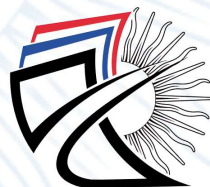


# Disminución del Impacto Ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos

Diego Armando Masaquiza Moposita  
Arnielis Díaz Hernandez  
Leonardo Daniel Cabezas Andrade  
Greys Carolina Herrera Morales  
Maritza Lucia Vaca Cárdenas  
Amilcar Arenal Cruz



PUERTO MADERO  
EDITORIAL

1era Edición  
2023



[puertomaderoeditorial.com.ar](http://puertomaderoeditorial.com.ar)



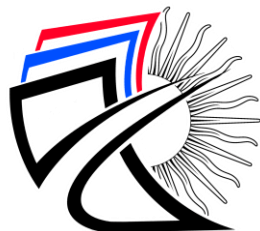
La Plata - Argentina



**Disminución del impacto  
ambiental en el control del  
parásito *Haemonchus contortus*  
en ovinos**

Diego Armando Masaquiza Moposita, Arnielis Díaz Hernandez  
Leonardo Daniel Cabezas Andrade, Greys Carolina Herrera Morales  
Maritza Lucia Vaca Cárdenas, Amilcar Arenal Cruz  
**ISBN:** 978-987-82912-2-2





**PUERTO MADERO  
EDITORIAL**

**Disminución del impacto  
ambiental en el control del  
parásito *Haemonchus contortus*  
en ovinos**

**AUTORES:**

Diego Armando Masaquiza Moposita  
Arnielis Díaz Hernandez  
Leonardo Daniel Cabezas Andrade  
Greys Carolina Herrera Morales  
Maritza Lucia Vaca Cárdenas  
Amilcar Arenal Cruz





Disminución del impacto ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos / Diego Armando Masaquiza Moposita ... [et al.] ; editado por Guido Patricio Santillán Lima ; Juan Carlos Santillán Lima ; Daniela Margoth Caichug Rivera. - 1a ed revisada. - La Plata : Puerto Madero Editorial Académica,

2023.

Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-82912-2-2

1. Ambiente. 2. Zootecnia. I. Masaquiza Moposita, Diego Armando. II. Santillán Lima, Guido Patricio, ed. III. Santillán Lima, Juan Carlos, ed. IV. Caichug Rivera, Daniela Margoth, ed.

CDD 636.089444



**Licencia Creative Commons:**

Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)



Primera Edición, Marzo 2023

**Disminución del impacto ambiental en el control del parásito  
*Haemonchus contortus* en ovinos**

ISBN: 978-987-82912-2-2

DOI: <https://doi.org/10.55204/pmea.31>

**Editado por:**

**Sello editorial:** ©Puerto Madero Editorial Académica

**N° de Alta:** 933832

**Editorial:** © Puerto Madero Editorial Académica

**CUIL:** 20630333971

Calle 45 N491 entre 4 y 5

Dirección de Publicaciones Científicas Puerto Madero

Editorial Académica

La Plata, Buenos Aires, Argentina

**Teléfono:** +54 9 221 314 5902

+54 9 221 531 5142

**Código Postal:** AR1900

*Este libro se sometió a arbitraje bajo el sistema de doble ciego (peer review)*

**Corrección y diseño:**

Puerto Madero Editorial Académica

**Diseño, Montaje y Producción Editorial:**

Puerto Madero Editorial Académica

Diseñador Gráfico: Santillán Lima, José Luis

**Director del equipo editorial:**

Santillán Lima, Juan Carlos

**Editor:**

Santillán Lima, Guido Patricio

Caichug Rivera, Daniela Margoth

Santillán Lima, Juan Carlos

Hecho en Argentina

Made in Argentina



## AUTORES:

### ***Diego Armando Masaquiza Moposita***

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Sede Orellana.  
Facultad de Ciencias Pecuarias. Carrera de Zootecnia. Francisco de  
Orellana – Ecuador

[dmasaquiza@esPOCH.edu.ec](mailto:dmasaquiza@esPOCH.edu.ec)



<https://orcid.org/0000-0001-5176-8261>

### ***Arnelis Díaz Hernández***

Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Centro de  
Biología Molecular, Camagüey 74650, Camagüey, Cuba

[arnelis.diaz@reduc.edu.cu](mailto:arnelis.diaz@reduc.edu.cu)



<https://orcid.org/0000-0002-3561-9845>

### ***Leonardo Daniel Cabezas Andrade***

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Sede Orellana.  
Facultad de Ciencias. Carrera Ambiental. Francisco de Orellana -  
Ecuador

[leonardod.cabezas@esPOCH.edu.ec](mailto:leonardod.cabezas@esPOCH.edu.ec)



<https://orcid.org/0000-0001-5056-9180>

### ***Greys Carolina Herrera Morales***

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Sede Orellana.  
Facultad de Ciencias. Carrera Ambiental. Francisco de Orellana -  
Ecuador

[greys.herrera@esPOCH.edu.ec](mailto:greys.herrera@esPOCH.edu.ec)



<https://orcid.org/0000-0002-9184-0333>

### ***Maritza Lucia Vaca Cárdenas***

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias  
Pecuarias. Carrera de Zootecnia. Riobamba – Ecuador  
[maritza.vaca@uta.edu.ec](mailto:maritza.vaca@uta.edu.ec)



<https://orcid.org/0000-0003-4474-4354>

### ***Amilcar Arenal Cruz***

Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Centro de  
Biología Molecular, Camagüey 74650, Camagüey, Cuba  
[amilcar.arenal@reduc.edu.cu](mailto:amilcar.arenal@reduc.edu.cu)



<https://orcid.org/0000-0003-2912-9871>

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	xix
PRÓLOGO .....	2
INTRODUCCIÓN .....	6
CAPÍTULO I. ....	15
1.1 <i>H. contortus</i> .....	15
1.1.1 Ciclo biológico .....	16
1.1.2 Prevalencia.....	19
1.1.3 Diagnóstico.....	21
1.1.4 Control.....	29
1.1.5 Afectaciones y pérdidas económicas .....	35
1.1.6 Impacto ambiental de los desparasitantes.....	38
CAPÍTULO II.....	47
2.1 Resistencia parasitaria .....	47
2.2 Desarrollo de vacunas.....	51
2.3 Respuesta inmunológica del hospedero.....	55
2.4 Bibliotecas de fago para el control de parásitos .....	58
2.5 Silenciamiento de genes en parásitos .....	62
CAPÍTULO III. ....	69
3.1 Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	69
3.2 Obtención de huevos de <i>H. contortus</i> .....	70

3.3	Conteo de huevos por gramo de heces – Técnica de McMaster.....	71
3.4	Coprocultivos estériles .....	71
3.5	Selección y preparación de un animal donante de huevos.....	72
3.6	Obtención de las L1 para el experimento de inmunoneutralización.	72
3.7	Obtención de las L3 para los experimentos de silenciamiento .....	73
3.8	Identificación de mimotopos similares a <i>H. contortus</i> a través de una Biblioteca de fagos .....	73
3.8.1	Introducción.....	73
3.8.2	Materiales y Métodos .....	76
3.8.3	Resultados y Discusión.....	80
CAPÍTULO IV. ....		88
4.1	Optimización de transferencia de genes en <i>H. contortus</i> para el silenciamiento de genes vitales.....	88
4.1.1	Introducción.....	88
4.1.2	Materiales y Métodos .....	91
4.1.3	Resultados y Discusión.....	99
4.1.4	Conclusiones Parciales .....	105
4.2	Evaluación de un péptido con epítomos de Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y de Desorganización Muscular (DIM 1) en la protección de ovinos contra <i>H. contortus</i> .....	106
4.2.1	Introducción.....	106
4.2.2	Materiales y Métodos .....	109
4.2.3	Resultados y Discusión.....	111
4.3.	Discusión General, Conclusiones y Recomendaciones .....	117
4.3.1	Discusión General.....	117

4.3.2 Conclusiones.....	120
4.3.3 Recomendaciones .....	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122
ACERCA DE LOS AUTORES.....	174



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Eficiencia del biopanning durante los procesos de selección. ....	82
<b>Tabla 2.</b> Proteínas de <i>H. contortus</i> con identidad a los fagotopos. ....	84
<b>Tabla 3.</b> Cebadores empleados en los experimentos de silenciamiento. ...	93
<b>Tabla 4.</b> Recuento de eosinófilos y niveles de hemoglobina y hematocrito de animales vacunados contra <i>H. contortus</i> .....	115



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>H. contortus</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Análisis de la conjuntiva en ovinos.....	23
<b>Figura 3.</b> Presencia de nematodos adultos de <i>Haemonchus contortus</i> en el abomaso, proveniente de un animal infestado con 21550 huevos por gramos de heces.....	24
<b>Figura 4.</b> Procedimiento gráfico para el conteo fecal de huevos por gramos de heces con el empleo de las técnicas de McMaster y MiniFlotac. ....	25
<b>Figura 5.</b> Huevos de <i>Haemonchus contortus</i> que se observan cuando se realiza la técnica de McMaster o MiniFlotac. ....	26
<b>Figura 6.</b> Curva de regresión lineal que incluye el análisis de las dos técnicas empleadas. ....	27
<b>Figura 7.</b> Secuenciación por el método de Sanger en la identificación de <i>Haemonchus contortus</i> . ....	28
<b>Figura 8.</b> Manejo integrado propuesto por la FAO en el control de parásitos gastrointestinales de rumiantes.....	30
<b>Figura 9.</b> Estructura tridimensional de H-gal de <i>Haemonchus contortus</i> PDB. ....	32
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la Lactona Macro ciclica. ....	39
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática del proceso de selección de péptidos presentados en bibliotecas de fagos, por afinidad con anticuerpos policlonales.....	60
<b>Figura 12.</b> Parásitos en los que se empleó las bibliotecas de fago con diferentes objetivos.....	62
<b>Figura 13.</b> Parásitos con informes de silenciamiento de genes. ....	64
<b>Figura 14.</b> Diagrama de flujo para el aislamiento de fagos con epítomos reconocidos por sueros hiperinmune hacia <i>Haemonchus contortus</i> .....	79
<b>Figura 15.</b> Efecto larvicida de sueros hiperinmunes de animales con alta respuesta natural contra <i>Haemonchus contortus</i> .....	81
<b>Figura 16.</b> Diagrama de flujo sobre el esquema seguido para el silenciamiento de genes. ....	97

<b>Figura 17.</b> Electroforesis de doble cadena de ARN.....	99
<b>Figura 18.</b> Análisis de transcripción por RT-PCR del gen de DIM 1 de Haemonchus contortus después del tratamiento de ARNdc.....	100
<b>Figura 19.</b> Efecto de la exposición a ARNdc (DIM 1 y Fotosistema II) sobre la capacidad de las larvas para migrar durante un período de 24 horas (período de inicio) y 48 horas (última medición) después de la exposición al ARNdc.....	102
<b>Figura 20.</b> Efecto del tiempo de incubación sobre la migración larval para $\beta$ -tubulina.....	104
<b>Figura 21.</b> Diagrama de flujo en el diseño experimental para la evaluación de la vacuna en ovinos. El bipéptido NH <sub>2</sub> -GSGNAIMGGGSFLSDTRS-COOH.....	111
<b>Figura 22.</b> Dinámica de huevos por gramos de heces (media $\pm$ d.e.) en carneros vacunados con el péptido.....	113
<b>Figura 24.</b> Dinámica de los títulos de IgG para los epitopes de la proteína de Desorganización Muscular 1 (DMI 1) y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).....	116

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
NGI	Nematodo Gastrointestinal
hpg	Huevos por gramo de heces
L3	Larva infestante o de tercer estadio evolutivo
L4	Larva de cuarto estadio evolutivo
L5	Larva de quinto estadio evolutivo
CIP	Control Integrado de Parásitos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ARNi	ARN de interferencia
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNm	ARN mensajero
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
SSTF	Solución Salina Tamponada con Fosfatos
SFB	Suero Fetal Bovino
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-etilbenzotiazolín sulfonato)
DO	Densidad Óptica
DIM 1	Proteína de Desorganización Muscular 1
GAPDH	Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa
BSA	Albúmina de Suero Bovino
UFP	Unidades Formadoras de Fagos
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
PEG	Polietilenglicol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TML	Test de migración larval
TDL	Test de desarrollo larval
DMSO	Dimetilsulfóxido
Aminoácido	a.a.



## PRÓLOGO

Las enfermedades ocasionadas por nemátodos gastrointestinales (NGI) constituyen una de las más importantes causas de pérdidas económica en los animales, fundamentalmente en los pequeños rumiantes. Ocasionan reducción en la ganancia de peso, retraso en el crecimiento, disminución del consumo de alimentos, disminución de la producción de leche, lana, baja fertilidad y, en los casos de infecciones masivas, la muerte de los animales (Liu et al. 2009 y Oliveira et al. 2012).

De los NGI, el más importante para los pequeños rumiantes es el *Haemonchus contortus*, que está presente en regiones de clima cálido (Amarante 2014 y Wilmsen et al. 2014) y en regiones templadas (Felippelli et al. 2014).

*Haemonchus contortus* es un parásito gastrointestinal hematófago de los rumiantes de gran importancia a escala mundial; es uno de los parásitos más prevalentes y causa muchos daños a los animales, por lo que repercute considerablemente en la producción de las explotaciones. Se ha informado de que el parásito sobrevive al uso de diferentes productos antihelmínticos (Fortes y Molento, 2013).

Para el diagnóstico del *Haemonchus contortus*, el método más utilizado consiste en técnicas para determinar la presencia y/o el

número de huevos del parásito (Ward et al. 1997). Dentro de estas técnicas, McMaster es la más popular universalmente (Bosco 2014) y más recientemente, el Mini-FLOTAC (Rinaldi 2014). El examen postmortem (necropsia) en los mataderos permite la confirmación del diagnóstico a través del hallazgo de los parásitos adultos (Khalafalla et al. 2011).

El ensayo inmunoenzimático de ELISA es una de las herramientas más utilizadas para establecer metodologías de diagnóstico para los más disímiles parásitos, en humanos como en animales: *Taenia solium* (Deplazes et al. 1991), *Fasciola hepatica* (Howell et al. 2015), *Crypto sporidium* (Elgun y Koltas 2011), *Schistosoma mansoni* (El-Badry 2009), *Trichinella spiralis* (Johnson et al. 1996) y *Taenia saginata* (Wandra et al. 2006). Sin embargo, para *Haemonchus contortus* aún no se describe un método inmunoenzimático que permita el diagnóstico en los animales.

Así mismo, los métodos actuales para el control de nematodos gastrointestinales se basan principalmente en el empleo de antihelmínticos químicos, cuyo uso indiscriminado durante largo tiempo provoca el desarrollo de la resistencia de los parásitos al tratamiento. Además, se describe la contaminación del medio ambiente y la presencia de residuos tóxicos en la cadena alimentaria que llega hasta el hombre (Wardhaugh, 2005).

Una alternativa de control de los nematodos gastrointestinales puede ser la inmunización con proteínas nativas. La H11 de *H. contortus* es una glicoproteína eficaz como inmunógeno (Tavernor *et al.*, 1992). La vacunación con extractos de proteínas de excreción/secreción de *H. contortus* también es efectiva en la protección de la infestación parasitaria (Lacroux *et al.*, 2006).

La purificación de proteínas de excreción/secreción como la HC58 (cisteína proteasa y galectina) reducen parcialmente la infección que produce *H. contortus* (Muleke *et al.*, 2007). No obstante, la obtención de pequeñas cantidades de estas proteínas por vía natural es una limitante para convertirlas en un producto comercial, de allí que la búsqueda de otras alternativas como la tecnología del ADN recombinante se convierte en una necesidad.

Los recientes avances en la tecnología de bibliotecas de fago llevan esta metodología a convertirse en una herramienta valiosa para la investigación (Han *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el empleo para mimificar epítomos de parásitos como *Fasciola hepatica* (Villa-Mancera *et al.*, 2008), *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Prudencio *et al.*, 2010), *Taenia solium* (Assana *et al.*, 2010), *Schistosoma japonicum* (Wu *et al.*, 2006) y *Plasmodium falciparum* (Ambroggio *et al.*, 2013).

En helmintos se recomienda el empleo de vacunas multiepítomos debido a la complejidad de los mecanismos de

infestación (Wu et al., 2006); sin embargo, no se ha descrito su uso en *H. contortus*.

## INTRODUCCIÓN

Las parasitosis por nematodos gastrointestinales (NGI) constituyen el problema más generalizado y desafiante para la industria de los pequeños rumiantes en todo el mundo (Torres-Acosta, Molento, & De Gives, 2012). De los NGI que parasitan a los ovinos y caprinos y que posee una distribución mundial, es sin dudas *H. contortus* el más importante. Los animales infectados padecen anemia, edema, diarrea, debilidad, emaciación e incluso la muerte, especialmente cuando se trata de animales jóvenes (Taylor, Coop, & Wall, 2007b).

En Cuba *H. contortus* constituye el parásito de mayor prevalencia e incidencia, que limita seriamente el desarrollo de la ganadería ovina (Arece & López, 2013). Estudios en el país muestran un 73,8 % de prevalencia en la provincia Las Tunas (Medina, 2019).

*H. contortus* tiene un ciclo de vida directo, sin ningún hospedero intermediario. Los huevos morulados son ovopositados por las hembras del parásito para luego ser expelidos al medio ambiente a través de las heces. Cada hembra del nematodo puede llegar a expulsar más de 5000 huevos por día, lo que hace que aumente vertiginosamente la cantidad de larvas en el medio y se conviertan en una seria amenaza para la salud de los animales.

De la eclosión de los huevos resulta el primer estadio larval (L1) con mudas sucesivas hasta llegar a la fase infectante (L3) en un

periodo de siete días bajo condiciones favorables. Las L3 son extremadamente resistentes a los ambientes hostiles ya que poseen una cubierta protectora. Los animales se infectan a través del alimento o el agua contaminada con las L3 (Lee, 2002).

Dos de las características que distinguen al *H. contortus* son su alta prevalencia en la mayoría de las regiones del mundo y su elevada capacidad para desarrollar resistencia a múltiples medicamentos usados en su tratamiento. Es por ello que un diagnóstico certero tiene importantes implicaciones para el estudio de su biología, epidemiología, estrategias de control y resistencia a los medicamentos (Yang et al., 2017).

El fenómeno de resistencia a múltiples drogas químicas por parte de *H. contortus* requiere del desarrollo de estrategias de lucha, encaminadas a descubrir nuevos medicamentos antihelmínticos y candidatos vacunales capaces de proteger a los animales contra la infestación del nematodo, basados en estudios que identifiquen moléculas claves para sus procesos de desarrollo y reproducción.

Para C Britton, Roberts, and Marks (2016) es imprescindible el conocimiento profundo de los procesos biológicos a nivel molecular del *H. contortus*, que permitan llegar a identificar algunas de estas moléculas claves como nuevos objetivos farmacológicos. Es por ello que se necesita con urgencia estudios inmunológicos contra las infecciones por nematodos del ganado. Después de la vacunación

con extractos de proteínas nativas se logra una protección significativa contra *H. contortus*, lo que demuestra que la búsqueda de vacunas es factible (Mohandas et al., 2016).

Aparejado al problema de resistencia a las drogas químicas, existe una tendencia hacia la disminución de los residuos de fármacos en los alimentos destinados al hombre y en el medio ambiente, lo cual supone que las estrategias de control antiparasitarias no dependan exclusivamente de los productos químicos. Entre las estrategias propuestas se encuentran el desarrollo de vacunas específicas contra los nematodos gastrointestinales y el empleo de animales genóticamente resistentes a las infecciones parasitarias (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán, 2012).

Hasta la fecha, se emplean varios antígenos nativos y recombinantes en ensayos de inmunización contra *H. contortus*, con una protección variable en la mayoría de los casos (Meier, Torgerson, & Hertzberg, 2016). De igual manera, también se prueban diferentes estrategias de vacunación, que incluyen el empleo de vacunas de ADN (Han, Xu, Yan, Song, & Li, 2012) y de variados adyuvantes (Piedrafita et al., 2013).

Si se tiene en cuenta las funciones esenciales que poseen algunas proteasas en la nutrición y la supervivencia de los helmintos en el huésped, estas se consideran candidatas para el desarrollo de vacunas contra este grupo de parásitos. Las cisteína-proteasas, que se

describen en la mayoría de los helmintos parásitos, se proponen como una fuente alternativa de antígenos (Toet, Piedrafita, & Spithill, 2014).

En el caso particular de *H. contortus*, las cisteína-proteasas también se usan como inmunógenos contra el nematodo en diferentes ensayos de vacunación con el uso de formas nativas o recombinantes en cabras y ovejas (Muleke et al., 2007). Tal es así que la inmunización con fracciones enriquecidas con tiol proteinasa obtenidas del *H. contortus* adulto o sus productos de excreción-secreción (E/S) inducen una importante protección contra el parásito. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos subyacentes a la protección son poco conocidos (J. M. Molina et al., 2018).

La identificación de epítomos es esencial para el diagnóstico, la inmunoterapia, el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de vacunas para el tratamiento de enfermedades (Pande, Szewczyk, & Grover, 2010). Las bibliotecas de presentación de fagos constituyen un método rápido y de bajo costo para mapear epítomos de un antígeno que esté involucrado en una interacción de proteína específica con el anticuerpo y son consideradas una herramienta potente que permite la selección de mimotopos de péptidos que imitan epítomos naturales de un patógeno, incluso sin conocimiento previo del área del ligando natural (Ellis, Newlands, Nisbet, & Matthews, 2012).

El ARN de interferencia (ARNi) es una herramienta genética atractiva que permite la validación de objetivos farmacológicos y la identificación de genes diana en parásitos de interés veterinario. Los problemas con su sensibilidad variable a los enfoques estándar de ARNi reducen el desarrollo de plataformas de silenciamiento de genes (Maule et al., 2011).

El silenciamiento de genes puede desencadenarse mediante la introducción del ARN de doble cadena (ARNdc) en un organismo.

El procesamiento posterior de la doble cadena y la incorporación dentro del complejo de silenciamiento conduce a la división del ARN mensajero específico del gen (ARNm) que comparte la secuencia homóloga con el ARNdc (Filipowicz, 2005). El fenotipo resultante de los niveles de transcripción reducidos después de la introducción del ARNi puede sugerir o indicar la(s) función(es) del gen específico y su importancia para el organismo huésped y, además, puede informar sobre su potencial como un nuevo objetivo de intervención (Marr, Sargison, Nisbet, & Burgess, 2014).

En el silenciamiento de genes en *H. contortus* se emplean genes vitales del parásito, entre ellas, H11 (Samarasinghe, Knox, & Britton, 2011) responsable en la absorción de nutrientes, sec-23 (Geldhof, Murray, et al., 2006) con función en el transporte de vesículas y  $\beta$ -tubulina (A. C. Kotze & Bagnall, 2006) que forma los

microtúbulos que con los microfilamentos de actina constituyen el citoesqueleto y es responsable del movimiento de los músculos (Cooper, 2000). Sin embargo, son pocos los estudios con éxito de silenciamiento de genes en *H. contortus* (Zawadzki, Presidente, Meeusen, & De Veer, 2006).

Con este antecedente se plantea el siguiente problema científico: ¿Puede reducirse la infestación de *H. contortus* en ovinos a través de la inmunización con epítomos de proteínas vitales provenientes de una biblioteca de fagos presentadora de péptidos?

En base a esto se busca demostrar la disminución de *H. contortus* en ovinos inmunizados con péptidos mimotopos de proteínas vitales del nematodo que participan en la respuesta inmune natural contra el parásito. En este sentido se proyectan diferentes experimentos como: identificar epítomos de proteínas de *H. contortus* involucradas en la respuesta inmune a través de una biblioteca de fagos presentadora de péptidos; optimizar el silenciamiento de genes en *H. contortus* con el empleo del gen de la  $\beta$ -tubulina, evaluar el efecto sobre la motilidad y el desarrollo larval del silenciamiento en *H. contortus* de los genes de  $\beta$ -tubulina y DIM 1; y determinar la reducción de la carga de *H. contortus* en ovinos con el empleo de un péptido que mimifique epítomos del parásito.

De la misma manera, este pesquisaje en la biblioteca de fagos constituye:

- El primer informe de empleo de esta herramienta en la identificación de proteínas involucradas en la respuesta inmune contra *Haemonchus* sp. en ovinos.
- La optimización del silenciamiento de genes en *Haemonchus* sp. representa el primer estudio de esta naturaleza.
- Es el primer informe de selección y silenciamiento de un gen novel (DIM 1) que sea vital para *Haemonchus* sp.

La compilación de este libro se divide en 4 capítulos, 2 de los cuales son introductorios, el tercero da a conocer sobre la obtención de las muestras y procesamiento, además de una identificación de mimotopos en una Biblioteca de fagos. El cuarto capítulo, indica en forma detallada los estudios de caso:

El CAPÍTULO 1, menciona aspectos de *H. contortus*, ciclo biológico, prevalencia, diagnóstico, control, afectaciones y pérdidas económicas e impacto ambiental de los desparasitantes.

En el CAPÍTULO 2, se trata sobre la resistencia parasitaria, desarrollo de vacunas, respuesta inmunológica del hospedero, bibliotecas de fago para el control de parásitos, silenciamiento de genes en parásitos.

El CAPÍTULO 3, explica el ensayo inmunoenzimático (elisa), obtención de huevos de *H. contortus*, conteo de huevos por gramo de heces – técnica de mcmaster, coprocultivos estériles, selección y preparación de un animal donante de huevos, obtención de las ll para

el experimento de inmunoneutralización, obtención de las L3 para los experimentos de silenciamiento, así mismo se presenta la identificación de mimotopos similares a *H. contortus* a través de una biblioteca de fagos.

Los estudios de caso se abordan en el CAPÍTULO 4: donde se realiza la optimización de transferencia de genes en *h. contortus* para el silenciamiento de genes vitales y la evaluación de un péptido con epítomos de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (gapdh) y de desorganización muscular (dim 1) en la protección de ovinos contra *H. contortus*.

*H. contortus*, ciclo biológico, prevalencia,  
diagnóstico, control, afectaciones y pérdidas  
económicas e impacto ambiental de los  
desparasitantes.

## CAPÍTULO I.

### *H. contortus*, CICLO BIOLÓGICO, PREVALENCIA, DIAGNÓSTICO, CONTROL, AFECTACIONES Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS, E IMPACTO AMBIENTAL DE LOS DESPARASITANTES.

#### **1.1 *H. contortus***

Los NGI son los parásitos que con más frecuencia afectan a las poblaciones animales, particularmente a los rumiantes, que de no controlarse pueden limitar la producción agropecuaria, constituir una amenaza grave para la salud, el bienestar de los animales y el hombre (Amarante, 2014; Wilmsen, Silva, Bassetto, & Amarante, 2014). Son muy comunes en las regiones tropicales y subtropicales, y llegan a ocasionar la muerte de los animales cuando las cargas parasitarias son altas (C. Bassetto et al., 2014; Felippelli et al., 2014). Los parásitos que más afectan a los pequeños rumiantes son los del género *Haemonchus* y de ellos *H. contortus* el más prevalente de todos (García et al., 2007; Sargison, Jackson, & Gilleard, 2011).

Taxonómicamente pertenecen al Phylum *Nematoda*, Clase *Secernentea*, Subclase *Rhabditia*, Orden *Strongylidae*, Familia *Trichostrongylidae*, Subfamilia *Haemonchinae* y Género *Haemonchus* con tres especies presentes en bovinos y pequeños

rumiantes, *H. contortus*, *H. placei* y *H. similis* (Vieira, Berne, Cavalcante, & Menezes, 1989).

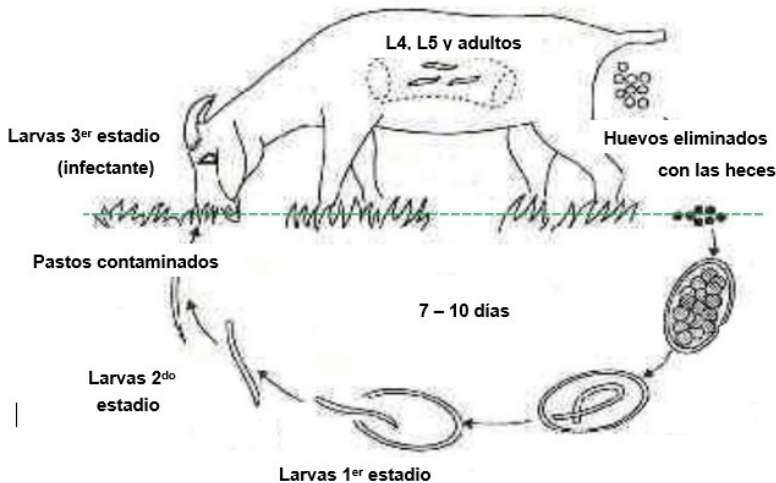
### **1.1.1 Ciclo biológico**

*H. contortus*, como la mayoría de los nematodos, presentan un ciclo de vida directo (figura 1). La ovoposición de las hembras puede alcanzar cifras que oscilan entre 5 000 y 15 000 huevos diarios, los cuales bajo condiciones climáticas adecuadas garantizan una rápida acumulación de la fase infectante (L3) del parásito en las áreas de pastoreo. Dado su carácter altamente hematófago, una larva 5 o un parásito adulto puede llegar a succionar hasta 30  $\mu$ l de sangre diariamente, lo que causa marcados cuadros de anemia y la muerte de algunos animales cuando la carga parasitaria supera los 500 nematodos (Rose, Hoar, Kutz, & Morgan, 2014).

Los huevos eliminados que todavía se encuentran en la fase de mórula, son más sensibles que los huevos larvados de otros nematodos. Los huevos en el pasto, bajo condiciones de temperatura y humedad óptimas eclosionan, dan lugar al primer estadio larval (L1) el cual a partir de mudas sucesivas se convierte en L2 y finalmente en L3, la fase infectante del parásito. La resistencia de los dos primeros estadios larvales es notablemente menor que la L3, que están protegidas por una fuerte cutícula o vaina que la rodea, la cual

llega a soportar una desecación moderada en el pasto (Molento, 2009).

