



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y  
Tecnología de los Alimentos

“ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN EN PEQUEÑOS RUMIANTES CON PROTEINASAS  
TIPO CISTEÍNA DE VERMES ADULTOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*:  
IMPLICACIONES EN LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO”

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Sergio Martín Martel**

Dirigida por:

**Dr. Antonio Ruiz Reyes y Dr. José Manuel Molina Caballero**

**Dr. Antonio Ruiz Reyes**

**Dr. José Manuel Molina Caballero**

**D. Sergio Martín Martel**

**Arucas, mayo 2010**

D. *Antonio Ruiz Reyes* y D. *José Manuel Molina Caballero*, Profesores Titulares del Área de Parasitología del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

**INFORMAN:**

Que D. Sergio Martín Martel, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado:

**“ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN EN PEQUEÑOS RUMIANTES CON  
PROTEINASAS TIPO CISTEÍNA DE VERMES ADULTOS DE *HAEMONCHUS  
CONTORTUS*. IMPLICACIONES EN LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL  
PARÁSITO”**

El cual consideramos cumple la normativa vigente para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Arucas, 17 de marzo de 2010

Los Directores

Dr. *Antonio Ruiz Reyes*

Dr. *José Manuel Molina Caballero*

*“Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro”.*

René Descartes

*A mis padres y hermanos.*

*ÍNDICE*

---

---

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1. HAEMONCHOSIS	5
2.1.1. ETIOLOGÍA	5
2.1.1.1. TAXONOMÍA	5
2.1.1.2. MORFOLOGÍA	7
2.1.1.3. CICLO BIOLÓGICO	11
2.1.1.3.1. Fase exógena	11
2.1.1.3.2. Fase endógena	13
2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	14
2.1.3. PATOGÉNESIS	17
2.1.4. SIGNOS CLÍNICOS	20
2.1.5. LESIONES	23
2.1.6. DIAGNÓSTICO	23
2.1.6.1. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS	23
2.1.6.2. ANÁLISIS DE LABORATORIO	24
2.1.6.3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	25
2.1.6.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	25
2.1.6.5. OTROS MÉTODOS	26
2.1.7. TRATAMIENTO	26
2.1.7.1. ANTIHELMÍNTICOS SINTÉTICOS	27
2.1.7.1.1. Benzimidazoles y probenzimidazoles	27
2.1.7.1.2. Imidazotiazoles	27
2.1.7.1.3. Lactonas macrocíclicas	28
2.1.7.1.4. Organofosforados	29
2.1.7.1.5. Derivados del amino-acetonitrilo (AADs)	29
2.1.7.2. RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS	29
2.1.7.3. PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA	31
2.1.8. PROFILAXIS Y CONTROL	33
2.1.8.1. MANEJO DEL PASTO	33
2.1.8.2. CONTROL BIOLÓGICO	34
2.1.8.3. SUPLEMENTOS NUTRICIONALES	35
2.1.8.4. INMUNOPROFILAXIS	36
2.1.8.4.1. Vacunas atenuadas	36

---

---

2.1.8.4.2. Vacunas frente a antígenos naturales	36
2.1.8.4.2.1. Antígeno E/S	37
2.1.8.4.2.2. Hc-sL3	38
2.1.8.4.2.3. Hc40	39
2.1.8.4.3. Vacunas frente a antígenos ocultos	39
2.1.8.4.3.1. H11	40
2.1.8.4.3.2. H-gal-GP	40
2.1.8.4.3.3. Proteinasas tipo cisteína	41
2.1.8.4.3.4. Otros antígenos ocultos	42
2.1.8.5. ENFOQUE GENÉTICO	43
2.1.8.6. CONTROL INTEGRADO	44
2.2. PROTEINASAS	45
2.2.1. ESTRUCTURA, TIPOS Y FUNCIÓN	45
2.2.1.1. Serina proteinasas	47
2.2.1.2. Aspártico proteinasas	47
2.2.1.3. Metaloproteinasas	48
2.2.1.4. Glutámico proteinasas	49
2.2.1.5. Treonina proteinasas	49
2.2.1.6. Proteinasas tipo cisteína	49
2.2.1.7. Proteinasas de mecanismo catalítico desconocido	51
2.2.2. PROTEINASAS EN <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	51
2.2.3. UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS PROTEINASAS	53
2.2.4. UTILIDAD INMUNOPROFILÁCTICA DE LAS PROTEINASAS	54
2.2.4.1. Utilidad inmunógena de las aspártico proteinasas	55
2.2.4.2. Utilidad inmunógena de las metaloproteinasas	56
2.2.4.3. Utilidad inmunógena de las proteinasas tipo cisteína	57
2.2.4.3.1. Utilidad inmunógena de las proteinasas tipo cisteína en <i>Haemonchus contortus</i>	58
2.3. POLIMORFISMO GENÉTICO	60
2.3.1. POLIMORFISMO GENÉTICO EN NEMATODOS	62
2.3.1.1. Implicaciones epidemiológicas y patológicas	63

