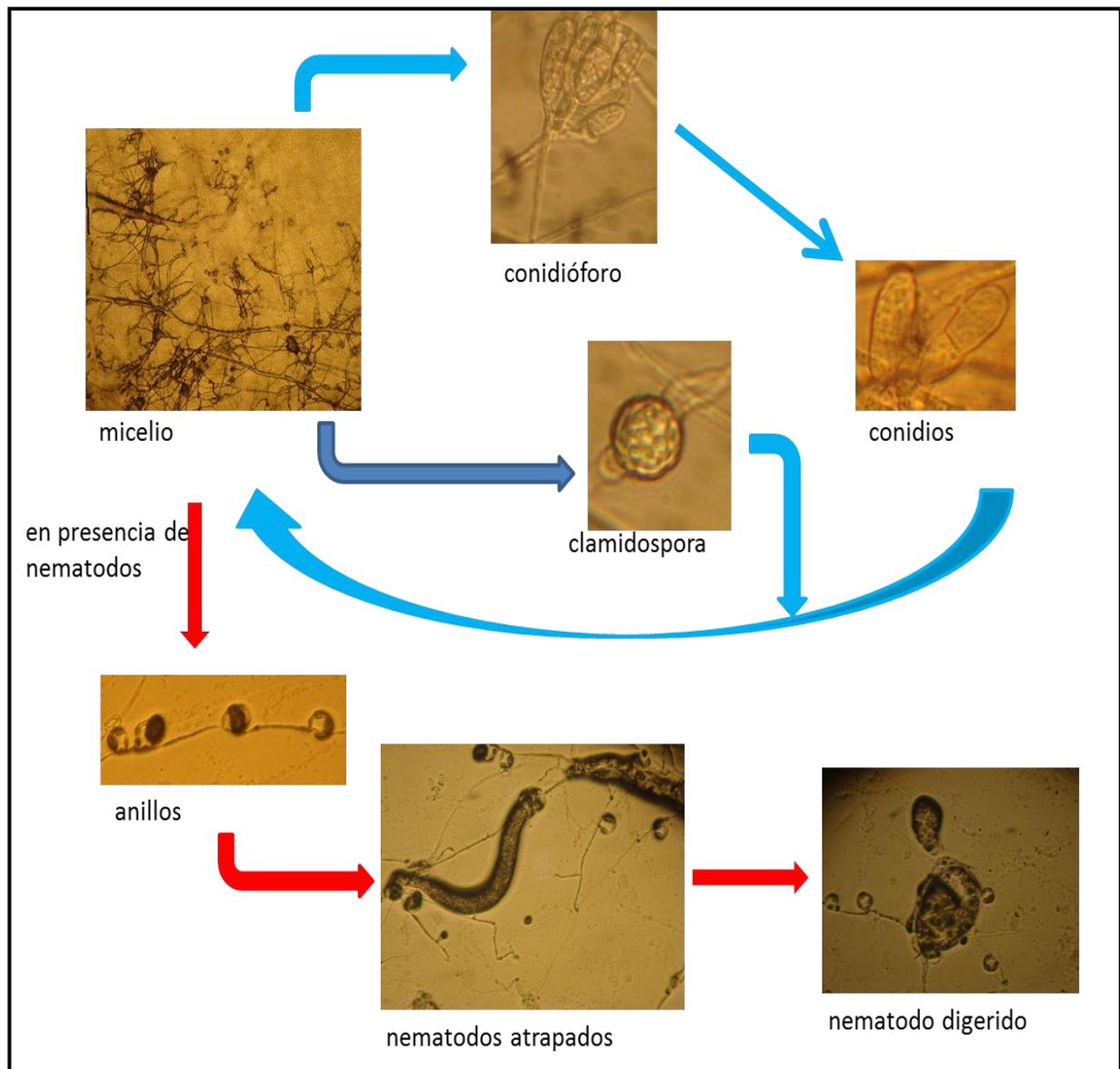


Figura 3. Representación fotográfica del ciclo biológico de *Arthrobotrys musiformis*. *A. musiformis* es un hongo saprobio que en presencia de nematodos desarrolla anillos y redes para capturarlos y alimentarse de ellos.

A. musiformis es un hongo saprobio y depredador facultativo de nematodos, por lo que es un candidato potencial como agente de control biológico indirecto, puesto que disminuye el número de larvas en las pasturas. Se ha demostrado la sobrevivencia y actividad depredadora de este hongo después de atravesar el tracto gastrointestinal de

ovinos (Gronvold, *et al.*, 1996; Graminha *et al.*, 2005a). Las pruebas *in vitro* demostraron una actividad nematófaga del 73.7% en L₃ de tricostrongilidos. Dicho hongo fue reaislado de las heces de ovinos, después de la administración de conidios en microcápsulas o en forma líquida; lo que se sugiere que esta especie es una alternativa promisoriosa para el control de los nematodos en ovejas ya que sobrevive sin protección alguna. En un estudio posterior, donde se suministró el hongo en dosis de 2×10^6 conidios/semana se confirmó la viabilidad del mismo (95,5%) después del paso de tracto gastrointestinal de ovinos. Los conidios favorecieron la reducción de *Trichostrongylus colubriformis*, reduciendo la tasa de infección de los animales y las formas inmaduras (L₄) de *H. contortus* (Graminha *et al.*, 2005b).

Mecanismo de acción nematocida de *A. musiformis*. Cutícula del nematodo y enzimas proteolíticas

Los hongos nematófagos se caracterizan por la capacidad de capturar y utilizar a los nematodos como fuente de alimento principal o complementario a su existencia saprofita. Este tipo de hongos depredadores producen estructuras atrapadoras de nematodos a partir del micelio (asas o anillos adhesivos), con las cuales capturan e inmovilizan a los nematodos, penetran en el cuerpo y finalmente consumen el contenido (Waller y Larsen, 1993). La invasión de los hongos nematófagos involucra el rompimiento de la capa externa del nematodo, ya sea por medios mecánicos o enzimáticos.

La complejidad de la cutícula sugiere que la penetración requiere de la sinergia de varias enzimas diferentes (Huang *et al.*, 2004). Algunos hongos nematófagos como *A. oligospora* secretan sustancias nematotóxicas que paralizan a los nematodos lo que permite que sean capturados e invadidos. Entre esos compuestos nematotóxicos están las proteínas subtilisinas de la familia de las serina-proteasas (Ahman *et al.*, 2002). En la primera etapa de la infección de nematodos por el hongo nematófago, la penetración de la superficie (cutícula) es consecuencia de la combinación de actividad mecánica y enzimas

hidrolíticas; se han detectado fosfatasa alcalinas y ácidas en el sitio de contacto entre el hongo *A. oligospora* y la cutícula del nematodo *P. redivivus*, lo que sugiere que en la invasión a la cutícula están involucradas estas enzimas hidrolíticas (Huang *et al.*, 2004).

Existen además enzimas extracelulares que degradan la colágena. Se han descrito varias proteasas (de la familia de las serina-proteasas), así como proteasas parecidas a quimiotripsinas, quitinasas y colagenasas involucradas en la infección de los nematodos. Las serinas proteasas extracelulares pueden destruir la integridad de la cutícula y facilitar la penetración y son fundamentales para el desarrollo de las trampas de hongos nematófagos. De algunos hongos nematófagos varias enzimas han sido parcialmente caracterizadas, pero todavía faltan muchas por conocer (Áhman *et al.*, 2002; Mendoza de Gives *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007b).

La especie *A. musiformis* desarrolla redes tridimensionales con las cuales captura a los nematodos. Araújo *et al.*, (1997) analizaron enzimas de importancia taxonómica de *A. musiformis* y demostraron la presencia de α -esterasa, fumarasa, hexocinasa, isocitrato deshidrogenasa, leucina aminopeptidasa, malato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa y fosfogluoisomerasa. Aún no se han descrito enzimas secretadas por *A. musiformis* que participen en la ruptura de la cutícula de los nematodos, por lo que es conveniente conocer el mecanismo enzimático que interviene en la acción nematicida contra larvas 3 de *H. contortus*.

Este hongo posee redes tridimensionales con las que captura a los nematodos; sin embargo, se desconoce el mecanismo bioquímico responsable del procesamiento del nematodo, *H. contortus* cuya cutícula está compuesta principalmente por colágena. En el caso particular el hongo debe tener un mecanismo que le permita degradar esta cutícula y acceder a los tejidos blandos del nematodo para ser utilizados como nutrientes.

Estudios sobre *Arthrobotrys musiformis* en México

México es uno de los países con mayor diversidad biológica, lo que abre la posibilidad de que gran parte de los seres vivos que aquí se encuentran puedan ser aprovechados en beneficio del hombre. Los hongos nematófagos podrían emplearse para controlar NGI en rumiantes para disminuir el uso de tratamientos químicos.

Aún se conocen pocas especies que podrían ser candidatas para el control de los NGI, en particular de *H. contortus*, por ello es fundamental realizar estudios en el país que permitan identificar *A. musiformis* y realizar un análisis en el cual se identifiquen componentes extracelulares como las proteasas que pudieran tener un impacto potencial para el control de estas parasitosis.

En México, *A. musiformis* se ha identificado en dos regiones (Jiutepec y Cuernavaca) en el Estado de Morelos (Valero, 2006; Alfaro, 2008) y en el Estado de Colima. En suelos cultivados con pepino, café y limón (Cruz, 2006). Se reportó la reducción del 97% de L₃ y del 73.2% de L₄ de *H. contortus* expuestas a *A. musiformis* (Alfaro, 2008). *A. musiformis* fue cultivado en varios medios líquidos sin y con la incorporación de nematodos. Posteriormente, se colectó el líquido y se desechó el micelio. Dicho líquido fue filtrado y se evaluó la actividad nematicida contra L₃ *H. contortus*. La presencia de larvas en los medios de cultivo no influyó en la actividad nematicida, el filtrado de *A. musiformis*, en ausencia y presencia de nematodos produjo una mortalidad de 37 y 25% respectivamente (Valero, 2006).

Aún sabemos poco sobre la existencia de este hongo en nuestro país y sobre su mecanismo de acción sobre las larvas 3 de *H. contortus*.

JUSTIFICACIÓN

Los nematodos gastrointestinales causan pérdidas económicas considerables, el uso de antihelmínticos sintéticos ha sido la estrategia más empleada para combatirlos; sin embargo, ha surgido un grave problema a nivel mundial, ya que hay poblaciones de parásitos resistentes a los antihelmínticos, además tienen efectos colaterales en los ovinos y en la salud de los consumidores, por otra parte causan deterioro del ambiente, por ello es necesario buscar formas alternativas de control.

Arthrobotrys musiformis es un hongo nematófago que crece y ha sido identificado en diferentes regiones de México, se ha demostrado su capacidad para atrapar larvas de *H. contortus* por lo que es considerado como un candidato potencial a ser utilizado como control biológico del nematodo. Por otra parte, existen pocos estudios encaminados a investigar el mecanismo de acción nematocida del hongo; en dicho proceso la degradación de la cutícula del nematodo constituye la primera etapa, por lo que la identificación y caracterización de la(s) proteasa (s) involucrada(s) permitirán avanzar en el conocimiento del mismo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar, purificar y caracterizar al menos una proteasa extracelular de *Arthrobotrys musiformis* con actividad *in vitro* contra larvas 3 de *Haemonchus contortus*.

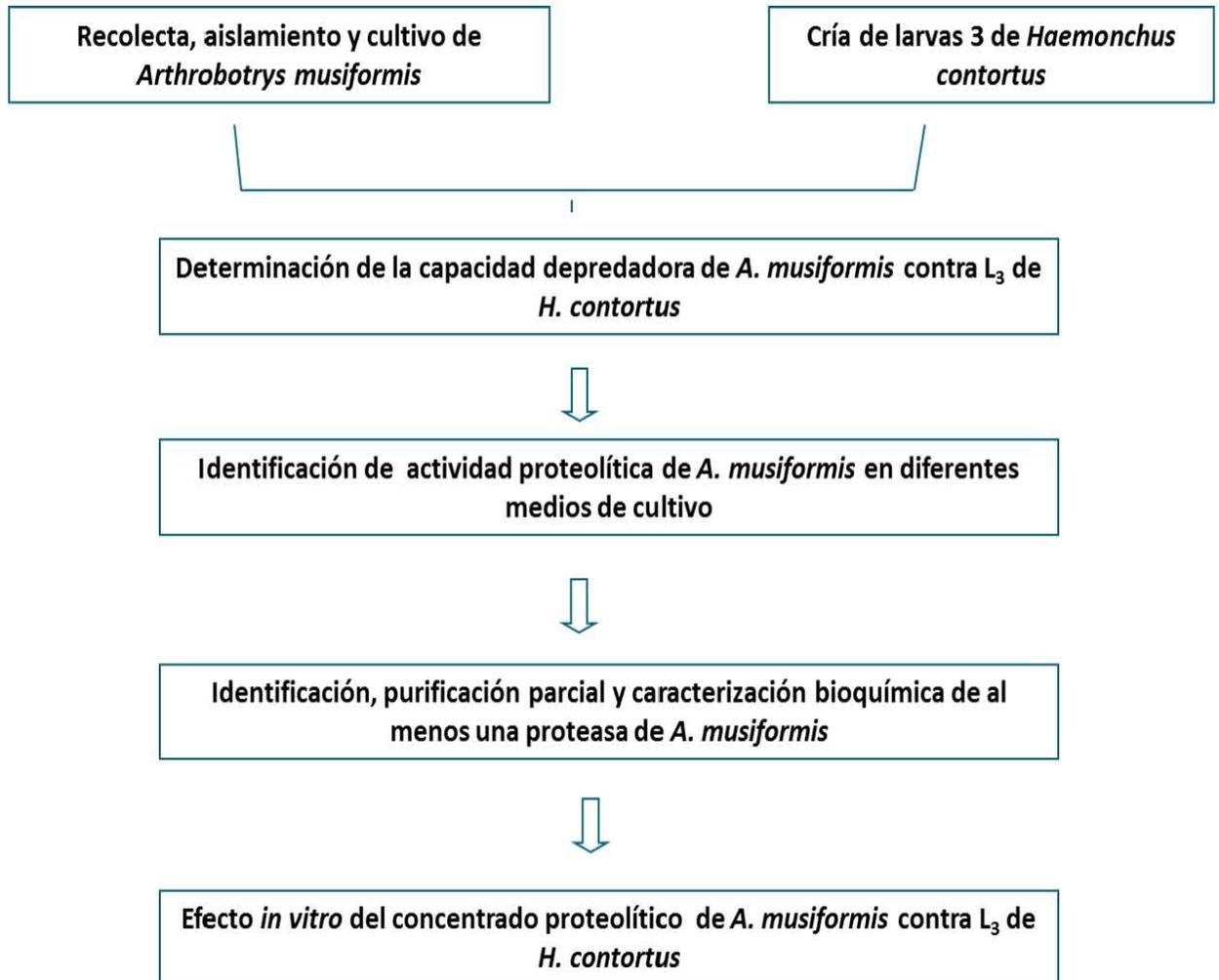
Objetivos específicos

- 1.- Aislar y cultivar el hongo nematófago *Arthrobotrys musiformis* a partir de diferentes sustratos recolectados en la República Mexicana.
- 2.- Detectar actividad proteolítica extracelular de *A. musiformis* en medios de cultivo.
- 3.- Probar la actividad nematocida *in vitro* de al menos una proteasa extracelular contra larvas 3 de *Haemonchus contortus*.
- 4.- Purificar y caracterizar bioquímicamente al menos una proteasa extracelular de *Arthrobotrys musiformis*.