Las L3 de *H. contortus* pueden permanecer vivas en los pastizales hasta nueve meses. La cutícula protectora se deshace cuando la larva alcanza el rumen, el primero de los compartimientos gástricos, luego pasa al abomaso donde penetra la mucosa y llega al cuarto estadio (L4). Después de 21 horas se convierte en L5, momento a partir del cual ocurre la diferenciación sexual (J. Leathwick, Moilanen, Ferrier, & Julian, 2010).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *H. contortus*

De los nematodos parásitos de los rumiantes, es *H. contortus* sobre el que más estudios se realizan en relación a los factores que

**Larvas 1er estadio**

influyen sobre su ciclo de vida y que determinan la viabilidad del huevo así como de las etapas larvarias. A diferencia de otros parásitos de la familia *Trichostrongylidae*, dentro de ellos *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus colubriformis*, los huevos y las larvas de *H. contortus* poseen requisitos más estricto de humedad, una menor tolerancia a las temperaturas frías, además de un mayor requerimiento y tolerancia para las altas temperaturas (O'Connor, Walkden-Brown, & Kahn, 2006).

La migración de las L3 se realiza de manera horizontal (desde las deposiciones fecales) y vertical (hacia la parte alta del pasto). Este proceso de migración es imprescindible en la ecología de las etapas de vida libre, por cuanto asegura ponerse al alcance de los animales que consumirán el pasto y con él la fase infectante del nematodo (Morgan, 2011). Asimismo, es conocido que las L3 de *H. contortus* pueden permanecer dentro del suelo o en la capa vegetal, lo que constituye también un reservorio de la fase infectante del parásito (Amaradasa, Lane, & Manage, 2010).

El conocimiento actual indica que *H. contortus* evolucionó a partir de animales salvajes en el África subsahariana antes de diseminarse a todo el mundo por el movimiento antropogénico del ganado. Durante este tiempo, se adaptó a diferentes especies hospedadoras y zonas climáticas, ahora está presente en las áreas de

pastos en la mayoría de las regiones y países del mundo (J. S. Gilleard, 2013).

En este mismo sentido, Waller and Chandrawathani (2005) informan que *H. contortus* demuestra ser notablemente adaptable en una amplia gama de entornos, debido a su alto potencial biótico que le permite aprovechar períodos cortos que son favorables para el desarrollo de sus etapas de vida libre, a la capacidad de supervivencia de la fase infecciosa, así como a mecanismos adaptativos específicos como la hipobiosis de las larvas del cuarto estadio (L4).

Este nematodo tiene una tendencia alta a desarrollar resistencia a los medicamentos antihelmínticos, incluso a los pocos años del uso de las drogas. Esta capacidad de adaptación se debe en gran medida al alto nivel de variación genética en las poblaciones del parásito (J. Gilleard & Beech, 2007).

### **1.1.2 Prevalencia**

La prevalencia del *H. contortus* está influenciada por múltiples factores como, la raza, la edad, el sexo, el estado nutricional, la época del año, entre otros (Dutta et al., 2017).

Estudios realizados por Lashari, Tasawar, Akhtar, Chaudhary, and Sial (2015) en una población de 380 cabras de diferentes sexo, raza y edad evidenciaron que 96 animales (25,26 %) estaban infestados por el nematodo, fue más frecuente en los machos (31,85 %) que en las

hembras (22,47 %) y en animales de la raza Teddy la prevalencia fue de 29,6 %, mientras que en la raza Beetal fue del 19,1 %. Por grupo de edad la prevalencia en el grupo de 3-12 meses fue más alta (31,66 %) que la del grupo de más de 42 meses de edad (15,55 %).

En una población de 380 cabras de diferentes sexo, raza y edad demostró que 96 animales (25,26 %) estaban infestados por el nematodo. La infección del parásito fue más frecuente en los machos que en las hembras (31,85 % y 22,47 % respectivamente). En animales de la raza Teddy la prevalencia fue de 29,6 %, mientras que en la raza Beetal solo fue del 19,1 %. Por grupo de edad la prevalencia en el grupo de 3-12 meses fue más alta (31,66 %) que la del grupo de más de 42 meses de edad (15,55 %).

Qasim, Avais, Durrani, Khan, and Shahzad (2016) informaron que, de un total de 646 animales, el 30 % (97/323) de las ovejas y el 25 % (81/323) de las cabras resultaron positivas a *H. contortus*. La prevalencia se encontró asociada con la época del año y la condición corporal.

En Nepal de 252 cabras investigadas la prevalencia de *H. contortus* fue del 13,89 %, fue mayor en los machos (15,18 %) que en las hembras (12,86 %), mientras que el grupo de menos de un año edad tuvo una prevalencia de 14,54 % y el de más de 2 años 12,96 % (Adhikari, Rana, Kaphle, Khanal, & Raut, 2017).

Otros estudios muestran prevalencias mucho más altas, como la encontrada por Rashid and Irshadullah (2018) en la India con un 60 %. Asimismo, investigaciones realizadas en tres países europeos arrojaron prevalencias del 77 % en Suiza, 73 % en Italia y 4 % en Irlanda (Rinaldi et al., 2015).

En Cuba los estudios de prevalencia de *H. contortus* (García et al., 2007) revelan que de los NGI es sin dudas el que más afecta a las poblaciones de ovinos y caprinos. Experimentos de dinámica de las L3 en tres granjas de la provincia de Matanzas muestran que el *Haemonchus* fue predominante (más del 90 % en cada granja durante todo el año), comparado con *Trichostrongylus colubriformis* y *Oesophagostomum columbianum* que en ningún caso excedió del 10 %.

### **1.1.3 Diagnóstico**

El diagnóstico de la hemoncosis se basa en el empleo de varios métodos, que van desde los síntomas clínicos, la técnica de FAMACHA, exámenes postmortem y pruebas de laboratorio dentro de las que se incluyen el conteo fecal de huevos, identificación de formas larvaria y técnicas moleculares (R. Besier, Kahn, Sargison, & Van Wyk, 2016a).

Para Bowman (2014), los síntomas clínicos que caracterizan la infección por *H. contortus* se relacionan casi exclusivamente con la capacidad de los nematodos adultos, así como las formas larvarias,

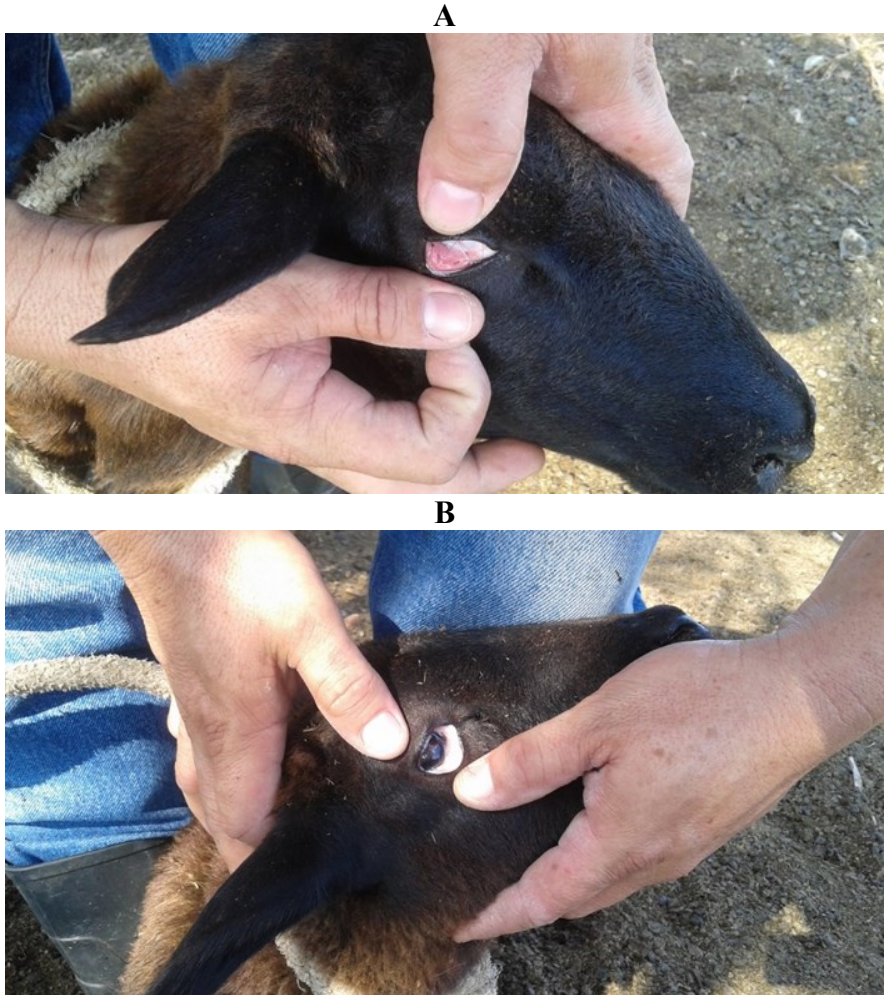
de alimentarse de sangre. Menciona, anemia, agotamiento físico, edema submandibular y la muerte. En casos de altas cargas parasitarias (forma hiperaguda) los animales se encuentran muertos con indicios de anemia severa.

En la mayor parte de los casos, el cuadro epidemiológico es característico, y toman como referencia la existencia de factores ambientales que son especialmente necesarios para el desarrollo del ciclo de vida del *Haemonchus* y la susceptibilidad de los animales. La enfermedad es principalmente diagnosticada en animales jóvenes (corderos y cabritos), así como en ovejas lactantes en las que la resistencia a la infección por nematodos disminuye notablemente durante este periodo (Taylor, Coop, & Wall, 2007a).

Como consecuencia de la anemia producida, se observa una palidez de las mucosas, especialmente de la conjuntiva, que fluctúa desde el color rojo-rosado normal al blanco porcelana en casos extremos (R. Besier et al., 2016a).

A partir de la década de los 90 del pasado siglo, con el aumento creciente de la resistencia parasitaria a los antihelmínticos, el Control Integrado de Parásitos (CIP) se erigió como una solución viable para el control de las enfermedades parasitarias (Tariq, 2017) y en el caso particular de la hemoncosis una herramienta valiosa para el diagnóstico de la enfermedad lo constituye la técnica de FAMACHA (Cintra, Ollhoff, & Sotomaior, 2018; Storey et al.,

2017) que se basa en la desparasitación selectiva que tiene en cuenta la coloración de la conjuntiva ocular muy relacionada con los niveles de anemia producida por *H. contortus* (Figura 2.).



**Figura 2.** Análisis de la conjuntiva en ovinos.

*A. Animal con coloración normal de la conjuntiva no necesita desparasitación, 220 huevos por gramos de heces. B. Animal con coloración blanco crisol, 21550 huevos por gramos de heces.*

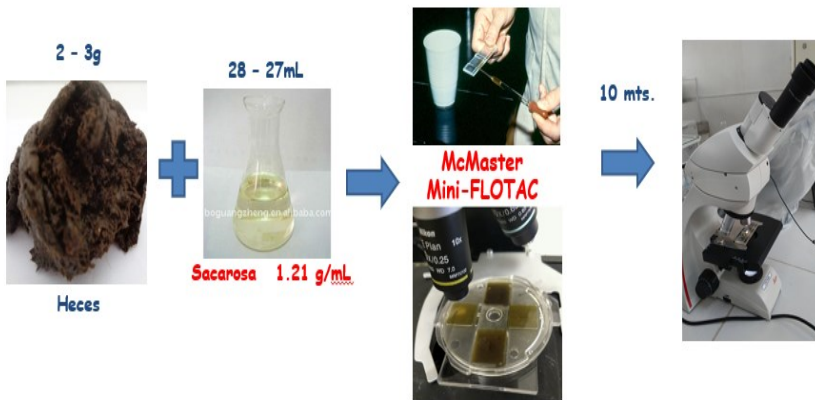


**Figura 3.** Presencia de nematodos adultos de *Haemonchus contortus* en el abomaso, proveniente de un animal infestado con 21550 huevos por gramos de heces.

El color de la conjuntiva (método FAMACHA®), y el promedio de HPG está relacionado con la presencia de parásitos, siendo el color rojo un indicador de baja carga de parásitos, en

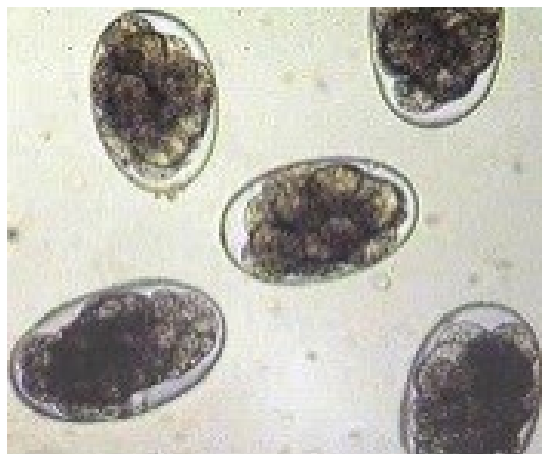
contraste con el color blanco que se relacionó con un alto grado de infestación para ambos sistemas de producción (Sánchez-Herrera, *et al.*, 2016). En Brasil se lleva a cabo un experimento en cabras lecheras, con el objeto de determinar los grados de anemia, utilizando el método FAMACHA© (Besier *et al.*, 2016).

Por otra parte, la necropsia de los animales en los mataderos confirma el diagnóstico a través del hallazgo de los nematodos adultos en el abomaso, donde se observa edema de la mucosa, con hemorragias petequiales, y en algunos casos infiltración de sangre. En dependencia del número de nematodos así como de la etapa de infección, puede apreciarse palidez del cadáver, ascitis, mientras que la sangre mantiene un aspecto acuoso sin llegar a coagularse (Figura 3.) (R. Besier *et al.*, 2016a).



**Figura 4.** Procedimiento gráfico para el conteo fecal de huevos por gramos de heces con el empleo de las técnicas de McMaster y MiniFlotac.

De los procedimientos que más se utilizan tradicionalmente para el diagnóstico del *H. contortus*, las técnicas para determinar la presencia y/o el número de huevos del parásito constituyen las herramientas más comunes (Höglund, Ljungstrom, Melville, & Skuce, 2017; Yang et al., 2017). La técnica de McMaster es la más utilizada mundialmente (Bosco, 2014) mientras que en los últimos años se suma la Mini-FLOTAC (Figura 4) (Rinaldi, 2014).

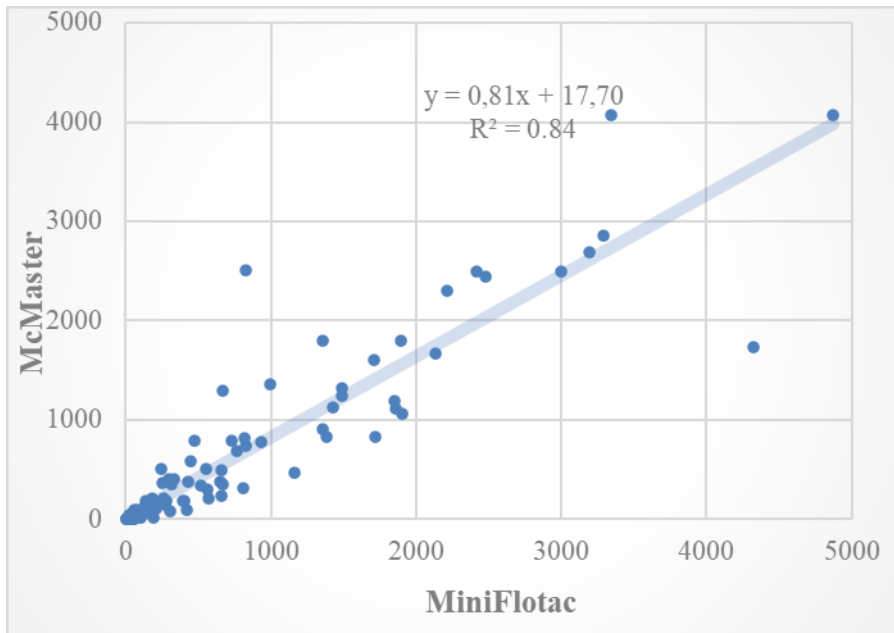


**Figura 5.** Huevos de *Haemonchus contortus* que se observan cuando se realiza la técnica de McMaster o MiniFlotac.

El conteo fecal de huevos constituye una valiosa prueba para el diagnóstico de *H. contortus* debido a que las muestras son fáciles de coleccionar y los medios utilizados durante el protocolo son muy baratos. Los resultados altos del número de huevos encontrados durante el conteo, pueden ser un indicador de casos de hemoncosis

aguda y constituir una alerta anticipada ante brotes de la enfermedad (R. Besier et al., 2016a) (Figura 5 ).

En nuestro laboratorio hemos realizado análisis de muestras por McMaster y MiniFlotac, con la conclusión de que MiniFlotac puede detectar más huevos que McMaster (Figura 6.).

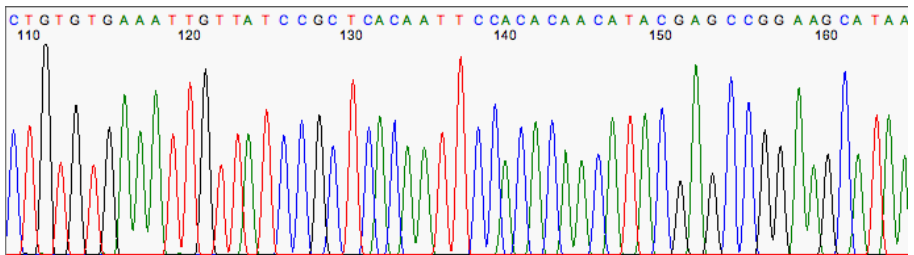


**Figura 6.** Curva de regresión lineal que incluye el análisis de las dos técnicas empleadas.

Otro de los métodos empleados para el diagnóstico es el conteo de los huevos con marcadores fluorescentes, que estima la proporción de estos. Comparado con los métodos de coprocultura, este procedimiento tiene un alto grado de especificidad (Jurasek, Bishop-Stewart, Storey, Kaplan, & Kent, 2010).

Dentro de las técnicas moleculares utilizadas para el diagnóstico de *H. contortus* está la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la identificación y diferenciación de las especies con el empleo de marcadores genéticos en el ADN ribosomal (Figura 7.) (Roeber, Jex, & Gasser, 2013).

Otras de las técnicas empleadas para el diagnóstico de múltiples parásitos que afectan tanto a los animales como al hombre, lo constituyen los ensayos inmunoenzimáticos ELISA. Cabe destacar *Taenia solium* (Chuang, Xing-Wang, Jian-Zhong, & Tiao-Ying, 2017), *Fasciola hepatica* (Howell, Baylis, Smith, Pinchbeck, & Williams, 2015), *Cryptosporidium* (Akinkuotu, Akinkuotu, & Oseni, 2016), *Schistosoma mansoni* (Nickel, Sayasone, Vonghachack, Odermatt, & Marti, 2015), *Trichinella spiralis* (Sun et al., 2015), *Taenia saginata* (Jansen et al., 2016).



**Figura 7.** Secuenciación por el método de Sanger en la identificación de *Haemonchus contortus*.

En el caso particular de *H. contortus*, los ensayos inmunoenzimáticos ELISA se utilizan para: estudiar la expresión de

proteínas como la H11 (Zhou et al., 2014), evaluar la respuesta inmune y su papel en la especificidad del parásito (Santos, Xavier, Amarante, Bassetto, & Amarante, 2014), estudio de proteínas como la Hc23 y su papel en la respuesta inmune de los animales (Fawzi, González-Sánchez, Corral, Cuquerella, & Alunda, 2014), probar el efecto sobre la respuesta inmune de vacunas de ADN (R. Yan, Sun, Song, Xu, & Li, 2013), detectar IgE y su papel en la respuesta inmune contra el nematodo (Shaw, Pfeffer, & Bischof, 2009), evaluar proteínas recombinantes así como su participación en la respuesta inmune (Gadahi et al., 2017), estudiar la respuesta humoral y celular frente a la infección del parásito (González-Sánchez, Cuquerella, & Alunda, 2018).

#### **1.1.4 Control**

A partir del potencial de mortalidad que posee *H. contortus*, si no se controla, se hacen necesarios tratamientos efectivos contra el nematodo para su prevención. La decisión de que tratamiento emplear y en qué momento aplicarlo, depende del equilibrio entre la urgencia del tratamiento, el costo económico y el potencial para el desarrollo de resistencia (R. Besier et al., 2016a).

Durante décadas, el uso de drogas químicas (antihelmínticos) constituye la estrategia principal para el control de *H. contortus* (dos Santos et al., 2017; Kaplan & Vidyashankar, 2012; Scott et al., 2013). Sin embargo, su control debe estar basado en un paquete

integral de manejo que toma como premisa, la utilización de los recursos de forma eficiente y efectiva para no tener que depender solo de drogas químicas.

El manejo del nematodo debe ser adaptativo y proactivo e incluir diferentes métodos como, utilización de forrajes bioactivos, vacunas, manejo del pastoreo, FAMACHA, selección de individuos resistentes, control biológico (hongos nematófagos) y drogas químicas (Kearney, Murray, Hoy, Hohenhaus, & Kotze, 2016) (Figura 8.).

## Control Integrado de Parásitos (CIP)

(FAO, 2003)

### Manejo del pastoreo

Descanso de pasturas

Pastoreo alterno

Pastoreo rotativo

Áreas de soca

Silvopastoreo

### Manejo de los animales

Animales Resistentes

FAMACHA

Fitoterapia

Confinamiento de categorías  
susceptibles

Vacunas

**Figura 8.** Manejo integrado propuesto por la FAO en el control de parásitos gastrointestinales de rumiantes.

La utilización de forrajes bioactivos que posean principios químicos capaces de tener un efecto sobre los nematodos, constituye

una alternativa para el control de la hemoncosis (Piluzza, Sulas, & Bullitta, 2014). Para Valladão, Gallani y Pilarski (2015), determinadas plantas se emplean para el tratamiento de los animales, aunque no solo para enfermedades parasitarias, sino para controlar otras dolencias, algunas de ellas con resultados exitosos.

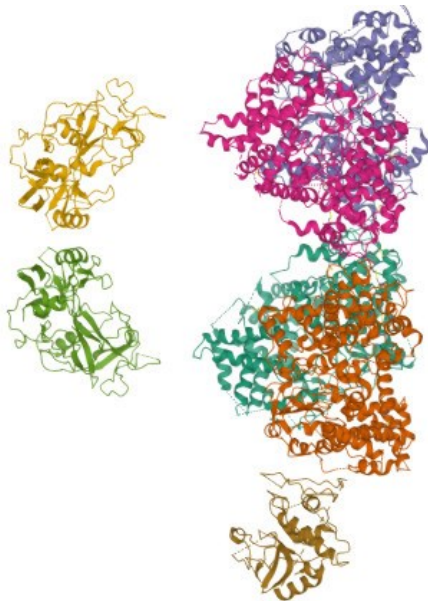
Aunque la obtención de vacunas que garanticen la protección de los animales contra varios parásitos es exitosa, en el caso particular de *H. contortus* los intentos realizados no son del todo acertados.

La mayoría de los estudios hechos, en la búsqueda de candidatos vacunales contra *H. contortus*, son a partir de dos variantes de antígenos. La primera se basa en proteínas nativas aisladas de la membrana intestinal del nematodo, principalmente H11 (Roberts et al., 2013) y H-gal-GP (Meier et al., 2016) (Figura 9).

Tal vez el mejor ejemplo lo constituye la vacuna llamada “Barbervax” obtenida contra la hemoncosis ovina en Australia que logra más del 85 % de reducción del conteo de huevos (Lyon, 2014). La segunda tiene en cuenta proteínas de excreción/secreción del parásito, entre las que destacan Hc23 (Kandil et al., 2017) y la Cisteína-proteasa (Martín et al., 2015).

Otro de los métodos empleados en el control de *H. contortus* es la selección de animales resistentes, que toma como base el conocimiento que dentro de una población hay un grupo de

individuos que soportan mucho más las infecciones por parásitos que otros. Uno de los mecanismos involucrados en este comportamiento lo constituye, al parecer, la producción de interleucina 13 (IL 13), la cual estimula el peristaltismo intestinal para provocar un efecto de desprendimiento de los nematodos de la pared del tubo digestivo (Corley & Jarmon, 2012).



**Figura 9.** Estructura tridimensional de H-gal de *Haemonchus contortus* PDB.

Los estudios demuestran que las cabras resistentes a parásitos expresan más IL 13 que las cabras susceptibles, lo cual representa un indicador para la selección de animales resistentes (Kearney et al., 2016). Las ventajas de la selección de animales resistentes son evidentes: disminuye la utilización de antihelmínticos, reduce la

contaminación de los pastizales, tiene beneficios marcados sobre la salud y en el plano económico (Bishop & Morris, 2007).

FAMACHA (Van Wyk & Bath, 2002) permite identificar, dentro de un rebaño, los animales afectados por *H. contortus*, y toma en cuenta la presencia o no de anemia para hacer una selección de los animales del rebaño que necesitan ser sometidos a un tratamiento con antihelmíntico (Storey et al., 2017). Todo está encaminado a reducir el uso indiscriminado de fármacos aparejado a una disminución consecuente de la resistencia parasitaria a las drogas.

Esta técnica, está extendida a nivel global y se aplica con éxito en países como: Argentina (Suárez, Fondraz, Viñabal, & Salatin, 2014), Iraq (Al-Jbory & Al-Samarai, 2016), Colombia (Uruburu, Alma, Quiroz Acosta, & Noguera Ortega, 2017), Malasia (Mohammed et al., 2016), México (Medina-Pérez, Ojeda-Robertos, Reyes-García, Cámara-Sarmiento, & Torres-Acosta, 2015), Estados Unidos (Notter, Burke, Miller, & Morgan, 2017), Perú (Zárate Rendón, Rojas Flores, & Segura Hong, 2017), India (Thomas & Syamala, 2017), Brasil (da Silva et al., 2017), Sudáfrica (Babayani, van Wyk, & Morgan, 2016), Puerto Rico (Acero-Camelo, Valencia, Rodríguez, & Randel, 2009), Uganda (Nabukenya, Rubaire-Akiiki, Olila, Muhangi, & Höglund, 2014), Canadá (Westers, 2016) y Cuba (Arece & López, 2013).

A pesar de todas las estrategias, el tratamiento por elección para *H. contortus* es el empleo de antihelmínticos (C. Bassetto & Amarante, 2015; Lambert et al., 2017). Dentro de los más utilizados están, los Imidazotiazoles, los Benzimidazoles y las Lactonas Macroclínicas (Silva, Delfino, do Carmo Medeiros, & Silva, 2017).

Los benzimidazoles basan su mecanismo de acción al inhibir la polimerización de los microtúbulos que provocan la muerte celular (Aleyasin et al., 2015). En este grupo se incluyen desde los primeros que comercialmente salieron al mercado (tiabendazol, cambendazol y oxibendazol) hasta los más actuales (albendazol, fenbendazol, oxfendazol y mebendazol) (McKellar & Jackson, 2004).

Con la salida al mercado de la Ivermectina a principios de la década de los 80, se inició una nueva etapa de eficacia aplicada a la mayoría de las especies de nematodos, así como contra determinados parásitos externos (Campbell, Fisher, Stapley, Albers-Schonberg, & Jacob, 1983). El mecanismo de acción de las Lactonas Macroclínicas es a través de los canales de Cloro ligados a los receptores glutamato (GluCl), los cuales se encuentran de manera exclusiva en las neuronas y células musculares de los invertebrados. Gracias a la interacción con el canal GluCl se desencadena un aumento en la permeabilidad al Cloro, lo que resulta en una hiperpolarización de la membrana celular (Roz Laing, Gillan, & Devaney, 2017).

La resistencia a la Ivermectina es muy frecuente en el caso particular de *H. contortus* (Luo et al., 2017). Por otra parte, el efecto persistente de la Moxidectina genera éxitos en su control, sin embargo, cuando aparece resistencia a las Lactonas Macroclínicas también se reduce o se elimina este efecto (R. Besier et al., 2016a).

En Cuba, el control de las parasitosis se hace de forma arbitraria sin tener en cuenta, en la casi totalidad de los casos, la epidemiología de la entidad que se trata, lo que trae consigo que los planes de control no sean eficaces, y aparejado a ello los parásitos gastrointestinales son cada vez más resistentes a los antihelmínticos que se usan (Arece et al., 2004), lo que se revierte en sistemas ineficientes de crianza ovina.

### **1.1.5 Afectaciones y pérdidas económicas**

*H. contortus* es sin dudas el más patógeno de los NGI de los pequeños rumiantes, debido a su actividad hematófaga y a su capacidad para aumentar vertiginosamente las poblaciones durante cortos períodos de tiempo, bajo condiciones que favorecen el desarrollo de las etapas de vida libre (R. Besier, Kahn, Sargison, & Van Wyk, 2016b). La fisiopatología de la hemoncosis y los signos clínicos están en relación sustancial con la anemia que se produce como resultado de su carácter hematófago (Saminathan et al., 2015). La gravedad de la infestación en el hospedero está marcadamente relacionada con el número de larvas que se establecen, ya que existe

una fuerte correlación entre la pérdida de sangre y el número de gusanos adultos (Iliev, Prelezov, Ivanov, Kirkova, & Tonev, 2017).

Se considera el parásito más importante económicamente en aquellas regiones o países del mundo donde es endémico, debido a su elevado potencial para generar altas tasas de mortalidad sobre todo en pequeños rumiantes. Las pérdidas que ocasiona fluctúan mucho entre regiones, años y temporadas, y están influenciadas por las condiciones ambientales y la efectividad de las medidas de control, incluido el impacto de la resistencia antihelmíntica (Kearney et al., 2016).

El impacto económico inmediato es mayor cuando los animales se manejan bajo condiciones comerciales intensivas en áreas endémicas. Sin embargo, las pérdidas son más numerosas a largo plazo en aquellos sistemas ganaderos tradicionales en los que el número de animales es generalmente pequeño, a menudo exacerbado por los períodos de mala nutrición, la limitada disponibilidad y asequibilidad de antihelmínticos, así como la resistencia a las drogas (Vatta & Lindberg, 2006).

Las pérdidas en la producción láctea en ovejas y cabras también están asociadas a la infestación por *H. contortus* en ovejas y cabras, asimismo la disminución parcial de la producción puede aumentar los efectos nocivos sobre la descendencia al reducir el crecimiento de los neonatos (Nnadi, Kamalu, & Onah, 2009).

En animales parasitados por el nematodo los niveles de nutrición bajos se relacionan con un balance negativo del nitrógeno (Rowe, Nolan, De Chaneet, Teleni, & Holmes, 1988) y este a su vez con la frecuente inapetencia observada en los animales como sucede en la mayoría de las infestaciones por parásitos de la familia *Trichostrongylidae* (Iliev et al., 2017).