---

---

2.3.1.2. Implicaciones en el diagnóstico	64
2.3.1.3. Implicaciones en el control	65
2.3.1.4. Polimorfismo en proteinasas tipo cisteína	66
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>69</b>
3.1. ANIMALES	69
3.1.1. ANIMALES DONANTES	69
3.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	69
3.2. PARÁSITOS	70
3.2.1. OBTENCIÓN, CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LARVAS 3	70
3.2.2. RECOGIDA Y PURIFICACIÓN DE VERMES ADULTOS	71
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	73
3.3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES	73
3.3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	74
3.3.3. INMUNIZACIONES	74
3.3.3.1. Obtención y preparación del antígeno	74
3.3.3.1.1. Preparación de homogeneizados	74
3.3.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas	75
3.3.3.1.3. Purificación del antígeno mediante cromatografía de afinidad	75
3.3.3.1.3.1. Preparación de la muestra	75
3.3.3.1.3.2. Preparación de la columna cromatográfica	76
a) Hidratación y estabilización de la matriz	76
b) Montaje de la columna	76
3.3.3.1.3.3. Prueba “binding”	77
3.3.3.1.3.4. Elución	77
3.3.3.1.3.5. Separación de las fracciones proteicas enriquecidas para proteinasas tipo cisteína	78
3.3.3.1.3.6. Determinación de la concentración de proteínas	78

---

---

3.3.3.2. Preparación del inmunógeno y protocolo de inmunización	79
3.3.4. INFECCIONES EXPERIMENTALES	79
3.3.5. TOMA DE MUESTRAS Y SACRIFICIO	79
3.4. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN	81
3.4.1. ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS	81
3.4.1.1. Recuentos fecales	81
3.4.1.2. Recuentos de vermes adultos	81
3.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IgGs ESPECÍFICAS EN SUERO	81
3.5. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO	83
3.5.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE VERMES	83
3.5.2. SELECCIÓN DE LOS GENES	83
3.5.3. EXTRACCIÓN DE ADN	84
3.5.4. AMPLIFICACIONES MEDIANTE PCR	85
3.5.5. SSCP ( <i>SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM</i> )	86
3.5.5.1. Preparación del soporte de la electroforesis	86
3.5.5.2. Preparación del gel de acrilamida	87
3.5.5.3. Preparación de las muestras	88
3.5.5.4. Condiciones de la electroforesis	88
3.5.5.5. Tinción de plata	88
3.5.6. SECUENCIACIÓN	89
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
3.6.1. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN	91
3.6.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO	92
3.6.3. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA	92
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>95</b>
4.1. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN	95
4.1.1. RECUENTO DE HUEVOS POR GRAMO DE HECES	95
4.1.1.1. Inmunizaciones en ovinos frente a infecciones con la cepa NA	95
4.1.1.2. Inmunizaciones en ovinos frente a infecciones con la cepa SP	96
4.1.1.3. Inmunizaciones en caprinos frente a infecciones con la cepa NA	97