HIPÓTESIS GENERAL

Arthrobotrys musiformis secreta al menos una proteasa extracelular involucrada en la degradación de la cutícula de los nematodos, por lo que es de esperarse que presente actividad nematocida *in vitro* contra larvas 3 de *H. contortus*.

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE LA OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE AL MENOS UNA PROTEASA DE *Arthrobotrys musiformis*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Recolecta, cultivo, aislamiento e identificación de especies de hongos nematófagos de varias regiones de México

3.1.1. Área de estudio.

Para obtener el hongo *Arthrobotrys musiformis* se recolectó tierra, materia orgánica en descomposición, raíces y heces de rumiantes (ovinos y bovinos) y cerdos, de distintas entidades federativas del país (Figura 4).



Figura 4. Sitios de recolecta de muestras de tierra, heces y materia en descomposición. Mapa tomado de INEGI. <http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/nacional.aspx?tema=M>

- 1) Instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria-Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET); localizado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, en el municipio de Jiutepec, Morelos. Jiutepec se ubica entre los paralelos 18° 53' N y 99° 10' O, a 1,350 msnm. El clima es subtropical caluroso con lluvias en verano, la temperatura promedio es de 21.2°C, su variante (máxima 31.4°C, mínima 10.8°C). Los meses más calurosos son abril y mayo y los más fríos diciembre y enero. Los más lluviosos son julio y agosto, con aproximadamente 80 días nublados al año. La precipitación media anual es de 1,021 mm (<http://www.municipiojiutepec.gob.mx>).
- 2) Campo Experimental “Las Margaritas” localizado en el municipio de Hueytamalco, Puebla. Su posición geográfica es 19° 51' 03" y 20° 12' 42" N y 97° 12' 48" y 97° 22' 42" O a una altura que oscila entre 250 y 1,700 msnm. Se presenta la transición de los climas templados de la Sierra Norte, a los cálidos del declive del Golfo. Se identifican dos climas: semicálido subhúmedo con lluvia todo el año, predominante se presenta en la zona Sur del Municipio y el clima cálido húmedo, con abundante lluvia en verano, se identifica en la zona Norte del Municipio. (http://www.emexico.gob.mx/work/EMM_1/Puebla/Mpios/21076a.htm).
- 3) Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo-Pastoril (CEIEPASP-UNAM), se localiza en el Km 68 de la carretera Atizapán-Jilotepec, en el municipio de Chapa de Mota, Edo de México.
- 4) Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT-UNAM), se localiza a una altura de 151 msnm, se ubica en el Km 5.5 de la Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan, Veracruz. El clima es cálido húmedo con una temperatura y precipitación media anual de 23.4°C y 1840 mm, respectivamente. Este campo está definido en términos agro ecológicos dentro de un bosque sub-tropical siempre verde, localizado en una zona de transición climática, entre la zona costera sub-húmeda (de menor precipitación) al oeste y la zona húmeda hacia la Sierra Madre Oriental, al este. (<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/localizacion.htm>).

- 5) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FMVZ-UAS), en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Culiacán se encuentra situado entre los 24° 02'10" y 25° 14'56" N y los 106° 56'50" y 107° 50'15" O a los 300 msnm. El clima es húmedo y caliente en el verano con lluvias, en invierno su temperatura hay escasas precipitaciones.
(<http://www.sinaloa.gob.mx/index.php/municipios/culiacan/informacion-general>).
- 6) Se recolectaron muestras de tierra de corrales de ovinos y heces de ovinos y bovinos de la localidad de Pozo de Balderas que está situado en el municipio de San Miguel de Allende, Guanajuato, a 20°54'51" N, 100°44'39" O a 1990 msnm (<http://mexico.pueblosamerica.com/i/pozo-de-balderas/>).
- 7) El sitio de recolecta realizado en varios corrales con ovinos del municipio de Ixmiquilpan, localizado en la parte central poniente del estado de Hidalgo, la cabecera municipal está situada geográficamente entre los 20° 92' y 20° 34' N y 98° 04' y 98°21' O. (<http://ixmiquilpan.hidalgo.gob.mx/index.php?option=content&task=view&id=23>).
- 8) Se recolectaron muestras de tierra y materia orgánica en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza ubicada en la Avenida Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente, Delegación Iztapalapa, y en las faldas del Ajusco, Delegación Tlalpan, en el Distrito Federal con coordenadas geográficas 18° 53' 32" N y 19° 20' 02" O con un clima Cw, templado húmedo con variantes (www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_108.pdf).

3.1.2. Muestreo de diferentes sustratos para el aislamiento de hongos nematófagos.

Las muestras consistentes en tierra, raíces y heces (de ovinos, bovinos y caprinos) fueron recolectadas individualmente en bolsas de plástico estériles, con su identificación respectiva. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento (Su *et al.*, 2007).

3.1.3. Aislamiento de *Arthrobotrys musiformis*.

Para aislar *A. musiformis* se empleó la técnica de espolvoreado. Se tomó una pizca de tierra entre los dedos (aproximadamente 1 g) y se espolvoreo sobre cajas Petri que contenían medio de cultivo agar-agua al 2% y cloramfenicol (500 mg/1 L), el inóculo se hizo por duplicado (Barron, 1977). A los siete días se adicionaron L₃ de *H. contortus* y se incubaron a temperatura ambiente (Wyborn *et al.*, 1969). A los 7, 14 y 28 días se analizó el sustrato bajo el microscopio estereoscópico para identificar material fúngico como conidióforos y nematodos atrapados por anillos o redes atrapadoras. Los conidios se recolectaron con agujas de disección modificadas y se sembraron en cajas de cultivo con agar-agua para promover la germinación y desarrollo del micelio.

3.1.4. Identificación taxonómica de hongos nematófagos.

Para obtener cultivos puros, libres de contaminantes, se hicieron pases subsecuentes de conidios a las cajas Petri con agua-agar hasta que el cultivo estuvo libre de contaminación con otros hongos. Se trabajó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. La identificación de los hongos se realizó empleando las claves de Cooke y Godfrey (1964) y Van Oorschot (1985).

3.1.5. Mantenimiento del cultivo de larvas infectivas (L₃) de *Haemonchus contortus* para el aislamiento de hongos nematófagos.

Para la obtención de larvas de *H. contortus*, se emplearon muestras fecales de un borrego previamente infectado con L₃ de *H. contortus*. Las heces se recolectaron y con ellas se hizo un coprocultivo, se incubó a 27°C durante 10-12 días. Posteriormente las larvas se concentraron mediante la técnica de Baermann (Hendrix, 1999) y se lavaron pasándolas por un gradiente con solución de sacarosa al 40% y se conservaron a 4°C.

3.1.6. Determinación de la capacidad atrapadora de *Arthrobotrys musiformis* contra larvas 3 de *Haemonchus contortus*.

Las muestras de *A. musiformis* se sembraron en medio agar-agua en cajas Petri de 60 mm de diámetro y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 semanas. Posteriormente, en cada caja se pusieron 100 L₃ de *H. contortus* aproximadamente y se incubaron por 5 días. Se realizaron diez repeticiones. Para el grupo control se prepararon diez cajas con agar-agua sin el hongo sólo con L₃.

En todos los casos, la superficie del agar de las cajas Petri se lavó con agua destilada y el líquido se colectó en tubos de ensayo, se refrigeraron a 4°C durante 2 horas para que las larvas migraran al fondo. Se desechó el volumen de los tubos y se ajustó el volumen a 2.0 mL. Se tomaron diez alícuotas de 20 µL y se cuantificó el número de larvas mediante el microscopio estereoscópico.

3.1.6.1 Análisis estadístico.

Se obtuvo el promedio y el porcentaje de larvas atrapadas en las redes y las que permanecieron libres (Nansen *et al.*, 1988). Se realizó una prueba de normalidad, debido a que los datos no se ajustaron a la normalidad, se hizo transformación logarítmica y se realizó la prueba no paramétrica U-Mann-Witney para identificar diferencia de atrapamiento entre especies (Conover, 1980).

3.2. Obtención de proteasas de *Arthrobotrys musiformis*

3.2.1. Cultivo de *Arthrobotrys musiformis*.

El hongo *A. musiformis* se sembró en diferentes medios para la producción de biomasa, para la obtención de las proteasas con efecto nematocida contra L₃ de *H. contortus*.

a) Se preparó medio líquido de sacarosa (Apéndice 2) en matraces llenos a la mitad de su capacidad. Un matraz permaneció únicamente con el medio líquido (testigo). A otros matraces con medio líquido, se les adicionó el contenido de una caja Petri con hongos de 3 semanas de crecimiento en PDA. Se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante durante 3 semanas, posteriormente a un matraz se le adicionaron 2500 nematodos/L y se incubaron por una semana más. Se separó el micelio y se colectó el líquido para concentrar las proteasas extracelulares (extracto líquido).

b) Se emplearon cajas Petri de 90 mm con medio agar- agua, el hongo se sembró y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 semanas. Posteriormente, a algunas cajas se les adicionaron aproximadamente 350 L₃ de *H. contortus* y se incubaron por una semana más. La superficie del agar se lavó con PBS y se raspó, todo el material colectado se centrifugó a 12,000 rpm durante 25 minutos (extracto crudo).

c) En cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) se sembró *A. musiformis* y se incubó a temperatura ambiente durante 3 semanas. La superficie de la caja Petri se raspó con una espátula, así, se colectó el micelio, se maceró en mortero con amortiguador de fosfatos (Tris-HCl 50 mM pH 7.8) con la finalidad de obtener proteasas extra e intracelulares, el homogeneizado resultante se centrifugó a 12,000 rpm durante 25 minutos y se colectó el sobrenadante (extracto crudo).

3.2.2. Identificación de la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis*.

A los tres extractos procedentes de los diferentes medios de cultivo se les saturó con sulfato de amonio al 85% en baño de hielo para precipitar las proteínas. La solución se centrifugó a 12000 rpm durante 25 minutos. La proteína precipitada se colectó y se resuspendió en una cantidad mínima de amortiguador, se dializó en Tris-HCl toda la noche a 4°C para eliminar el exceso de sales.

3.2.3. Actividad proteolítica de los cultivos de *Arthrobotrys musiformis*.

Para detectar la actividad proteolítica en el medio filtrado y durante el proceso de purificación, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (hidrolizado de la proteína colágena) como sustrato de las proteasas (GS-PAGE) (Tunlid y Jansson 1991). Brevemente, para GS-PAGE, se prepararon geles de poliacrilamida al 9% con gelatina al 1%. Las muestras fueron diluidas en un amortiguador semi-desnaturalizante (Tris-HCl 0.5 M, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.25%, SDS 4%) en proporción 4:1 (4 de muestra: 1 de amortiguador). Se incubaron a 37°C durante 20 min. La electroforesis se corrió en amortiguador Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.2 M, SDS 0.1% a 4°C a 15 mA hasta que el frente de la corrida llegó al borde del gel. Después se realizó la tinción con Azul de Coomassie R-250 y se destiñó con metanol (40%) -ácido acético (6%) - agua (Heussen y Dowdle, 1980; Naggie *et al.*, 1997; Ortiz-Alegría, 2008).

3.2.4. Selección del medio de cultivo para la obtención de proteasas.

Se seleccionó el medio líquido como fuente de proteasas ya que fue el cultivo en el que se registró un crecimiento más rápido del hongo y se detectó actividad proteolítica en el gel de gelatina. *A. musiformis* se sembró en el medio papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri de 90 mm de diámetro, durante 2 semanas a temperatura ambiente. El contenido de la caja se cortó en cm² y los cuadritos se colocaron en matraces con medio de sacarosa y se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante durante 2 semanas.

Posteriormente, se realizó un cultivo masivo del hongo en el medio de sacarosa se incubó temperatura ambiente y agitación constante durante 14 días. El medio líquido se filtró, se separó el micelio y únicamente se colectó el líquido para obtener las proteasas extracelulares (medio filtrado).