En sentido general las pérdidas asociadas a la infestación por *H. contortus* incluyen, pérdida de peso, reducción de la ganancia media diaria, ineficiencia reproductiva (disminución de la fertilidad), retardo del crecimiento, así como disminución de la calidad de la lana y de la producción de leche (Kelly, Kahn, & Walkden-Brown, 2010; Veríssimo et al., 2012), asimismo, también provoca baja productividad, desequilibrios hematológicos y bioquímicos, inapetencia, pérdida de peso corporal, alteración de la eficiencia digestiva y reducción de la producción de carne y lana de un 27 % y 40 % respectivamente (Bachaya, Iqbal, Jabbar, & Ali, 2006). En invasiones agudas la mortalidad puede oscilar entre un 30 y un 50 % (Regassa, Sori, Dhuguma, & Kiros, 2006).

En el examen de animales sacrificados o muertos el contenido del abomaso suele observarse de color marrón oscuro con el revestimiento mucoso pálido, edematoso y cubierto de petequias de color rojo oscuro, así como nódulos en la mucosa. Microscópicamente, las lesiones fundamentales se relacionan con los

efectos locales de larvas o nematodos adultos lo que conlleva a una hipertrofia de la mucosa, infiltración de células mononucleares y eosinófilos en las glándulas gástricas, hiperemia periglandular y hemorragia, hiperplasia de las glándulas mucosas, proliferación del tejido conectivo y necrosis (Edwards, Garner, Williamson, Storey, & Sakamoto, 2016; Javanbakht et al., 2014).

El *H. contortus* adulto generalmente se localiza entre el epitelio y una capa gruesa de moco, donde las laceraciones o erosiones de la mucosa resultan en hemorragias de capilares superficiales atribuidas a la actividad del nematodo.

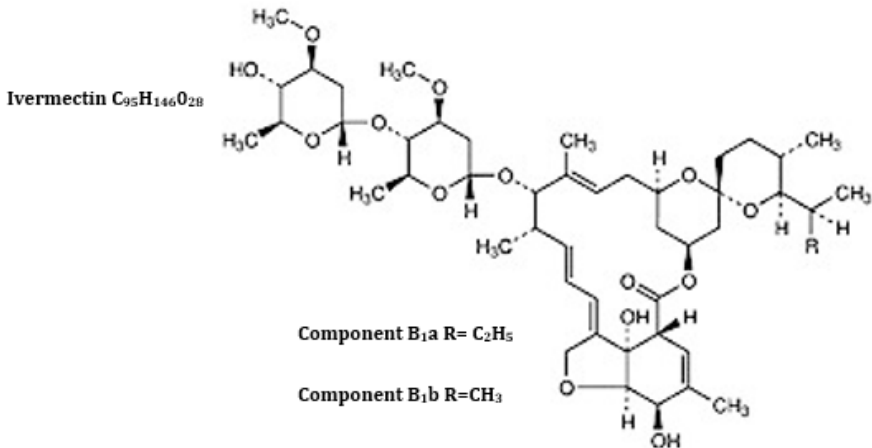
Los gastos financieros anuales destinados para el control de *H. contortus* son elevados en todo el mundo. En Sudáfrica 45 millones (Waller, 2006), en Australia 436 millones (Lane, Jubb, Shepherd, Webb-Ware, & Fordyce, 2015), en la India 103 millones (McLeod, 2004), en Gran Bretaña 84 millones (Nieuwhof & Bishop, 2005), en México 445 millones (Rodríguez-Vivas et al., 2017) y en Brasil 700 millones (VIEIRA, 2005).

### **1.1.6 Impacto ambiental de los desparasitantes**

En las últimas décadas se desarrollaron y aplicaron varias estrategias de control para endo y ectoparásitos, muchos de estos productos son eficaces (antihelmínticos, acaricidas, insecticidas); sin embargo, son incapaces de prevenir la contaminación al medio

ambiente por su aplicación. Casi sin excepción, y en la medida que los antiparasitarios fueron perdiendo eficacia, estas estrategias se hicieron menos rentables, comprometiendo en algunos casos, la propia sustentabilidad del sistema productivo. (FAO, 2003).

En este sentido, en la industria ganadera es muy frecuente el uso de lactonas macrocíclicas (Figura 10) a partir de medicamentos como la ivermectina y la doramectina; sin embargo, estas al almacenarse en el cuerpo del animal alrededor de 3 meses pueden ocasionar daños al animal, así como también a las personas que consuman su carne o leche, esto cuando aún la ivermectina no haya sido expulsada totalmente del animal, mientras que doramectina, al ser expulsada por heces, tiende a ocasionar problemas en el medio ambiente (Sevilla Miranda & Murillo García, 2021).



**Figura 10.** Estructura química de la Lactona Macrocíclica.

De la misma manera Argandoña, Pereda y Cusi (2020), mencionan que, en el caso de productos derivados de la avermectina como la ivermectina, se recomienda su uso prudente para reducir los efectos negativos sobre el medio ambiente, por cuanto estudios recientes sugieren que las plantas pueden verse afectadas negativamente. Con respecto a los invertebrados del suelo, los efectos negativos como el aumento de la mortalidad y la reducción de la reproducción son más conocidos por los escarabajos coprófagos. Igualmente, algunos estudios también han sugerido que las lombrices de tierra, los colémbolos y los enquitreidos pueden verse afectados negativamente por la exposición a la avermectina.

Pérez-Cogollo et al, (2018), señalan sobre la toxicidad de las avermectinas para los invertebrados del suelo y en las heces de ovejas recién tratadas (abamectina fue más tóxica que la doramectina). En el suelo, las lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) fueron las más afectadas con una CL50 (concentración letal) de 18 y 228 mg/kg de suelo seco, respectivamente, mientras que las CL50 fueron de 67-111 y >300 mg/kg para colémbolos (*Folsomia candida*), isópodos (*Porcellio scaber*) y enquitreidos (*Enchytraeus crypticus*).

Las CE50 (concentración efectiva) para el efecto sobre la reproducción de colémbolos y enquitreidos fueron de 13 y 38 mg/kg, respectivamente para abamectina, y de 42 y 170 mg/kg para

doramectina. Para las lombrices de tierra, la NOEC fue de 10 y 8,4 mg/kg para los efectos de abamectina y doramectina sobre el peso corporal. Cuando se expusieron en las heces, los colémbolos y los enquitreidos dieron CL50 y CE50 de 1,0-1,4 y 0,94-1,1 mg/kg de heces secas para abamectina y 2,2->2. 4 mg/kg para doramectina. La reproducción de lombrices no se vio afectada. Este estudio indica un riesgo potencial de avermectinas para los invertebrados del suelo que colonizan las heces de ovejas tratadas recientemente (Pérez-Cogollo et al., 2018).

Las avermectinas son producidas por los actinomicetos *Streptomyces avermitilis* que habitan en el suelo y, a pesar de tener estructuras químicas complejas, se fabrican mediante síntesis a gran escala para uso comercial. Aunque el alcance de los efectos ecotoxicológicos de las avermectinas no está bien documentado, existen informes de ecotoxicidad. Las avermectinas tienen vidas medias cortas y sus residuos pueden eliminarse mediante diferentes métodos de procesamiento de alimentos (Álvarez, 2013).

Las avermectinas pueden persistir en el agua, sedimentos, suelos y productos alimentarios y, por lo tanto, deben desarrollarse más prácticas de gestión que reduzcan los riesgos potenciales asociados con la ecotoxicidad de estos compuestos altamente tóxicos. Por su parte, Acosta (2022) indica que la industria ganadera utiliza ampliamente antibióticos y pesticidas, así mismo los productos

químicos agrícolas pueden presentar riesgos potenciales para la salud humana y ambiental debido a su toxicidad y a través de sus contribuciones a la resistencia a los antimicrobianos; en consecuencia, se necesita con urgencia estrategias para reducir su emisión al medio ambiente.

Mientras que Quispe (2020), indica que la presencia de la ivermectina en el aire, agua y suelo pueden afectar a cualquier forma de vida presente en el ambiente; igualmente afirma que los efectos negativos en el aire no se darán de manera significativa, debido a las propiedades fisicoquímicas que la hacen difícilmente volátil a condiciones ambientales. Por otro lado, el daño causado en los sistemas acuáticos y terrestres es un riesgo latente y que requiere de mayor investigación, además del establecimiento de nuevos protocolos para su uso y disposición final, pues una vez que entran en contacto con el agua o el suelo se facilita su movilidad y disponibilidad perjudicando a los organismos que en ellos habitan. Finalmente, es necesario que se promuevan estudios respecto a los impactos que podrían conllevar su presencia en desechos humanos

Por otro lado, Roque (2019), evaluaron el estado de resistencia de los nematodos gastrointestinales bovinos (GIN) frente a la ivermectina (IVM) y el fenbendazol (FBZ) en Ecuador, el estudio involucró cinco fincas ganaderas ubicadas en diferentes zonas topográficas del país; se evaluó la eficacia antihelmíntica

calculando el porcentaje de reducción del recuento de huevos fecales (FECR) después del tratamiento. Además, se analizó el ADN de los cultivos de larvas combinados para determinar los alelos de resistencia al bencimidazol. Para los animales tratados con IVM, los porcentajes de FECR oscilaron entre 0 y 68 %, lo que indica la presencia de gusanos altamente resistentes. Se encontró lo contrario para los animales tratados con FBZ, donde los porcentajes de FECR estaban por encima del 90% en todas las granjas probadas.

Hasta ahora la evidencia concuerda en señalar, que los desparasitantes al ser expulsados por los animales pueden originar un peligro latente para el ecosistema terrestre, así como contaminar el agua, requiriéndose mayor efectividad profiláctica en el manejo de estos desechos, dado que su toxicidad puede afectar a las colonias de escarabajos, entre otros animales de tierra (Ortíz, 2017).

La toxicidad ocasionada al agua por estos desparasitantes puede resultar perjudicial no solo para el consumo animal, sino, humano, por cuanto las aguas potables al ser consumidas pueden contaminar al receptor con los residuos tóxicos, promoviendo el origen de enfermedades gastrointestinales, así mismo, la toxicidad altera el ecosistema del río, laguna, donde son depositados afectando los peces, plantación acuática, movilizándose hasta 100 km al ser combinados con pesticidas, los cuales también contribuyen a una contaminación de mayor alcance (Iglesias et al., 2016).

De ese modo, el agua contaminada provoca la proliferación de algas en un lago o en un entorno marino, la proliferación de nutrientes recién introducidos estimula el crecimiento de plantas y algas, lo que a su vez reduce los niveles de oxígeno en el agua. Esta escasez de oxígeno, conocida como eutrofización, sofoca plantas y animales y puede crear " zonas muertas ", por lo tanto, los ecosistemas saludables dependen de una red compleja de animales, plantas, bacterias y hongos, todos los cuales interactúan, directa o indirectamente, entre sí. El daño a cualquiera de estos organismos puede crear un efecto en cadena, poniendo en peligro ambientes acuáticos enteros (Quispe, 2020).

Pérez-Cogollo et al., (2018) señalan que es recurrente que se implementen estudios científicos para certificar la eficacia de desparasitantes alternativos, o en caso, organismos de control y eliminación de tal toxicidad, esto con la finalidad de establecer un progresivo proceso de sustitución hacia prácticas de mayor eficacia ecológica. Por consiguiente, las investigaciones generadas, concuerdan con estudios realizados en otras latitudes geográficas en cuanto al riesgo de toxicidad a tratamientos relacionados a ivermectina, siendo considerable establecer un programa nacional de epidemiología animal con la intención de sumar esfuerzos que permitan realizar ensayos científicos

De la misma manera, se corroboran la posibilidad de existencia de contaminación al momento de realizar la desparasitación del ganado, específicamente cuanto se aplica Ivermectina, siendo este el medicamento con mayor documentación científica. De aquí la necesidad de contar con mayor evidencia a partir de seguir realizando investigaciones al respecto, con la finalidad de estipular con mayor certeza el real alcance en el medio ambiente (Iglesias et al., 2016).

Esto permitirá, ir descubriendo desde el entorno ambiental nativo, posibles alternativas para la implementación de medidas ecológicas que no solo minimicen el impacto en el ambiente, sino, que sea sostenible en cuanto a lo económico y su rentabilidad al productor, esto permitiría generar una cadena saludable en el consumo humano de los productos derivados del ganado bovino, no solo para la salud, sino, para el ahorro familiar (Pérez-Cogollo et al., 2018).

Resistencia parasitaria, desarrollo de vacunas,  
respuesta inmunológica del hospedero, bibliotecas  
de fago para el control de parásitos, silenciamiento  
de genes en parásitos

## CAPÍTULO II.

### RESISTENCIA PARASITARIA, DESARROLLO DE VACUNAS, RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HOSPEDERO, BIBLIOTECAS DE FAGO PARA EL CONTROL DE PARÁSITOS, SILENCIAMIENTO DE GENES EN PARÁSITOS

#### 2.1 Resistencia parasitaria

La resistencia parasitaria es la capacidad de un organismo parásito para sobrevivir a dosis de fármacos que normalmente serían letales a otros organismos de la misma especie. Es una modificación en la respuesta a un tratamiento medicamentoso de forma tal que la eficacia disminuye con respecto a la obtenida cuando el fármaco comenzó a usarse comercialmente (A. Kotze & Prichard, 2016).

La Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria considera resistente una población de parásitos cuando el por ciento de reducción en el conteo de huevos posterior al tratamiento con antihelmíntico es inferior al 95 %, y el intervalo del confianza es menor del 90 % (Coles et al., 1992).

Dentro de la familia *Trichostrongylidae*, el nematodo más estudiado en relación a la resistencia antihelmíntica es *H. contortus*, debido a su alta capacidad para desarrollar resistencia a los fundamentales tipos de antihelmínticos con un significado

económico importante a nivel global. Asimismo, otras de las razones es si se toma en cuenta las características de su biología y fisiología que lo convierten en un excelente modelo para las investigaciones (J. S. Gilleard, 2013). Algunas de esas características incluyen, su alta fecundidad, el tamaño grande de los adultos, lo fácil de lograr y mantener infecciones grandes de miles de gusanos en un hospedero y la accesibilidad a protocolos fáciles y exitosos para conservar las larvas del nematodo. Otro rasgo particular es que en su genoma, recientemente secuenciado, se pueden encontrar marcadores de resistencia antihelmíntica (RB Gasser, Schwarz, Korhonen, & Young, 2016; R Laing et al., 2016).

El *H. contortus* desarrolla resistencia a la totalidad de los tipos de drogas antihelmínticas empleadas en su control y es la especie donde se reporta, por primera vez, resistencia a una clase particular de fármaco. Los mecanismos de resistencia en *H. contortus* aparecen en la mayoría de los estudios en los primeros años de comenzar a utilizar cada fármaco (A. Kotze & Prichard, 2016).

Los mecanismos de resistencia de *H. contortus* dependen del grupo farmacológico que se trate (A. Kotze & Prichard, 2016). Los primeros informes de resistencia fueron al Tiabendazol, que salió al mercado en 1961 y cuatro años después se informó el primer caso de resistencia (Drudge, Szanto, Wyant, & Elam, 1964). Con otros antihelmínticos sucedió de manera similar, entre ellos, Albendazol,

## Mebendazol, Fenbendazol, Levamisol, Ivermectina, **Abamectina y Moxidectina**

Existen confirmación de resistencia de *H. contortus* en la mayoría de las regiones del mundo, como en Australia (Lamb, Elliott, Chambers, & Chick, 2017), Europa (Ramünke et al., 2016), América del Norte (Crook et al., 2016), Asia (Chandra et al., 2015), América del Sur (Chagas et al., 2016; Chaparro et al., 2017) y África (Arafa, Holman, & Craig, 2017).

En Cuba la resistencia antihelmíntica en *Haemonchus* spp se evidenció en estudios de evaluación de la eficacia de tratamientos con Ivermectina, Eprinomectina, Albendazol sulfóxido y Albendazol, que mostraron reducciones al conteo fecal de huevos menores del 90 %, lo que indica resistencia a los antihelmínticos (Arece-García et al., 2017).

En el caso de la resistencia a los Benzimidazoles se atribuye a una disminución de la afinidad a los receptores. Cuando se transfirió el gen del isotipo-1 de la  $\beta$ -tubulina de una cepa de *H. contortus* susceptible a una cepa resistente a los Benzimidazoles de *Caenorhabditis elegans* provocó la susceptibilidad al fármaco en los nematodos de *C. elegans*. También la sustitución de una fenilalanina (Phe) por una tirosina (Tyr) en el codón 200 del gen que codifica para el isotipo-1 de la  $\beta$ -tubulina de *H. contortus* por mutagénesis *in vitro*, provocó la reversión de la resistencia.

Los experimentos de cambios de una Tyr por una Phe demostraron la vinculación de estos cambios en la resistencia a los Benzimidazoles (Kwa, Veenstra, Van Dijk, & Roos, 1995). Actualmente existen evidencias que demuestran que el cambio de estos a.a. es el responsable de la resistencia de *H. contortus* a los Benzimidazoles (A. Kotze & Prichard, 2016).

Otros polimorfismos del gen de la  $\beta$ -tubulina ocurren en los codones 167 (Prichard et al., 2000) y 198 (A. C. Kotze et al., 2012) en poblaciones resistentes. Aunque la primera parece ser poco frecuente (Barrère, Keller, von Samson-Himmelstjerna, & Prichard, 2013), S. M. Williamson et al. (2011) dan a conocer una frecuencia de un 40 % en el codón 167 y más de 95 % en el codón 198.

Para las Lactonas Macrocíclicas el mecanismo de resistencia del *H. contortus* se basa en una mutación del gen de la subunidad de los receptores Glutamato-Cloro (Blackhall, Pouliot, Prichard, & Beech, 1998), encontrada en poblaciones resistentes a la Ivermectina y la Moxidectina. Asimismo, Hamad, Qadir, and Hamad (2017) demostraron que el cambio de algunos a.a. aromáticos por el residuo de leucina 256 del gen de los receptores Glu-Cl, podían provocar la resistencia.

Existen estudios que aportan detalles de cómo ocurre la interacción de las ivermectinas con los receptores GluCl. En *H. contortus* existe la presencia de un residuo de Glicina (Gly) en el

tercer dominio transmembrana de los receptores GluCl (Lynagh & Lynch, 2012). El polimorfismo en el residuo de la Glicina en la proteína GluCl $\alpha$ 3B de *H. contortus* provoca la pérdida de sensibilidad a la ivermectina (Lynagh & Lynch, 2010).

Otros estudios vinculan la resistencia del *H. contortus* a las Lactonas Macrocíclicas a través de un polimorfismo del gen que expresa la P-glicoproteína involucrada en la bomba de flujo de los fármacos (Godoy, Che, Beech, & Prichard, 2015; Raza, Kopp, Jabbar, & Kotze, 2015). Además, muchos ensayos demuestran que la expresión de la P-glicoproteína es alta en poblaciones resistentes (S. M. Williamson et al., 2011). Inhibidores de la P-glicoproteína provocan reversión de la resistencia a las Lactonas Macrocíclicas en *H. contortus* (Heckler et al., 2014; Raza et al., 2015), algunos de ellos se usan para incrementar la eficacia de la Ivermectina y la Moxidectina en nematodos resistentes en ovinos (Lifschitz et al., 2010).

## **2.2 Desarrollo de vacunas**

El avance en la búsqueda de productos vacunales con fines comerciales dirigido a reducir las infecciones por parásitos tuvo sus inicios en la década de 1950 con la evidencia que la inmunización de terneros con larvas de *Dictyocaulus viviparus*, atenuadas por radiación, eran capaces de lograr elevados niveles de protección contra el nematodo (Nisbet, Meeusen, González, & Piedrafita, 2016).

Por esta razón, para W. D. Smith and Zarlenga (2006) la búsqueda de vacunas dirigidas al control de *H. contortus* en ovinos, tiene como objetivo la identificación de moléculas y complejos inmunogénicos en los productos de excreción/secreción (E/S) del parásito, así como de la superficie de la cutícula y antígenos “ocultos” derivados del intestino. Tanto los productos de E/S como los provenientes del epitelio intestinal se emplean con relativo éxito como vacunas.

Las proteínas de E/S y las derivadas del intestino del nematodo son utilizadas mayormente como vacunas efectivas a partir de una perspectiva práctica con el enriquecimiento de fracciones de otras moléculas que confieren determinado grado de protección en ensayos pioneros. Sin embargo, la mayor parte de las vacunas candidatas se generan como proteínas recombinantes al tener en cuenta el precepto establecido de que la comercialización de vacunas está determinada por la escala, calidad, uniformidad y seguridad que las proteínas recombinantes pueden tener comparadas con los inmunógenos nativos (Geldhof, De Maere, Vercruyse, & Claerebout, 2007).

Esta variante del uso de proteínas recombinantes a partir de inmunógenos nativos resulta en el desarrollo de vacunas efectivas para el control de algunos parásitos como los céstodos (Lightowlers

et al., 2003), pero aún no se logra con éxito para una vacuna contra *H. contortus* (Nisbet et al., 2016).

Muchas son las proteínas nativas empleadas para la búsqueda de candidatos vacunales contra *H. contortus*. Dentro de ellas destacan la H-gal-GP, la H11 (derivadas del epitelio intestinal del nematodo), la Hc23 y la Cisteína proteasa (proteínas de excreción/secreción).

H-gal-GP es un complejo de glicoproteínas que contiene galactosa, de función desconocida, aunque se sospecha está implicada en la digestión de la sangre ingerida por el nematodo (Cachat, Newlands, Ekoja, McAllister, & Smith, 2010). La H-gal-GP es muy efectiva cuando se usa como vacuna en ovinos al lograr una disminución del 90 % del conteo fecal de huevos y un 70 % de la carga de nematodos en el abomaso (W. Smith, Newlands, Smith, Pettit, & Skuce, 2003). Otros ensayos de vacunación con H-gal-GP lograron una reducción del conteo de huevos en las heces del 88,5 % (Cachat et al., 2010). Igualmente, C. C. Bassetto (2015) encontró al inmunizar ovinos con H-gal-GP una disminución del conteo fecal entre el 86 % y el 93 %, y la carga de parásitos en el abomaso se redujo entre el 52 % y el 75 %.

La H11 es una glicoproteína integral familia de las aminopeptidasas microsomales presentes en las microvellosidades intestinales del *H. contortus* (Newton, 1999). Es un inmunógeno muy

efectivo que confiere una alta protección, experimentos de inmunización con H11 arrojaron como resultados disminuciones significativas del conteo fecal de huevos (71 %) y del número de nematodos en el estómago (88,5 %) (Meier et al., 2016).

En otros ensayos de inmunización desarrollados con una vacuna de ADN de H11 se lograron reducciones del 56,6 % al conteo fecal de huevos y 46,7 % de la carga parasitaria en el abomaso (Zhao et al., 2012). Asimismo, una vacuna de H11 expresada en *C. elegans* alcanzó una reducción del número de nematodos en el estómago del 93,6 % y del conteo fecal de huevos del 99,9 % (Roberts et al., 2013).

La Hc23 es un antígeno expuesto de función desconocida que constituye el 1,8 % del extracto somático acuoso total del *H. contortus* adulto. La vacunación con esta proteína en ensayos realizados redujo la carga de huevos en las heces un 70 % y el número de parásitos en el abomaso un 67 % (Fawzi et al., 2014).

Experimentos realizados a partir de la vacunación con Hc23 en ovinos mostraron como resultado una disminución del 80 % del conteo fecal y un 70 % de la carga de nematodos (González-Sánchez et al., 2018). Otros estudios de inmunización a partir de una vacuna recombinante de Hc23 reflejaron reducción del conteo fecal de huevos del 92,2 % mientras que el número de *H. contortus* adultos en

el estómago se redujo un 59,9 % comparado con los controles empleados (Kandil et al., 2017).

En ensayos de vacunación en ovinos que usaron como inmunógeno Cisteína proteasa se lograron reducciones del número de huevos en las heces del 48 %, mientras que la carga de parásitos en el abomaso disminuyó un 46 % (Redmond & Knox, 2004).

### **2.3 Respuesta inmunológica del hospedero**

La capacidad de los hospederos para hacer frente a los efectos patógenos de la infestación por *H. contortus* estriba en complejas interacciones de variados factores, que incluyen el estado nutricional, las características fisiológicas del animal, el periodo de gestación, la edad, el sexo, así como la inmunidad innata y adquirida del huésped (Hein, Pernthaner, Piedrafita, & Meeusen, 2010; Saddiqi et al., 2011).

La infestación por *H. contortus* se acompaña de cambios patológicos en el estómago verdadero asociados con erosión y descamación de la mucosa, hiperplasia de numerosas células que incluyen las epiteliales productoras de moco, leucocitos, linfocitos, mastocitos y eosinófilos (Balic, Cunningham, & Meeusen, 2006).

Para Piedrafita, Meeusen, and Stear (2017) los linfocitos son importantes en la mediación de la respuesta inmune de los animales contra *H. contortus*. Otros estudios demuestran que algunos tipos específicos de linfocitos desempeñan un papel fundamental en la

inmunidad específica de la mucosa gástrica (Muñoz-Guzmán, Cuenca-Verde, Valdivia-Anda, Cuéllar-Ordaz, & Alba-Hurtado, 2012).

Los linfocitos intervienen en la respuesta inmune estimulados por la producción de citoquinas, y en el caso particular de las infestaciones por *H. contortus* en rumiantes, se asocia con un aumento de las citoquinas, así como un incremento de las inmunoglobulinas A (IgA) e inmunoglobulinas E (IgE) específicas del nematodo, acompañado además del aumento de los eosinófilos (Arsenopoulos, Symeonidou, & Papadopoulos, 2017).

El primer mecanismo inmunitario que se desencadena en el huésped se produce contra la fase infectante (L3) al entrar este en contacto con las larvas (Hein et al., 2010). Se conoce como “exclusión inmunitaria” el rechazo inicial a las L3, caracterizada por una hipersensibilidad inmediata que se acompaña de la presencia de anticuerpos (IgE) y mastocitos. La activación de los anticuerpos y células trae consigo un incremento del peristaltismo intestinal con el propósito de evitar la fijación de las larvas a las criptas de la mucosa abomasal (Yasuda & Nakanishi, 2018).

Una vez que las IgE se unen a la superficie de la mucosa del abomaso, los mastocitos liberan mediadores de la respuesta inmune, histaminas, proteasas, leucotrienos, neutrófilos y quimiotaxinas, lo que desencadena una hipermotilidad de la musculatura lisa del

abomaso, así como aumento de la secreción gástrica e hiperplasia de las células caliciformes e incremento de la secreción de moco y reclutamiento de células efectoras (H. Miller, Knight, & Pemberton, 2006).

Según Douch, Morum, and Rabel (1996) la secreción mucosa producida por el abomaso contiene factores que inhiben las L3 y que se pueden encontrar en altas concentraciones en las deyecciones de los hospederos. Los factores están muy relacionados con la activación de los leucocitos, lo que hace pensar que el aumento del peristaltismo conduce a una reducción de la motilidad de las L3.

El segundo mecanismo inmunitario desencadenado por el hospedero tras la infección con L3 de *H. contortus* está regido por una alta actividad de los eosinófilos, los cuales participan en la eliminación de las larvas (MacKinnon, Bowdridge, Kanevsky-Mullarky, Zajac, & Notter, 2015; Muñoz-Caro et al., 2015). La actividad eosinofílica está mediada por la producción de Galectina, proteína vinculada a la respuesta inmune en ovinos y bovinos contra las larvas del tercer estadio de *H. contortus* (Li et al., 2016; Sakthivel et al., 2017), lo que inhibe significativamente su alimentación y crecimiento (Preston, Beddoe, Walkden-Brown, Meeusen, & Piedrafita, 2015).

## **2.4 Bibliotecas de fago para el control de parásitos**

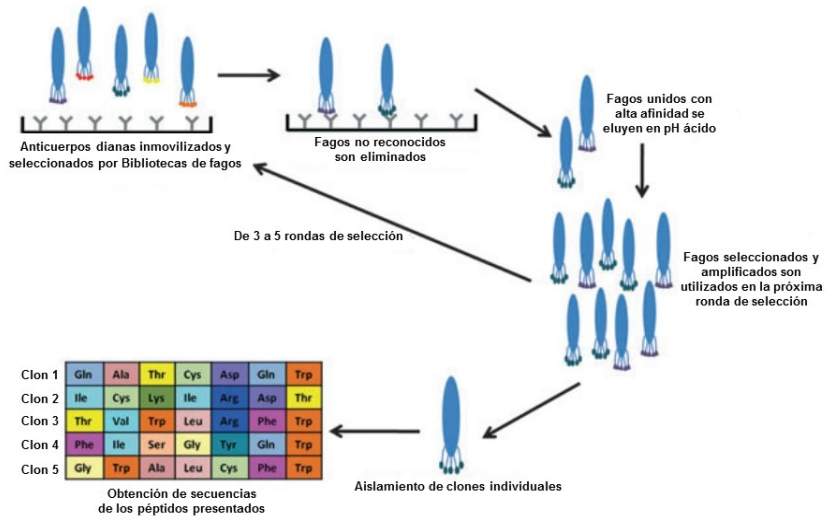
Los bacteriófagos son virus que utilizan bacterias como vectores de replicación, tienen un genoma de ADN o ARN contenido dentro de una cápsida proteica. Son manipulados mediante secuencias específicas de ADN para generar bibliotecas de presentación de fagos (Russel, Lowman, & Clackson, 2004). Al final ocurre la fusión transcripcional del segmento de ADN en un gen que codifica una de las proteínas de la cápsida del bacteriófago, así la secuencia de péptidos que codifica la inserción se muestra en la superficie del virus (Gao, Wang, Liu, & Wang, 2010).

Para Pande et al. (2010) las bibliotecas de fagos constituyen una tecnología que da la posibilidad de expresar una gran variedad de péptidos exógenos en la superficie (cápsula) de partículas de fagos y se usan para seleccionar aquellas que se unen al objetivo deseado. El fago filamentoso M13 es el más común y posee ventajas que lo convierte en un vector ideal para clonar y expresar péptidos en su superficie. Entre ellas están: en el genoma se puede insertar ADN en regiones no esenciales sin que se modifique su estructura; su genoma se puede aislar como ADN de simple y doble cadena; las proteínas de la cápsida del fago pueden modificarse sin pérdida de la capacidad de infección del virus; son muy estables a variadas condiciones de pH y temperatura y pueden acumularse en altas concentraciones en

las células bacterianas infectadas debido a la propagación no lítica (Kehoe & Kay, 2005).

En las bibliotecas de fagos los clones de interés se identifican a través de una técnica llamada “biopanning” (Figura 11). La técnica implica múltiples rondas de incubación de la biblioteca de fagos con la(s) molécula(s) diana(s) seguido de lavados rigurosos para desechar los fagos que no se unen o que lo hacen débilmente.