---

---

---

4.1.1.4. Inmunizaciones en caprino frente a infecciones con la cepa SP	98
4.1.1.5. Animales no inmunizados	99
4.1.2. RECUENTO DE VERMES ADULTOS RECOGIDOS EN ABOMASO	100
4.1.2.1. Inmunización en ovinos frente a infecciones con las cepas NA y SP	100
4.1.2.2. Inmunizaciones en caprinos frente a infecciones con las cepas NA y SP	101
4.1.3. SEGUIMIENTO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN MEDIANTE ELISA	102
4.1.3.1. Inmunizaciones en ovinos infectados con la cepa NA	102
4.1.3.2. Inmunizaciones en caprinos infectados con la cepa SP	103
4.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO MEDIANTE SSCP	105
4.2.1. GEN GCP-7	105
4.2.1.1. Factor inmunización	106
4.2.1.2. Factor cepa	109
4.2.1.3. Factor hospedador	110
4.2.2. GEN AC-1	113
4.2.2.1. Factor inmunización	114
4.2.2.2. Factor cepa	117
4.2.2.3. Factor hospedador	117
4.2.3. GEN AC-3	119
4.2.3.1. Factor inmunización	120
4.2.3.2. Factor cepa	123
4.2.3.3. Factor hospedador	124
4.2.4. GEN AC-4	127
4.2.4.1. Factor inmunización	128
4.2.4.2. Factor cepa	131
4.2.4.3. Factor hospedador	132
4.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	134
4.3.1. GEN GCP-7	134
4.3.2. GEN AC-1	135
4.3.3. GEN AC-3	136
4.3.4. GEN AC-4	138

---

---

<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>141</b>
5.1. Aspectos generales sobre la variabilidad genética e inmunoprotección frente a proteinasas tipo cisteína de <i>Haemonchus contortus</i>	141
5.2. Diferencias intrínsecas entre cepas y variabilidad genética	144
5.3. Variabilidad genética y factor hospedador	151
5.4. Niveles de inmunoprotección conferidos por las TBSP-PBS frente a la haemonchosis	155
5.4.1. <i>Inmunizaciones homólogas</i>	157
5.4.2. <i>Inmunizaciones heterólogas o cruzadas</i>	160
5.5. Inmuprotección y variabilidad genética	163
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>173</b>
<b>7. RESUMEN</b>	<b>175</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>177</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>179</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>183</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>241</b>
11.1. FIGURAS	241
11.2. TABLAS	252

## *1. INTRODUCCIÓN*

Los nematodos gastrointestinales son los parásitos más frecuentes de los rumiantes en todo el mundo, especialmente en zonas templadas y húmedas destinadas a pastoreo, considerándose uno de los problemas más importantes en términos económicos en la producción de estas especies. Son causantes de gastroenteritis parasitarias, procesos generalmente endémicos, de curso crónico y mortalidad baja, producidos por varias especies que se localizan en el cuajar e intestino. Entre los distintos parásitos que afectan al tracto gastrointestinal del ganado ovino y caprino, *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) destaca por su amplia distribución y por su patogenicidad. El parásito adulto se localiza en abomaso y se alimenta de la sangre del hospedador, pudiendo causar anemia severa, alteraciones gástricas, edema, pérdida de peso y muerte, especialmente en animales jóvenes. Las pérdidas económicas originadas por la haemonchosis se atribuyen a la disminución de la producción, los costes de la profilaxis y control, y la muerte de los animales afectados. Los costes anuales debidos a tratamientos frente a este parásito han sido cifrados en cientos de millones de dólares en diversos países.

*H. contortus* tiene distribución mundial. En Europa se ha descrito tanto en zonas con climas templados, como puede ser Italia o España, como en zonas nórdicas de climas más fríos. En Canarias, en particular, se ha señalado como una de las principales especies involucradas en las nematodosis gastrointestinales del ganado caprino. A lo largo del continente americano se ha observado desde América del Norte (EEUU) hasta América del Sur. En países del continente africano como Nigeria o Sudáfrica, *H. contortus* también se presenta como uno de los nematodos de mayor trascendencia en la producción de los pequeños rumiantes, siendo su frecuencia muy importante también en ciertos rumiantes de vida libre. Por último, estudios llevados a cabo en distintos países asiáticos y Australia nos indican que estos continentes tampoco se encuentran exentos de esta importante enfermedad parasitaria.