3.3. Obtención de proteasas de *Arthrobotrys musiformis*.

3.3.1. Purificación parcial de proteasas.

El medio filtrado se adsorbió a una columna DEAE Sephacel (30 x 2.5 cm) previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8. La proteína adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0.3 M. Las fracciones con actividad proteolítica se concentraron en tubos Amicon-ultra (ultracel 10 kDa) centrifugando a 2,500 x *g*. El concentrado se dializó contra sulfato de amonio 1.5M disuelto en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8. Posteriormente, la muestra se adsorbió a una columna de Fenil-Sefarosa (5 x 2 cm) previamente equilibrada con el mismo amortiguador con el que se dializó la muestra. La proteína se eluyó con un gradiente lineal decreciente de Sulfato de amonio (1.5 M-0M) con Tris-HCl, 50 mM de pH 8. Las fracciones con actividad fueron concentradas y almacenadas a -10°C (Tunlid *et al.*, 1994).

3.3.2. Actividad proteolítica de las fracciones eluídas.

Para detectar actividad proteolítica en el medio filtrado y en las fracciones obtenidas de las cromatografías de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, se realizó GS-PAGE. Las fracciones con actividad proteolítica se concentraron mediante el uso de tubos concentradores con membranas de tamaño de poro de 10,000 Da. Se centrifugaron a 4000 rpm hasta obtener un volumen mínimo. Se verificó la actividad proteolítica con albúmina y con GS-PAGE (Tunlid y Jansson 1991; Wang *et al.*, 2006).

3.3.3. Actividad nematocida del medio filtrado de *Arthrobotrys musiformis* contra larvas infectivas de *Haemonchus contortus*.

Para determinar la actividad nematocida, las L₃ se incubaron bajo 4 condiciones diferentes: 1) medio de cultivo líquido sin hongo (testigo), 2) medio de cultivo filtrado, 3) fracción concentrada obtenida de la cromatografía de intercambio iónico, 4) Fracción concentrada obtenida de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones (pozos de placa de ELISA), en cada caso, se colocaron 200 µl de la fracción correspondiente y se adicionaron 50 L₃. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 24 y 48 h.

3.3.3.1. Análisis estadístico.

A las 0, 24 y 48 horas se realizó el conteo de larvas vivas/muertas y se obtuvo el porcentaje de mortalidad. Para evaluar los cambios a través del tiempo, el análisis se hizo por cada tratamiento utilizando la metodología de los modelos lineales generalizados. La distribución de la variable empleada fue la binomial negativa con la liga Logaritmo natural (Wilson y Grenfell, 1997). Para comparar los tratamientos dentro de cada medición se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Conover, 1980).

3.3.4. Actividad proteolítica del medio filtrado de *Arthrobotrys musiformis*.

Además de realizar GS-PAGE, como prueba adicional de la presencia de una enzima con actividad proteolítica en el medio de *A. musiformis* se realizó la técnica descrita por Wang *et al.*, (2006) con modificaciones, empleando soluciones de gelatina y de albúmina como sustrato. Se realizaron cursos temporales para determinar la formación del producto de la hidrólisis de una proteína a distintos tiempos, conforme el tiempo se incrementó, la absorbancia se incrementó, lo que indica que hubo mayor cantidad de sustrato hidrolizado. Para ello, se prepararon tubos conteniendo una solución de gelatina o albúmina de suero bovino (BSA) preparada en Tris-HCl 50mM, pH 8.0, a 200 µL de la

solución correspondiente se le adicionaron 50 μL del extracto (con actividad proteolítica) y la mezcla se detuvo por la adición de ácido tricloroacético (TCA) para tener una concentración final del 5%. El precipitado formado se descartó por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante obtenido se tomaron 250 μL que se mezclaron con 2.5 mL de Na_2CO_3 0.55 M y 200 μL de reactivo folín–fenol (2N) y la mezcla se incubó a 30°C durante 15 min. Se determinó la absorbancia a 680 nm.

Para cada etapa del proceso de purificación se obtuvo el porcentaje de actividad proteolítica, considerando al medio filtrado como el 100%. También se obtuvieron las unidades proteolíticas (UP) mediante el incremento en la absorbancia A_{680} $\mu\text{L}/\text{h}$ (Tunlid *et al.*, 1994).

3.3.5. Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford. Para hacer la curva patrón, en tubos de ensayo se colocaron 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μL de una solución madre de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/1 mL, y se ajustó el volumen de 100 μL con agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 5.0 mL de reactivo Bradford y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm. Se tomaron 20 y 50 μL de las muestras, se ajustó el volumen de 100 μL con agua destilada, se le adicionaron 5.0 mL de reactivo Bradford y se realizó la lectura espectrofotométrica a 595 nm. El valor obtenido se interpoló a la curva y se obtuvo la concentración de proteína (Bradford, 1976).

3.4. Caracterización de la proteasa extracelular de *Arthrobotrys musiformis*.

3.4.1. Actividad proteolítica en diferentes sustratos y concentraciones.

Para evaluar la afinidad de la enzima por el sustrato, se utilizaron concentraciones crecientes de albúmina (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 μM). Los ensayos se realizaron por triplicado y a partir de la pendiente inicial de un gráfico de absorbancia contra tiempo, se obtuvo la velocidad inicial a la concentración correspondiente. Los parámetros cinéticos: V_m (valor máximo al que tiende la curva experimental) y K_m (concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_m) se obtuvieron por ajuste de los datos experimentales de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la regresión no lineal. Debido a que la colágena utilizada como sustrato alternativo está constituida por un hidrolizado de la misma, con fragmentos de peso molecular variable, no fue posible evaluar la afinidad de la proteasa por dicha proteína.

3.4.2. Determinación de temperatura de la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis*.

Para determinar la temperatura óptima de la fracción enriquecida con actividad proteolítica, se utilizó la técnica descrita anteriormente usando como sustrato albúmina a una concentración de 500 μM , para ello las mezclas de reacción fueron incubadas a diferentes temperaturas (4, 10, 25, 37, 50 y 60°C) durante 4, 24 y 48 h, posteriormente, se midió la absorbancia a 680 nm.

3.4.3. Determinación del pH de la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis*.

Para determinar el pH óptimo de la actividad proteolítica de la fracción concentrada, se empleó albúmina a una concentración de 500 μM y amortiguadores con distinto pK_a , abarcando un rango de pH que va de 3 a 10 (ácido acético 100 mM pH 3, 4 y

5; Tris-HCl 100 mM pH 6, 7 y 8; glicina 100 mM pH 9 y 10) con incubaciones de 4, 24 y 48 horas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.4.4. Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis*.

Para analizar el efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad de la fracción concentrada, se utilizaron los inhibidores: fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) específico de proteasas dependientes de serinas y el ácido etilen-amino-tetra-acético (EDTA) inhibidor utilizado para identificar metaloproteasas. Ambos fueron empleados a una concentración final de 10 mM. Se utilizó BSA como sustrato, las mezclas de reacción se incubaron en presencia del inhibidor correspondiente a 37°C durante 4, 24 y 48 h y la actividad proteolítica se analizó como se describió anteriormente. Al GS-PAGE se le adicionaron los inhibidores: PMSF (inhibidor específico de proteasas dependientes de serina), el quelante EDTA y el inhibidor E-64 (inhibidor específico de proteasas dependientes de cisteína).

4. RESULTADOS

4.1. Recolecta, cultivo, aislamiento e identificación de hongos nematófagos.

Se analizaron 259 muestras de nueve estados de la República Mexicana. El número de muestras por región fue desde 10 hasta 47. El hongo *A. musiformis* se identificó en siete de 259 (2.7%) de las muestras procedentes de los estados de Puebla (6/47 lo que corresponde al 13%) y Veracruz (1/33, es decir el 3%) en las muestras procedentes de los estados de Puebla y Veracruz (Cuadro 1, Figura 5).

Cuadro 1. *Arthrobotrys musiformis* identificado en muestras recolectadas en distintas los estados de Puebla y Veracruz, México.

Entidad Federativa	Muestras positivas/ Total de muestras	Porcentaje %	Muestra
Morelos	0/10		
Puebla	6/47	13	Tierra de jardín y de macetas de cafetal, naranjo y menta.
Veracruz	1/33	3	Materia en descomposición de jardín.
Estado de México	0/55		
Sinaloa	0/34		
Distrito Federal	0/40		
Guanajuato	0/25		
Hidalgo	0/15		
Total	7/259	2.7	

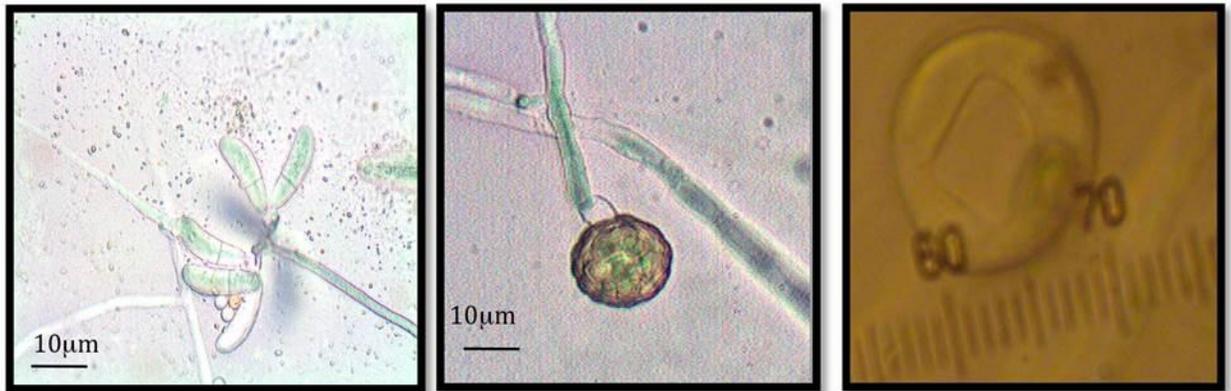


Figura 5. Microfotografías de *Arthrobotrys musiformis* (40X) que muestran conidios, clamidospora y un anillo. Microscopía de luz.

4.1.2. Determinación de la capacidad atrapadora de *Arthrobotrys musiformis*.

Además de *A. musiformis* se identificaron otras especies (Apéndice 1) con capacidad depredadora contra L₃ de *H. contortus*. Se obtuvieron diferente porcentaje de atrapamiento de L₃ de *H. contortus* cuando se incubaron con las cinco especies del hongo. *A. musiformis* capturó el 44 % de las L₃ de *H. contortus* (Figura 6). Hubo diferencia estadística en el atrapamiento entre especies de *Arthrobotrys* con respecto al testigo ($P < 0.05$).

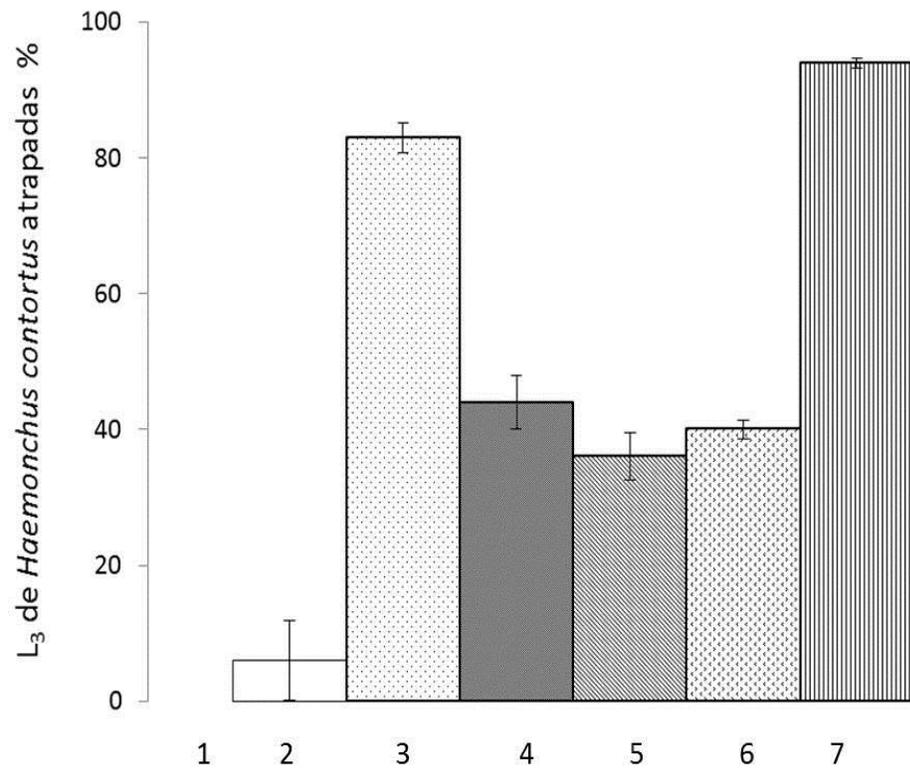


Figura 6. Porcentaje de atrapamiento de distintas especies de hongos nematófagos después de cinco días de incubación con L₃ de *Haemonchus contortus*. 1: Testigo, 2: *Arthrobotrys brochophaga*, 3: *Microsporium gephyropagum*; 4: *Arthrobotrys musiformis*; 5: *Arthrobotrys kirghizica*; 6: *Arthrobotrys oligospora*; 7: *Arthrobotrys conoides*.

4.2. Identificación de actividad proteolítica en cultivos de *Arthrobotrys musiformis*.

4.2.1. Actividad proteolítica de *A. musiformis* en distintos medios de cultivo.

En todos los medios (sólidos y líquido) donde se cultivó *A. musiformis*, sin y con nematodos, se registró actividad proteolítica con gelatina como se evidenció en las GS-PAGE (Figura 7).