Los fagos que se unen se eluyen y se amplifican con la infección de células huésped de *Escherichia coli*, para la siguiente ronda de selección. Luego de varias rondas de biopanning, los péptidos que se unen a la molécula con la mayor afinidad y especificidad se identifican por secuenciación de los clones seleccionados (Mooney, Fredericks, & Hearn, 2011).



**Figura 11.** Representación esquemática del proceso de selección de péptidos presentados en bibliotecas de fagos, por afinidad con anticuerpos policlonales.

Existen variantes de presentación de las bibliotecas de fagos, determinadas por el número de a.a. insertados en la cápsida del virus, unas son de siete (7) y otras de 12 a.a. (Ellis et al., 2012).

Las bibliotecas de fagos son potentes herramientas que pueden favorecer la identificación de secuencias de péptidos que potencialmente simulen la estructura de epítomos antigénicos (Ellis et al., 2012). Los estudios sobre las biblioteca de fagos convierten la metodología en una opción innegable en la investigación de cómo las proteínas interactúan con ligandos y analizar las interacciones entre

un parásito y su hospedero, por ejemplo, las interacciones antígeno-anticuerpo (Pande et al., 2010).

Son numerosas las investigaciones que se realizan con el empleo de bibliotecas de fagos, sobre todo en la búsqueda de candidatos vacunales para un número importante de parásitos con impacto en la salud tanto del hombre como de los animales, entre los que se encuentran *Trichinella spiralis* (Long et al., 2014), *Fasciola hepatica* (Abel Villa-Mancera, Reynoso-Palomar, Utrera-Quintana, & Carreón-Luna, 2014), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (B. Kumar, Manjunathachar, & Ghosh, 2015), *Trypanosoma cruzi* (Kleshchenko, Zhigunova, Dalin, & Melnikov, 2017), *Taenia solium* (Sanabria-Ayala, Belmont, & Abraham, 2015), *Toxoplasma gondii* (Bastos et al., 2016) *Schistosoma japonicum* (Feng et al., 2017) *Entamoeba histolytica* (Bharadwaj, Arya, Bhattacharya, & Bhattacharya, 2017), *Leishmania infantum* (Link, Alban, Soccol, Pereira, & Thomaz Soccol, 2017) y *Plasmodium falciparum* (Almukadi, Hanada, & Chishti, 2017).

Sin embargo, la tecnología de las librerías de fagos aún no está lo suficientemente explotadas para los estudios sobre *H. contortus*. El objetivo del empleo de las librerías de fagos tuvo enfoque para el diagnóstico, en la búsqueda de genes diana y como mimotopos protectivos para el empleo de vacunas (Figura 12).

## Bibliotecas de Fagos

### Mimotopos protectivos

*Trichinella spiralis*

(Long et al., 2014)



*Fasciola hepatica*

(Villa-Mancera et al., 2014)



### Diagnóstico

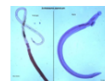
*Plasmodium falciparum*

(Almukadi et al., 2017)



*Schistosoma japonicum*

(Feng et al., 2017)



### Genes dianas

*Rhipicephalus microplus*

(Kumar et al., 2015)



*Taenia solium*

(Sanabria-Ayala et al., 2015)



**Figura 12.** Parásitos en los que se empleó las bibliotecas de fago con diferentes objetivos.

Rehman et al. (2016) usaron una librería de fagos anti-HcES scFvs (simple cadena de la región variable) para bloquear el mecanismo de permeabilidad del epitelio abomasal producida por productos de excreción/secreción de *H. contortus*. Como resultado de este ensayo, con concentraciones del fago de  $10^{15}$  CFU/mL, se logró el bloqueo de la permeabilidad del epitelio de dos a ocho horas.

## 2.5 Silenciamiento de genes en parásitos

El silenciamiento de genes es un mecanismo de conservación que su función está dada por proteger las células a través del ARN de

doble cadena (ARNdc) de las infecciones por virus así como de regular el proceso de transcripción del ADN (Bagasra & Prilliman, 2004; Tijsterman, Ketting, & Plasterk, 2002). Su mecanismo se basa en la degradación del ARN mensajero (ARNm) que es complementario al ARNdc.

Los primeros estudios de silenciamiento se realizaron en el nematodo de vida libre *C. elegans* (Fire et al., 1998) lo que sentó las bases para su utilización en un variado grupo de organismos, dentro de los que se incluyen plantas (M. Kumar, Ranjan, Natra, & Shamim, 2017), insectos (Chavez-Pena & Kamen, 2018) y vertebrados (Schrader & Schrader, 2017).

Según los estudios de Spracklin et al. (2017), el efecto del ARNi se hereda hasta por cinco generaciones en *C. elegans*.

El silenciamiento de genes a través del ARNi es muy utilizado en un número importante de parásitos de interés veterinario y humano. Dentro de ellos, *Ascaris suum* (McCoy et al., 2015), *Brugia malayi* (Misra, Gupta, & Misra-Bhattacharya, 2017), *Leishmania* spp. (Brettmann et al., 2016), *Fasciola hepatica* (Dell'Oca et al., 2014), *Entamoeba histolytica* (Khalil, Foda, Suresh, & Singh, 2016), *Schistosoma mansoni* (Gava et al., 2017), *Strongyloides stercoralis* (Lei et al., 2017) y *Toxocara canis* (Ma et al., 2015).

## Algunos parásitos donde se realizó Silenciamiento de genes (Geldhof et al., 2006)

*Caenorhabditis elegans*

(Fire et al., 1998)



*Fasciola hepatica*

(Dell'Oca et al., 2014)



*Schistosoma mansoni*

(Gava et al., 2017)



*Leishmania* spp.

(Brettmann et al., 2016)



*Strongyloides stercoralis*

(Lei et al., 2017)



**Figura 13.** Parásitos con informes de silenciamiento de genes.

En *H. contortus* el silenciamiento de genes es una herramienta muy utilizada. El primer estudio con éxito (A. C. Kotze & Bagnall, 2006) tuvo como objetivo el silenciamiento del gen de la  $\beta$ -tubulina (isotipo 1 y 2). La incubación de la doble cadena de ARN con larvas del tercer estadio, disminuyeron los niveles de expresión al 0,1 % para el isotipo 1 y al 10 % para el isotipo 2, comparados con los controles donde se empleó la doble cadena de la toxina cry13A del *Bacillus thuringiensis*. Geldhof, Murray, et al. (2006) también lograron silenciar el gen de la  $\beta$ -tubulina y el gen sec-23; sin

embargo, no observaron cambios en los niveles de expresión en otros nueve genes que sus silenciamientos en *C. elegans* fueron satisfactorios.

Zawadzki et al. (2012) evaluaron el silenciamiento en nueve genes vitales para *H. contortus*, a través de tres métodos de transferencia del ARNdc (con larvas alimentadas con *E. coli*, electroporación y nematodos adultos incubados en la solución). Se alcanzó una disminución de la expresión en la mayoría de los genes; sin embargo, fenotípicamente solo observaron cambios en la alimentación de las L3 con la *E. coli*.

Se propusieron dos hipótesis para explicar el éxito limitado del silenciamiento de genes en parásitos de animales. Estas son: (1) el suministro externo de ARNdc es inadecuado para lograr la interferencia del ARN y (2) que en los nematodos parásitos los genes necesarios para iniciar el silenciamiento a partir de ARNdc suministrados externamente, no son funcionales (Viney & Thompson, 2008).

Samarasinghe et al. (2011) al usar secuencias que se expresan, no consiguen silenciamiento reproducible. Sin embargo, se logra un silenciamiento consistente de los genes expresados de manera putativa por el intestino, células secretoras y anfidos (aminopeptidasa H11, proteína secretora Hc-ASP-1,  $\beta$ -tubulina, homólogo de la acuaporina y ARN helicasa). Por lo que los autores

sugieren que genes expresados en sitios accesibles son más susceptibles de lograr un silenciamiento efectivo. Además, el silenciamiento de H11 en L3 reduce la infestación de *H. contortus* en ovinos.

La actividad aminopeptidasa se redujo en un 64 % y la reducción del conteo fecal de huevos y la carga de nematodos en el estómago disminuyó un 57 y 40 % respectivamente; lo que constituyó el primer y único informe de silenciamiento *in vivo*.

El silenciamiento de genes también es usado en *H. contortus* para la búsqueda de nuevos medicamentos y la interacción de algunos fármacos en el control del parásito. Ejemplo lo constituye el bloqueo de la expresión del gen de la enzima fosfoetanolamina transmetilasa que cataliza la metilación de la fosfoetanolamina a fosfocolina; y que la misma es esencial para la supervivencia del *H. contortus* (Witola et al., 2016). Además el silenciamiento de la enoil-CoA hidratasa, enzima necesaria para la biosíntesis de las cadenas laterales de los ácidos grasos confirma que es clave para la vida del nematodo (Ding et al., 2017).

El silenciamiento de genes en *H. contortus* se utiliza además para estudiar la interacción entre el hospedero y el huésped; en especial su efecto en las células mononucleares de la sangre periférica. Un ejemplo es que al silenciar los genes de las proteínas de transmembrana 63A (Yuan et al., 2015) y 147 (Li et al., 2016) se

demuestra que ambas se unen a la Galactina del *H. contortus* y están involucradas en la respuesta inmune del hospedero.

Los antecedentes expuestos ponen de manifiesto que el silenciamiento de genes en *H. contortus* constituye una herramienta muy valiosa para el estudio de la interacción parásito-hospedero. Además, permite la búsqueda de nuevos genes vitales que sirvan como dianas para la producción de fármacos. No obstante, aún existen muchas lagunas en el conocimiento del silenciamiento de genes, lo cual sugiere la necesidad de la optimización del proceso de silenciamiento, que pudieran estar enfocado en la cantidad de ARNdc que se utiliza, el tiempo de incubación, la relación con liposomas, entre otras variables.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA),  
obtención de huevos de *H. contortus*, conteo  
de huevos por gramo de heces – técnica de  
McMaster, coprocultivos estériles, selección y  
preparación de un animal donante de huevos,  
obtención de las L1 para el experimento de  
immunoneutralización, obtención de las L3  
para los experimentos de silenciamiento

## CAPÍTULO III.

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA), OBTENCIÓN DE HUEVOS DE *H. contortus*, CONTEO DE HUEVOS POR GRAMO DE HECES – TÉCNICA DE MCMMASTER, COPROCULTIVOS ESTÉRILES, SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE UN ANIMAL DONANTE DE HUEVOS, OBTENCIÓN DE LAS L1 PARA EL EXPERIMENTO DE INMUNONEUTRALIZACIÓN, OBTENCIÓN DE LAS L3 PARA LOS EXPERIMENTOS DE SILENCIAMIENTO.

IDENTIFICACIÓN DE MIMOTOPOS SIMILARES A *H. contortus* A TRAVÉS DE UNA BIBLIOTECA DE FAGOS.

### 3.1 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Las placas de microtitulación de 96 pocillos (PolySorp, Nunc) se recubrieron a una concentración de 5 µg/mL (100 µL/pozo) con el extracto de proteínas (o un péptido sintético según el resultado de la biblioteca de fagos) de *H. contortus* diluidas en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato de sodio 0,1mM, pH 9,6) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Los pocillos se lavaron tres veces con SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % ([vol/vol]).

El bloqueo se realizó con Suero Fetal Bovino (SFB) al 3 % ([vol/vol]) diluido en SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % por espacio

de una hora. Los pocillos se lavaron tres veces con SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % [vol/vol]. Las muestras de sueros de los animales en estudio y los controles se aplicaron (100  $\mu$ L/ pozo) diluidos en SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % ([vol/vol]) y SFB al 0,25 % ([vol/vol]).

Después de incubar las placas durante una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % [vol/vol] y se añadió el Anti IgG de ovino diluido 1:7000 en SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % ([vol/vol]) y SFB al 0,25 % ([vol/vol]), se incubó una hora.

Los pocillos se lavaron tres veces con SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % ([vol/vol]) y se añadió el tampón ABTS (revelado), se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La densidad óptica se determinó en el lector Biotek ELx 800 a 405 nm.

Los controles positivos fueron sueros de animales que tenían altos títulos, mientras que los controles negativos fueron sueros de animales que la lectura estuvo por debajo de la línea de corte. La línea de corte fue determinada por análisis ROC. La sensibilidad del ensayo fue 92,05 % y la especificidad 99,21 % (Díaz et al., 2016).

### **3.2 Obtención de huevos de *H. contortus***

Hembras adultas de *H. contortus* se colectaron del abomaso de animales sacrificados. Se lavaron e incubaron con SSTF durante 4 horas a temperatura ambiente para que expulsaran los huevos. Los

huevos se lavaron y filtraron a través de una malla de 26  $\mu\text{m}$ . Se realizó una cuantificación de tres réplicas de 25  $\mu\text{L}$  de la muestra. Los huevos obtenidos se añadieron a heces estériles de ovino en placas de Petri (coprocultivos) a razón de 1000 huevos por gramo.

### **3.3 Conteo de huevos por gramo de heces – Técnica de McMaster**

Se pesaron tres gramos de heces y se le añadieron 27 mL (dilución 1:10) de una solución de flotación de Sacarosa y Cloruro de Sodio a una densidad de 1,21 g/mL. Posteriormente se mezclaron y se filtraron en un tamiz de 1 mm. La suspensión se homogenizó y se llenó la cámara de McMaster. Las muestras se dejaron reposar al menos por 10 minutos y se observaron al microscopio (10X) para el conteo de huevos en toda el área de la cámara.

### **3.4 Coprocultivos estériles**

Se tomaron heces de ovinos y se esterilizaron a 121 °C y una atmósfera durante 15 minutos para garantizar la eliminación de cualquier huevo o larva de parásitos. Las heces autoclavadas se colocaron en placas de Petri y se depositaron los huevos de *H. contortus*.

Las placas de Petri, según la metodología de Ojeda-Robertos et al. (2008), se mantuvieron en una incubadora por 8 días a 28 °C con humedad del 80 % y en días alternos se airearon. Las larvas se colectaron a través de la técnica de Baermann durante 24 horas. Las larvas se cuantificaron con el empleo de 10 alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  acorde

al método descrito por Fontenot, Miller, Peña, Larsen, and Gillespie (2003).

### **3.5 Selección y preparación de un animal donante de huevos**

Se seleccionó un macho ovino de la raza Pelibuey de 6 meses de edad con un peso vivo aproximado de 25 kg. Se mantuvo en condiciones de estabulación en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Camagüey con disponibilidad de agua y heno *at libitum*.

El animal fue tratado de forma simultánea con Labiomec (0,2 mg/kg por vía subcutánea) y Labiozol (10 mg/kg por vía subcutánea) 30 días antes de la infestación para garantizar que estuviera libre de parásitos. Se realizó, durante dos semanas previo a la infestación, chequeos de hpg en días alternos con el empleo de la técnica de McMaster. El animal se infestó con 10 000 larvas (L3) a través de una sonda esofágica. A partir de los 21 días después de la infestación se realizó un hpg por la técnica de McMaster para confirmar el nivel de infestación.

### **3.6 Obtención de las L1 para el experimento de inmunoneutralización**

Se tomaron heces directamente del recto del ovino donante. El procedimiento se realizó por el método de flotación. Las heces se maceraron en una solución de sacarosa, luego se filtraron y se centrifugaron en tubos de centrifuga de 50 mL durante 10 minutos a 2500 rpm. Los huevos se tomaron de la superficie de los tubos, se

lavarón con SSTF 1X y se filtraron a través de un tamiz de 25  $\mu\text{m}$ . Los huevos se cuantificaron al microscopio con el empleo de 10 alícuotas de 5  $\mu\text{L}$ . En placas de cultivo celular de 24 pozos se depositó en cada pozo 150 huevos del nematodo suspendidas en 1 mL de SSTF 1X.

### **3.7 Obtención de las L3 para los experimentos de silenciamiento**

Se tomaron heces directamente del recto del ovino donante y se colocaron en placas de Petri, de acuerdo al método de Ojeda-Robertos et al. (2008), se mantuvieron en una incubadora por 8 días a 28 °C con humedad del 80 % y en días alternos se airearon. Las larvas se colectaron a través de la técnica de Baermann durante 24 horas. Las larvas se cuantificaron con el empleo de 10 alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  acorde al método descrito por Fontenot et al. (2003).

### **3.8 Identificación de mimotopos similares a *H. contortus* a través de una Biblioteca de fagos**

#### **3.8.1 Introducción**

*H. contortus* es uno de los parásitos de mayor importancia económica que infesta a los rumiantes en todo el mundo, especialmente al ganado ovino y caprino. Las infecciones con el nematodo pueden causar anemia, pérdida de peso o incluso muertes en los animales gravemente afectados (Hoberg & Zarlenga, 2016). Los métodos de control para *H. contortus* se basan principalmente en tratamientos antihelmínticos repetidos.

El uso generalizado de los antihelmínticos resulta en graves problemas de resistencia en todo el mundo (A. C. Kotze et al., 2014). Por ello se necesita implementar herramientas como el desarrollo de vacunas que contribuyan a reducir el creciente fenómeno de resistencia a los antihelmínticos. Las bibliotecas de fagos permiten la identificación de epítomos para el diseño de vacunas más efectivas contra nematodos. Estos péptidos se pueden seleccionar a través del mapeo de las bibliotecas con el empleo de anticuerpos protectores del hospedero (Ellis et al., 2012).

Una biblioteca de presentación de fagos es una mezcla compleja de clones de fagos que muestran péptidos al azar, proteínas extrañas o dominios de proteínas; que están codificados en el genoma del fago, fusionados con uno o varios genes de las proteínas de la superficie de la cápsida (G. P. Smith, Petrenko, VA., 1997). Son metodologías que se usan en la identificación de ligandos para varios objetivos y se emplean en aplicaciones básicas para estudiar mecanismos en biología molecular que implican interacciones de proteínas con proteína, así como de proteínas con otras biomoléculas (Yu et al., 2009).

Las bibliotecas de fagos se usan ampliamente en diferentes áreas de la biociencia y la biotecnología, incluida la detección de epítomos, el diagnóstico de cáncer, la biodetección (Qi, Lu, Qiu, Petrenko, & Liu, 2012), así como para el desarrollo de nuevos

agentes terapéuticos, terapia génica, producción de vacunas, pruebas de diagnóstico y otras aplicaciones (Giordano, Edwards, Tuder, Arap, & Pasqualini, 2009).

Existen evidencias de empleo de bibliotecas de fagos para buscar epítomos que puedan ser candidatos a su utilización como vacunas. Anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* se emplearon en el mapeo con seis bibliotecas de fagos diferentes y se identificaron péptidos que protegían contra el absceso hepático en ratones como modelo (Marinets et al., 1997).

Anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* se utilizaron para el mapeo en una biblioteca de fagos de 12 a.a. De los cuatro clones aislados dos generaron una respuesta alta contra el parásito con una reducción del 29 % de la carga de nematodos (Gu et al., 2008).

El empleo de anticuerpos contra cathepsina de *F. hepatica* para el pesquiasaje en una biblioteca de fagos, permitió la selección de siete clones con los que se inmunizaron ovejas desafiadas con metacercaria. La respuesta de IgG frente a los péptidos redujo un 48 % de la carga de trematodos (A Villa-Mancera et al., 2008).

Sin embargo, aunque las bibliotecas de fagos también se utilizan en los estudios de desarrollo de vacunas para varios parásitos (Rhaiem & Houimel, 2016; Ruiz et al., 2015) en el caso particular de *H. contortus* no ocurre de la misma manera.

### **El objetivo del estudio fue:**

Identificar epítomos de proteínas de *H. contortus* involucradas en la respuesta inmune a través de una biblioteca de fagos presentadora de péptidos.

### **3.8.2 Materiales y Métodos**

#### **3.8.2.1 Inmunoneutralización de las L1 con sueros hiperinmunes de *H. contortus***

Para el ensayo se seleccionó un suero hiperinmune con el mayor valor de densidad óptica (1,7815) determinado a través de ELISA. Las diluciones del suero que se emplearon fueron 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000. Como control positivo se empleó el Albendazol (99,8 % como referencia estándar), diluido en Dimetilsulfóxido (DMSO) a 7,5 µg/mL. Como control negativo se utilizó suero negativo y DMSO. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **3.8.2.2 Biopanning o rondas de selección**

El protocolo utilizado fue acorde a lo recomendado por el fabricante (New England BioLabs, USA) del Kits Biblioteca de Péptidos PhD-7 y la metodología de Wu et al. (2006). Brevemente, las placas de microtitulación de 96 pocillos (PolySorp, Nunc) se recubrieron con el suero (descrito en el capítulo anterior) de los animales (1:1000, diluido en tampón de recubrimiento) e incubaron a 4 °C durante toda la noche. Se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 5 % diluida en

SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 % ([vol/vol]). Se lavó 3 veces SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 %.

En una primera línea de pocillos con sueros negativos se agregó el fago a una concentración de  $10^{11}$  Unidades Formadoras de Fagos (UFP) diluido en SSTF 1X con Tween 20 al 0,2 %, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transfirió el contenido de la primera fila de pocillos para la segunda fila también con sueros negativos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transfirió el contenido de la segunda fila de pocillos para la tercera fila, con sueros positivos, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 10 veces la placa con SSTF 1X con Tween 20 al 0,5 %. Se eluyó el contenido con Glicina (100 mM pH 2,5) previa incubación de 10 minutos. Finalmente se neutralizó con Tris (150 mM pH 8).

### **3.8.2.3 Amplificación de los clones de fagos**

En tubos centrifugables de 15 mL (Corning, USA) se cultivó la *E. coli* (ER2537) en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) suplementado con tetraciclina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubó a 37 °C toda la noche en agitación. En medio LB se inoculó la bacteria (1:100) junto con el fago y se incubó 5 horas con agitación a 37 °C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos. Se añadió Polietilenglicol (PEG 20 %/NaCl 2,5 mol L<sup>-1</sup>) para precipitar el fago y se incubó a 4 °C durante 2 horas. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos y se

descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en SSTF 1X con tween al 0,2 %. Se volvió a centrifugar a 12 000 rpm por 5 minutos y se tomó el sobrenadante. Se añadió PEG/NaCl y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en SSTF 1X y se tituló a partir de la dilución  $10^{-3}$  hasta la dilución  $10^{-7}$ .

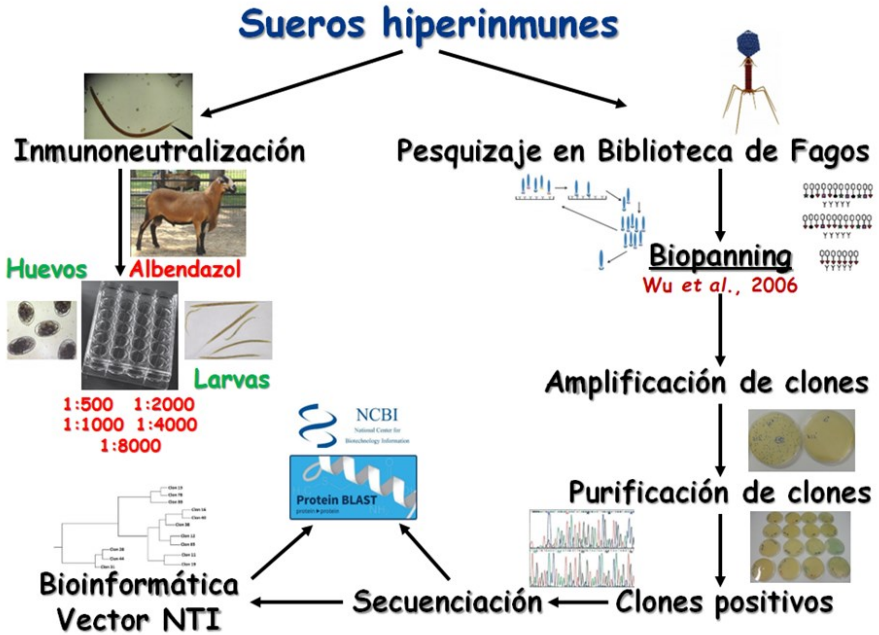
#### **3.8.2.4 Purificación de los clones de fagos**

Para la purificación de los clones seleccionados se amplificaron según la metodología descrita en la sección anterior (4.2.3). Posteriormente se resuspendió el fago en 100  $\mu$ L de Tampón Yoduro (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 4 M NaI). Se añadió 250  $\mu$ L de etanol absoluto y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 500  $\mu$ L de etanol al 70 % a -20 °C y se centrifugó a 12 000 x g durante 2 minutos para finalmente descartar el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua estéril.

#### **3.8.2.5 Análisis de los clones seleccionados**

Después de las cuatro rondas de selección, de cada clon obtenido el ADN fue purificado y secuenciado (Figura 14), se usó un equipo de electroforesis capilar (ABI3130) con BigDye® terminator v 3.1 y polímero POP 7. Los análisis de secuencia se realizaron a través del software Vector NTI (versión 6.0) y MEGA (Molecular

Evolutionary Genetics Analysis) (versión 6.06). Se evaluó la identidad entre los clones y también con secuencias de proteínas de *H. contortus* disponibles en GenBank.



**Figura 14.** Diagrama de flujo para el aislamiento de fagos con epítomos reconocidos por sueros hiperinmune hacia *Haemonchus contortus*.

### 3.8.2.6 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue analizada por la prueba de Shapiro-Wilk. Para el ensayo de inmunoneutralización se realizó una transformación de escala arcsen  $(P/100)^{1/2}$ . La diferencia entre grupos se determinó por un ANOVA simple seguido por el test de Student Newman-Keuls para la comparación entre los tratamientos. Los

análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

### **3.8.3 Resultados y Discusión**

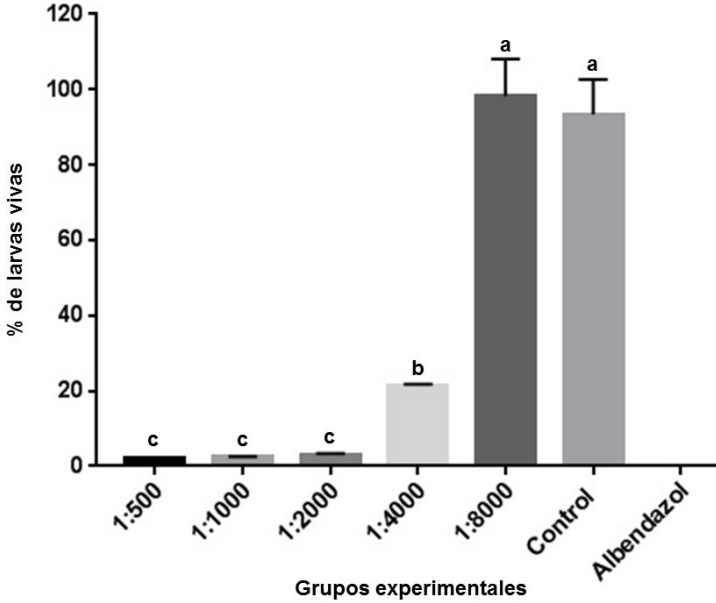
#### **3.8.3.1 Inmunoneutralización de las L1 con sueros hiperinmunes de *H. contortus***

En la Figura 15 se representa el porciento de L1 vivas al emplear sueros hiperinmunes de animales con una alta respuesta natural contra *H. contortus*. Entre los grupos donde se emplearon las diluciones 1:500; 1:1000 y 1:2000 tuvieron menor por ciento de larvas vivas (1,96 %; 2,32 %; 3,09 % respectivamente). Sin embargo, al emplear el suero de los animales en dilución 1:4000 el porciento fue mayor (21,34) ( $p < 0,0001$ ). En el grupo donde se empleó la dilución 1:8000 el porciento de larvas vivas fue de 98,29 %, similar al grupo control (93,34 %). Lo que sugiere un efecto dosis-respuesta de la inmunoneutralización de los sueros.

Estos resultados demuestran que sueros hiperinmunes de animales con respuesta natural contra *H. contortus* pueden inhibir el desarrollo de las larvas del nematodo durante la etapa del primer estadio larval. Lo que ofrece una herramienta *in vitro* para evaluar sueros provenientes de candidatos vacunales.

En ensayos similares a los nuestros, Bethony et al. (2005) utilizaron sueros de perros que fueron vacunados con proteínas de

excreción (ASP-2) de *Ancylostoma caninum* en un test de migración larval.



**Figura 15.** Efecto larvicida de sueros hiperinmunes de animales con alta respuesta natural contra *Haemonchus contortus*.

Control: suero negativo y DMSO. n= 6. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ANOVA simple, comparación de rangos múltiples de Newman-Keuls.

Los autores observaron una reducción del 60 % de migración de las larvas. Asimismo, A. L. Williamson et al. (2006) a partir de sueros de perros vacunados con una metaloproteasa (Ac-MTP-1) secretada por *Ancylostoma caninum* los resultados del test de migración larval mostraron una reducción de la migración entre el 70 y el 75 %. El propio antisuero redujo en un 85 % la actividad

proteasa en la digestión del colágeno. Lo que indica que esta proteína interviene en la penetración y la migración del parásito.

### **3.8.3.2 Biopanning o rondas de selección**

Se utilizó suero inmunoneutralizante como elemento de captura en procesos de selección con el empleo de la biblioteca de péptidos (PhD-7). Se observó un incremento en la cantidad de fagos adsorbidos desde el primero hasta el tercer ciclo de selección (Tabla 1), lo cual indica la amplificación de fagos específicos a las IgG del suero.

**Tabla 1.** Eficiencia del biopanning durante los procesos de selección.

	Ciclos de selección		
	1	2	3
<b>Títulos de la fracción absorbida (UFP)</b>	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$
<b>Grado de enriquecimiento</b>	1	45,5	2090

La capacidad de unión de los clones individuales de fagos a las IgG de los sueros se confirmó mediante ELISA anti-IgG. A partir de aquí se seleccionaron 120 clones del mapeo de la biblioteca de fago con un suero de altos títulos de anticuerpos que reconocen proteínas de *H. contortus*, solo nueve mostraron alta identidad con las 23 proteínas declaradas en la inmunoproteómica de adultos del parásito (F. Yan et al., 2010).

Como resultado del mapeo en la biblioteca de fagos se alcanzaron algunas secuencias consenso entre clones; consistente con

una respuesta IgG policlonal de los ovinos frente a *H. contortus*. Primeramente, se alinearon con proteínas que se informaron en una inmunoproteómica de *H. contortus* (F. Yan et al., 2010). De ellos, 15 péptidos presentaron identidad (57,1 % – 71,4 %) con la proteína ATPasa; otros dos clones sus secuencias tuvieron identidad (57,1 %) con DIM 1; mientras que un clon mostró identidad (71,4 %) con GAPDH (Tabla 2).