El control y la profilaxis de la haemonchosis suele contemplar un conjunto de acciones que combinan los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de infección. Estas medidas deben ser diseñadas para cada zona de acuerdo con los sistemas de explotación y las condiciones climáticas. Los antihelmínticos han sido y continúan siendo por tanto una importante herramienta para su control, pero la aparición de cepas resistentes a estos productos tanto en ganado ovino como caprino, así como los problemas medioambientales y de salud alimentaria que originan sus residuos han estimulado la búsqueda de medidas para un control inmunológico de esta parasitosis.

En el caso de *H. contortus* se han realizado varios ensayos de vacunación usando antígenos naturales (ocultos o no) y recombinantes del parásito. Un grupo de

antígenos con potencial protector lo constituyen ciertas enzimas proteolíticas: las proteinasas tipo cisteína. Estas enzimas, que se han observado tanto en productos de excreción-secreción como en extractos somáticos de *H. contortus*, se ha sugerido que puedan ser diferentes según el origen geográfico de la cepa, o que incluso se pudieran expresar con distintas características en función del hospedador. La importancia de las funciones vitales que desempeñan en el parásito estas enzimas, justifica el hecho de que cualquier alteración de su actividad a través de la respuesta inmune del hospedador pueda dificultar la penetración, asentamiento y pervivencia del parásito en el mismo.

Numerosos estudios han evaluado y descrito, con distintos grados de efectividad, la capacidad inmunoprotectora de diversas fracciones de *H. contortus* con actividad proteinasa tipo cisteína. En nuestro laboratorio, en concreto, se han aislado fracciones proteicas solubles en PBS enriquecidas para proteinasas tipo cisteína con columnas de Thiol-Sepharosa, cuyo principal componente se mostró capaz de inmunizar eficazmente a caprinos frente a la haemonchosis tras un desafío con L3 del parásito, registrándose una reducción significativa tanto en el recuento de huevos en heces como en la carga parasitaria.

Teniendo en cuenta el potencial de las proteinasas tipo cisteína como posibles vacunas frente a *H. contortus*, son de interés los estudios preliminares que han revelado que estas enzimas podrían variar entre diferentes aislados geográficos. En esta línea, un estudio previo de variabilidad genética entre la cepa empleada en los ensayos de inmunización en caprinos realizados previamente en nuestro laboratorio, y una cepa ovina del mismo parásito procedente de Norteamérica, reveló la existencia de polimorfismo genético en 4 de los 5 genes codificadores de proteinasas tipo cisteína analizados, fenómeno que podría estar implicado en diferencias funcionales en dichos genes.

Dado que actualmente no disponemos de información precisa sobre el papel que juegan cada una de las enzimas codificadas por estos genes, ni sobre el papel que sistema inmune desempeña a la hora de reconocerlas y actuar frente a ellas, un estudio detallado de su variabilidad genética mediante ensayos guiados de inmunoprotección podría permitir la identificación de los alelos con mayor potencial inmunoprotector frente a esta nematodosis, o valorar los posibles riesgos asociados a la aparición de cepas resistentes a este tipo de inmunizaciones.

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales:

**Primero:** Describir el comportamiento epidemiológico de inoculaciones experimentales con dos cepas del parásito *H. contortus* de dos regiones geográficas distintas (cepa de Norteamérica o NA y cepa de Gran Canaria o SP) en hospedadores habituales (NA en ovino y SP en caprino) y no habituales (SP en ovino y NA en caprino).

**Segundo:** Analizar el valor inmunoproliférico de proteínas tipo cisteína procedentes de vermes adultos de esas dos cepas del parásito, tanto en ovino como en caprino.

### Objetivos Específicos:

1. Comparar el nivel de protección conferido mediante la inmunización con proteínas tipo cisteína en ovinos y caprinos de 6 meses, con ambas cepas del parásito (“Factor Inmunización”).
2. Valorar el poder inmunoproliférico de las proteínas tipo cisteína en inmunizaciones realizadas a distintas especies hospedadoras (ovino y caprino) (“Factor Hospedador”).
3. Valorar el poder inmunoproliférico de las proteínas tipo cisteína en inoculaciones con distintas cepas de *H. contortus* (“Factor Cepa”).

**Tercero:** Evaluar el grado de variabilidad genética utilizando un análisis de polimorfismo mediante SSCP y subsiguiente secuenciación en 4 genes que codifican proteínas tipo cisteína en *H. contortus*, en relación con la cepa del parásito, el tipo de hospedador y el proceso de inmunización.