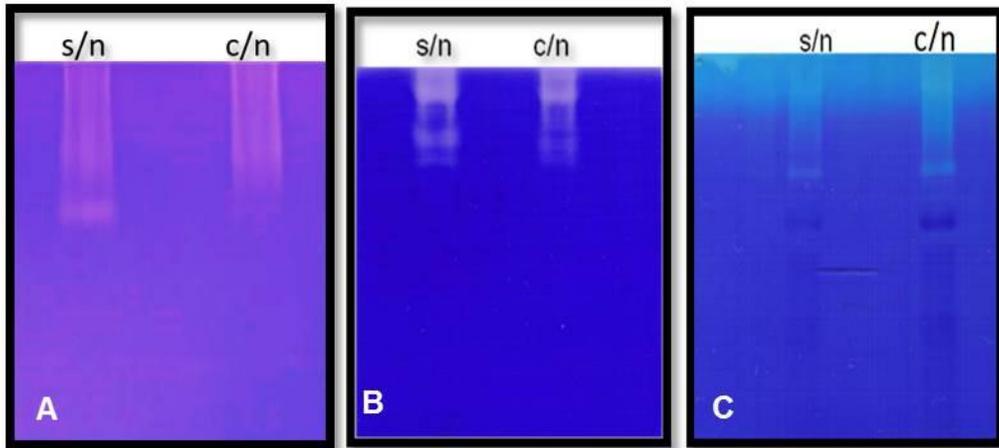


Figura 7. Fotografías que muestran la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* crecido en A: medio líquido. B: medio agar-agua. C: medio papa dextrosa agar, a temperatura ambiente, en ausencia (s/n) o en presencia de nematodos (c/n). La corrida se detuvo hasta que el frente llegó al borde del gel. Las zonas claras en cada gel indican actividad proteolítica (proteólisis de la gelatina).

4.2.2. Selección del medio de cultivo para la obtención de proteasas producidas por *Arthrobotrys musiformis*.

Para obtener las proteasas extracelulares de *A. musiformis*, se seleccionó el medio de cultivo líquido sin la incorporación de larvas, ya que bajo estas condiciones, se registró actividad proteolítica en el gel de gelatina y se logró obtener mayor cantidad de proteasa, lo que permitió hacer los ensayos subsecuentes.

4.2.3. Actividad nematocida de *Arthrobotrys musiformis* contra *Haemonchus contortus*.

Las L₃ de *H. contortus* que se mantuvieron en el medio de cultivo líquido en ausencia de *A. musiformis* mostraron movimientos ondulatorios rápidos. Las L₃ que fueron expuestas al medio filtrado donde el hongo creció, permanecieron inmóviles y con el cuerpo rígido, inclusive al exponerlos a estímulos como luz y calor (Figura 8).

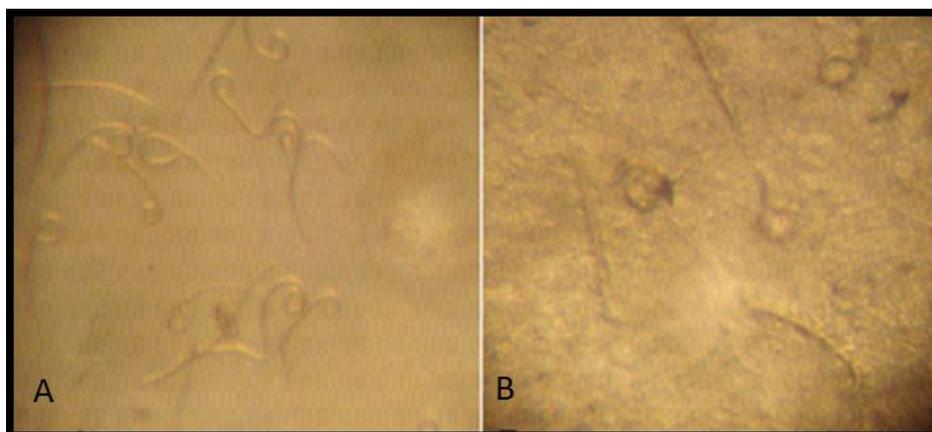


Figura 8. Microfotografías que muestran larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* expuestos a A: medio líquido sin hongo. B: medio filtrado. Microscopía de luz.

En el medio de cultivo filtrado se registró una mortalidad del 38% de las L₃ a las 48 h, lo cual sugiere que el hongo secretó productos en el medio de cultivo que causaron la muerte de las L₃ de *H. contortus*. Este efecto fue mayor al exponer a las L₃ a las fracciones concentradas con actividad proteolítica provenientes de la cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, con un 85 y 77% de mortalidad a las 48 h con diferencia con respecto al testigo y al medio filtrado (Cuadro 2, Figura 9). Un efecto tiempo-dependiente en las fracciones obtenidas de las cromatografías fue observado, mostrando una clara diferencia proteolítica entre el tiempo 0 y el tiempo 48 ($P < 0.05$); además de la diferencia nematocida en las diferentes fracciones, se registró un efecto del tiempo-tratamiento, entre el testigo y las fracciones concentradas provenientes de las columnas de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica a las 48 h ($P = 0.002$).

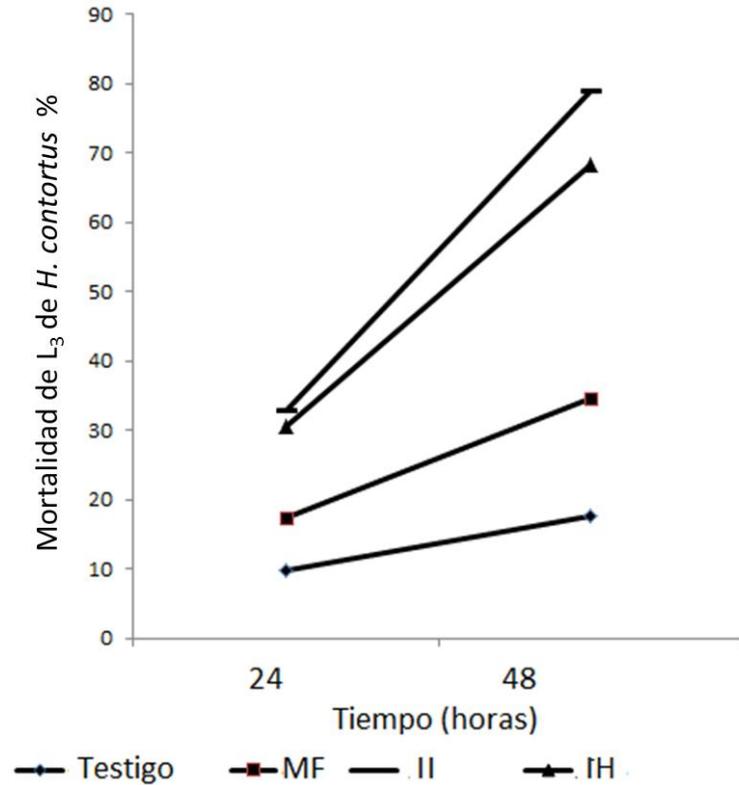


Figura 9. Mortalidad de larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* expuestas a distintos tratamientos: Testigo; MF: medio líquido filtrado antes de pasar por la columna. II: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de intercambio iónico. IH: fracción concentrada obtenida de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Hubo diferencia estadística (P=0.002) entre el número de larvas muertas en el testigo con los demás tratamientos a las 24 y 48 h.

La actividad nematicida se identificó en el medio filtrado y en las fracciones obtenidas a través del proceso de purificación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad nematocida medida a través de las medias marginales de los productos extracelulares del cultivo en medio líquido de *Arthrobotrys musiformis*.

Tratamiento	24h	%	48h	%
Medio sin hongo (testigo)	0.09±0.018 ^a	13	0.17±0.19 ^a	22
Medio filtrado	0.17±0.04 ^a	16	0.34±0.035 ^a	38
Fracción concentrada de cromatografía de intercambio iónico	0.32±.058 ^b	42	0.78±0.063 ^b	85
Fracción concentrada de cromatografía de interacción hidrofóbica	0.3±0.8 ^b	31	0.68±0.1b ^b	77

Literales distintas dentro de columnas indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.002$.

4.2.4. Actividad proteolítica del medio de cultivo filtrado de *Arthrobotrys musiformis*

La actividad proteolítica fue identificada en el medio de cultivo filtrado, debido a las proteasas extracelulares que el hongo secretó, y se registró en los subsecuentes pasos cromatográficos. El enriquecimiento de actividad proteolítica en estas fracciones sugirió la presencia de proteasas secretadas por el hongo aun cuando creció en ausencia de nematodos. Se comprobó la presencia de proteasas en las distintas etapas de purificación (figura 10); se incluyó el medio líquido sin hongo como testigo.

En el medio líquido filtrado y en las purificaciones subsecuentes se registró actividad proteolítica con BSA. En el medio de cultivo sin hongo (testigo) no hubo actividad proteolítica, mientras que en el medio líquido filtrado la actividad fue baja y en la fracción concentrada de la cromatografía de interacción hidrofóbica se registró la actividad más elevada (Cuadro 3).

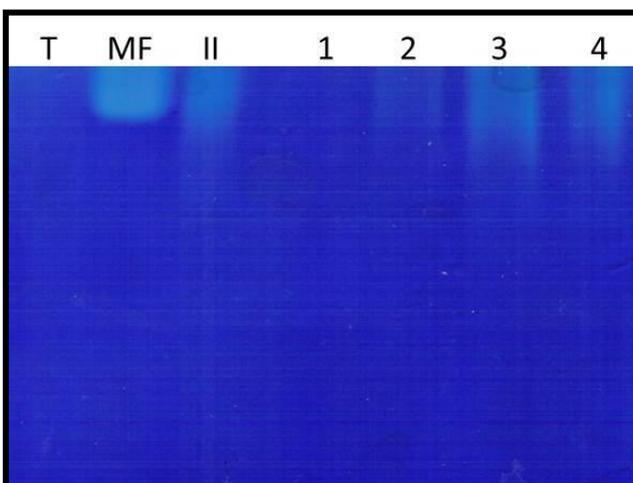


Figura 10. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* cultivado en medio líquido. T: testigo (medio sin hongo). MF: medio filtrado. II: fracción concentrada de la cromatografía de intercambio iónico. 1-4: fracciones colectadas de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Cuadro 3. Actividad proteolítica de los productos extracelulares de *Arthrobotrys musiformis* registrada a las 72 h.

Proceso de purificación	Proteína total μg	Actividad proteolítica con albúmina (%)	Unidad Proteolítica (UP) $(\Delta A_{680} \mu\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}) \times 10^{-3}$
Medio sin hongo (testigo)	0	0	0
Medio filtrado	1440	100	0.019
Fracción concentrada de la cromatografía de intercambio iónico	9.9	44	3.41
Fracción concentrada de la cromatografía de interacción hidrofóbica	14.4	78	3.51

4.3. Caracterización de la proteasa extracelular de *Arthobotrys musiformis*.

4.3.1. Identificación de sustratos.

Se identificó actividad proteolítica en el medio filtrado, lo que sugirió la presencia de proteasas extracelulares que el hongo secreta aún en ausencia de nematodos como se demostró anteriormente. Las fracciones concentradas tuvieron actividad proteolítica. Para caracterizar la actividad proteolítica se realizaron ensayos enzimáticos en solución utilizando BSA y gelatina como sustrato, con esta última, se registró actividad en un periodo de tiempo más corto. La figura 11 muestra los cursos temporales obtenidos con albúmina 200 μ M (A) o gelatina al 1% (B).

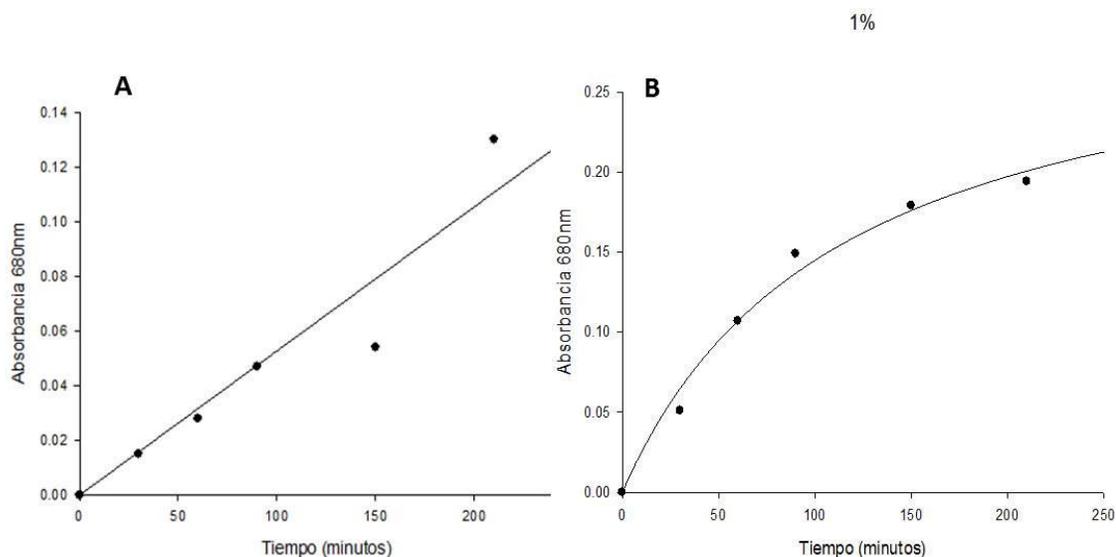


Figura 11. Cursos temporales de la actividad proteolítica de la fracción eluida de la cromatografía de interacción hidrofóbica del cultivo de *Arthobotrys musiformis* en medio líquido. A: Albúmina (200 μ M). B: Gelatina (1%).

4.3.2. Actividad proteolítica en diferentes concentraciones de sustrato.

Como previamente se mencionó, la naturaleza de la gelatina impidió que pudiera ser utilizada como sustrato para caracterizar la actividad proteolítica, por lo que los experimentos descritos a continuación fueron realizados con albúmina bovina como sustrato.

A partir de las velocidades iniciales obtenidas de los cursos temporales a diferentes concentraciones de albúmina, se evaluó la actividad de la proteasa extracelular por dicho sustrato. El ajuste de los datos a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten reveló una constante de afinidad en el rango de $100 \pm 34 \mu\text{M}$, el resultado del ajuste fue satisfactorio ($r=0.88$). Después de la columna hidrofóbica se obtuvo la velocidad de las curvas de las gráficas de cada concentración, se hicieron tres repeticiones por triplicado (Figura 12).