De forma similar, en *Ascaris suum* se detectó GAPDH en un análisis de inmunoproteómica (González-Miguel et al., 2014). Mientras que DIM 1 se detectó en productos de E/S de *H. contortus*, lo que indica que participa en el mecanismo de infestación del parásito con el hospedero (Hart et al., 2012). También en la descripción de la respuesta inmunológica del hospedero se informa sobre la participación de las ATPasa.

Estas proteínas están involucradas en los movimientos de los metabolitos, la expulsión de toxinas y la generación de energía para los procesos metabólicos; además participan en la respuesta ambiental (Knight & Behm, 2012; Rosa, Townsend, Jasmer, & Mitreva, 2015) y, por lo tanto, se cree que están inmersas durante la respuesta inmune del nematodo (Grzelak, Moskwa, & Bień, 2018).

Otros clones aislados de nuestra biblioteca mostraron identidad con proteínas que no estuvieron entre las descritas por F. Yan et al. (2010); como por ejemplo Fumarato reductasa, Factor de

elongación de la traducción y Proteína Rica en Leucina con 6 a.a. idénticos cada una con los péptidos de los fagos secuenciados.

En varios trabajos de inmunoproteómica en parásitos se describen proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo y los procesos de expresión de genes (Grzelak et al., 2018).

Prudencio, Marra, Cardoso, and Goulart (2010) trabajaron con una biblioteca de fago presentadora de péptidos, con un anticuerpo policlonal para garrapata, sin observar identidad después de secuenciar 36 clones. Así mismo, A Villa-Mancera et al. (2008) identificaron siete secuencias no consenso con un antisuero para catepsina L1/L2 de *Fasciola hepatica*.

Arnon, Tarrab-Hazdai, and Steward (2000), al usar un anticuerpo monoclonal que protege frente a la infección de *Schistosoma mansoni* no detectaron secuencias consenso.

Sin embargo, con otras bibliotecas presentadoras de péptidos se describen secuencias consensos, por ejemplo, con *Schistosoma japonicum* (Liu et al., 2011; Tang, Yi, Zeng, Wang, & Zhang, 2004), *Entamoeba histolytica* (Melzer et al., 2002) y *Rhipicephalus microplus* (Bishop-Hurley, Strachan, & Sutherland, 2010).

**Tabla 2.** Proteínas de *H. contortus* con identidad a los fagotopos.

Secuencia Clon	Secuencia Proteína	Proteína	Número de acceso	Aminoácidos idénticos	Número de clones
GSGNAIM	GKGNANF	DIM 1	ADZ24723.	4	2

			1		
<b>FLSDTRS</b>	FVSDTHS	GAPDH	AFA34911.1	5	1
<b>YPSYNML</b>	HTYNMLG	ATPasa	CDJ97714.1	4	9
<b>ELWGTAH</b>	ELWGQV	Globin	CDJ94105.1	4	2
<b>YSLQSVI</b>	SLQSVGQ	ATPasa	CDJ93611.1	5	6
<b>NERALTL</b>	NERALDL	Fumarato reductasa	CDJ86690.1	6	6
<b>GHKDFSA</b>	GHVDFSA	Fact. Elong. Trad.	CDJ89000.1	4	1
<b>SPSTHWK</b>	SPSTRWK	Proteína T04C4.1	CDJ87652.1	6	2
<b>LSNNNLR</b>	LANNNLR	Prot. Rica Leuc.	CDJ97098.1	6	2

*Fact. Elong. Trad.:* Factor de elongación de la traducción. *Prot. Rica Leuc.:* Proteína Rica en Leucina.

En el presente trabajo las secuencias de un mayor número de clones (120) permitió, además de la diversidad, la detección de algunas secuencias consenso.

### **3.8.3.3 Conclusiones Parciales**

Los fagos presentadores de péptidos permiten mimificar epítomos de *H. contortus* involucrados en la respuesta inmune de ovinos contra el parásito.

**Disminución del impacto ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos**

Masaquiza, D. A., Díaz, A., Cabezas, L. D., Herrera, G. C., Vaca, M. L., Arenal, A.

**ISBN:** 978-987-82912-2-2

---

---

Identificación de mimotopos similares a *H. contortus* a través de una Biblioteca de fagos, optimización de transferencia de genes en *H. contortus* para el silenciamiento de genes vitales, evaluación de un péptido con epítomos de Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y de Desorganización Muscular (DIM 1) en la protección de ovinos contra *H. contortus*

## CAPÍTULO IV.

### OPTIMIZACIÓN DE TRANSFERENCIA DE GENES EN *H. CONTORTUS* PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES VITALES, EVALUACIÓN DE UN PÉPTIDO CON EPÍTOPOS DE GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA (GAPDH) Y DE DESORGANIZACIÓN MUSCULAR (DIM 1) EN LA PROTECCIÓN DE OVINOS CONTRA *H. contortus*.

#### **4.1 Optimización de transferencia de genes en *H. contortus* para el silenciamiento de genes vitales**

##### **4.1.1 Introducción**

Los NGI son considerados entre las principales causas de enfermedades parasitarias que minimizan económicamente la producción de pequeños rumiantes en cualquier parte del mundo (C. Miller et al., 2012). Los géneros más comunes y económicamente importantes hallados en ovejas en pastoreo en diferentes partes son *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Chabertia* y *Haemonchus*, se considera este último como el de mayor prevalencia y patogenicidad (Fiel & Nari, 2013).

Las ovejas son susceptibles a los nematodos gastrointestinales, especialmente al *H. contortus*, a cualquier edad aunque los corderos y las ovejas periparturientas son las categorías más afectadas y epidemiológicamente más relevantes (Robin Gasser & Samson-Himmelstjerna, 2016).

*H. contortus* es uno de los nematodos parásitos más importantes del mundo, infecta a cientos de millones de pequeños rumiantes (incluidos ovejas y cabras) y causa enfermedades, muertes y pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares por año. Este nematodo se alimenta de sangre en el estómago y causa gastritis, anemia y complicaciones asociadas (hemoncosis), lo que conduce a graves pérdidas de producción y muerte en animales gravemente afectados (Sutherland & Scott, 2010).

El ARNi tiene un excelente potencial para identificar vacunas o genes diana con un marcado efecto farmacológico en parásitos (Geldhof, Visser, et al., 2006). Posee muchas ventajas sobre los métodos convencionales, por ejemplo, en genes cuya función no se conoce reduce la expresión del mismo a través de un ARN antisentido para investigar la función del gen (Hong-Geller & N Micheva-Viteva, 2010).

Siempre que se conozca una porción de una secuencia particular de ARNm, los efectos de alterar su expresión pueden evaluarse al introducir ARN bicatenario (ARNdc) correspondiente a

la secuencia deseada, que elude la necesidad de generación y selección de transformantes genéticos estables que contengan inserciones del ADN de interés. El primer informe de silenciamiento de genes en animales fue en el nematodo de vida libre *C. elegans* (Fire et al., 1998). Posteriormente se demostró que el mecanismo está presente en una amplia variedad de organismos (M. Kumar et al., 2017).

A pesar del fracaso del silenciamiento de genes en *H. contortus* existen observaciones del efecto de interferencia de algunos genes como  $\beta$ -tubulina (A. C. Kotze & Bagnall, 2006), sec-23 (Geldhof, Murray, et al., 2006) y H11 (Samarasinghe et al., 2011). Otro gen que puede ser objeto de estudio es DIM 1 por su función de mantener la integridad de la pared en la célula muscular (Rogalski, Gilbert, Devenport, Norman, & Moerman, 2003).

En general, los estudios demuestran efectos fenotípicos después de la incubación, alimentación o electroporación de los nematodos parásitos con la doble cadena de ARN (Issa, Grant, Stasiuk, & Shoemaker, 2005). Sin embargo, la utilización del silenciamiento de genes en *H. contortus* no es sencilla y todos los estudios no demuestran el efecto correspondiente del silenciamiento del gen. Además, es difícil distinguir entre el efecto del ARNi específico del gen y una toxicidad no específica (Zawadzki et al., 2012).

## **Los objetivos de este estudio fueron:**

- ✓ Optimizar el silenciamiento de genes en *H. contortus* con el empleo del gen de la  $\beta$ -tubulina.
- ✓ Evaluar el efecto sobre la motilidad y el desarrollo larval del silenciamiento en *H. contortus* de los genes de  $\beta$ -tubulina y DIM 1.

### **4.1.2 Materiales y Métodos**

#### **4.1.2.1 Parásitos**

Las L3 se lavaron en agua destilada, se colocaron en una solución salina (NaCl al 0,9 %) y se desenvainaron con hipoclorito de sodio al 0,2 % (NaOCl) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizaron cinco lavados con SSTF.

Seguidamente las L3 se filtraron a través de una malla de 50  $\mu\text{m}$  y se lavaron con SSTF 1X (NaCl 140  $\text{mmol L}^{-1}$ , KCl 5  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5  $\text{mmol L}^{-1}$ ), para después mantener en solución salina a 28 °C durante 2 horas y suplementada con un antibiótico antimicótico (10  $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina B, 200 U/mL de penicilina y 200  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina) en un matraz estéril.

#### **4.1.2.2 Aislamiento de los genes**

Para la preparación de la doble cadena de ARN se amplificaron los genes de DIM 1 de *H. contortus* (número de acceso GenBank: HQ444389,1), de  $\beta$ -tubulina de *H. contortus* (número de

acceso GenBank: M76493) y del Fotosistema II (tratamiento control) de *Arabidopsis thaliana*; número de acceso NM\_0012027 90,1 (Zawadzki et al., 2012) (Tabla 3).

Las condiciones usadas para el PCR fueron: 94 °C x 2,5 minutos (1 ciclo); 94 °C x 30 segundos, 57 °C x 30 segundos, 72 °C x 90 segundos (35 ciclos); 72 °C x 7 minutos (1 ciclo). La presencia de amplicones específicos se confirmó mediante análisis en gel de agarosa al 0,8 %.

El ADN se recuperó de la reacción de PCR mediante precipitación con el uso 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3 M). La concentración de ADN se determinó con un fluorímetro Qubit™. El ADN se usó luego como molde para amplificar el fragmento de la transcripción inversa.

## Disminución del impacto ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos

Masaquiza, D. A., Díaz, A., Cabezas, L. D., Herrera, G. C., Vaca, M. L., Arenal, A.

ISBN: 978-987-82912-2-2

**Tabla 3.** Cebadores empleados en los experimentos de silenciamiento.

Cebadores		5' → 3'	Nº de bases	Producto PCR
β-tub (T7)	sentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAATGCTACCCTTTCCGTCCATC	47	411
	antisentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAAACCGGGCATGAAGAAG	45	
DIM 1 (T7)	sentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAGCAGGACTCTCGCTTCCAGTTCAAG	52	554
	antisentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTTTTTCGTGTAATGTCCGGCGC	48	
Fotosist II (T7)	sentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTCGATGGACTTGACCAAACCTTGCCAAGAA	57	82
	antisentido	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCGGCGTCTTGCCATGCAATTCCTG	50	
DIM 1 (gen)	sentido	AAGCAGGACTCTCGCTTCCAGTTCAAG	27	504
	antisentido	GGTTTTCGTGTAATGTCCGGCGC	23	
GAPDH	sentido	TGGGTGTGAACCACGAGAC	19	213
	antisentido	GCAGCACCACGTCCATCA	18	
β-tub (gen)	sentido	AATGCTACCCTTTCCGTCCATC	22	361
	antisentido	CAAACCGGGCATGAAGAAG	20	

#### **4.1.2.3 Preparación de la doble cadena de ARN (ARNdc)**

El molde para la transcripción inversa se generó mediante PCR de cualquiera de los ADNc preparados a partir de adultos de *H. contortus* (DIM 1) o *Arabidopsis thaliana*. Las condiciones usadas para el PCR fueron: 94 °C x 2,5 minutos (1 ciclo); 94 °C x 30 segundos, 61 °C x 30 segundos, 72 °C x 90 segundos (35 ciclos); 72 °C x 7 minutos (1 ciclo). La presencia de amplicones específicos se confirmó mediante análisis en gel de agarosa al 1,2 %. El ADN se recuperó de la reacción de PCR mediante precipitación con el uso 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3 M).

La concentración de ADN se determinó con un fluorímetro Qubit™. El ADN se usó luego como molde para las reacciones de transcripción *in vitro* a través del sistema de producción T7 a gran escala RiboMAX RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, EE.UU.).

Se hibridaron cadenas únicas de ARN complementarias por medio de la mezcla de cantidades equimolares y con elevación de la temperatura a 90 °C durante 2 minutos, seguido de 1 hora adicional a 37 °C. La calidad y la integridad del ARNdc se confirmaron en geles de agarosa al 0,8 % y la concentración en un fluorímetro Qubit dsDNA™ (Thermo Fisher Scientific, EUA).

#### **4.1.2.4 Tratamiento de ARN de interferencia (ARNi)**

Las L3 desenvainadas se incubaron en tubos Eppendorf en 25  $\mu\text{L}$  de SSTF a una concentración de 8 000 L3  $\text{mL}^{-1}$ . Se realizaron 32 ensayos de silenciamiento de genes: 18 ensayos para ARNdc DIM 1 (6 ensayos para la medición de la expresión, 3 para incubaciones de 24 horas y 48 horas con ARNdc, 6 ensayos para pruebas de migración larval y 6 ensayos para test de desarrollo larval) y 14 ensayos para ARNdc del Fotosistema II (2 ensayos para la medición de la expresión, uno para incubaciones de 24 horas y 48 horas con ARNdc, 6 ensayos para pruebas de migración de larvas y 6 ensayos para test de desarrollo larval).

#### **4.1.2.5 Cantidad de lipofectina y tiempo de incubación**

La formulación liposómica del ARNdc se preparó de la siguiente manera: se mezclaron suavemente con 10  $\mu\text{L}$  de lipofectina 2000 (Invitrogen) con 10  $\mu\text{L}$  de SSTF y se dejaron en reposo durante 10 minutos, según el experimento a temperatura ambiente. El ARNdc se añadió y se homogenizó suavemente. La mezcla se dejó reposar durante otros 20 minutos y luego se añadió a las larvas. Se adicionó RNasin (Promega) a todos los ensayos hasta una concentración final de 0,4 U/mL. Las larvas se mantuvieron a 40 °C desde 1 hasta 48 horas, según el experimento.

#### **4.1.2.6 Purificación de ARN**

Las larvas fueron removidas, se lavaron una vez con agua y se homogenizaron en tampón de lisis (PureLink® RNA Mini Kit,

Invitrogen) con el empleo de una jeringuilla. Para la extracción del ARN se usó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **4.1.2.7 PCR de transcripción inversa (RT-PCR)**

Las L3 de *H. contortus* tratadas con la doble cadena de ARN se lavaron tres veces en SSTF, luego el RNA se extrajo al usar reactivo de aislamiento total de ARN (PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit). El RT-PCR se llevó a cabo con el uso del sistema One-Step RT-PCR (Affymetryx, EE.UU.).

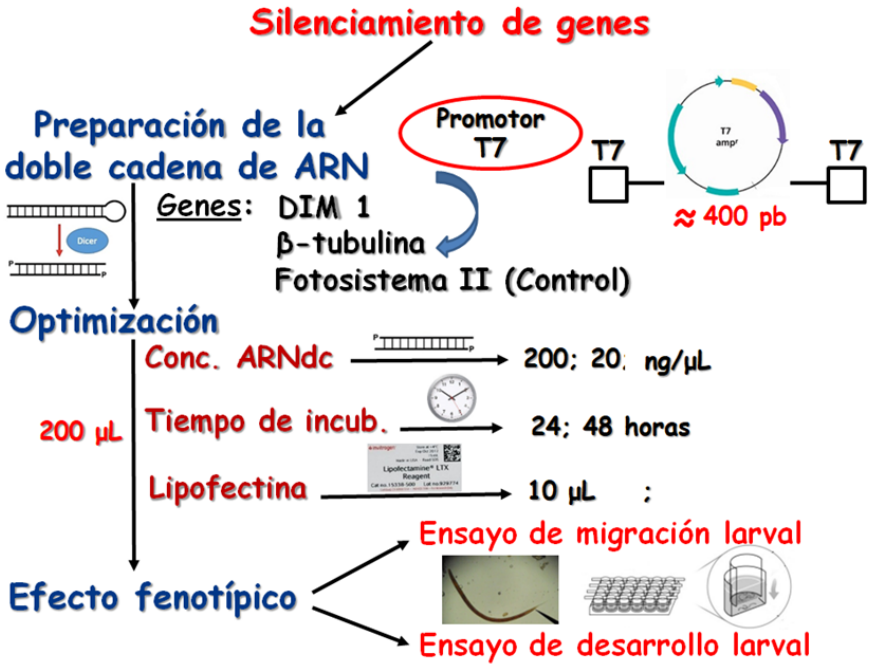
Para  $\beta$ -tubulina, cada mezcla de PCR se dividió en dos tubos que contenían cebadores específicos para el gen de la  $\beta$ -tubulina o hacia un gliceraldehído DH no designado como objetivo de control (HM145749,1) (tabla 2). La RT-PCR se llevó a cabo en 35 ciclos y los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2 % que contenían 0,001 % de SYBR<sup>®</sup> seguro.

Para DIM 1, cada mezcla de PCR se dividió en dos tubos que contenían cebadores específicos para el gen de DIM 1 o para un control no objetivo expresado constitutivamente, gliceraldehído DH (HM145749,1) (tabla 2). La RT-PCR se llevó a cabo en 35 ciclos y los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1 % que contenían 0,001 % de SYBR<sup>®</sup> seguro.

#### **4.1.2.8 Test de migración larval (TML) y test de desarrollo larval (TDL) in vitro**

El TML y el TDL se realizaron para determinar el efecto de la doble cadena de ARN sobre al gen de DIM 1 en las L3. Para el

TML, se transfirieron seis réplicas de 200 larvas (alícuotas de 200  $\mu$ L) por tratamiento, a un aditamento con tamices de 20  $\mu$ m en un tubo plano, colocados en los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos (Wagland, Jones, Hribar, Bendixsen, & Emery, 1992).



**Figura 16.** Diagrama de flujo sobre el esquema seguido para el silenciamiento de genes.

*ARNdc*: ácido ribonucleico de doble cadena, los genes de DIM 1 de *H. contortus* (número de acceso GenBank: HQ444389,1), de  $\beta$ -tubulina de *H. contortus* (número de acceso GenBank: M76493) y del Fotosistema II (tratamiento control) de *Arabidopsis thaliana*; número de acceso NM\_0012027 90,1; T7 promotor del fago.

La placa se colocó en una cámara a 37 °C durante toda la noche. Los datos fueron obtenidos por medio del número de larvas que migraron a través del tamiz y las que no lo hicieron.

Para el TDL, se usaron seis alícuotas por tratamiento de 200 larvas para evaluar la transformación de la fase de L3 a la fase L4. Después de 48 horas de incubación con la doble cadena de ARN, las L3 se transfirieron a 2 mL de medio de cultivo (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgSO<sub>4</sub>, suplementado con suero fetal bovino al 20 % (v/v); pH 6 ajustado con NaHCO<sub>3</sub>) en viales de 20 mL.

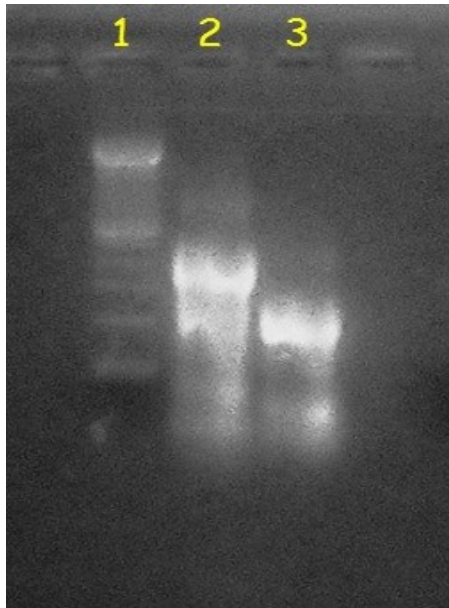
Los viales se sellaron con una tapa de rosca que contenía un revestimiento de caucho de silicona. El contenido se agitó suavemente y los tubos fueron incubados a 40 °C durante 3 días. Las primeras piezas bucales de la fase L4 se confirmaron mediante microscopía (Sommerville, 1966).

Los datos se transformaron con  $\arcsen(p/100)^{1/2}$  y se evaluó la normalidad. La comparación entre los grupos de tratamiento para ambas pruebas *in vitro* se realizó por separado a través de un ANOVA, y las diferencias entre las medias se examinaron por medio de la prueba de Student-Newman Keuls, donde se aceptó una diferencia significativa de  $p < 0,05$ .

### 4.1.3 Resultados y Discusión

#### 4.1.3.1 Síntesis de la doble cadena de ARN (ARNdc)

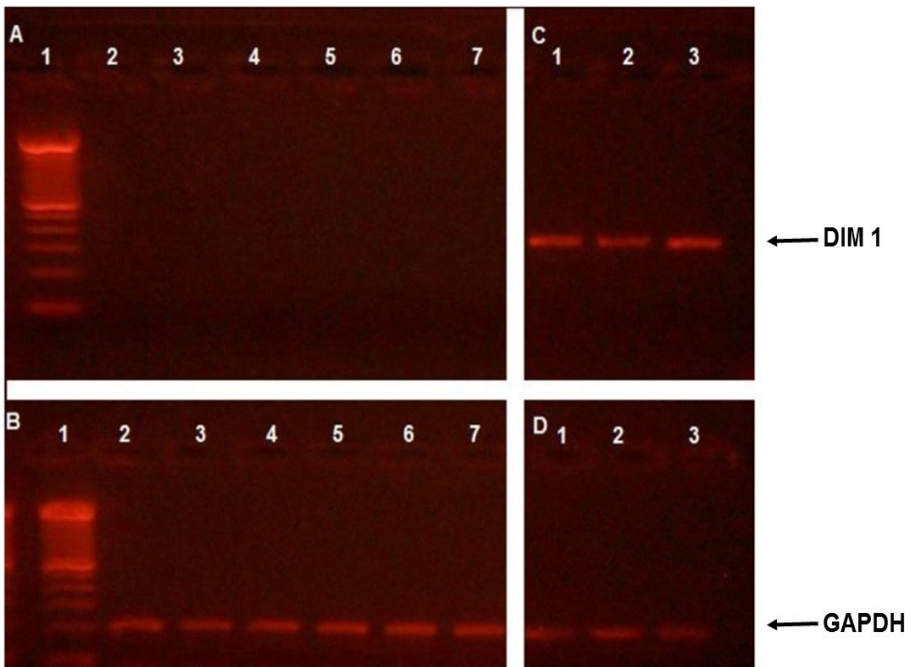
El promotor T7 permitió la amplificación de las dobles cadenas de los genes de DIM 1 y  $\beta$ -tubulina de *H. contortus* y del Fotosistema II (tratamiento control) de *Arabidopsis thaliana*. Las dobles cadena se obtuvieron a una concentración de 2,55  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\beta$ -tubulina) y 1,68  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (DIM 1) con bandas bien definidas que demuestran su integridad (Figura 17).



**Figura 17.** Electroforesis de doble cadena de ARN. DIM 1 (2),  $\beta$ -tubulina (3), obtenidas de la transcripción *in vitro* proveniente del promotor T7 en los extremos. Patrón de peso molecular 100 pb (1).

#### 4.1.3.2 Efecto sobre el silenciamiento del gen de DIM 1

Se observó un silenciamiento efectivo del gen de DIM 1 de *H. contortus* después de 48 horas de incubación de las larvas 3 con el ARNdc homólogo, 24 horas no fue suficiente para lograr el silenciamiento. La incubación de las larvas 3 con el ARNdc de Fotosistema II no afectó la expresión del gen (Figura 18). Por esta razón DIM 1 se puede agregar a la corta lista de genes que se lograron silenciar exitosamente en *H. contortus*.



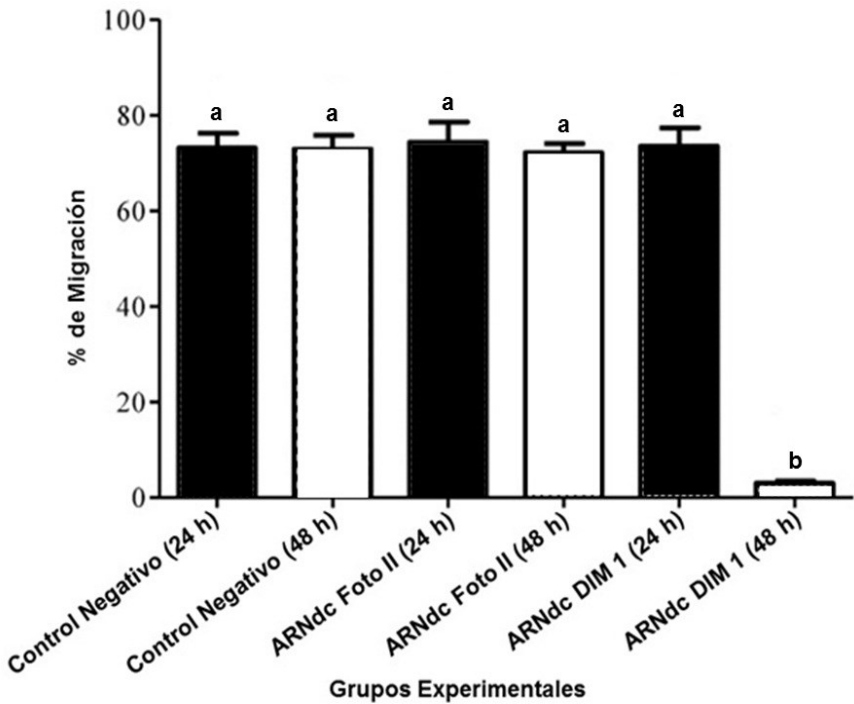
**Figura 18.** Análisis de transcripción por RT-PCR del gen de DIM 1 de *Haemonchus contortus* después del tratamiento de ARNdc.

Aunque está demostrado que *H. contortus* posee el mecanismo de silenciamiento de genes (A. C. Kotze & Bagnall, 2006), no todos los genes que se emplearon para el silenciamiento en el nematodo tuvieron éxito (Samarasinghe et al., 2011). De acuerdo con los resultados, el proceso de entrada del ARNdc debe establecerse para cada gen, ya que existe cierta evidencia de que la entrada del ARNdc en un experimento de incubación no requiere la ingestión de la doble cadena por el parásito (A. C. Kotze & Bagnall, 2006), pero su limitante parece estar dada por una baja penetración del ARNdc a la célula (Collette Britton, Samarasinghe, & Knox, 2012).

#### **4.1.3.3 Test de migración larval (TML) y test de desarrollo larval (TDL) in vitro**

Se obtuvo una migración del 4 % en las larvas incubadas 48 horas con la doble cadena del gen de DIM 1, mientras que la migración de las larvas en el grupo control fue del 75 % ( $p < 0,05$ ). Asimismo, las larvas incubadas con la doble cadena durante 24 horas fue tiempo insuficiente para afectar la migración (Figura 19).

De manera similar, con  $\beta$ -tubulina fue necesario 48 horas de incubación de las larvas con la doble cadena para lograr una reducción (2,5 %) de la migración larval, menor ( $p \leq 0,05$ ) al 75 % del control (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto de la exposición a ARNdc (DIM 1 y Fotosistema II) sobre la capacidad de las larvas para migrar durante un período de 24 horas (período de inicio) y 48 horas (última medición) después de la exposición al ARNdc.

*Cuadro A: DIM 1 24 horas (líneas 2–4); DIM 1 48 horas (líneas 5–7); Cuadro C: Fotosistema II (Arabidopsis thaliana) controles 24 horas (líneas 1) y 48 horas (líneas 2), no tratado (líneas 3). Cuadros B y D: GAPDH expresión correspondiente a cada muestra. Línea 1 de cada cuadro corresponde al marcador de peso molecular de ADN (100 pb).*

El efecto también se midió en un tratamiento de control negativo adicional en el que las larvas no recibieron ARNdc, RNasin y lipofectina. Cada columna representa la media ( $\pm$  desviación estándar) de seis mediciones en ensayos con tamices de 20  $\mu$ m que

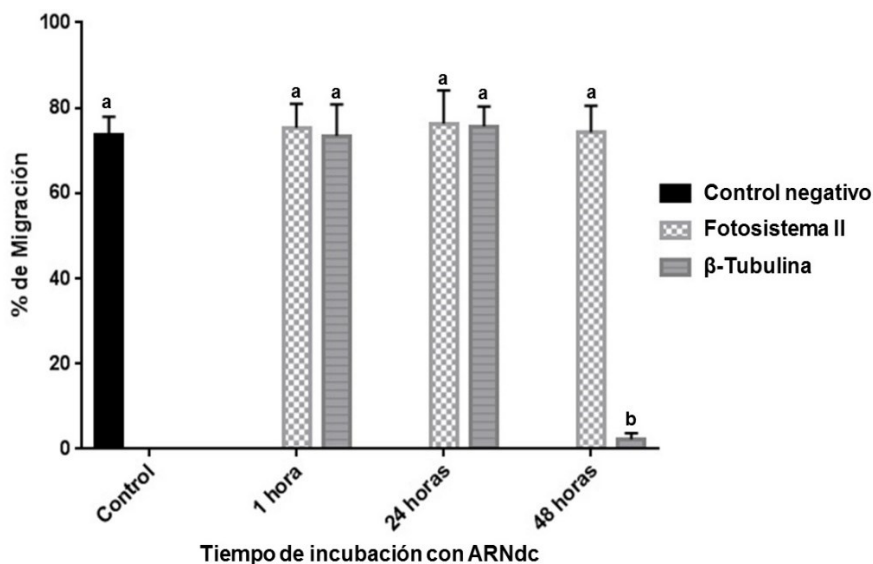
examinan la migración de larvas de seis tratamientos con ARNdc de 200 larvas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Las larvas se incubaron con ARNdc según corresponda, en el control no se empleó ARNdc. Los por cientos de migración larval se transformaron como  $\arcsen (P/100)^{1/2}$ . Cada columna representa la media ( $\pm$  desviación estándar) de seis mediciones en ensayos con tamices de 20  $\mu\text{m}$  que examinan la migración de larvas de seis tratamientos con ARNdc de 200 larvas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Nuestros resultados indican que el tiempo de incubacion es necesario que sea lo suficientemente largo para lograr el silenciamiento para que la no expresión del gen se manifieste en el fenotipo.