### Objetivos Específicos:

1. Determinar la variabilidad genética entre las dos cepas utilizadas en el estudio y dentro de ellas en los cuatro genes seleccionados.
2. Valorar los cambios de frecuencia alélica en cada una de las cepas tras infecciones en hospedadores habituales y no habituales.
3. Analizar el grado de selección genética que se produce tras los diferentes ensayos de inmunización tratando de identificar los

alelos que codificarían proteínas tipo cisteína con valor inmunoproláctico frente a la haemonchosis.

4. Identificar a partir de los resultados obtenidos en los análisis de selección genética aquellos alelos que, usados en el diseño de vacunas recombinantes, podrían conferir un mayor nivel de protección en ambas cepas y ambas especies hospedadoras.

## *2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## 2.1. HAEMONCHOSIS

### 2.1.1. ETIOLOGÍA

#### 2.1.1.1. TAXONOMÍA

La haemonchosis producida por *H. contortus* en los pequeños rumiantes se incluye en un conjunto de enfermedades parasitarias que se conocen comúnmente como nematodosis gastrointestinales. Suelen ser infecciones mixtas, es decir, suelen estar producidas por diversas familias y géneros, destacando las siguientes: Trichostrongylidae (*Haemonchus*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia*, *Cooperia*); Molineidae (*Nematodirus*); Ancylostomatidae (*Bunostomum*) y Strongylidae (*Chabertia* y *Oesophagostomum*) (**Cordero del Campillo, 2000**). Dependiendo de la especie, estos vermes se localizan a distintos niveles en el aparato digestivo: cuajar (Tricostrongílicos), intestino delgado (Tricostrongílicos, Molineidos, Ancilostomátidos), e intestino grueso (Estrongílicos).

La carga parasitaria, es decir, el número de vermes que albergan los hospedadores, variará en función del sistema de explotación (intensivo-extensivo), el acceso a zonas de pastoreo (mayor intensidad en regadíos) o la edad de los animales (mayor en jóvenes), pudiendo fluctuar entre varios cientos (pastoreo en seco) y decenas de miles (regadío). De este factor dependerá en gran medida las presentaciones subclínicas o clínicas del proceso.

Todas estas especies son parásitos vermiformes de sección redondeada, de color blanquecino o rojizo (si desarrollan hematofagia), con unas medidas que oscilan entre un par de milímetros y tres o cuatro centímetros. La cutícula puede ser lisa o estriada, más o menos ornamentada, y a veces puede presentar expansiones en el extremo anterior. A nivel del extremo posterior de los machos estas expansiones de la cutícula forman una estructura conocida como bolsa copuladora, donde se localizan diversas estructuras quitinosas que intervienen en la cópula.

Las hembras producen huevos que son ovoides, de cáscara fina, y que salen al medio con las heces en fase de blástula, con un número variable de blastómeros según especie. Continúan su desarrollo en el medio bajo condiciones ambientales apropiadas hasta que eclosiona la larva (L1) de su interior, la cual, bajo las mismas condiciones, experimentará dos mudas para alcanzar finalmente el estado de L3, que será infectante.

## 2. Revisión Bibliográfica

---

Dentro del amplio conjunto de especies responsables de “gastroenteritis parasitarias” en pequeños rumiantes, uno de los encuadres taxonómicos reconocidos actualmente para *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) sería el siguiente:

Phylum Nematoda  
Orden Strongylida  
Suborden Strongylina (Wilford Olsen/ Cordero del Campillo, 1977)  
Superfamilia Trichostrongyloidea (Cram, 1927)  
Familia Trichostrongylidae (Leiper, 1912)  
Subfamilia Haemonchinae (Anderson, 1992).  
Género *Haemonchus* (Cobb, 1898)  
Especie *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