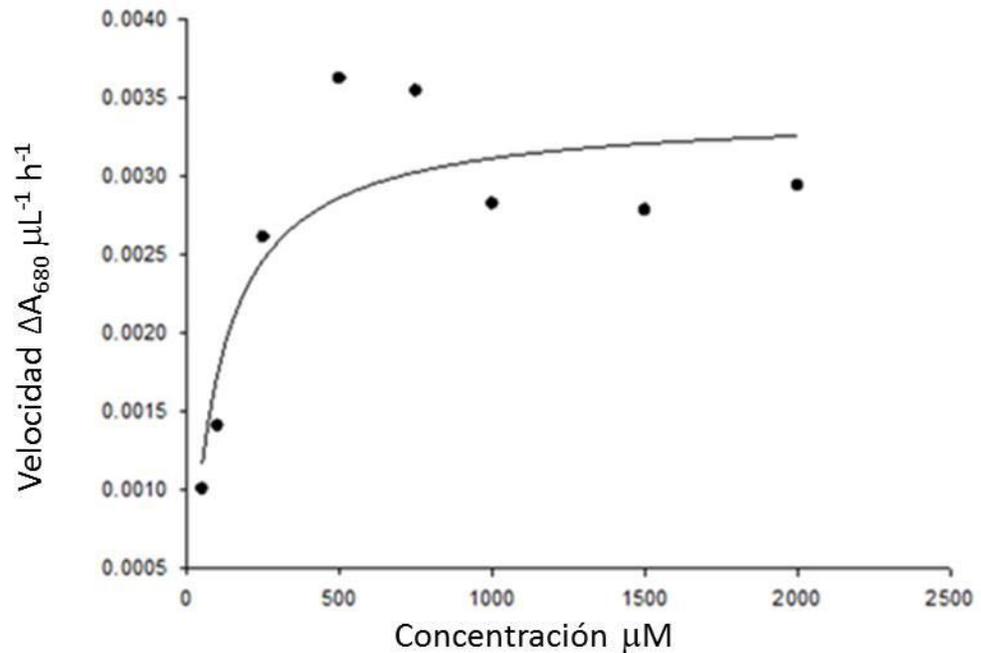


Figura 12. Cinética de saturación de la proteasa extracelular de *Arthrotrrys musiformis* con albúmina bovina como sustrato. Cada punto representa el promedio de tres experimentos. La línea continua muestra el ajuste obtenido mediante regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

4.3.3. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* en distintas temperaturas.

La actividad proteolítica más alta se registró a 37°C en los distintos tiempos (Figura 13).

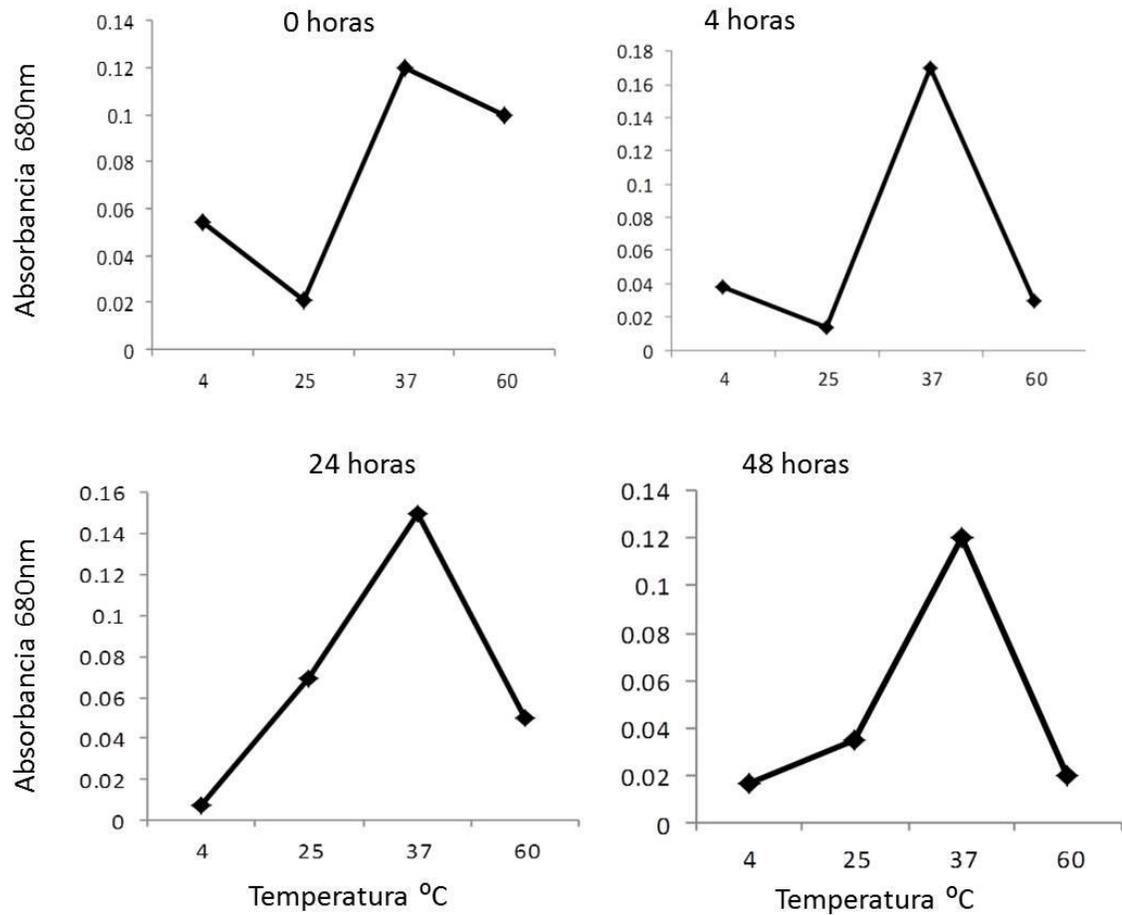


Figura 13. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* después de dos cromatografías (columna de intercambio iónico e hidrofóbica) empleando albúmina de suero bovino como sustrato (500 μ M) en diferentes temperaturas. Cada punto es resultado de tres repeticiones por triplicado.

4.3.4. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* en pH distinto.

La actividad proteolítica tuvo dos picos, en pH 5 y en pH 8, lo que puede sugerir que probablemente haya dos proteasas que intervienen en pH distinto. La actividad fue más elevada en pH 8, por encima o por debajo de este pH, la actividad disminuyó (Figura 14).

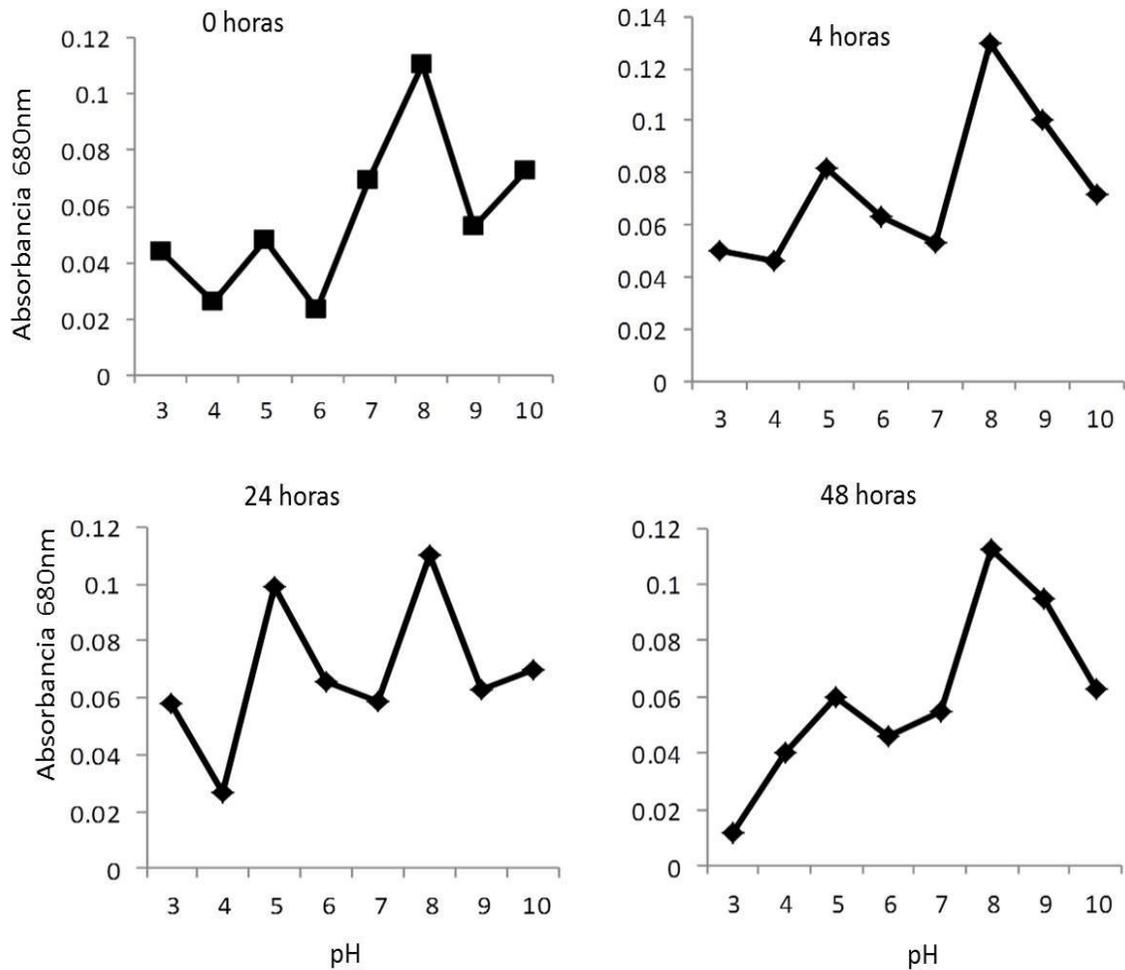


Figura 14. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* después de dos cromatografías (columna de intercambio iónico e hidrofóbica) empleando albúmina de suero bovino como sustrato (500 μ M) en diferente pH a 37°C. Cada punto es resultado de tres repeticiones por triplicado.

4.3.4 Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis*.

Se emplearon los inhibidores PMSF, E-64 y el quelante EDTA. La actividad disminuyó, con PMSF en un 6% y en 100% a las 4 y 24 horas, respectivamente, en comparación con la muestra que no tuvo inhibidor. Con el EDTA se registró un incremento de actividad del 6% a las 4 horas, pero la actividad proteolítica se mantuvo sin cambio a las 24 horas. En el GS-PAGE se observó que no hubo degradación de gelatina en la muestra que contenía PMSF (Figura 15).

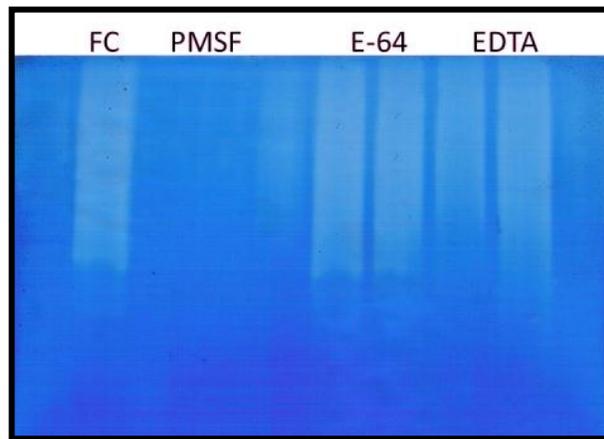


Figura 15. Actividad proteolítica de *Arthrobotrys musiformis* cultivado en medio líquido en presencia de inhibidores. FC: fracción eluida y concentrada sin inhibidores. PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluoruro) específico de serinas proteasas. E-64, específico de cisteína proteasas. EDTA (ácido etilaminotetraacético) para identificar metaloproteasas.

5. DISCUSIÓN

En años recientes se han identificado cepas de nematodos gastrointestinales, como *H. contortus*, resistentes a los antihelmínticos disponibles. Por ello, es necesario recurrir a otras alternativas, como el control biológico con hongos nematófagos. Así mismo es fundamental estudiar e identificar las sustancias que son capaces de causar la muerte de los nematodos. *A. musiformis* es un hongo nematófago, poco estudiado, con la capacidad de sobrevivir al paso del tracto digestivo de ovinos y bovinos manteniendo sus capacidades atrapadoras, es decir, conserva su viabilidad después de cultivarlo *in vitro* (Valero, 2006; Alfaro, 2008; Graminha *et al.*, 2005a; Soto-Barrientos *et al.*, 2011).

La especie *A. musiformis* ha sido identificada en Alemania, Escocia, China, Brasil y Costa Rica (Graminha *et al.*, 2005a; Saxena, 2008; Soto-Barrientos *et al.*, 2011). En México es la primera vez que se obtiene en muestras recolectadas de los estados de Puebla y Veracruz. Otros estudios lo han detectado en Morelos y Colima (Cruz, 2006; Valero, 2006; Alfaro, 2008). En este estudio la especie más frecuente fue *A. oligospora*, seguida de *A. musiformis*. Su *et al.*, (2007) y Soto-Barrientos *et al.*, (2011) también reportaron que la especie *A. oligospora* es más frecuente que *A. musiformis*

En este trabajo, se recolectaron muestras positivas a *A. musiformis* procedentes de tierra de jardín en materia en descomposición, bajo plantas ornamentales o aromáticas. No se identificaron hongos nematófagos en las muestras de heces de ovinos, caprinos, bovinos y cerdos, probablemente debido a que fueron animales confinados a corrales. Larsen *et al.*, (2006) registraron un escaso número de hongos a partir de heces de rumiantes.