Zawadzki et al. (2012) al silenciar ocho genes esenciales en *H. contortus* a través de varios métodos de transferencia de genes, observaron una disminución en la expresión del transcrito pero no encontraron efectos fenotípicos en las larvas y los nematodos adultos. La reducción de la migracion larval se sustenta en la funcion que desempeña DIM 1, que es una proteína estructural localizada en la región de la membrana de la célula muscular alrededor y entre los cuerpos densos que está involucrada en el movimiento del parásito (Gieseler, Qadota, & Benian, 2005; R. Yan et al., 2013).

Por otra parte, la necesidad de mayor tiempo de incubación para observar efectos sobre el fenotipo puede estar dado por la vida media de la proteína. Se conoce que las proteínas estructurales tienen un tiempo de vida mayor que las que ejercen otras funciones (ej. hormonas, rutas metabólicas); lo cual pudiera estar relacionado con la estructura primaria de la proteína y la desamidación de los residuos de a.a. (Robinson, 2002).



**Figura 20.** Efecto del tiempo de incubación sobre la migración larval para  $\beta$ -tubulina.

Solo el  $12,5 \pm 4,6$  % de las larvas incubadas con la doble cadena para el tratamiento con DIM 1 fueron capaces de desarrollarse hasta la fase de larva 4 (L4). Sin embargo en  $\beta$ -tubulina todas las larvas que migraron murieron. Este porcentaje de migración

fue muy inferior al alcanzado por las larvas tratadas con la doble cadena del Fotosistema II ( $71,8 \pm 6,4$  %) y el control no tratado ( $73,3 \pm 5,8$  %). La tasa de desarrollo de las larvas de *H. contortus* en el grupo control está en correspondencia con los resultados de Sommerville (1966).

Se conoce que los patrones de expresión de las proteínas son diferentes para poblaciones resistentes y susceptible. Sin embargo, DIM 1 mantiene los niveles de expresión independientemente de la susceptibilidad o resistencia de la población parasitaria (Hart et al., 2012). Esto hace a DIM 1 una proteína diana para el control de *H. contortus*.

Los resultados de nuestro estudio muestran que el silenciamiento de genes en *H. contortus* se puede lograr de una manera rápida y robusta con el empleo de bajas concentraciones de la doble cadena de ARN. Sin embargo, el efecto sobre el fenotipo está condicionado al tiempo de incubación y al tipo de gen.

#### **4.1.4 Conclusiones Parciales**

El gen DIM 1 es vital para la motilidad y el desarrollo de las larvas de *H. contortus* que lo convierten en una diana para estrategias de control del nematodo.

## **4.2 Evaluación de un péptido con epítomos de Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y de Desorganización Muscular (DIM 1) en la protección de ovinos contra *H. contortus***

### **4.2.1 Introducción**

El *H. contortus* es considerado el más importante NGI que afecta a los pequeños rumiantes, los cuales causan una disminución en el rendimiento de los animales y, en casos extremos, la muerte, particularmente en animales jóvenes y hembras en edad reproductiva, porque son más susceptibles a las infecciones (Santos et al., 2014).

La profilaxis contra las infecciones por NGI se basa en el uso de antihelmínticos. Sin embargo, su eficacia disminuye por la aparición de poblaciones de parásitos resistentes (C. Bassetto & Amarante, 2015). Este es un problema que afecta tanto a pequeños como grandes rumiantes (Cotter, Van Burgel, & Besier, 2015; D. Leathwick & Miller, 2013).

Una opción viable para el control de los NGI está representada por el desarrollo de vacunas (C. Bassetto & Amarante, 2015). Las vacunas reducen la dependencia a los antihelmínticos y constituyen una estrategia de reemplazo sostenible. La acción de una vacuna está dirigida a activar el sistema inmunológico, lo que evita el establecimiento de los parásitos dentro del hospedero, reduce la contaminación del pasto por huevos y larvas e interrumpe el ciclo de vida (Kearney et al., 2016). La búsqueda de vacunas en *H. contortus* se centra en la identificación de antígenos que estimulen niveles

útiles de inmunidad protectora, entre 70 y 95 % de reducción de huevos en ovinos (Tak et al., 2015).

El desarrollo de una vacuna que proteja a ovejas y cabras de la infestación por *H. contortus* es el centro de investigaciones por más de 30 años (Torres-Acosta & Hoste, 2008).

Dos son los tipos de antígenos asociados a nematodos: (1) productos de E/S y (2) los presentes en las superficies externas o dentro del parásito (antígenos somáticos). Estos tipos de antígenos inducen una respuesta inmune en el hospedero durante el curso de la infección (Maqbool et al., 2018) y son capaces de inducir altos niveles de protección, hasta un 90 % de reducción en el conteo de huevos y un 75 % en la carga de parásitos (Newton, 1999).

Una alternativa en el desarrollo de vacunas está dirigida al empleo de proteínas recombinantes como antígenos. Sin embargo, la reducción del conteo de huevos no supera el 50 % (Maqbool et al., 2018). Vacunación con proteínas recombinantes de Hcp26/23 (García-Coiradas et al., 2010), H11 (Roeber et al., 2013) y H-gal-GP (Cachat et al., 2010) no obtuvieron una reducción significativa del conteo de huevos de los animales.

A pesar de todos los esfuerzos, la obtención de una vacuna comercial contra *H. contortus* todavía no es posible. Esto puede atribuirse a la falta de comprensión de la respuesta inmunitaria contra los parásitos helmintos y en particular para *H. contortus* y a la

incapacidad de producir antígenos recombinantes equivalentes a los antígenos naturales (Maqbool et al., 2018).

Solo Barbervax®, vacuna contra *H. contortus* en ovejas desarrollada en Australia se produce comercialmente. Aunque los resultados de su uso en Australia muestran reducciones del conteo fecal de huevos superiores al 85 % (B. Besier, Lyon, Michael, Newlands, & Smith, 2012), estudios de su empleo en otros países no muestran los mismo resultados.

Con el uso de Barbervax® en Brasil se logró una reducción de huevos del 69,8 % (de Matos et al., 2017) y en Estados Unidos en animales vacunados no hubo una reducción significativa del conteo fecal de huevos comparado con el grupo control (VanHoy et al., 2018).

Los antígenos que más se utilizan en estudios sobre vacunas para *H. contortus* son: H11 (de Matos et al., 2017), H-gal-GP (VanHoy et al., 2018), Cisteína-proteasa (J. Molina et al., 2012) y Hc23 (González-Sánchez et al., 2018). Sin embargo, antígenos a partir de proteínas como GAPDH (Umair, Bouchet, Knight, Pernthaner, & Simpson, 2017) y DIM 1 (C. Wang et al., 2017) pueden ser potencialmente exitosos en la búsqueda de una vacuna.

El empleo de una vacuna de ADN de DIM 1 de *H. contortus* en cabras redujo el conteo fecal de huevos un 46 % mientras que la carga de nematodos disminuyó un 51 % (R. Yan et al., 2013).

Asimismo, Han et al. (2012) con el uso de una vacuna de ADN de GAPDH indujeron una protección parcial de las cabras, con una reducción del conteo fecal de huevos y del número de parásitos de 34,9 % y 37,73 % respectivamente.

**El objetivo de este estudio fue:** Evaluar la capacidad de protección en ovinos contra *H. contortus* de un péptido que mimifique epítomos del parásito.

## **4.2.2 Materiales y Métodos**

### **4.2.2.1 Vacunación para evaluar la respuesta inmunológica de los animales**

Se utilizaron ocho carneros de 12-13 meses de edad y con peso de  $53 \pm 2$  kg. Los animales fueron estabulados y desparasitados 28 y 14 días antes del inicio del experimento con el propósito que estuvieran libres de nematodos. El día 0 se inicia el experimento con la primera vacunación de los animales. Los ovinos se dividieron en dos grupos, uno (n=4) fue vacunado con el péptido que contiene el bi-epítomo GAPDH y DIM 1 (Mlu-2: GSGNAIMGGGSFLSDTRS, PM 1713,83 g mol<sup>-1</sup>, 78,2 % pureza en Genescript, EEUU) a 2 µg/kg de peso del animal y adyuvante (Montanide 50VG-2).

El grupo placebo (n=4) solo recibió el adyuvante. Se realizaron cuatro inmunizaciones, tiempo 0, 7 días, 21 días y 35 días. Todos los animales fueron infestados con 1250 L3 de *H. contortus* el día 35 del experimento. Las larvas se obtuvieron por la técnica de

Bearmann, de un coprocultivo de huevos colectados a partir de la ovoposición de las hembras adultas de *H. contortus* de uno de los animales sacrificados en el matadero (Agriculture, 1986).

#### **4.2.2.2 Análisis hematológico**

Se colectaron muestras de sangre (10 mL) en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1 mM) los días 0, 35 y 70 del experimento a través de punción de la vena yugular. Se determinó el hematocrito por el método del micro-hematocrito y la hemoglobina por cianometahemoglobina, y se realizó el recuento diferencial de células.

#### **4.2.2.3 Análisis coprológico**

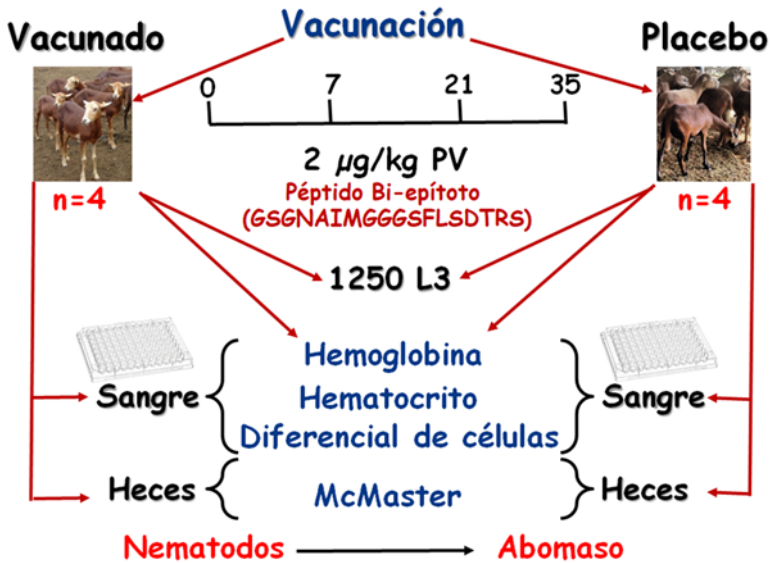
Las muestras de heces fueron colectadas directamente del recto los días 0, 14, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, y el número de huevos por gramo de heces (hpg) fue determinado a través del método de McMaster (Gordon & Whitlock, 1939).

Todos los animales del ensayo fueron sacrificados a los 70 días del experimento y se contaron los nematodos adultos del abomaso.

#### **4.2.2.4 Análisis estadístico**

La normalidad de los datos fue analizada por la prueba de Shapiro-Wilk. La diferencia entre grupos se determinó por un ANOVA simple seguido por el test de Student Newman-Keuls para la comparación entre los tratamientos. La comparación de los niveles de eosinófilos, hemoglobina y hematocrito se realizó por medio de

una prueba t-student pareado. Las diferencias de los valores de hpg se hizo a través de un t-student. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).



**Figura 21.** Diagrama de flujo en el diseño experimental para la evaluación de la vacuna en ovinos. El bipéptido NH<sub>2</sub>-GSGNAIMGGGSFLSDTRS-COOH.

## 4.2.3 Resultados y Discusión

### 4.2.3.1 Vacunación

La Figura 22 muestra el conteo de huevos por gramo de heces (hpg) de los animales de cada grupo experimental durante la investigación. La ovoposición comenzó a los 63 días, 28 días después de la infestación, lo que coincide con el periodo de

prepatencia de *H. contortus*. El promedio de hpg el día 70 (día del sacrificio) fue 57,9 % menor (2130 hpg) en el grupo vacunado con el péptido Mlu2 que en el grupo control (5060 hpg) ( $p < 0,05$ ).

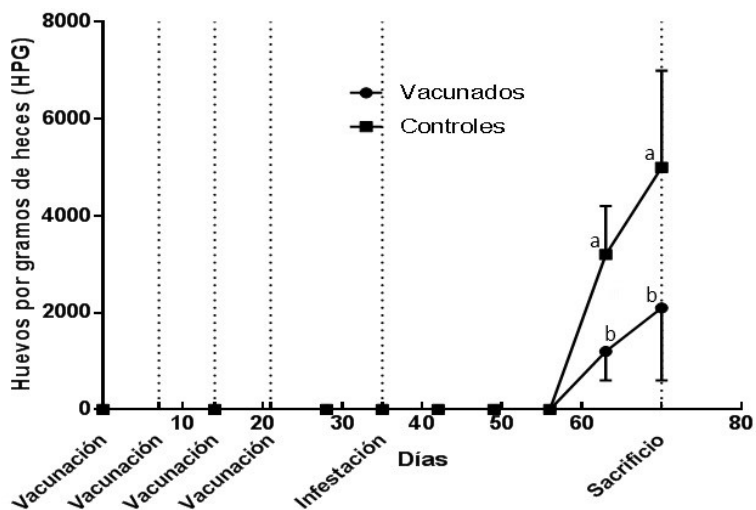
La carga de parásitos adultos en el abomaso de los animales del grupo vacunado con el péptido Mlu2 fue 52,3 % menor comparada con el grupo control ( $p < 0,01$ ). El promedio de la proporción de hembras en el grupo vacunado (55/104) fue similar al grupo control (116/218).

Para Sargison et al. (2011) el nivel de infestación puede variar por la edad de los animales, la supresión inmune, las cepas de *H. contortus* presentes, así como el número de larvas que se usen para el desafío. R. Yan et al. (2013) dieron a conocer en sus estudios 8000 hpg y 524 nemátodos adultos, mientras que Zhao et al. (2012) hallaron 13000 hpg y 742 nematodos adultos.

El Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa es uno de los péptidos de más empleo en ensayos de vacunación para proteger contra parásitos gastrointestinales. En *Schistosoma mansoni* se evaluaron seis péptidos deducidos de la secuencia primaria de GAPDH, y con la combinación de cuatro de ellos redujeron significativamente el hpg y la carga parasitaria.

La vacunación de cabras con ADN de GAPDH de *H. contortus* redujo la producción de huevos (34,9 %) y la carga parasitaria en el abomaso (37,7 %) (R. Yan et al., 2013). Aunque los

resultados del presente estudio son superiores, se reafirma el hecho de usar GAPDH como candidato vacunal contra *H. contortus*.



**Figura 22.** Dinámica de huevos por gramos de heces (media  $\pm$  d.e.) en carneros vacunados con el péptido.

Grupo *Mlu2* ( $n=4$ ): inyectado con el péptido *GSGNAIMGGSFLSDTRS*, correspondiente a los epítopos GAPDH y DIM 1. El control ( $n=4$ ) fue un placebo vacunado solamente con el adyuvante. El día 0 corresponde al primer día de la vacunación. Los 2 grupos fueron infestados con 1250 L3 de *H. contortus*. Las líneas discontinuas indican los días de vacunación, el día de la infestación y el momento del sacrificio. Las T muestran la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La proteína de Desorganización Muscular 1 (DMI 1) es un nuevo candidato como antígeno para proteger frente a diferentes parásitos. La vacunación en cabras con el gen de DMI 1 redujo la

producción de huevos y carga parasitaria en el abomaso en 45,7 y 51,1 %, respectivamente (R. Yan et al., 2013). Así mismo, la inyección de BS-Ag3 (idéntica a DIM 1) de *Baylisascaris schroederi* (ascariasis del panda) redujo significativamente en 62,9 % la carga de parásitos (T. Wang et al., 2008). Los resultados del presente estudio confirman los hallazgos de usar esta proteína como candidato vacunal. Aunque el mecanismo de protección con el uso de DMI 1 y GAPDH como antígenos es aún desconocido, se discute que puede estar dado por el incremento de anticuerpos y eosinófilos.

#### **4.2.3.2 Análisis hematológico**

Los resultados del conteo de eosinófilos fueron más alto en el grupo vacunado que en el grupo control ( $p < 0,01$ ). Asimismo, el valor de hemoglobina fue menor en el grupo control a partir del día 56 y fue 20 % menor el día del sacrificio (tabla 4).

El aumento de los eosinófilos en sangre periférica es considerado como un marcador potencial para la resistencia de los animales contra *H. contortus* (Douch, Green, Morris, McEwan, & Windon, 1996). Los eosinófilos pueden dañar y probablemente matar las larvas del parásito en el tracto gastrointestinal (Balic et al., 2006).

En un estudio *in vitro*, eosinófilos extraídos de lavados mamarios de ovejas infestadas repetidamente, inhibieron la movilidad y mataron las L3 de *H. contortus* en presencia de

anticuerpo de superficie anti-L3 (Rainbird, Macmillan, & Meeusen, 1998).

**Tabla 4.** Recuento de eosinófilos y niveles de hemoglobina y hematocrito de animales vacunados contra *H. contortus*.

	Tiempo (días)	Control	Vacunados (Mlu2) <sup>1</sup>
Eosinófilos (1 x 10 <sup>9</sup> ) mL <sup>-1</sup>	0	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
	28	0,01 ± 0 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,03 <sup>a</sup>
	56	0,06 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>
	70	0,08 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,07 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g L <sup>-1</sup> )	0	102,2 ± 5,8 <sup>a</sup>	100,6 ± 14,3 <sup>a</sup>
	28	91,4 ± 6,8 <sup>a</sup>	91,0 ± 7,4 <sup>a</sup>
	56	74,2 ± 5,3 <sup>b</sup>	87,2 ± 3,8 <sup>a</sup>
	70	62,6 ± 7,0 <sup>b</sup>	77,4 ± 6,9 <sup>a</sup>
Hematocrito (%)	0	33,8 ± 2,2 <sup>b</sup>	33,1 ± 2,9 <sup>a</sup>
	28	31,1 ± 3,2 <sup>b</sup>	32,0 ± 1,8 <sup>a</sup>
	56	27,3 ± 4,0 <sup>a</sup>	31,5 ± 7,9 <sup>a</sup>
	70	20,7 ± 3,5 <sup>b</sup>	25,5 ± 2,4 <sup>a</sup>

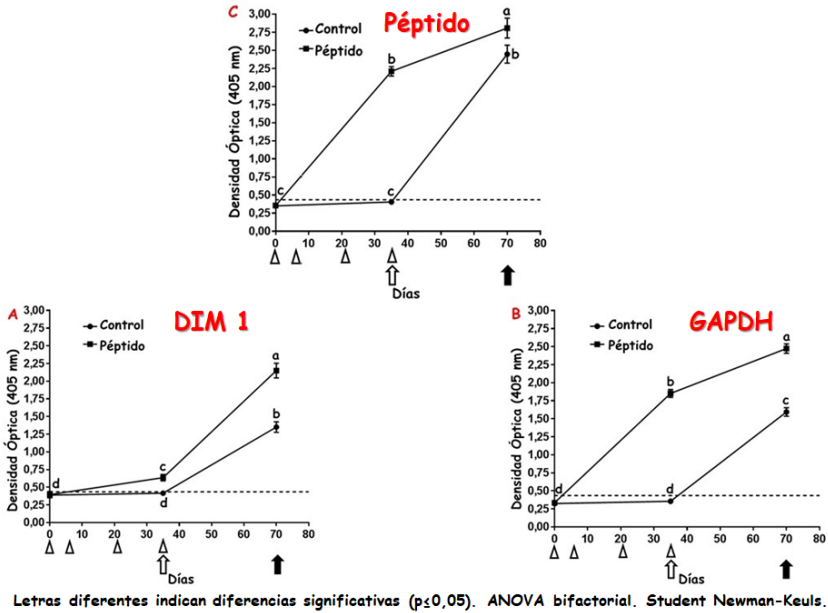
<sup>1</sup>Mlu2 bipéptido (GSGNAIMGGGSFLSDTRS, PM 1713,83 g mol<sup>-1</sup>, 78,2 % pureza en Genescript, EEUU) que contiene los epítomos de DIM 1 y GAPDH de *H. contortus*.

Los niveles de IgG en sangre que reconocen el epítomo, fueron máximos el día del sacrificio. El mismo comportamiento se observó para ambos péptidos independientes; aunque en el caso de GAPDH hubo una respuesta más rápida, comparado con DMI 1 en el momento de la infestación y al sacrificio (Figura 23).

En la Figura 24 se muestra la dinámica de los títulos de IgG que reconocen *H. contortus*. Los resultados indican que los títulos

que primero aumentan están dirigidos hacia el péptido gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

### Dinámica de títulos de IgG que reconocen a *H. contortus*



**Figura 23.** Dinámica de los títulos de IgG para los epitopes de la proteína de Desorganización Muscular 1 (DMI 1) y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Altos títulos de IgG específicos se relacionan con la defensa del huésped contra el desafío de *H. contortus*. Por ejemplo, la inmunización con una fracción de la Proteasa Catepsina B provocó altos títulos de IgG e indujo una reducción del 47 % en la carga de parásitos y un 77 % de la producción de huevos (Knox & Smith, 2001). Además, el aumento de los niveles séricos de IgG1 e IgG2 se

asociaron con la disminución del recuento fecal de huevos (Schallig, Hornok, & Cornelissen, 1995).

De manera similar, en ovejas resistentes se encontraron antígenos para producir mayores niveles de IgG1 e IgE (Gill, Watson, & Brandon, 1993). Los resultados aquí descritos fueron consistentes con informes anteriores, porque confirman que el mecanismo de protección puede estar mediado por anticuerpos y la participación de los eosinófilos.

#### **4.5.4 Conclusiones Parciales**

La respuesta inmunológica en ovinos frente a un péptido que contiene epítomos que mimifican a DIM 1 y GAPDH de *H. contortus* reduce la carga del parásito y el conteo fecal de huevos.

### **4.3. Discusión General, Conclusiones y Recomendaciones**

#### **4.3.1 Discusión General**

En este trabajo, sueros naturales de ovinos fueron capaces de inmunoneutralizar larvas de *H. contortus*. El mapeo con estos sueros en una biblioteca de fagos permitió identificar varios péptidos con identidad para algunas proteínas de *H. contortus*, dentro de ellas, DIM 1 y GAPDH. El silenciamiento de la expresión del gen DIM 1 redujo la motilidad y limitó el desarrollo de las L3, lo que indica que DIM 1 es una proteína vital para el nematodo.

La utilización de un péptido con epítomos de DIM 1 y GAPDH en la inmunización de ovinos logró reducir el conteo fecal

de huevos y la carga parasitaria en los animales; lo que indica que sueros inmunoneutralizantes permite dirigir la selección de las proteínas con un potencial para el control de *H. contortus*.

Existen evidencias del empleo de sueros para evaluar su capacidad inmunoneutralizante, aunque en los estudios constatados los sueros siempre provenían de una respuesta inducida (Bethony et al., 2005; A. L. Williamson et al., 2006). El empleo en nuestro trabajo de sueros provenientes de una respuesta natural demostró que es posible la inmunoneutralización de las larvas de *H. contortus*. Este tipo de ensayo *in vitro* puede ser una nueva propuesta para evaluar la respuesta inmunológica de candidatos vacunales contra parásitos.

Un enfoque en la identificación de antígenos de vacunas lo constituye las bibliotecas de fagos, a partir de la identificación de secuencias de péptidos que imitan potencialmente la estructura de los epítomos antigénicos (Ellis et al., 2012).

El empleo de sueros para mapear epítomos en bibliotecas de fagos está documentado en varios organismos que van desde bacterias hasta parásitos (Gnanasekar et al., 2004; Tang et al., 2004; H. Wang et al., 2007). Sin embargo, la mayoría de los sueros que se utilizan son a partir de una respuesta inducida (Rhaiem & Houimel, 2016) mientras que son pocos los estudios que el mapeo se realiza a través de sueros con respuesta natural (Salles et al., 2017; Toledo-Machado et al., 2015).

En este trabajo sueros de ovinos con respuesta natural frente a *H. contortus* permitieron la identificación de epítomos de proteínas del parásito, lo que constituye el primer informe de bibliotecas de fagos en este nematodo.

El silenciamiento de genes en parásitos es una herramienta que permite identificar genes vitales y emplearlos como dianas para el desarrollo de vacunas (Anandanarayanan et al., 2017). El gen que se usó como modelo para silenciamiento en *H. contortus* fue  $\beta$ -tubulina, del cual se describen varios trabajos con éxito (Geldhof, Murray, et al., 2006; A. C. Kotze & Bagnall, 2006; Zawadzki et al., 2012).

Sin embargo, pocos genes se describen con silenciamiento exitoso en *H. contortus* (Zawadzki et al., 2006); lo cual puede ser por poca accesibilidad a los genes dianas (Samarasinghe et al., 2011), poca estabilidad de la doble cadena de ARN (Yuen et al., 2014), estudios de moléculas (nanopartículas) que permitan cambiar el perfil farmacocinético (Coelho et al., 2013) y falta de estudios sobre la optimización de los protocolos de silenciamiento.

En el presente trabajo se alcanzó la eliminación completa de la expresión del gen con cantidades 500 veces menor de ARNdc desnudo y con una hora de tiempo de incubación; lo que indica que para cada gen es necesario buscar las condiciones que permitan su silenciamiento. Lo cual coincide con la estrategia seguida para el

silenciamiento de genes en *F. gigantica* (Anandanarayanan et al., 2017).

Por otra parte, el efecto sobre el fenotipo después del silenciamiento de los genes DIM 1 y  $\beta$ -tubulina fue dependiente del tiempo de incubación, lo que indica una relación directa del tiempo de vida media de la proteína que se silencia. Para nuestro conocimiento es la primera vez que se informa la eliminación del transcripto de DIM 1 y el efecto sobre el fenotipo en larvas de *H. contortus*.

En *C. elegans* DIM 1 resulta una proteína vital (Rogalski et al., 2003). La inmunización de animales con una vacuna de ADN de DIM 1 redujo el conteo fecal de huevos y la carga parasitaria (R. Yan et al., 2013). En el presente trabajo la vacunación con un péptido que contenía un epítipo de DIM 1 disminuyó el conteo fecal de huevos y el número de nematodos en el abomaso.

### **4.3.2 Conclusiones**

El mapeo en una biblioteca de fagos con sueros de ovinos inmunoneutralizantes contra *H. contortus* permiten la identificación de proteínas vitales del parásito, que lo convierte en una herramienta para dirigir hacia nuevos blancos en el control del nematodo.

### **4.3.3 Recomendaciones**

- ✓ Evaluar la respuesta celular contra *H. contortus* y su relación con la respuesta mediada por anticuerpos.

- ✓ Identificar otros genes vitales para *H. contortus* a través del silenciamiento.
- ✓ Diseñar péptidos que combinen epítomos para la búsqueda de una vacuna para el control de *H. contortus*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero-Camelo, A., Valencia, E., Rodríguez, A. A., & Randel, P. F. (2009). FAMACHA© as a tool to detect anemia in meat goats in Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 93(1-2), 61-68.
- Acosta García, G. S. (2022). *Tratamientos homeopáticos como alternativa para el control de parásitos Gastrointestinales en bovinos*. BABAHOYO: UTB, 2022.
- Adhikari, K., Rana, H. B., Kaphle, K., Khanal, T., & Raut, R. (2017). Prevalence of *Haemonchus contortus* in Goats of Western Chitwan of Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(3), 321-325.
- Agriculture, G. B. M. o. (1986). *Manual of veterinary parasitological laboratory techniques* (Vol. 418): HM Stationery Office.
- Akinkuotu, O., Akinkuotu, A., & Oseni, O. (2016). Prevalence of cryptosporidium infection in a rabbitory in Abeokuta, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 37(4), 243-246.
- Al-Jbory, W. A. H., & Al-Samarai, F. R. (2016). Validation of FAMACHA [C] system for detecting anemic sheep in some regions of Baghdad, Iraq. *Advances in Environmental Biology*, 10(5), 186-192.

- Alba-Hurtado, F., & Muñoz-Guzmán, M. A. (2012). Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *BioMed research international*, 2013.
- Aleyasin, H., Karuppagounder, S. S., Kumar, A., Sleiman, S., Basso, M., Ma, T., . . . Langley, B. (2015). Antihelminthic benzimidazoles are novel HIF activators that prevent oxidative neuronal death via binding to tubulin. *Antioxidants & redox signaling*, 22(2), 121-134.
- Almukadi, H. S., Hanada, T., & Chishti, A. H. (2017). Phage Display cDNA Screens Reveal a Specific Region of *Plasmodium falciparum* Glutamic Acid-rich Protein that Binds to Human Red Blood Cells. A Functional Role in Malaria Pathogenesis. *The FASEB Journal*, 31(1 Supplement), 1002.1004-1002.1004.
- Amaradasa, B. S., Lane, R. A., & Manage, A. (2010). Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. *Veterinary Parasitology*, 170(1-2), 78-87.
- Amarante, A. F. (2014). Sustainable worm control practices in South America. *Small Ruminant Research*, 118(1), 56-62.
- Ambroggio X, Jiang L, Aebig J, Obiakor H, Lukszo J, Narum D. 2013. The epitope of monoclonal antibodies blocking erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* map to the dimerization and receptor glycan binding sites of EBA-175. *PloS One* 8(2): e56326. doi: 10.1371/journal.pone.-0056326

- Anandanarayanan, A., Raina, O. K., Lalrinkima, H., Rialch, A., Sankar, M., & Varghese, A. (2017). RNA interference in *Fasciola gigantica*: Establishing and optimization of experimental RNAi in the newly excysted juveniles of the fluke. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(12), e0006109.
- Arafa, W. M., Holman, P. J., & Craig, T. M. (2017). Genotypic and phenotypic evaluation for benzimidazole resistance or susceptibility in *Haemonchus contortus* isolates. *Parasitology research*, *116*(2), 797-807.
- Argandoña Pereda, R. I., & Cusi Fernández, E. (2020). Conocimiento sobre el empleo de *Chenopodium ambrosoides* (paico) en la parasitosis intestinal en pobladores del asentamiento humano “monitor huáscar” san juan de lurigancho-2019.
- Arece-García, J., López-Leyva, Y., Olmedo-Juárez, A., Ramírez-Vargas, G., Reyes-Guerrero, D., Arellano, M. E. L., . . . González-Garduño, R. (2017). First report of multiple anthelmintic resistance in goat farm in Cuba. *Helminthologia*, *54*(4), 358-362.
- Arece, J., & López, Y. (2013). Validación del método FAMACHA© en la detección de anemia en ovejas Pelibuey en Cuba. *Pastos y Forrajes*, *36*(4), 479-484.
- Arece, J., Mahieu, M., Archimède, H., Aumont, G., Fernández, M., González, E., . . . Menéndez-Buxadera, A. (2004). Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of

gastrointestinal nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*, 54(1), 61-67.

Arnon, R., Tarrab-Hazdai, R., & Steward, M. (2000). A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology*, 101(4), 555-562.

Arsenopoulos, K., Symeonidou, I., & Papadopoulos, E. (2017). Immune and other factors modulating host resistance against gastrointestinal nematode parasites in sheep. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(2), 131-144.

Assana E, Gauci CG, Kyngdon CY, Zoli AP, Dorny P, Geerts S, Lightowers MW. 2010. Antibody responses to the host-protective *Taenia solium* oncosphere protein TSOL18 in pigs are directed against conformational epitopes. *Parasite Immunol* 32: 399-405. doi: 10.1111/j.13653024.2009.01197.x

Babayani, N. D., van Wyk, J. A., & Morgan, E. R. (2016). An elaborated SIR model for haemonchosis in sheep in South Africa under a targeted selective anthelmintic treatment regime. *Preventive veterinary medicine*, 134, 160-169.

Bachaya, H. A., Iqbal, Z., Jabbar, A., & Ali, R. (2006). Coping with loss of livestock.

Bagasra, O., & Prilliman, K. R. (2004). RNA interference: the molecular immune system. *Journal of molecular histology*, 35(6), 545-553.

- Balic, A., Cunningham, C., & Meeusen, E. (2006). Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite immunology*, 28(3), 107-115.
- Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., & Prichard, R. K. (2013). Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitology international*, 62(5), 464-470.
- Bassetto, C., & Amarante, A. (2015). Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *Journal of helminthology*, 89(5), 517-525.
- Bassetto, C., Silva, M., Newlands, G., Smith, W., Júnior, J. R., Martins, C. L., & Amarante, A. F. T. d. (2014). Vaccination of grazing calves with antigens from the intestinal membranes of *Haemonchus contortus*: effects against natural challenge with *Haemonchus placei* and *Haemonchus similis*. *International journal for parasitology*, 44(10), 697-702.
- Bassetto, C. C. (2015). Proteção de ovinos e bovinos contra haemonchose após imunização com antígenos oriundos da membrana intestinal de *Haemonchus contortus*.
- Bastos, L. M., Macêdo Jr, A. G., Silva, M. V., Santiago, F. M., Ramos, E. L., Santos, F. A., . . . Mineo, J. R. (2016). Toxoplasma gondii-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes from GRA2 protein are able to enhance mice survival in a model of experimental toxoplasmosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 59.

- Besier, B., Lyon, J., Michael, D., Newlands, G., & Smith, D. (2012). *Towards a commercial vaccine against Haemonchus contortus-a field trial in Western Australia*. Paper presented at the Proc. Australian Sheep Vet Conf.
- Besier, R., Kahn, L., Sargison, N., & Van Wyk, J. (2016a). Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 181-238): Elsevier.
- Besier, R., Kahn, L., Sargison, N., & Van Wyk, J. (2016b). The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 95-143): Elsevier.
- Bethony, J., Loukas, A., Smout, M., Brooker, S., Mendez, S., Plieskatt, J., . . . Wang, Y. (2005). Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. *The FASEB Journal*, 19(12), 1743-1745.
- Bharadwaj, R., Arya, R., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, A. (2017). EhRho1 regulates plasma membrane blebbing through PI3 kinase in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*.
- Bishop-Hurley, S. L., Strachan, K. A., & Sutherland, I. A. (2010). The application of phage-displayed peptide libraries to ligand detection in eggs and larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 173-177.

- Bishop, S., & Morris, C. (2007). Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 70(1), 48-59.
- Blackhall, W. J., Pouliot, J.-F., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (1998). *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin-and moxidectin-selected strains. *Experimental parasitology*, 90(1), 42-48.
- Bosco, A. (2014). The coprological diagnosis of gastrointestinal nematode infections in small ruminants.
- Bowman, D. D. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians-E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Brettmann, E. A., Shaik, J. S., Zangger, H., Lye, L.-F., Kuhlmann, F. M., Akopyants, N. S., . . . Ronet, C. (2016). Tilting the balance between RNA interference and replication eradicates *Leishmania RNA virus 1* and mitigates the inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 11998-12005.
- Britton, C., Roberts, B., & Marks, N. (2016). Functional genomics tools for *Haemonchus contortus* and lessons from other helminths *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 599-623): Elsevier.
- Britton, C., Samarasinghe, B., & Knox, D. P. (2012). Ups and downs of RNA interference in parasitic nematodes. *Experimental parasitology*, 132(1), 56-61.

- Cachat, E., Newlands, G., Ekoja, S., McAllister, H., & Smith, W. (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite immunology*, 32(6), 414-419.
- Campbell, W., Fisher, M., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., & Jacob, T. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *science*, 221(4613), 823-828.
- Cintra, M. C. R., Ollhoff, R. D., & Sotomaior, C. S. (2018). Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. *Veterinary Parasitology*.
- Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P. N., Mant, T., . . . Tranter, E. (2013). Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 369(9), 819-829.
- Coles, G., Bauer, C., Borgsteede, F., Geerts, S., Klei, T., Taylor, M., & Waller, P. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2), 35-44.
- Cooper, G. M., Hausman R.E. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (Seventh Edition ed.): Sinauer Associates, Inc.

- Corley, M., & Jarmon, A. (2012). Interleukin 13 as a biomarker for parasite resistance in goats naturally exposed to *Haemonchus contortus*. *Journal of Agricultural Science*, 4(7), 31.
- Cotter, J., Van Burgel, A., & Besier, R. (2015). Anthelmintic resistance in nematodes of beef cattle in south-west Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4), 276-284.
- Crook, E., O'Brien, D., Howell, S., Storey, B., Whitley, N., Burke, J., & Kaplan, R. (2016). Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of in vivo and in vitro detection methods. *Small Ruminant Research*, 143, 89-96.
- Chagas, A. M., Junior, F. D. S., Pacheco, A., da Cunha, A. B., dos Santos Cruz, J., Scofield, A., & Góes-Cavalcante, G. (2016). F200Y polymorphism of the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene in *Haemonchus contortus* and sheep flock management practices related to anthelmintic resistance in eastern Amazon. *Veterinary Parasitology*, 226, 104-108.
- Chandra, S., Prasad, A., Yadav, N., Latchumikanthan, A., Rakesh, R., Praveen, K., . . . Sankar, M. (2015). Status of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* of goats from different geographic regions of Uttar Pradesh, India. *Veterinary Parasitology*, 208(3-4), 263-267.
- Chaparro, J. J., Villar, D., Zapata, J. D., López, S., Howell, S. B., López, A., & Storey, B. E. (2017). Multi-drug resistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in Antioquia,

Colombia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 29-34.

Chavez-Pena, C., & Kamen, A. A. (2018). RNA interference technology to improve the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology advances*.

Chuang, C., Xing-Wang, C., Jian-Zhong, D., & Tiao-Ying, L. (2017). Evaluation of ELISA kit for detection of serum specific IgG antibodies against *Taenia solium* in diagnosis of human cysticercosis. *Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi= Chinese journal of schistosomiasis control*, 29(2), 228-230.

da Silva, D., de Menezes, B., Bettencourt, A., Frantz, A., Corrêa, M., Ruzskowski, G., . . . Hirschmann, L. (2017). FAMACHA® method as a tool to check the parasitic infestation caused by *Haemonchus* spp. in sheep. *PUBVET*, 11(10), 1015-1211.

de Matos, A. F. I. M., Nobre, C. O. R., Monteiro, J. P., Bevilaqua, C. M. L., Smith, W. D., & Teixeira, M. (2017). Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. *Small Ruminant Research*, 151, 1-4.

Dell'Oca, N., Basika, T., Corvo, I., Castillo, E., Brindley, P. J., Rinaldi, G., & Tort, J. F. (2014). RNA interference in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles: Long dsRNA induces more persistent silencing than siRNA. *Molecular and biochemical parasitology*, 197(1-2), 28-35.

- Deplazes, P., Eckert, J., Pawlowski, Z., Machowska, L. & Gottstein, B. 1991. An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* copro-antigens in humans. *Transactions of the Royal Soc. Tropical Medicine and Hygiene* 85:391
- Díaz, A., Arenal, A., França, J., Gomes, A. L., Machado, M. A., Sossanovicz, M., . . . Molento, M. (2016). Optimization of an immunoenzymatic (ELISA) assay for detecting ovine antibodies against *Haemonchus contortus*. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4).
- Ding, H., Shi, H., Shi, Y., Guo, X., Zheng, X., Chen, X., . . . Du, A. (2017). Characterization and function analysis of a novel gene, Hc-maoc-1, in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Parasites & vectors*, 10(1), 67.
- dos Santos, J. M. L., Vasconcelos, J. F., Frota, G. A., Ribeiro, W. L. C., André, W. P. P., da Silva Vieira, L., . . . Monteiro, J. P. (2017). *Haemonchus contortus*  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 248, 90-95.
- Douch, P., Green, R., Morris, C., McEwan, J., & Windon, R. (1996). Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *International journal for parasitology*, 26(8-9), 899-911.
- Douch, P., Morum, P., & Rabel, B. (1996). Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal

tissues and isolated mucosal mast cells. *International journal for parasitology*, 26(2), 205-211.

Drudge, J., Szanto, J., Wyant, Z., & Elam, G. (1964). Field studies on parasite control in sheep: comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. *American journal of veterinary research*, 25(108), 1512-1518.

Dutta, B., Konch, P., Rahman, T., Upadhyaya, T., Pathak, D., Tamuli, S., . . . Begum, S. (2017). Occurrence and pathology of *Haemonchus contortus* infection in Goats. *J. of Ent*, 1284-1287.

Edwards, E. E., Garner, B. C., Williamson, L. H., Storey, B. E., & Sakamoto, K. (2016). Pathology of *Haemonchus contortus* in New World camelids in the southeastern United States: a retrospective review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(2), 105-109.

El-Badry, A. 2009. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. *J. Egyptian Soc. Parasitology* 39:757

Elgun, G. & Koltas, I.S. 2011. Investigation of *Crypto sporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitology Res.* 108:395

Ellis, S., Newlands, G., Nisbet, A., & Matthews, J. (2012). Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. *Parasite immunology*, 34(5), 285-295.

- Fawzi, E. M., González-Sánchez, M. E., Corral, M. J., Cuquerella, M., & Alunda, J. M. (2014). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *International Journal for Parasitology*, 44(7), 429-436. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.02.009>
- Felippelli, G., Lopes, W. D. Z., Cruz, B. C., Teixeira, W. F. P., Maciel, W. G., Favero, F. C., . . . Gomes, L. V. C. (2014). Nematode resistance to ivermectin (630 and 700 µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil. *Parasitology international*, 63(6), 835-840.
- Feng, J., Xu, R., Zhang, X., Han, Y., He, C., Lu, C., . . . Jin, Y. (2017). A candidate recombinant antigen for diagnosis of schistosomiasis japonica in domestic animals. *Veterinary Parasitology*, 243, 242-247.
- Fiel, C., & Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes.: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control.
- Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 122(1), 17-20.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806.

- Fontenot, M., Miller, J., Peña, M., Larsen, M., & Gillespie, A. (2003). Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydozoospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, 118(3-4), 203-213.
- Fortes FS, Molento MB. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(12): 1391-1402.
- Gadahi, J. A., Ehsan, M., Wang, S., Zhang, Z., Yan, R., Song, X., . . . Li, X. (2017). Recombinant protein of *Haemonchus contortus* small GTPase ADP-ribosylation factor 1 (HcARF1) modulate the cell mediated immune response in vitro. *Oncotarget*, 8(68), 112211.
- Gao, J., Wang, Y., Liu, Z., & Wang, Z. (2010). Phage display and its application in vaccine design. *Annals of microbiology*, 60(1), 13-19.
- García-Coiradas, L., Angulo-Cubillán, F., Valladares, B., Martínez, E., de la Fuente, C., Alunda, J. M., & Cuquerella, M. (2010). Immunization against lamb haemonchosis with a recombinant somatic antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Veterinary medicine international*, 2010.
- García, J. A., Rodríguez-Diego, J. G., Torres-Hernández, G., Mahieu, M., García, E. G., & González-Garduño, R. (2007). The epizootiology of ovine gastrointestinal strongyles in the

province of Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*, 72(2), 119-126.

Gasser, R., & Samson-Himmelstjerna, G. v. (2016). *Haemonchus contortus and haemonchosis—past, present and future trends* (Vol. 93): Academic Press.

Gasser, R., Schwarz, E., Korhonen, P., & Young, N. (2016). Understanding *Haemonchus contortus* better through genomics and transcriptomics *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 519-567): Elsevier.

Gava, S. G., Tavares, N. C., de Matos Salim, A. C., de Araújo, F. M. G., Oliveira, G., & Mourão, M. M. (2017). *Schistosoma mansoni*: Off-target analyses using nonspecific double-stranded RNAs as control for RNAi experiments in schistosomula. *Experimental parasitology*, 177, 98-103.

Geldhof, P., De Maere, V., Vercruyse, J., & Claerebout, E. (2007). Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? *TRENDS in Parasitology*, 23(11), 527-532. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.012>

Geldhof, P., Murray, L., Couthier, A., Gilleard, J. S., McLauchlan, G., Knox, D. P., & Britton, C. (2006). Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 36(7), 801-810.

Geldhof, P., Visser, A., Clark, D., Saunders, G., Britton, C., Gilleard, J., . . . Knox, D. (2006). RNA interference in parasitic

helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology*, 134(5), 609-619.

Gieseler, K., Qadota, H., & Benian, G. M. (2005). Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle.

Gill, H., Watson, D., & Brandon, M. (1993). Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology*, 78(1), 43.

Gilleard, J., & Beech, R. (2007). Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology*, 134(8), 1133-1147.

Gilleard, J. S. (2013). *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, 140(12), 1506-1522.

Giordano, R. J., Edwards, J. K., Tuder, R. M., Arap, W., & Pasqualini, R. (2009). Combinatorial ligand-directed lung targeting. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(5), 411-415.

Gnanasekar, M., Rao, K. V., He, Y.-X., Mishra, P. K., Nutman, T. B., Kaliraj, P., & Ramaswamy, K. (2004). Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. *Infection and immunity*, 72(8), 4707-4715.

Godoy, P., Che, H., Beech, R., & Prichard, R. (2015). Characterization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16

and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics. *Molecular and biochemical parasitology*, 204(1), 11-15.

González-Miguel, J., Morchón, R., Gussoni, S., Bossetti, E., Hormaeche, M., Kramer, L. H., & Simón, F. (2014). Immunoproteomic approach for identification of *Ascaris suum* proteins recognized by pigs with porcine ascariasis. *Veterinary Parasitology*, 203(3-4), 343-348.

González-Sánchez, M. E., Cuquerella, M., & Alunda, J. M. (2018). Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PloS one*, 13(3), e0193118.

Gordon, H. M., & Whitlock, H. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the council for Scientific and Industrial Research*, 12(1), 50-52.

Grzelak, S., Moskwa, B., & Bień, J. (2018). *Trichinella britovi* muscle larvae and adult worms: stage-specific and common antigens detected by two-dimensional gel electrophoresis-based immunoblotting. *Parasites & vectors*, 11(1), 584.

Gu, Y., Li, J., Zhu, X., Yang, J., Li, Q., Liu, Z., . . . Li, Y. (2008). *Trichinella spiralis*: characterization of phage-displayed specific epitopes and their protective immunity in BALB/c mice. *Experimental parasitology*, 118(1), 66-74.

Hamad, K. K., Qadir, F. A., & Hamad, H. O. (2017). Control of antinematicidal-resistant gastrointestinal nematodes in tamed

small ruminants: achievements, trends and prospectives. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*, 29(3), 62-77.

- Han, K., Xu, L., Yan, R., Song, X., & Li, X. (2012). Vaccination of goats with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 149(3-4), 177-185.
- Hart, E. H., Morphey, R. M., Bartley, D. J., Millares, P., Wolf, B. T., Brophy, P. M., & Hamilton, J. V. (2012). The soluble proteome phenotypes of ivermectin resistant and ivermectin susceptible *Haemonchus contortus* females compared. *Veterinary Parasitology*, 190(1), 104-113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.009>
- Heckler, R., Almeida, G., Santos, L., Borges, D., Neves, J., Onizuka, M., & Borges, F. (2014). P-gp modulating drugs greatly potentiate the in vitro effect of ivermectin against resistant larvae of *Haemonchus placei*. *Veterinary Parasitology*, 205(3-4), 638-645.
- Hein, W., Pernthaner, A., Piedrafita, D., & Meeusen, E. (2010). Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite immunology*, 32(8), 541-548.
- Hoberg, E. P., & Zarlenga, D. (2016). Evolution and biogeography of *Haemonchus contortus*: linking faunal dynamics in space and time *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 1-30): Elsevier.

- Höglund, J., Ljungstrom, S., Melville, L., & Skuce, P. J. (2017). Comparison of four diagnostic methods for detection and relative quantification of *Haemonchus contortus* eggs in faeces samples. *Frontiers in veterinary science*, 4, 239.
- Hong-Geller, E., & N Micheva-Viteva, S. (2010). Functional gene discovery using RNA interference-based genomic screens to combat pathogen infection. *Current drug discovery technologies*, 7(2), 86-94.
- Howell, A., Baylis, M., Smith, R., Pinchbeck, G., & Williams, D. (2015). Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 121(1-2), 41-48.
- Iglesias, L. E., Sallovitz, J. M., Saumell, C. A., Sagüés, M. F., & Lifschitz, A. L. (2016). *Transferencia de ivermectina desde masas fecales bovinas al suelo subyacente y vegetación: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires*.
- Iliev, P., Prelezov, P., Ivanov, A., Kirkova, Z., & Tonev, A. (2017). Clinical study of acute haemonchosis in lambs. *Trakia Journal of Sciences*, 15(1), 75.
- Issa, Z., Grant, W., Stasiuk, S., & Shoemaker, C. (2005). Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. *International journal for parasitology*, 35(9), 935-940.

- Jansen, F., Dorny, P., Berkvens, D., Van Hul, A., Van den Broeck, N., Makay, C., . . . Gabriël, S. (2016). Assessment of the repeatability and border-plate effects of the B158/B60 enzyme-linked-immunosorbent assay for the detection of circulating antigens (Ag-ELISA) of *Taenia saginata*. *Veterinary Parasitology*, 227, 69-72.
- Javanbakht, J., Hosseini, E., Mousavi, S., Hassan, M. A., Kazeroni, S. S., Khaki, F., . . . Alimohammadi, S. (2014). Evaluation of two Iranian domestic ovine breeds for their pathological findings to gastrointestinal infection of *Haemonchus contortus*. *Journal of parasitic diseases*, 38(3), 311-316.
- Johnson, M., Behnke, J. & Coles, G. 1996. Detection of gastrointestinal nematodes by a coproantigen capture ELISA. *Research in Vet. Sci.* 60:7
- Jurasek, M. E., Bishop-Stewart, J. K., Storey, B. E., Kaplan, R. M., & Kent, M. L. (2010). Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. *Veterinary Parasitology*, 169(1-2), 209-213.
- Kandil, O. M., Abdelrahman, K. A., Shalaby, H. A., Hendawy, S. H., El Ezz, N. M. A., Nassar, S. A., & Miller, J. E. (2017). Evaluation of crude larval protein and recombinant somatic protein 26/23 (rHcp26/23) immunization against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary world*, 10(7), 758.

- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 70-78.
- Kearney, P., Murray, P., Hoy, J., Hohenhaus, M., & Kotze, A. (2016). The ‘Toolbox’ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’s in and what’s out. *Veterinary Parasitology*, 220, 93-107.
- Kehoe, J. W., & Kay, B. K. (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical reviews*, 105(11), 4056-4072.
- Khalafalla, R.E., Elseify, M.A. & Elbahy, N.M. 2011. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in Northern region of Nile Delta, Egypt. *Parasitology Res.* 108:337
- Kelly, G., Kahn, L., & Walkden-Brown, S. (2010). Integrated parasite management for sheep reduces the effects of gastrointestinal nematodes on the Northern Tablelands of New South Wales. *Animal Production Science*, 50(12), 1043-1052.
- Khalil, M. I., Foda, B. M., Suresh, S., & Singh, U. (2016). Technical advances in trigger-induced RNA interference gene silencing in the parasite *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology*, 46(3), 205-212.
- Kleshchenko, Y. E., Zhigunova, A., Dalin, M., & Melnikov, V. (2017). Peptides Selected Using Phage Library Variants,

Effectively Inhibit *Trypanosoma cruzi* Infection. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 163(3), 361-364.

- Knight, A. J., & Behm, C. A. (2012). Minireview: the role of the vacuolar ATPase in nematodes. *Experimental parasitology*, 132(1), 47-55.
- Knox, D. P., & Smith, W. D. (2001). Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary Parasitology*, 100(1-2), 21-32. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00480-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00480-0)
- Kotze, A., & Prichard, R. (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 397-428): Elsevier.
- Kotze, A. C., & Bagnall, N. H. (2006). RNA interference in *Haemonchus contortus*: suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms in vitro. *Molecular and biochemical parasitology*, 145(1), 101-110.
- Kotze, A. C., Cowling, K., Bagnall, N. H., Hines, B. M., Ruffell, A. P., Hunt, P. W., & Coleman, G. T. (2012). Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 92-97.
- Kotze, A. C., Hunt, P. W., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R. J., Sager, H., . . . Jex, A. R. (2014). Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to

the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 164-184.

- Kumar, B., Manjunathachar, H., & Ghosh, S. (2015). Identification of Cathepsin L gene from *Hyalomma anatolicum* and its comparative sequence analysis with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and other hard ticks. *Journal of Veterinary Parasitology*, 29(1), 10-19.
- Kumar, M., Ranjan, T., Natra, N., & Shamim, M. (2017). RNA Interference and Virus-Induced Gene Silencing in Plants *Plant Biotechnology, Volume 2* (pp. 93-120): Apple Academic Press.
- Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Van Dijk, M., & Roos, M. H. (1995).  $\beta$ -Tubulin Genes from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus* Modulate Drug Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, 246(4), 500-510.
- Lacroux C, Nguyen THC, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud JP, Gruner L, et al. 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res* 37: 607-622. doi: 10.1051/vetres:2006022
- Laing, R., Gillan, V., & Devaney, E. (2017). Ivermectin—Old Drug, New Tricks? *TRENDS in Parasitology*, 33(6), 463-472.

- Laing, R., Martinelli, A., Tracey, A., Holroyd, N., Gilleard, J., & Cotton, J. (2016). *Haemonchus contortus*: genome structure, organization and comparative genomics *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 569-598): Elsevier.
- Lamb, J., Elliott, T., Chambers, M., & Chick, B. (2017). Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Veterinary Parasitology*, 241, 48-51.
- Lambert, S. M., Nishi, S. M., Mendonça, L. R., da Silva Souza, B. M. P., da Silva Julião, F., da Silva Gusmão, P., & de Almeida, M. A. O. (2017). Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 8, 28-34.
- Lane, J., Jubb, T., Shepherd, R., Webb-Ware, J., & Fordyce, G. (2015). Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Final Report: Meat & Livestock Australia L.
- Lashari, M. H., Tasawar, Z., Akhtar, M. S., Chaudhary, M. S., & Sial, N. (2015). Prevalence of *Haemonchus contortus* in local goats of DG Khan. *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 4(5), 190-196.
- Leathwick, D., & Miller, C. (2013). Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 293-300.

- Leathwick, J., Moilanen, A., Ferrier, S., & Julian, K. (2010). Complementarity-based conservation prioritization using a community classification, and its application to riverine ecosystems. *Biological Conservation*, 143(4), 984-991.
- Lee, D. L. (2002). Life cycles. *The biology of nematodes*, 61-72.
- Lei, W.-Q., Lok, J. B., Yuan, W., Zhang, Y.-Z., Stoltzfus, J. D., Gasser, R. B., . . . Zhao, J.-L. (2017). Structural and developmental expression of Ss-riok-2, an RIO protein kinase encoding gene of *Strongyloides stercoralis*. *Scientific reports*, 7(1), 8693.
- Li, Y., Yuan, C., Wang, L., Lu, M., Wang, Y., Wen, Y., . . . Li, X. (2016). Transmembrane protein 147 (TMEM147): another partner protein of *Haemonchus contortus* galectin on the goat peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Parasites & vectors*, 9(1), 355.
- Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., . . . Lanusse, C. (2010). Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), 291-298.
- Lightowlers, M. W., Colebrook, A. L., Gauci, C. G., Gauci, S. M., Kyngdon, C. T., Monkhouse, J. L., . . . Sato, C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology*, 115(2), 83-123. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00202-4)

- Link, J. S., Alban, S. M., Soccol, C. R., Pereira, G. V. M., & Thomaz Soccol, V. (2017). Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniosis Diagnosis. *Journal of immunology research*, 2017.
- Liu, Y., Li, F., Liu, W., Dai, R., Tan, Y., He, D., Lin, R. & Zhu, X. 2009. Prevalence of helminths in water buffaloes in Hunan Province, China. *Tropical Animal Health and Production* 41:543
- Liu, Y., Brindley, P. J., Zeng, Q., Li, Y., Zhou, J., Chen, Y., . . . Cai, L. (2011). Identification of phage display peptides with affinity for the tegument of *Schistosoma japonicum* schistosomula. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 180(2), 86-98.
- Long, S. R., Wang, Z. Q., Liu, R. D., Liu, L. N., Li, L. G., Jiang, P., . . . Cui, J. (2014). Molecular identification of *Trichinella spiralis* nudix hydrolase and its induced protective immunity against trichinellosis in BALB/c mice. *Parasites & vectors*, 7(1), 600. doi: 10.1186/s13071-014-0600-9
- Luo, X., Shi, X., Yuan, C., Ai, M., Ge, C., Hu, M., . . . Yang, X. (2017). Genome-wide SNP analysis using 2b-RAD sequencing identifies the candidate genes putatively associated with resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Parasites & vectors*, 10(1), 31.
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2010). A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *International journal for parasitology*, 40(13), 1477-1481.

- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012). Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 33(8), 432-441.
- Lyon, J. (2014). Development and production of a vaccine against *Haemonchus contortus* in sheep. Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, Australia. Retrieved 23032018, 2018, from <https://www.agric.wa.gov.au/livestock-research-development/development-and-production-barbervax-vaccine-against-barbers-pole>
- Ma, G. X., Zhou, R. Q., Song, Z. H., Zhu, H. H., Zhou, Z. Y., & Zeng, Y. Q. (2015). Molecular mechanism of serine/threonine protein phosphatase 1 (PP1 $\alpha$ –PP1 $\gamma$ ) in spermatogenesis of *Toxocara canis*. *Acta tropica*, 149, 148-154.
- MacKinnon, K., Bowdridge, S., Kanevsky-Mullarky, I., Zajac, A., & Notter, D. (2015). Gene expression profiles of hair and wool sheep reveal importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance to *Haemonchus contortus*. *Journal of animal science*, 93(5), 2074-2082.
- Maqbool, I., Malla, B. A., Mohmad, A., Dutta, N., Manzoor, N., Kushwaha, B., . . . Para, I. A. (2018). Vaccination against *Haemonchus contortus* in Small Ruminants: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(11), 2878-2895.
- Marinets, A., Zhang, T., Guillén, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., . . . Duchêne, M. (1997). Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed

against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1557-1565.

Marr, E., Sargison, N., Nisbet, A., & Burgess, S. (2014). RNA interference for the identification of ectoparasite vaccine candidates. *Parasite immunology*, 36(11), 616-626.

Martín, S., Molina, J., Hernández, Y., Ferrer, O., Muñoz, M. C., López, A., . . . Ruiz, A. (2015). Influence of immunoprotection on genetic variability of cysteine proteinases from *Haemonchus contortus* adult worms. *International journal for parasitology*, 45(13), 831-840.

Maule, A. G., McVeigh, P., Dalzell, J. J., Atkinson, L., Mousley, A., & Marks, N. J. (2011). An eye on RNAi in nematode parasites. *TRENDS in Parasitology*, 27(11), 505-513.

McCoy, C. J., Warnock, N. D., Atkinson, L. E., Atcheson, E., Martin, R. J., Robertson, A. P., . . . Mousley, A. (2015). RNA interference in adult *Ascaris suum*—an opportunity for the development of a functional genomics platform that supports organism-, tissue-and cell-based biology in a nematode parasite. *International journal for parasitology*, 45(11), 673-678.

McKellar, Q. A., & Jackson, F. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *TRENDS in Parasitology*, 20(10), 456-461.

- McLeod, R. (2004). Economic impact of worm infections in small ruminants in South East Asia, India and Australia. *Worm control for small ruminants in tropical Asia*, 23.
- Medina-Pérez, P., Ojeda-Robertos, N., Reyes-García, M., Cámara-Sarmiento, R., & Torres-Acosta, J. (2015). Evaluation of a targeted selective treatment scheme to control gastrointestinal nematodes of hair sheep under hot humid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 127, 86-91.
- Medina, O. (2019). *Haemonchosis, fasciolosis y paramfistomosis: prevalencia y factores de riesgo en pequeños rumiantes de la provincia Las Tunas*. (Tesis de Maestría), Universidad de Camagüey, Camagüey.
- Meier, L., Torgerson, P. R., & Hertzberg, H. (2016). Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Veterinary Parasitology*, 229, 15-21.
- Melzer, H., Fortugno, P., Mansouri, E., Felici, F., Marinets, A., Wiedermann, G., . . . Duchêne, M. (2002). Antigenicity and immunogenicity of phage library-selected peptide mimics of the major surface proteophosphoglycan antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasite immunology*, 24(6), 321-328.
- Miller, C., Waghorn, T., Leathwick, D., Candy, P., Oliver, A. B., & Watson, T. (2012). The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 376-381.

- Miller, H., Knight, P., & Pemberton, A. (2006). Mucus; Modulation By The The Response To Enhance An Innate Defensive Barrier Against Gut Nematodes. *Parasite immunology*, 28(6), 259-262.
- Misra, S., Gupta, J., & Misra-Bhattacharya, S. (2017). RNA interference mediated knockdown of *Brugia malayi* UDP-Galactopyranose mutase severely affects parasite viability, embryogenesis and in vivo development of infective larvae. *Parasites & vectors*, 10(1), 34.
- Mohammed, K., Abba, Y., Ramli, N. S. B., Marimuthu, M., Omar, M. A., Abdullah, F. F. J., . . . Lila, M. A. M. (2016). The use of FAMACHA in estimation of gastrointestinal nematodes and total worm burden in Damara and Barbados Blackbelly cross sheep. *Tropical animal health and production*, 48(5), 1013-1020.
- Mohandas, N., Young, N. D., Jabbar, A., Korhonen, P. K., Koehler, A. V., Hall, R. S., . . . Gasser, R. B. (2016). The complement of family M1 aminopeptidases of *Haemonchus contortus*—Biotechnological implications. *Biotechnology advances*, 34(2), 65-76.
- Molento, M. B. (2009). Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, 163(3), 229-234.
- Molina, J., Martín, S., Hernández, Y., González, J., Ferrer, O., & Ruiz, A. (2012). Immunoprotective effect of cysteine proteinase fractions from two *Haemonchus contortus* strains

adapted to sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 53-59.