El porcentaje de atrapamiento de *A. musiformis* recolectado de Puebla fue del 44%, mientras que Alfaro (2008) reportó el 97% de atrapamiento muestras recolectadas en Morelos. Graminha *et al.*, (2005a) obtuvieron el 73.7% de atrapamiento en muestras

recolectadas en Brasil. Estas diferencias en el porcentaje de atrapamiento pueden deberse a varias razones: las diferentes condiciones ambientales de donde se obtuvieron las muestras, lugar en donde se realizó el experimento (diferente al sitio donde se obtuvo el hongo), variabilidad genética de la especie de hongo, medios de cultivo utilizados para el crecimiento del hongo o variabilidad en la especie de *H. contortus*.

Se obtuvo un buen crecimiento de *A. musiformis* en PDA y fue lento en medio agar-agua; por tal motivo, el cultivo del hongo fue en el medio PDA, situación similar a la señalada por Valero (2006) y Soto-Barrientos *et al.*, (2011) quienes tuvieron buen crecimiento del hongo en el medio PDA.

Hasta el momento, se dispone de poca información sobre el cultivo y producción de *A. musiformis* y sus productos extracelulares. Valero (2006) realizó cultivos de *A. musiformis* en medio líquido Czapek-Dox, con un intervalo de tiempo superior a las tres semanas y a baja escala. En el presente trabajo: a) se logró el crecimiento del hongo en un medio casero, a base de sacarosa, que resultó más accesible, b) el tiempo de incubación fue de sólo 2 semanas, tiempo suficiente para que en el medio se detectaran sustancias nematocidas que causaron la muerte de las larvas, c) se demostró que el cultivo de *A. musiformis* en el medio líquido (enriquecido) con la adición de nematodos no presentó diferencia en la mortalidad contra las larvas, a diferencia del medio que no tuvo nematodos, y d) se registró la producción y excreción de proteasas en ausencia de nematodos.

Valero (2006), cultivó *A. musiformis* en medio de cultivo con levadura y obtuvo el 24% de mortalidad de L₃ de *H. contortus* a las 72 horas, y cuando utilizó el medio Czapek la mortalidad fue cercana al 17%. En el presente estudio, se obtuvo el 38% de mortalidad de L₃ de *H. contortus* expuestas al medio líquido filtrado de *A. musiformis* a las 48 horas. Estas diferencias pueden deberse a que en este estudio, el cultivo se realizó a mayor escala y probablemente fue mayor la cantidad de productos nematocidas extracelulares.

Se considera importante el proceso de purificación de los componentes a través de las columnas de intercambio iónico e hidrofóbica, porque se incrementó el porcentaje de mortalidad (85%).

A. musiformis cultivado en medio líquido produjo productos extracelulares nematocidas que causaron la muerte de L₃ de *H. contortus*. Los resultados de los geles copolimerizados con gelatina evidenciaron la presencia de proteasas en todos los medios de cultivo probados, tanto en los medios en los que se incorporaron nematodos como en los que no lo tuvieron.

Conforme se realizó el proceso de purificación, aumentó el porcentaje de mortalidad de L₃, lo que indicó que se seleccionaron y concentraron sustancias nematocidas. La actividad proteolítica fue mayor en la gelatina que en la albúmina. La explicación más factible es que la proteasa es más afín a la colágena que a la albúmina, ya que la colágena se asemeja más a la colágena de la cutícula de los nematodos. Por otro lado, en el medio filtrado se registró actividad más alta en la albúmina; probablemente en el medio existen mayor cantidad de proteasas no específicas y a medida que pasan por las cromatografías, se purifican, por tanto son más puras pero menos específicas.

Las proteasas son productos del metabolismo que el hongo produce; cabe mencionar que Persson y Friman (1993) indicaron que los productos extracelulares dependían del sustrato en que el hongo creció. En el presente trabajo, se comprobó que no es necesaria la presencia de nematodos para que los hongos secreten proteasas extracelulares, ya que en el medio filtrado de *A. musiformis* hay proteasas que pueden degradar gelatina y por lo tanto podría tratarse de las mismas o algunas muy similares que actúan sobre la cutícula de las larvas. De manera similar a como Mendoza *et al.*, (2003), lo registraron, se observó que hay secreción de proteasas independiente de la presencia o ausencia de nematodos.

Además en este trabajo, el hongo *A. musiformis* fue sembrado en un medio de cultivo constituido principalmente por sacarosa libre de proteína, con esto, se logró la producción de proteasas en un medio más económico. En otros estudios para la obtención de proteasas el hongo se cultivó en medio con algunas proteína que actúan como inductores de la producción de proteasas (Zhao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

Hasta el momento, se han identificado proteasas de *A. oligospora*, *A. conoides* y *Duddingtonia flagrans* (hongos nematófagos) con actividad proteolítica contra la cutícula de los nematodos; sin embargo, no se han identificado proteasas de *A. musiformis*. (Tunlid y Jansson, 1991; Yang *et al.*, 2007a; Braga *et al.*, 2011).

Este estudio es pionero en la identificación de proteasas de *A. musiformis*. Se encontró que la actividad proteolítica fue mayor en pH 8/37°C. Debido a que el PMSF inhibió la actividad proteolítica, dicha situación, sugiere que se trata de una proteasa dependiente de serinas. Dicha proteasa, tiene características similares a las identificadas en otros hongos nematófagos (Tunlid *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007a; Yang *et al.*, 2007b) debido a que son especies muy relacionadas filogenéticamente (Yang *et al.*, 2012).

Por otra parte, se observó que además de gelatina las proteasas tuvieron actividad en la albúmina, a 37°C esta actividad permaneció hasta por 72 horas. Después de que la proteasa de *A. musiformis* fue almacenada a 4°C/60 días conservó la actividad proteolítica, lo cual difiere de lo reportado por Tunlid *et al.*, (1994) que mencionaron que la proteasa obtenida de *A. oligospora* tiene un periodo de vida corto por lo que estas proteasas no son tan lábiles como las de otras especies que tienden a la autodegradación.

Se han realizado estudios con proteasas obtenidas de hongos nematófagos para evaluar su uso potencial como medio de control de nematodos parásitos, principalmente de *A. oligospora*; sin embargo, sólo se han realizado pruebas con nematodos de vida libre, como *Caenorhabditis* o *Panagrellus* cuya característica es que toda su vida se alimentan

por vía oral, por tal razón, las proteasas administradas pueden ingresar al cuerpo del nematodo por los orificios naturales. En contraste, las L₃ de *H. contortus* poseen una vaina que cubre todo el cuerpo, por tanto, no pueden alimentarse, así que las proteasas extracelulares secretadas por el hongo intervienen en el daño a la cutícula en esta fase de vida libre; la proteasa de *A. musiformis* obtenida en este trabajo puede ser parte de la acción nematicida que el hongo produce para alimentarse de las larvas por lo que podría ser posible su empleo como control biológico. Por otra parte, Soto-Barrientos *et al.*, (2011) mencionaron los productos extracelulares que *A. musiformis* secreta, podrían ser un factor que evita la sobrevivencia de las larvas 4 de *H. contortus* y de adultos del género *Trichostrongylus*.

En este estudio, se logró identificar, aislar y cultivar al hongo *A. musiformis* que tiene capacidad nematófaga contra *Haemonchus contortus*, así mismo, se registró la presencia de al menos una proteasa extracelular de este hongo, se logró purificar parcialmente la misma y se identificaron sus características bioquímicas generales.

Con estas investigaciones, se pretende llegar a la purificación y caracterización de las proteasas producidas por *A. musiformis* para la comprensión del mecanismo de acción contra las L₃ de nematodos gastrointestinales, en particular contra *H. contortus*. Se demostró que la producción de proteasas es un mecanismo natural de los hongos, no depende de la presencia de nematodos; sin embargo, no es el único mecanismo que tienen los hongos para causar la muerte de las larvas, hay otras sustancias nematicidas, como metabolitos secundarios que pueden actuar sinérgicamente por lo que debe ahondarse en la investigación de los mismos para que con otros mecanismos se actúe de forma integral y ofrezca alternativas de control que sean lo menos agresivos contra la salud animal, humana y ambiental.

6. CONCLUSIONES

Arthrobotrys musiformis se encuentra en regiones cálidas de Puebla y Veracruz.

A. musiformis excreta una proteasa extracelular con actividad proteolítica (gelatina) aún en ausencia de nematodos.

El medio líquido filtrado donde creció *A. musiformis* causó la muerte de larvas 3 de *H. contortus* *in vitro*.

A. musiformis contiene proteasas con actividad con albúmina y gelatina.

Se caracterizó bioquímicamente la actividad proteolítica de *A. musiformis* en el que se identificó mejor actividad en pH 8/37°C.

La inhibición de la actividad proteolítica por PMSF sugiere que podría tratarse de una proteasa dependiente de serinas.

7. LITERATURA CITADA

- Ahman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P., Van den Hondel, J., Tunlid, A. (2002) Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3408–3415.
- Alfaro, I. (2008). Comparación de la actividad depredadora in vitro de hongos nematófagos sobre larvas del 3º y 4º estadios del nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Morelos, México, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Anderson, R. (2000). Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmisión. 2nd ed. CABI Publishing. UK.
- Aparicio-Medina, J.M., Paredes-Vanegas, V., González-López, O., Navarro-Reyes, O. (2011). Impacto de la ivermectina sobre el ambiente. *La Calera*, 11(17), 64 – 66.
- Araújo, J.V., Junghans, T.G., Alfenas, A.C., Gomes, A.P.S. (1997). Isoenzyme analysis of *Arthrobotrys*, a nematode-trapping fungus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30, 1149-1152.
- Aumont, G. (1995). Strongyloses Gastro-intestinales des petits ruminants dans les Antilles Francaises. Parasitology Research in Africa. Internacional Foundation for Science, 169-187.
- Barron, G. (1977). The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications Ltd. Canada. 140p.
- Betschart, B., Marti S., Glaser, M. (1990). Antibodies against the cuticlin of *Ascaris suum* cross-react with epicuticular structures of filarial parasites. *Acta Tropica*, 47, 331-338.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braga, F.R., Araujo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Genier, H.L.A., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Queiroz, J.H., Ferreira, S.R. (2011). Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. *Journal of Helminthology*, 85, 164–170.
- Beynon, S.A. (2012). Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 113–124.
- Campos, R., Herrera, D., Quiroz, R. (1992). Diagnóstico *in vitro* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Veterinaria México*, 23, 51-56.
- Conover, W.J. (1980). Nonparametric Statics. John Wiley and Sons. 2nd ed. USA, 493pp.
- Cooke, R.C., Godfrey, B.E.S. (1964). A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions British Mycological Society*, 47(1), 61-74.
- Coop, R., Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*, 17(7), 325-330.
- Coronado, A., Escalona, H., Henriquez, H., Mújica, F., Suarez, C. (2003). Ivermectin resistance in naturally *Cooperia* sp. infected heifers in Lara State, Venezuela. V International Seminar of Animal Parasitology. Yucatan, Mexico. 67-71.
- Cruz, A. (2006). Presencia de hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp. en suelos del estado de Colima. Tesis de Licenciatura. Colima, México, Universidad de Colima.

- Cuéllar, A. (2007). Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Nematodos gastroentéricos. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina.
- Domingues, L.F., Giglioti, R., Feitosa, K.A., Fantatto, R.R., Rabelo, M.D., de Sena Oliveira, M.C., Bechara, G.H., de Oliveira, G.P., Barioni Junior, W., de Souza Chagas, A.C. (2013). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. *Veterinary Parasitology*, 197(1-2), 263-270.
- Encalada, L., López, M., Mendoza, P., Liébano, E., Vázquez, V., Vera, G. (2008). Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Veterinaria México*, 39(4), 423-428.
- Figuroa, C.J.A., Méndez, M.R.D., Berruecos, V.J.M., Álvarez, L.J.A. (2000). Detección de resistencia de *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. *Veterinaria México*, 31(4), 309-313.
- Fontenot, M.E., Miller, J.E., Peña, M.T., Larsen, M., Gillespie, A. (2003). Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, 118(3-4), 203-13.
- Fujimoto, D., Kanaya, S. (1973). Cuticlin: a noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 157, 1-6.
- García, A. (2003). *In vitro* and *in vivo* diagnosis of antihelminthic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in Mexico. V International Seminar of Animal Parasitology. Yucatán, México. 194-199.

- Gómez-Rincón, C., Valderrábano, J., Uriarte, J. (2006). Eficacia de *Duddingtonia flagrans* en el control de los nematodos gastrointestinales del ovino en sistemas extensivos de montaña. *Jornadas sobre Producción Animal*.
- Graminha, E., Costa, A., Oliveira, G., Monteiro, A., Palmeira, S. (2005a). Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: in vitro activity and after passage through the gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 717–722.
- Graminha, E., Monteiro, A., da Silva, H., Pereira, G., da Costa, A. (2005b.) Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(9), 927-933.
- Gray, D. (1995). World control in Australia-Where now? Parasitology Research in Africa. International Foundation for Science. 155-167.
- Gronvold, J., Nansen, P., Henriksen, S., Larsen, M., Wolstrup, J., Bresciani, J., Rawat, H., Fribert, L. (1996). Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Helminthology*, 70, 291-297.
- Hendrix, C.M. (1999). Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Harcourt-Brace. 2nd Ed. España.
- Hernández, H.A., López, M.N. (2000). Efecto del tratamiento con extractos de plantas medicinales (estafiate, epazote, semilla de calabaza, semilla de papaya y ajo) sobre parásitos gastroentéricos en ovinos. Tesis de licenciatura. MVZ. Tlaxcala, México, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Herrera, T., Ulloa, M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2ª. Ed. FCE, IB-UNAM, México.