Molina, J. M., Hernández, Y. I., Martín, S., Ferrer, O., Rodríguez, F., & Ruiz, A. (2018). Immune response in goats vaccinated with thiol-binding proteins from *Haemonchus contortus*. *Parasite immunology*, e12569.

Mooney, J. T., Fredericks, D., & Hearn, M. T. (2011). Use of phage display methods to identify heptapeptide sequences for use as affinity purification ‘tags’ with novel chelating ligands in immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 92-99.

Morgan, E. (2011). The influence of water on the migration of infective trichostrongyloid larvae onto grass. *Parasitology*, 138(6), 780-788.

Muleke, C. I., Yan, R., Sun, Y., Zhao, G., Xu, L., & Li, X. (2007). Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with a recombinant cysteine protease. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 95-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.11.006>

Muñoz-Caro, T., Silva, L. M., Magdowski, G., Gärtner, U., McNeilly, T. N., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2015). Leucocyte-derived extracellular trap formation significantly contributes to *Haemonchus contortus* larval entrapment. *Parasites & vectors*, 8(1), 607.

- Muñoz-Guzmán, M., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J., & Alba-Hurtado, F. (2012). Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 185(2-4), 175-180.
- Nabukenya, I., Rubaire-Akiiki, C., Olila, D., Muhangi, D., & Höglund, J. (2014). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Veterinary Parasitology*, 205(3-4), 666-675.
- Newton, S. E., Munn, E.A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematodes, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15, 116–122.
- Nickel, B., Sayasone, S., Vonghachack, Y., Odermatt, P., & Marti, H. (2015). *Schistosoma mansoni* antigen detects *Schistosoma mekongi* infection. *Acta tropica*, 141, 310-314.
- Nieuwhof, G., & Bishop, S. (2005). Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science*, 81(1), 23-29.
- Nisbet, A., Meeusen, E., González, J., & Piedrafita, D. (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development *Advances in parasitology* (Vol. 93, pp. 353-396): Elsevier.
- Nnadi, P., Kamalu, T., & Onah, D. (2009). The effect of dietary protein on the productivity of West African Dwarf (WAD)

goats infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4), 232-238.

Notter, D., Burke, J., Miller, J., & Morgan, J. (2017). Association between FAMACHA scores and fecal egg counts in Katahdin lambs. *Journal of animal science*, 95(3), 1118-1123.

O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142(1-2), 1-15.

Ojeda-Robertos, N. F., de Jesus Torres-Acosta, J. F., Aguilar-Caballero, A. J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L. A., Sandoval-Castro, C. A., . . . de Gives, P. M. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 329-335.

Oliveira, A.C., Nunes, A.P., Bern, M.E.N., Borba, M.F.S., Echevarria, F., Vaz, C.M. & Carvalho, F.I.F. 2012. Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça corriedale com marcadores RAPD. *Current Agricultural Sci. Technol.* 13

Ortíz, R. G. (2017). *Identificación de helmintos gastrointestinales zoonóticos en primates en cautiverio*. Previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista. Cevallos-Ecuador.

- Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology advances*, 28(6), 849-858.
- Pérez-Cogollo, L. C., Rodríguez-Vivas, R. I., Basto-Estrella, G. d. S., Reyes-Novelo, E., Martínez-Morales, I., Ojeda-Chi, M. M., & Favila, M. E. (2018). Toxicidad y efectos adversos de las lactonas macrocíclicas sobre los escarabajos estercoleros: una revisión. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(4), 1293-1314.
- Piedrafita, D., Meeusen, E., & Stear, M. (2017). Modulation of *Haemonchus contortus* infection by depletion of  $\hat{\text{P}}\hat{\text{I}}^+$  T cells in parasite resistant Canaria Hair Breed sheep. *Veterinary Parasitology*.
- Piedrafita, D., Preston, S., Kemp, J., de Veer, M., Sherrard, J., Kraska, T., . . . Meeusen, E. (2013). The effect of different adjuvants on immune parameters and protection following vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *PloS one*, 8(10), e78357.
- Piluzza, G., Sulas, L., & Bullitta, S. (2014). Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*, 69(1), 32-48.
- Preston, S., Beddoe, T., Walkden-Brown, S., Meeusen, E., & Piedrafita, D. (2015). Galectin-11: a novel host mediator targeting specific stages of the gastrointestinal nematode

parasite, *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 45(12), 791-796.

Prichard, R., Oxberry, M., Bounhas, Y., Sharma, S., Lubega, G., & Geary, T. (2000). *Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins from *Haemonchus contortus**. Paper presented at the American Association of Veterinary Parasitologists, Forty-fifth Annual Meeting.

Prudencio, C. R., Marra, A. O., Cardoso, R., & Goulart, L. R. (2010). Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172(1), 122-131.

Qasim, H. M., Avais, M., Durrani, A. Z., Khan, M. A., & Shahzad, A. H. (2016). Dynamic Dispersal of *Haemonchosis*, its Treatment and Effect on Blood Profile of Small Ruminants of Lodhran District, Punjab, Pakistan. *Pakistan J. Zool*, 48(3), 755-761.

Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V., & Liu, A. (2012). Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*, 417(3), 129-143.

Quispe Pérez, E. R. (2020). *Toxicidad de Ivermectina de uso veterinario expuesta a radiación solar sobre *Hyaella curvispina* (Amphypoda)*. Previa a la obtención del título de Biólogo, en la especialidad de Ecología y Recursos Naturales. Ayacucho – Perú.

- Rainbird, M., Macmillan, D., & Meeusen, E. T. (1998). Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite immunology*, 20(2), 93-103.
- Ramünke, S., Melville, L., Rinaldi, L., Hertzberg, H., de Waal, T., von Samson-Himmelstjerna, G., . . . Krücken, J. (2016). Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), 230-240.
- Rashid, S., & Irshadullah, M. (2018). Epidemiology and seasonal dynamics of adult *Haemonchus contortus* in goats of Aligarh, Uttar Pradesh, India. *Small Ruminant Research*, 161, 63-67.
- Raza, A., Kopp, S. R., Jabbar, A., & Kotze, A. C. (2015). Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and-susceptible isolates of *Haemonchus contortus* to anthelmintics in vitro. *Veterinary Parasitology*, 211(1-2), 80-88.
- Redmond, D. L., & Knox, D. P. (2004). Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine*, 22(31-32), 4252-4261. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.04.028>
- Regassa, F., Sori, T., Dhuguma, R., & Kiros, Y. (2006). Epidemiology of gastrointestinal parasites of ruminants in

Western Oromia, Ethiopia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 4(1), 51.

Rehman, Z., Deng, Q., Umair, S., Savoian, M., Knight, J., Pernthaner, A., & Simpson, H. (2016). Excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* which increase the permeability of Caco-2 cell monolayers are neutralised by antibodies from immune hosts. *Veterinary Parasitology*, 221, 104-110.

Rhaim, R. B., & Houimel, M. (2016). Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta tropica*, 159, 11-19.

Rinaldi, L. (2014). *The coprological diagnosis of gastrointestinal nematode infections in small ruminants*. Ghent University.

Rinaldi, L., Catelan, D., Musella, V., Cecconi, L., Hertzberg, H., Torgerson, P. R., . . . Coll, T. (2015). *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospatial health*, 9(2), 325-331.

Roberts, B., Antonopoulos, A., Haslam, S. M., Dicker, A. J., McNeilly, T. N., Johnston, S. L., . . . Britton, C. (2013). Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary research*, 44(1), 111.

Robinson, N. E. (2002). Protein deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5283-5288.

- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F. d. J., Fragoso Sánchez, H., . . . Garcia Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1).
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: a turning point? *Advances in parasitology* (Vol. 83, pp. 267-333): Elsevier.
- Rogalski, T. M., Gilbert, M. M., Devenport, D., Norman, K. R., & Moerman, D. G. (2003). DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. *Genetics*, 163(3), 905-915.
- Roque Cortez, C. L. (2019). Efecto del Biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (LAMARCK 1819) en Laboratorio.
- Rosa, B. A., Townsend, R., Jasmer, D. P., & Mitreva, M. (2015). Functional and phylogenetic characterization of proteins detected in various nematode intestinal compartments. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(4), 812-827.
- Rose, H., Hoar, B., Kutz, S. J., & Morgan, E. R. (2014). Exploiting parallels between livestock and wildlife: predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in

ruminants. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 209-219.

Rowe, J., Nolan, J., De Chaneet, G., Teleni, E., & Holmes, P. (1988). The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal of Nutrition*, 59(1), 125-139.

Ruiz, A., Pérez, D., Muñoz, M., Molina, J., Taubert, A., Jacobs-Lorena, M., . . . Hermosilla, C. (2015). Targeting essential *Eimeria ninakohlyakimovae* sporozoite ligands for caprine host endothelial cell invasion with a phage display peptide library. *Parasitology research*, 114(11), 4327-4331.

Russel, M., Lowman, H. B., & Clackson, T. (2004). Introduction to phage biology and phage display. *Phage Display: A practical approach*, 1-26.

Saddiqi, H. A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., & Shahzad, A. (2011). Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology research*, 109(6), 1483-1500.

Sakthivel, D., Swan, J., Preston, S., Shakif-Azam, M., Faou, P., Jiao, Y., . . . Piedrafita, D. (2017). Proteomic identification of Galectin-11 and 14 ligands from *Haemonchus contortus*. *PeerJ PrePrints*.

Salles, B. C., Costa, L. E., Alves, P. T., Dias, A. C., Vaz, E. R., Menezes-Souza, D., . . . Chávez-Fumagalli, M. A. (2017). *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay

as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 87(3), 219-225.

Samarasinghe, B., Knox, D. P., & Britton, C. (2011). Factors affecting susceptibility to RNA interference in *Haemonchus contortus* and in vivo silencing of an H11 aminopeptidase gene. *International journal for parasitology*, 41(1), 51-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.005>

Saminathan, M., Gopalakrishnan, A., Latchumikanthan, A., Milton, A., Aravind, M., Dhama, K., & Singh, R. (2015). Histopathological and parasitological study of blood-sucking *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(2), 99-108.

Sanabria-Ayala, V., Belmont, I., & Abraham, L. (2015). Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPI): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity. *Parasitology research*, 114(1), 55-64.

Santos, M. C., Xavier, J. K., Amarante, M. R. V., Bassetto, C. C., & Amarante, A. F. T. (2014). Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. *Veterinary Parasitology*, 203(1-2), 127-138. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.048>

Sargison, N., Jackson, F., & Gilleard, J. (2011). Effects of age and immune suppression of sheep on fecundity, hatching and

larval feeding of different strains of *Haemonchus contortus*.  
*The Veterinary Journal*, 189(3), 296-301.

Sevilla Miranda, J. J., & Murillo García, Y. J. (2021). *Parasitosis gastrointestinales en equinos de campo (Equus Ferus Caballus), agropecuaria el Ancla comunidad el Hatillo Acoyapa Chontales-octubre 2020*. Universidad Nacional Agraria.

Scott, I., Pomroy, W., Kenyon, P., Smith, G., Adlington, B., & Moss, A. (2013). Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), 166-171.

Schallig, H., Hornok, S., & Cornelissen, J. (1995). Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 57(4), 329-338.

Schrader, T. A., & Schrader, M. (2017). siRNA-mediated Silencing of Peroxisomal Genes in Mammalian Cells. *Peroxisomes: Methods and Protocols*, 69-79.

Shaw, R., Pfeffer, A., & Bischof, R. (2009). Ovine IgE and its role in immunological protection and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(1), 31-40.

Silva, W. W., Delfino, L. J. B., do Carmo Medeiros, M., & Silva, J. P. (2017). Multiple resistances of gastrointestinal nematodes to anthelmintic groups in cattle of semiarid of Paraíba, Brazil. *Acta Brasiliensis*, 1(2), 29-32.

- Smith, G. P., Petrenko, V.A. (1997). Phage Display. *Chem. Rev*, 97, 391-410.
- Smith, W., Newlands, G., Smith, S., Pettit, D., & Skuce, P. (2003). Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite immunology*, 25(6), 313-323.
- Smith, W. D., & Zarlenga, D. S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 347-359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.024>
- Sommerville, R. (1966). The development of *Haemonchus contortus* to the fourth stage in vitro. *The Journal of parasitology*, 127-136.
- Spracklin, G., Fields, B., Wan, G., Vijayendran, D., Wallig, A., Shukla, A., & Kennedy, S. (2017). Identification and Characterization of *Caenorhabditis elegans* RNAi Inheritance Machinery. *Genetics*, genetics. 116.198812.
- Storey, B. E., Williamson, L. H., Howell, S. B., Terrill, T. H., Berghaus, R., Vidyashankar, A. N., & Kaplan, R. M. (2017). Validation of the FAMACHA© system in South American camelids. *Veterinary Parasitology*, 243, 85-91.
- Suárez, V. H., Fondraz, M., Viñabal, A. E., & Salatin, A. O. (2014). Validación del método FAMACHA© para detectar anemia en caprinos lecheros en los valles templados del Noroeste Argentino. *Rev Med Vet (B Aires)*, 95(2), 4-11.

- Sun, G.-G., Wang, Z.-Q., Liu, C.-Y., Jiang, P., Liu, R.-D., Wen, H., . . . Cui, J. (2015). Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory–secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms. *Parasites & vectors*, 8(1), 484.
- Sutherland, I., & Scott, I. (2010). *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control*: John Wiley & Sons.
- Tak, I., Dar, J., Dar, S., Ganai, B., Chishti, M., & Ahmad, F. (2015). A comparative analysis of various antigenic proteins found in *Haemonchus contortus*—a review. *Molecular Biology*, 49(6), 789-795.
- Tang, L.-F., Yi, X.-Y., Zeng, X.-F., Wang, L.-Q., & Zhang, S.-K. (2004). *Schistosoma japonicum*: Isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 36(3), 206-210.
- Tariq, K. A. (2017). Anthelmintics and emergence of anthelmintic resistant nematodes in sheep: need of an integrated nematode management.
- Tavernor AS, Smith TS, Langford CF, Graham M, Munn EA. 1992. Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 14: 671-675. doi: 10.1111/ j.1365-3024.1992.tb00038.
- Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2007a). Parasites of poultry and gamebirds. *Veterinary Parasitology*, 3rd ed., Blackwell Publishing, Oxford, 531-533.

- Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2007b). *Veterinary Parasitology*. 3rd edn. Blackwell Publishing: UK.
- Thomas, M., & Syamala, K. (2017). SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE FAMACHA SYSTEM IN ATTAPPADY BLACK GOATS© OF KERALA. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*, 23(2), 204-207.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., & Plasterk, R. H. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 489-519.
- Toet, H., Piedrafita, D. M., & Spithill, T. W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*, 44(12), 915-927. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.011>
- Toledo-Machado, C. M., Machado de Avila, R. A., NGuyen, C., Granier, C., Bueno, L. L., Carneiro, C. M., . . . Fujiwara, R. T. (2015). Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. *BioMed research international*, 2015.
- Torres-Acosta, J., & Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77(2-3), 159-173.
- Torres-Acosta, J., Molento, M., & De Gives, P. M. (2012). Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: Is

there sufficient incentive for a greater extension effort?  
*Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 132-142.

Umair, S., Bouchet, C. L. G., Knight, J. S., Pernthaner, A., & Simpson, H. V. (2017). Molecular and biochemical characterisation and recognition by the immune host of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of the abomasal nematode parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Experimental parasitology*, 181, 40-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.07.006>

Uruburu, A., Alma, V., Quiroz Acosta, L. A., & Noguera Ortega, D. A. (2017). Application of the Famacha© method in two types of goat farming in Popayán (Cauca, Colombia). *Revista de Medicina Veterinaria*(35), 45-52.

Valladão, G., Gallani, S., & Pilarski, F. (2015). Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 38(5), 417-428.

Van Wyk, J. A., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary research*, 33(5), 509-529.

VanHoy, G., Carman, M., Habing, G., Lakritz, J., Hinds, C. A., Niehaus, A., . . . Marsh, A. E. (2018). Safety and serologic response to a *Haemonchus contortus* vaccine in alpacas. *Veterinary Parasitology*, 252, 180-186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.014>

- Vatta, A., & Lindberg, A. (2006). Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource-poor farmers in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(1), 2-8.
- Veríssimo, C. J., Niciura, S. C. M., Alberti, A. L. L., Rodrigues, C. F. C., Barbosa, C. M. P., Chiebao, D. P., . . . Margatho, L. F. F. (2012). Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 209-216.
- Vieira, L. d. S. (2005). Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Embrapa Caprinos. Documentos*.
- Vieira, L. d. S., Berne, M., Cavalcante, A., & Menezes, R. (1989). Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos e ovinos medicados com anti-helmínticos. *EMBRAPA-CNPC. Boletim de Pesquisa*.
- Villa-Mancera, A., Quiroz-Romero, H., Correa, D., Ibarra, F., Reyes-Perez, M., Reyes-Vivas, H., . . . Alonso, R. (2008). Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology*, 135(12), 1437-1445.
- Villa-Mancera, A., Reynoso-Palomar, A., Utrera-Quintana, F., & Carreón-Luna, L. (2014). Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitology research*, 113(1), 243-250.

- Viney, M., & Thompson, F. (2008). Two hypotheses to explain why RNA interference does not work in animal parasitic nematodes. *International journal for parasitology*, 38(1), 43-47.
- Wagland, B., Jones, W., Hribar, L., Bendixsen, T., & Emery, D. (1992). A new simplified assay for larval migration inhibition. *International journal for parasitology*, 22(8), 1183-1185.
- Waller, P. (2006). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 1-14.
- Waller, P., & Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed*, 22(2), 131-137.
- Wang, C., Li, F., Zhang, Z., Yang, X., Ahmad, A. A., Li, X., . . . Hu, M. (2017). Recent research progress in China on *Haemonchus contortus*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1509.
- Wang, H., Gao, Y., Gong, Y., Chen, X., Liu, C., Zhou, X., . . . Yang, H. (2007). Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of *Avibacterium paragallinarum* from a phage display peptide library. *Veterinary Microbiology*, 119(2), 231-239.

- Wang, T., He, G., Yang, G., Fei, Y., Zhang, Z., Wang, C., . . . Liu, L. (2008). Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Baylisascaris schroederi* Bs-Ag3 antigen in mice. *Vaccine*, 26(52), 6919-6924.
- Ward, M., Lyndal-Murphy, M. & Baldock, F. 1997. Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces. *Veterinary Parasitology* 73:181
- Westers, T. (2016). *Evaluating Strategies for Controlling Anthelmintic-Resistant Haemonchus contortus in Ontario Sheep Flocks*.
- Wilmsen, M. O., Silva, B. F., Bassetto, C. C., & Amarante, A. F. T. d. (2014). Gastrointestinal nematode infections in sheep raised in Botucatu, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 348-354.
- Williamson, A. L., Lustigman, S., Oksov, Y., Deumic, V., Plieskatt, J., Mendez, S., . . . Loukas, A. (2006). *Ancylostoma caninum* MTP-1, an astacin-like metalloprotease secreted by infective hookworm larvae, is involved in tissue migration. *Infection and immunity*, 74(2), 961-967.
- Williamson, S. M., Storey, B., Howell, S., Harper, K. M., Kaplan, R. M., & Wolstenholme, A. J. (2011). Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 180(2), 99-105.

- Witola, W. H., Cooks-Fagbodun, S., Ordonez, A. R., Matthews, K., Abugri, D. A., & McHugh, M. (2016). Knockdown of phosphoethanolamine transmethylase enzymes decreases viability of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 223, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.008>
- Wandra, T., Sutisna, P., Dharmawan, N., Margono, S., Sudewi, R., Suroso, T., Craig, P. & Ito, A. 2006. High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002–2004. *Transactions of the Royal Soc. Tropical Medicine and Hygiene* 100:346
- Wardhaugh KG. 2005. Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: an Australian perspective. *Environ Toxicol Chem* 24: 789-796. doi: 10.1897/03-588.1
- Wu, H.-W., Hu, X.-M., Wang, Y., Kurtis, J., Zeng, F.-J., McGarvey, S., . . . Hua, Z.-C. (2006). Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta tropica*, 99(2-3), 200-207.
- Yan, F., Xu, L., Liu, L., Yan, R., Song, X., & Li, X. (2010). Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*, 185(2), 174-179. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.021>
- Yan, R., Sun, W., Song, X., Xu, L., & Li, X. (2013). Vaccination of goats with DNA vaccine encoding Dim-1 induced partial protection against *Haemonchus contortus*: a preliminary

experimental study. *Research in Veterinary science*, 95(1), 189-199.

Yang, X., Qi, M., Zhang, Z., Gao, C., Wang, C., Lei, W., . . . Hu, M. (2017). Development and Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for the detection of *Haemonchus contortus* in goat fecal samples. *Journal of Parasitology*, 103(2), 161-167.

Yasuda, K., & Nakanishi, K. (2018). Host responses to intestinal nematodes. *International immunology*.

Yu, L., Yu, P. S., Mui, E. Y. Y., McKelvie, J. C., Pham, T. P. T., Yap, Y. W., . . . Orner, B. P. (2009). Phage display screening against a set of targets to establish peptide-based sugar mimetics and molecular docking to predict binding site. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(13), 4825-4832.

Yuan, C., Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yan, R., Xu, L., . . . Li, X. (2015). Transmembrane protein 63A is a partner protein of *Haemonchus contortus* galectin in the regulation of goat peripheral blood mononuclear cells. *Parasites & vectors*, 8(1), 211.

Yuen, M.-f., Chan, H. L.-y., Given, B., Hamilton, J., Schlupe, T., Lewis, D. L., . . . Gish, R. G. (2014). phase Ii, dose ranging study of Arc-520, a sir-na-based therapeutic, in patients with chronic hepatitis B virus infection: Ib-21. *Hepatology*, 60(6), 1280A.

- Zárate Rendón, D., Rojas Flores, J., & Segura Hong, A. (2017). Validación del método FAMACHA© para dosificación antihelmíntica selectiva en rebaños caprinos lecheros. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 150-159.
- Zawadzki, J. L., Kotze, A., Fritz, J.-A., Johnson, N., Hemsworth, J., Hines, B., & Behm, C. (2012). Silencing of essential genes by RNA interference in *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 139(5), 613-629.
- Zawadzki, J. L., Presidente, P. J., Meeusen, E. N., & De Veer, M. J. (2006). RNAi in *Haemonchus contortus*: a potential method for target validation. *TRENDS in Parasitology*, 22(11), 495-499.
- Zhao, G., Yan, R., Muleke, C. I., Sun, Y., Xu, L., & Li, X. (2012). Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *The Veterinary Journal*, 191(1), 94-100. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.023>
- Zhou, Q.-J., Yang, Y., Guo, X.-L., Duan, L.-J., Chen, X.-Q., Yan, B.-L., . . . Du, A.-F. (2014). Expression of *Caenorhabditis elegans*-expressed Trans-HPS, partial aminopeptidase H11 from *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 145(0), 87-98. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.005>

**Disminución del impacto ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos**

Masaquiza, D. A., Díaz, A., Cabezas, L. D., Herrera, G. C., Vaca, M. L., Arenal, A.

**ISBN:** 978-987-82912-2-2

---

## ACERCA DE LOS AUTORES

### DIEGO ARMANDO MASAQUIZA MOPOSITA



De profesión Ingeniero Zootecnista (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2012). Master en Ciencias con la especialidad en Producción Animal Sostenible mención bovina (Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz” – Cuba, 2014). Doctor en Ciencias Veterinarias (Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte

Loynaz” – Cuba, 2019).

Investigador del Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA - Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”) desde el año 2014 al 2019.

Investigador Agregado 2 – Acreditado de la Secretaria de Educación Superior Ciencia Tecnología e Innovación (SENESCYT) desde el año 2019. Integrante del Grupo de Investigación “Causana Yachay” de la ESPOCH desde el año 2021. Revisor de revistas de Alto Impacto como: *Journal of Apicultural Research* (2021) y de la

Revista de Investigación TALENTOS de la Universidad Estatal de Bolívar. Evaluador de proyectos, integrando el Banco de Evaluadores del FONCYT – Argentina (2022).

Dirección de proyectos de Investigación y Vinculación con la sociedad a nivel nacional y miembro de proyectos de Investigación a nivel internacional. Autor de varios artículos científicos en el área Zootécnica, publicados en revistas indexadas y de alto impacto. Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Sede Orellana desde el año 2020.

## **ARNIELIS DÍAZ HERNANDEZ**



De profesión Médico Veterinario (Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, 2002). Máster en Ciencias en Diagnóstico Veterinario (Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, 2018). Doctor en Ciencias Veterinarias (Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez

Pérez, 2019).

Investigador del Centro de Estudio para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA) desde el 2019 hasta el 2021.

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz de 2021 a 2023. Profesor del claustro del Doctorado de Salud Animal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Miembro de varios proyectos nacionales e internacionales en las áreas de parasitología y biología molecular.

## **LEONARDO DANIEL CABEZAS ANDRADE**



Ingeniero en Recursos Naturales Renovables en la Universidad Técnica del Norte y Magister en Gestión Ambiental en la Universidad Internacional SEK, fui investigador en el Grupo de Investigación de Agrobiodiversidad, Seguridad y Soberanía Alimentaria (GIASSA) para la evaluación de Sustentabilidad de la comunidad San Clemente, mediante el manejo de los recursos naturales, desde el año 2018 al 2019 y actualmente soy investigador en el Grupo Yasuní SDC de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo desde el año 2021.

Coordinador de proyecto de Vinculación a nivel institucional para el desarrollo local en la parroquia Puerto Francisco de Orellana denominado “Educación Ambiental con mención en el uso y manejo de recursos naturales en la parroquia urbana Puerto Francisco de Orellana.

Investigador del proyecto denominado “Revalorización de la cascarilla del Cacao para la elaboración de papel Kraft”. Autor de varios artículos científicos en el área Ambiental, publicados en

revistas indexadas y de alto impacto. Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Sede Orellana desde el 2021. Facilitador Ambiental en temas de gestión de Proyectos y regularizaciones ambientales desde el 2020.

## **GREYS CAROLINA HERRERA MORALES**



Formación académica en la carrera de Ingeniera en Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2017 y Magister en Sistema Integrados de Gestión en mención Seguridad Industrial, Calidad y Ambiente en la Universidad Internacional de La

Rioja, 2020.

Miembro activo de la consultora NATURE STRATEGY como técnica ambiental en el manejo de temas en relación a plantas de tratamiento de aguas, planes de manejo ambiental, evaluaciones de impactos ambientales, licencias, certificados y registro ambientales entre otros ámbitos ambientales; adicional otorgándose la certificación por la SETEC-124-CCL-61731, en prevención de riesgos laborales, 2018.

Dirección de proyectos de investigación en relación a Economía Circular y Producción Limpia. Integrante del Grupo de Investigación “Causana Yachay” de la ESPOCH, desde el año 2020. Evaluadora de proyectos de innovación ciencia y tecnología, en el HubNorte. Autor de varios artículos científicos en el área ambiental

**Disminución del impacto ambiental en el control del parásito *Haemonchus contortus* en ovinos**

Masaquiza, D. A., Díaz, A., Cabezas, L. D., Herrera, G. C., Vaca, M. L., Arenal, A.

**ISBN:** 978-987-82912-2-2

---

indexados y de alto impacto. Docente de la Escuela Superior  
Politécnica de Chimborazo – Sede Orellana desde el 2020.

## MARITZA LUCIA VACA CARDENAS



Ingeniera Zootecnista graduada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Magister en Cadenas Productivas Agroindustriales de la Universidad Nacional de Chimborazo). Aspirante Doctoral (Universidad Nacional Agraria la Molina Lima – Perú).

Investigador Señor de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Integrante del Grupo de Investigación: Conservación Y Gestión De Los Recursos Naturales Del Ecuador de la ESPOCH desde el año 2017.

Miembro fundador del Comité de Bioética para Investigación (CBIESPOCH) (2017 – 2022). Arbitro evaluador del Libro Mejoramiento Genético en pasto Janeiro (*Eriochloa polystacya*) (2021), Evaluador Externo del proyecto “Sustentabilidad de la ganadería de leche en condiciones de trópico de la Universidad Técnica de Babahoyo (2022).

Directora de proyectos de Investigación y Vinculación de trascendencia nacional e internacional nacional como: Sostenibilidad

Ambiental y Económica en base al perfil productivo y sanitario de la *Vicugna vicugna* de la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo auspiciado por el Programa de las Naciones Unidas. Autor de varios artículos científicos en el área Zootécnica y Agroindustria publicados en revistas indexadas y de alto impacto. Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

## AMILCAR ARENAL CRUZ



Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de de Camagüey, Camagüey, Cuba.

Completó su Licenciatura en Bioquímica (1992-1997) por la Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Maestría en Bioquímica, Biología Molecular (1999-2001), Facultad de Biología.

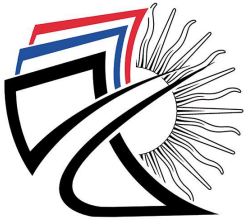
Universidad de La Habana. Obtuvo el Ph.D. en Ciencias Biológicas 2007, Facultad, Universidad de La Habana.

Se ha desempeñado como Profesor de Bioquímica, Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, actual Vicerrector de la Universidad de Camagüey. Los principales premios que ha recibido son; Año Profesor (Investigador) en el Sector de Educación Superior 2018, Joven Investigador. Academia de Ciencias de Cuba 2009, Premio Joven Investigador. Academia de Ciencias de Cuba 2005, Premio Nacional en la Concurso Técnico-científico Joven 2005, Premio Nacional en el Concurso Técnico-científico Joven 2007,

Ciencias Premio de Investigación. Academia de Ciencias de Cuba 2006. Se desempeñó como Profesor en Programas de Maestría en Producción Animal, Diagnóstico Veterinario, Manejo sostenible del territorio, Procesos Químico, Universidad de Camagüey, Bioquímica, Universidad de La Habana.

Coordinador de 4 proyectos internacionales (CAPES, Brasil; 3 VLIR, Bélgica). Consejo Editorial Revista de Producción Animal, BMC Veterinary Research, Agrisost. Asesor del Consejo Editorial, Acuicultura. Ha supervisado 28 tesis de Master en Ciencias, 6 Ph.D. tesis, tiene 10 doctorado estudiantes. Ha publicado más de 60 publicaciones en revistas de revisión por pares.





**PUERTO MADERO  
EDITORIAL**

ISBN 978-987-82912-2-2