- Heussen, C., Dowdle, E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing Sodium Dodecyl Sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102, 196-202.
- Huang, X., Zhao, N., Zhang, K. (2004). Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology*, 155, 811–816.
- Kahn, L., Norman, T., Walkden-Brown, S., Crampton, A., O'Connor, L. (2007). Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. *Veterinary Parasitology*, 146, 83–89.
- Kelly, P., Good, B., Hanrahan, J., Fitzpatrick, R., Waal, T. (2009). Screening for the presence of nematophagous fungi collected from Irish sheep pastures. *Veterinary Parasitology*, 165, 345–349.
- Kolar, L., Kozuh Erzen, N., Hogerwerf, L., van Gestel, C.A. (2008). Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, 151(1), 182-189.
- Lappe, P., Ulloa, M. (1982). Hongos destructores de nematodos en algunos suelos de México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 17, 99-113.
- Larsen, M. (2006). Biological of control of nematodes in sheep. *Journal of Animal Sciences*, 84, E133-E139.
- Llerandi-Juarez, R.D, Mendoza de Gives, P. (1998). Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep. *Journal of Helminthology*, 72, 209-213.

- López-Arellano, M.A. (2010). Diagnóstico de resistencia antihelmíntica en nematodos parásitos de rumiantes. En: Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Libro Técnico No. 2 INIFAP.
- Martínez, I., Cruz, R. (2009). El uso de químicos veterinarios y agrícolas en la zona ganadera de Xico, Centro de Veracruz, México y el posible impacto ambiental. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3), 673-681.
- Martínez Ortiz de Montellano, C. (2010). Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes. Tesis para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. (2013). Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Experimental Parasitology*. 133(3), 281-286.
- Mendoza de Gives, P., Valero Coss, R.O. (2009). Uso de hongos nematófagos: Una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado. Folleto Técnico No. 7. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP.
- Mendoza de Gives, P., Torres Acosta, F. (2012). Biotechnological use of Fungi in the Control of Ruminant Parasitic Nematodes. In: "Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease". Edited by MS Arias and Adolfo Paz. Nova Editorial, New York, USA. 389-408.
- Mendoza, P., Benhke, J., Davies, K. (2003). Extracellular enzyme production by nematophagous fungi in the presence and absence of nematodes. *International Journal of Nematology*, 13(1), 27-36.

- Montalvo, X., López, M., Vázquez, V., Liébano, E., Mendoza, P. (2003). Presence of antihelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep farms in Tlaxcala, Mexico. V International Seminar of Animal Parasitology. Yucatan, Mexico, 299-306.
- Morales, G., Pino, L. (2004). Métodos de control de los nematodos gastroentéricos de ovinos y caprinos. FAO Corporate Document Repository. Disponible en: <http://www.fao.org>.
- Naggie, S., Hu, Y., Pulliam-Holloman, T., Bentley, W. (1997). Substrate (gelatin) gel electrophoretic method for analysis of proteases activity in insect (Sf-9) cells. *Biotechnology Techniques*, 11(5), 297-300.
- Nansen, P., Gronvold, J., Henriksen, S., Wolstrup, J. (1988). Interactions between the predacious fungus *Arthobotrys oligospora* ante third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology*, 26, 329-337.
- Nari, A., Fiel, C. (1994). Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Bases Epidemiológicas para su Prevención y Control. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 519p.
- Niec, R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. República Argentina.
- Niezen, J., Charleston, W., Hodgson, J., Miller, C., Waghorn, T., Robertson, H. (1998). Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasite sheep. *International Journal for Parasitology*, 28, 791-803.
- Ortiz-Alegría, L. (2008). Identificación de proteasas liberadas por el miracidio de *Fasciola hepatica* durante el proceso de invasión a caracoles del género *Lymnaea*. Tesis de Maestría. México D. F., Universidad Nacional Autónoma de México.

- Paraud, C., Chartier, C. (2003). Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. *Parasitology Research*, 89(2), 102-106.
- Paraud, C., Lorrain, R., Pors, I., Chartier, C. (2012). Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. *Journal of Helminthology*, 86(1), 95-103.
- Paraud, C., Pors, I., Chicard, C., Chartier, C. (2006). Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture. *Parasitology Research*, 98(3), 207-213.
- Persson, Y., Friman, E. (1993). Intracellular proteolytic activity in micelia of *Arthrobotrys oligospora* bearing mycoparasitic or nematode trapping structures. *Experimental Mycology*, 17, 182-190.
- Quiroz H. (1999). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Edit. UTEHA. México.
- Saumell, C., Fusé, L., Iglesias, L., Fernández, S., Fiel, C. (2008). Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematófagos en el control biológico de trichostrongílidos de rumiantes. *Revue de Medecine Veterinaire*, 89(2), 45-54.
- Saxena, G., Lysek, G. (1993). Observation of nematophagous fungi in natural soils by fluorescence microscopy and their correlation with isolation. *Mycological Research*, 97(8), 1005-1011.
- Saxena, G. (2008). Observations on the occurrence of nematophagous fungi in Scotland. *Applied soil ecology*, 39, 352-357.

- Sebastiano, M., Lassandro, F., Bazzicalupo, P. (1991). *cut-1 a Caenorhabditis elegans* gene coding dauer-specific noncollagens components of the cuticle. *Developmental Biology*, 146, 519-530.
- Soto-Barrientos, N., de Oliveira, J., Vega-Obando, R., Montero-Caballero, D., Vargas, B., Hernández-Gamboa, J., Orozco-Solano, C. (2011). *In-vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 37-52.
- Su, H., Hao, Y., Mo, M., Zhang, K. (2007). The ecology of nematodo-trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. *Veterinary Parasitology*, 144, 293-298.
- Thienpont, D., Rochete, F., Vanparijs, O. (1979). Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Jansenn Research Foundation.
- Torres, J., Roberts, B., Canto, J., Martínez, C., Rodríguez, J., Canul, L., Cob, L., Tirado, F., Aguilar, A. (2003). Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiales and macrocyclic lactones in Yucatan. V International Seminar of Animal Parasitology, Yucatan, Mexico, 48-52.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 89-96.
- Tunlid, A., Jansson, S. (1991). Proteasas and their involmente in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Applied Environmental Microbiology*, 2868-2872.
- Tunlid, A., Jansson, H., Nordbring-Hertz, B. (1992). Fungal attachment to nematodes. *Mycological Research*, 96(6), 401-412.

- Tunlid, A., Rosen, S., Ek, B., Rask, L. (1994). Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology*, 140, 1687-1695.
- Valero, R. (2006). Actividad nematicida *in vitro* de filtrados de hongos nematófagos contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Tesis de Maestría. Morelos, México, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Van Oorschot, C. (1985). Taxonomy of the *Dactylaria* complex V. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Micology*, 26.
- Villegas, A. (1986) Influencia de dos tipos de manejo de ganado sobre la densidad de larvas infestantes de nematodos gastroentéricos en pastos del Estado de Morelos. Memorias de la VII Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C. Tamaulipas, México. 36.
- Waller, P., Larsen, M. (1993). The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, 25(4), 539-546.
- Waller, P.J., Bernes, G., Rudby Martin, L., Ljungstrom, B.L., Rydzik, A. (2004). Evaluation of Copper supplementation to control infections of sheep in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(3), 149–160.
- Waller, P.J., Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22(2), 131-7.
- Waller, P., Ljungström, J., Rudby, L., Morrison, D., Rydzik, A. (2006). Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: Trials on Commercial Farms in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47, 23-32.

- Wang, M., Yang, J., Zhang, K. (2006). Characterization of an extracellular protease and its cDNA from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium microscaphoides*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 130–139.
- Webb, L., Beaumont, D.J., Nager, R.G., McCracken, D.I. (2007). Effects of avermectin residues in cattle dung on yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae) populations in grazed pastures. *Bulletin of Entomological Research*, 97(2), 129-38.
- Wilson, K., Grenfell, B.T. (1997). Generalized Linear Modelling for Parasitologists. *Parasitology Today*. 13(1): 33-38.
- Wyborn, C.H.E., Priest, D., Duddington, C.L. (1969). Selective technique for the determination of nematophagous fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 101-102.
- Yang, C.C. (2012). Acute human toxicity of macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), 999-1003.
- Yang, E., Xu, L., Yang, Y., Zhang, X., Xiang, M., Wang, C., An, Z., Liu, X. (2012). Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the U.S.A*, 109, 10960-10965.
- Yang, J., Liang, L., Zhang, Y., Li, J., Zhang, L., Ye, F., Gan, Z., Zhang, K. (2007a). Purification and cloning of a novel serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellina varietas* and its potential roles in infection against nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 557-565.
- Yang, J., Tian, B., Liang, L., Zhang, K. (2007b). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 21–31.

Zhao, M., Mo, M., Zhang, K. (2004). Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthobotrys oligospora*. *Mycologia*, 96(1), 16-22.

APÉNDICE 1

De las 259 muestras recolectadas en varias entidades de México, 29 (11.2%) resultaron positivas a hongos nematófagos pertenecientes a seis especies diferentes de *A. musiformis* (Cuadro 4, Figuras 15-20).

Cuadro 4. Especies de hongos nematófagos aislados en distintas entidades federativas de México.

Entidad federativa	Muestras positivas/ Total de muestras	Especies	Muestra
Morelos	1/10	<i>Arthrobotrys oligospora</i> (Figura 16).	Heces de bovino recolectadas de jardín.
Puebla	6/47	<i>A. musiformis</i> (Figura 2).	Tierra de jardín y de macetas de cafetal, de naranjo y menta.
Veracruz	6/33	<i>A. oligospora</i>	Tierra de jardín y materia en descomposición.
		<i>A. musiformis</i>	Materia en descomposición de jardín.
		<i>A. kirghizica</i> (Figura 17).	Heces de ovino recolectada del suelo.
		<i>Monacrosporium sp.</i>	Tierra de jardín.
Estado de México	0/55		
Sinaloa	2/34	<i>Arthrobotrys sp.</i> ,	Tierra de corral con heces de bovinos.
		<i>A. brochopaga</i> . (Figura 18).	
Distrito Federal	9/40	<i>A. oligospora</i>	Tierra de jardín, tierra de cancha de fútbol, composta.
		<i>Monacrosporium gephyropagum</i> (Figura 19).	Tierra de jardín.
		<i>A. superba</i> (Figura 20).	Tierra de jardín.
		<i>A. conoides</i> (Figura 21).	Tierra de cancha de fútbol.
Guanajuato	4/25	No identificadas por la presencia de ácaros.	
Hidalgo.	1/15	<i>A. oligospora</i>	Tierra de jardín.
Total	29/259 (11.2%)	7 especies diferentes	

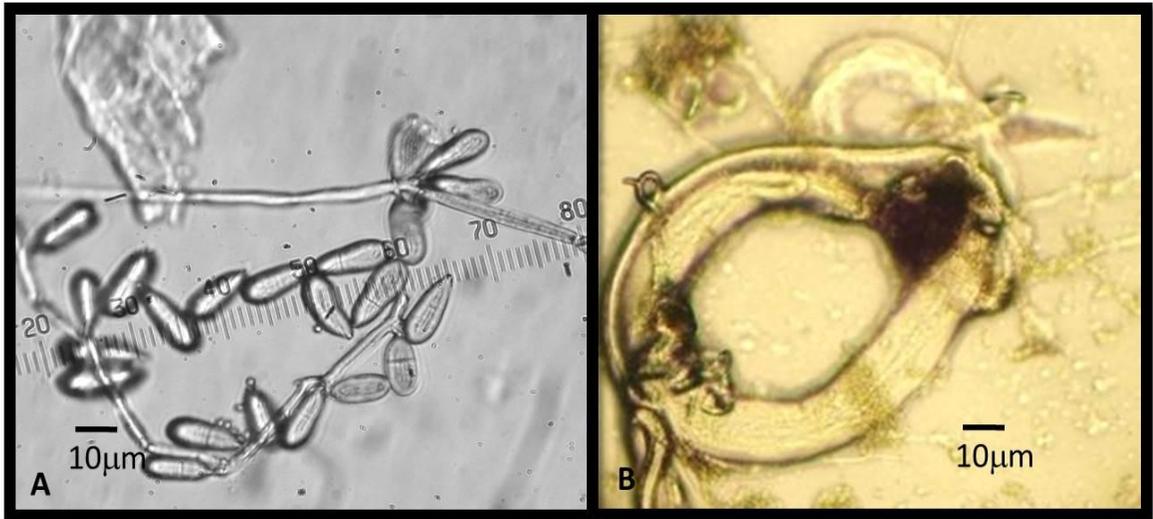


Figura 16. *Arthrobotrys oligospora*. A: conidios (40X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* atrapada (40X). Microscopía de luz.

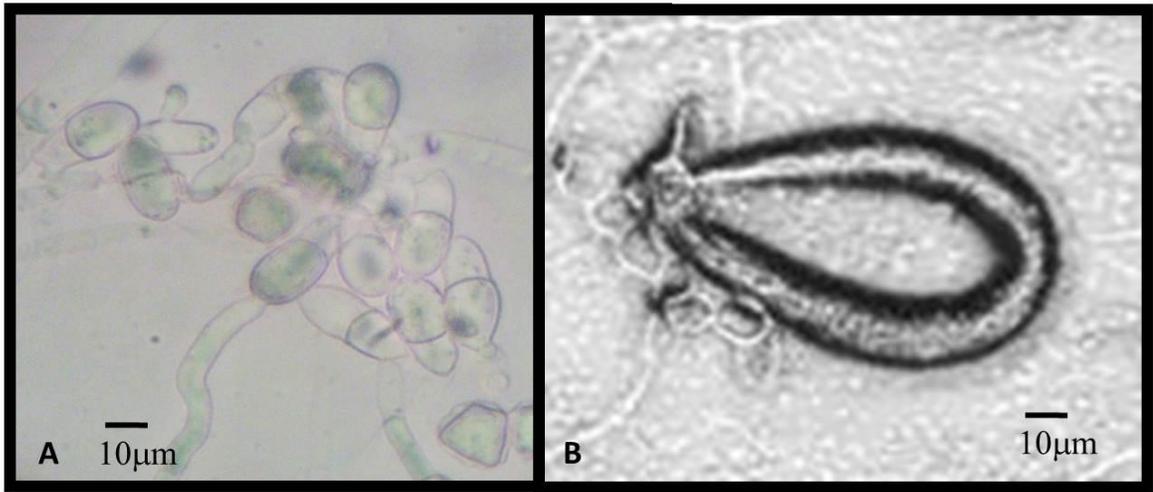


Figura 17. *Arthrobotrys kirghizica*. A: conidios (40X). B. Red tridimensional (10x). Microscopía de luz.

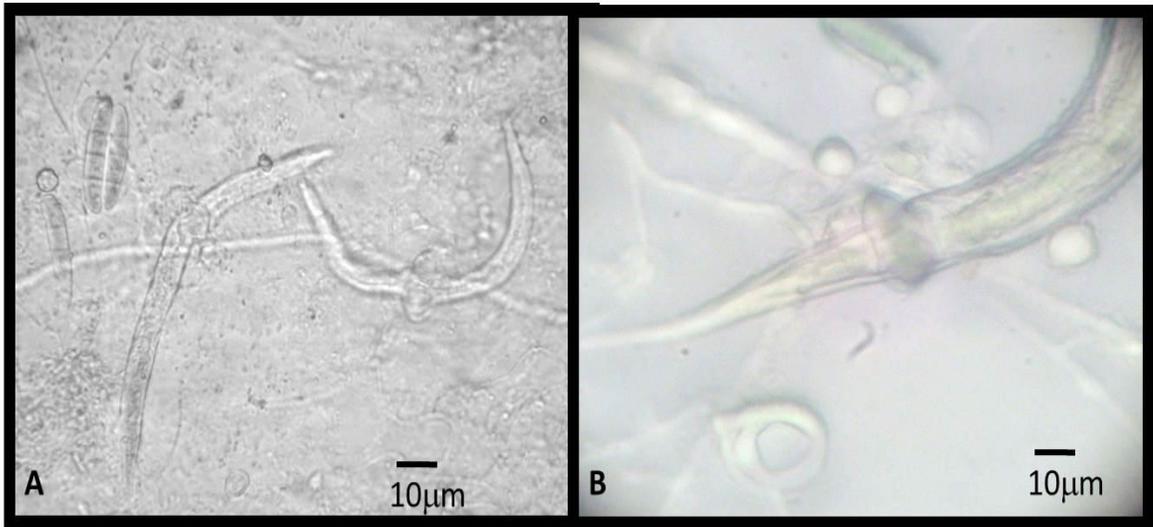


Figura 18. *Arthrobotrys brochopaga* A: conidios, anillos constrictores (10X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* (40X). Microscopía de luz.

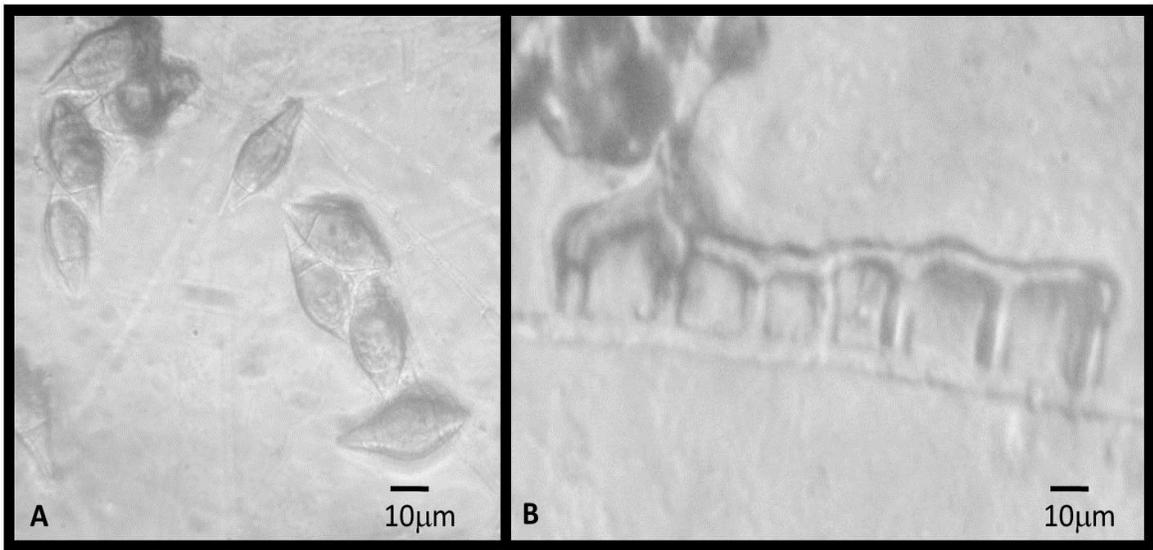


Figura 19. *Monacrosporium gephyropagum* A: conidios (40X). B: Red escaleriforme (40X). Microscopía de luz.

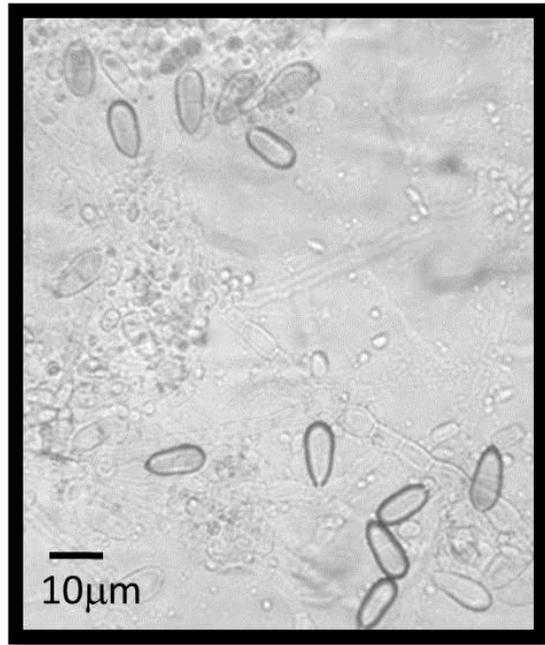


Figura 20. *Arthrobotrys superba* conidios (40X). Microscopía de luz.

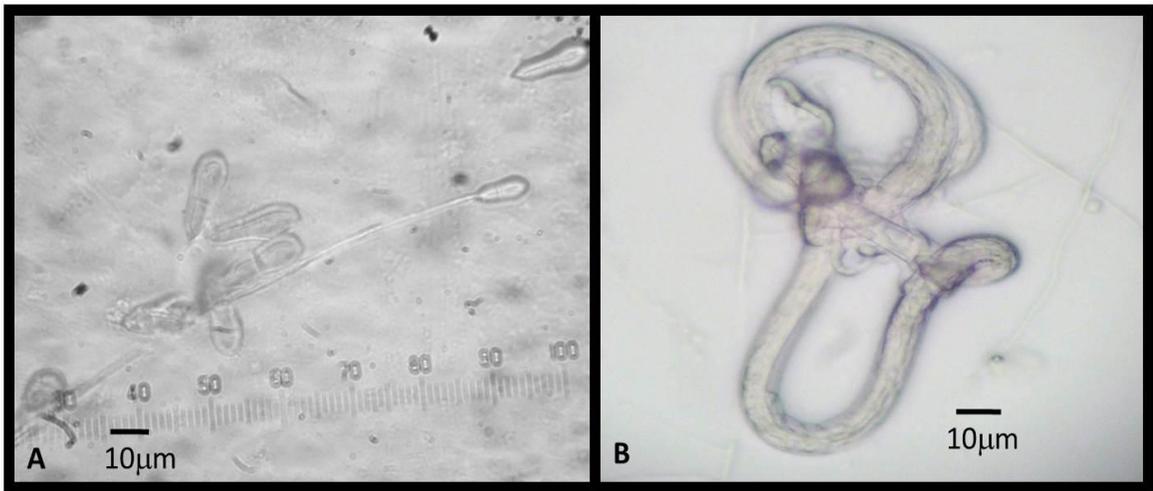


Figura 21. *Arthrobotrys conoides* A: conidios (40X). B. Larva 3 de *Haemonchus contortus* (10X). Microscopía de luz.

Todas las especies tuvieron efecto depredador contra las L₃ de *H. contortus*. Las especies *A. conoides*, *M. gephyropagum* y *A. musiformis* capturaron 94, 83 y 44 % de las L₃ de *H. contortus* respectivamente. Hubo diferencia estadística en el atrapamiento entre especies ($P < 0.05$). Todas las especies fueron diferentes del testigo, no hubo diferencia estadística entre *A. oligospora*, *A. kirghizica*, *A. brochopaga* y *A. musiformis*, pero *A. conoides* y *M. gephyropagum* difirieron estadísticamente de todas las demás especies ($P < 0.05$) con el 94 y 83% de atrapamiento respectivamente.

Las especies aisladas e identificadas de diferentes sitios de colecta fueron criopreservados en agua: glicerol y mantenidas a -180°C en el laboratorio de Helmintología del CENID-PAVET.

A. oligospora fue la especie más frecuente, lo cual concuerda con Su *et al.*, (2007) quienes registraron en mayor cantidad a *A. oligospora* y *A. musiformis*. El hongo *A. conoides* se registró en una localidad cercana al Ajusco, tal como la registraron Lappe y Ulloa (1982) quienes ya la habían identificado en sitios cercanos por lo que podría pensarse que esta es la zona de distribución de este hongo. *A. superba* tiene un registro previo en Morelos (Llerandi-Juárez y Mendoza-de Gives, 1998), pero es el primer registro que se hace de esta especie en el Distrito Federal. Es importante mencionar que en el presente estudio se hace el primer registro de *A. kirghizica* y *Monacrosporium gephyropagum* en el país.

Todas las especies identificadas tuvieron efecto depredador contra larvas infectivas de *H. contortus* por lo que pueden ser potencialmente efectivos contra los nematodos gastrointestinales de rumiantes.

En comparación con otros países, en Alemania, de 30 muestras colectadas en suelos de Berlín, se aislaron 9 especies de *Arthrobotrys*, 2 especies de *Monacrosporium*, 1 especie de *Duddingtonia* y 3 no fueron identificadas, el número elevado de aislamiento de hongos nematófagos puede deberse a la técnica de fluorescencia que emplearon (Saxena

y Lysek, 1993). *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. oligospora* y *A. superba* se han identificado en Alemania, Escocia y en este estudio, además de que manera similar se registraron *A. gephyropaga*, *A. kirghizica*, y *Drechslerella brochopaga* (Saxena, 2008).

Kelly *et al.*, 2009 en 120 muestras de pasturas irlandesas colectaron 12 hongos nematófagos de los cuales *Monacrosporium cionopaga*, *Duddingtonia flagrans* y *Drescheller coniospora* fueron detectados en muestras fecales frescas, como contraste, de los resultados obtenidos en este presente estudio. Únicamente cuatro muestras positivas de las especies *A. oligospora* y *A. brochopaga* fueron colectadas de heces de bovino y *A. kirghizica* fue aislado de heces de ovinos; sin embargo, cabe mencionar que las muestras fueron colectadas de la tierra, por lo que la presencia de hongos sobre las heces pudo haber sido una contaminación secundaria y no precisamente que hayan estado en las mismas y por tanto haber atravesado el tracto digestivo de los animales.

APÉNDICE 2

Medios de cultivo

Medios sólidos

***Agar agua**

20 g de agar bacteriológico en 1 L de agua, 0.5mg de cloranfenicol, se disuelven en 1 L de agua destilada, se colocan en autoclave a 121°C/15 min/20 lb.

***Papa dextrosa agar (PDA)**

39 g de agar bacteriológico en 1 L de agua, 0.5mg de cloranfenicol, se disuelven en 1 L de agua destilada, se colocan en autoclave a 121°C/15 min/20 lb.

Medio líquido

Sacarosa 30 g/L, KCl 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, cloramfenicol 0.5 g/L en 1 L de agua destilada en matraces llenos a la mitad de su capacidad se colocaron en autoclave /121°C/15 min/ 20 lb.

Geles para electroforesis

Gel SDS 9%

Reactivos	Gel separador mL	Gel concentrador mL
Acrilamida (30 g%) y bisacrilamida (1 g%) en agua destilada	2.70	0.67
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.25	1.125
SDS 20%	0.45	0.225
Persulfato de amonio 100 mg/mL en agua destilada	0.05	0.050
TEMED	0.010	0.005
Agua destilada	3.6	2.42
Volumen total	9.6	4.495

Amortiguador para las muestras, solución desnaturalizante 400%:

Reactivos	μL
Glicerol 15%	172
Tris-HCl 1.5 M pH 6.7	100
Mercaptoetanol 3%	30
Azul de bromofenol 0.25%	
SDS 20%	250
Agua	440

Amortiguador de corrida

Glicina 0.2 M

Tris-HCl 0.025 M

SDS 0.1%

Se disuelven en agua destilada y se ajusta a pH 8.

Gel copolimerizado con gelatina

El gel se preparó haciendo modificaciones de la técnica de Heussen y Dowdle (1980).

Reactivos	Gel separador mL	Gel concentrador mL
Acrilamida (30 g%) y bisacrilamida (1 g%) en agua destilada	2.70	200 μ l
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.22	250 μ l
SDS 20%	0.045	0.005
Gelatina 1 g% en agua destilada	0.9	
Persulfato de amonio 100 mg/mL en agua destilada	.05	0.020
TEMED	.010	0.010
Agua	2.7	1.55
Volumen total	9.03	2.03

Amortiguador para las muestras

Glicerol 10%

Tris-HCl 0.5 M

Azul de bromofenol 0.25%

SDS 1%

Amortiguador de corrida

Glicina 0.2 M

Tris-HCl 0.025 M

SDS 0.1%