Además de *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803), descrito como parásito del cuajar de ovejas, cabras, y en menor medida de bovinos y otros numerosos rumiantes en casi todas las zonas del mundo, se han identificado otras especies diferentes dentro del género. Gibbons (1979), uno de los autores que quizás ha revisado el género *Haemonchus* con más profundidad, reconoce la existencia de un total de nueve especies. Autores como Das y Whitlock (1960), en base a diferencias morfológicas de diversos aislados geográficos del parásito, han propuesto incluso la existencia de dos nuevas subespecies y una nueva variedad de *H. contortus*, denominadas *Haemonchus contortus contortus* (Australia), *H. contortus cayugensis* (Estado de New York, EEUU) y *H. contortus* var. *utkalensis* (Orissa, India). Posteriormente se han identificado otras subespecies, entre ellas *H. contortus bangalorensis* (India), *H. contortus hispanicus* (España) y *H. contortus kentuckiensis* (Kentucky, EEUU). Según Daskalov (1972) el hospedador sería el principal responsable de la aparición de las diferentes subespecies de *H. contortus*, sin dejar al margen la influencia de los factores geográficos y ecológicos.

Otra especie actualmente reconocida del género *Haemonchus* es *Haemonchus placei* (Place, 1893; Ransom, 1911). La propuesta inicial de estos autores fue contrastada por Roberts *et al.* (1954) tras diversos estudios realizados en Australia en rumiantes parasitados por *Haemonchus* sp.. Concluyen que bovinos y ovinos están parasitados por dos especies diferentes del género *Haemonchus*, *H. placei* y *H. contortus*, respectivamente. Los estudios de Bremner (1955) sobre el cromosoma X apoyan las diferencias entre las dos especies; mientras que la longitud del cromosoma X era de 8  $\mu\text{m}$  en bovino, en el ovino era semejante a los autosomas y medía 3  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, Herlich *et al.* (1958) encontraron diferencias entre las dos especies en la longitud de las espículas, la distancia entre las lengüetas y la punta de las espículas, así como en la actividad de las larvas infectantes. A pesar de estas

evidencias, Gibbons (1979) siguió considerando cierta identidad entre *H. placei* y *H. contortus*. Más recientemente se han realizado estudios basados en métodos moleculares que demuestran claras diferencias en el ADN ribosomal de ambas especies (Stevenson *et al.*, 1995). Se han propuesto incluso 3 subespecies: *H. placei placei* en aislados de Australia, *H. placei africanus* en el oeste de África y *H. placei argentinensis* en el Nuevo Mundo (Giudici *et al.*, 1999).

Dentro de este mismo género se encuentra también *Haemonchus similis* (Travassos, 1914). Esta especie se ha encontrado en bóvidos y cérvidos en Florida, Louisiana y Texas, y también en rumiantes de Europa y Brasil. Difiere de *H. contortus* en que el proceso terminal del radio dorsal es más largo y las espículas más cortas. En ciertas regiones de África (Costa de Marfil), donde los rumiantes comparten los mismos pastos durante todo el año, es común encontrar infecciones mixtas por *H. placei*, *H. contortus* y *H. similis*. En este caso, esta última especie (*H. similis*) parece ser la especie predominante en bovinos de razas autóctonas y en cebúes (Achi *et al.*, 2003).

En camellos y dromedarios del Norte de África e India, también se ha descrito *H. longistipes* (Pailliet y Henry, 1909), una especie cuyas espículas son mucho más largas que en las demás especies del género (unos 625 µm). Algunas otras especies se han descrito en rumiantes silvestres; *H. bedfordi* (Le Roux, 1929), cuajar de búfalo africano y diversas gacelas; *H. dinniki* (Sachs, Gibbons y Leveno, 1973), cuajar de diversas gacelas; *H. krugeri* (Ortlepp, 1964), cuajar de impala; *H. lawrenci* (Sandground, 1933), intestino delgado de antílope *Cephalophus*; *H. mitchelli* (Lichtenfels *et al.*, 2002), cuajar de gacelas, eland, orix; *H. vegliai* (Le Roux, 1929), cuajar de orix y antílopes; *H. okapiae* (Lichtenfels *et al.*, 2002), okapis (*Okapia johnstoni*), *H. horaki* (Lichtenfels *et al.*, 2001) antílopes (*Pelea capreolus*) de ciertas regiones del África austral.

#### 2.1.1.2. MORFOLOGÍA

*H. contortus* se encuentra englobado en la superfamilia Trichostrongyloidea, considerándose la especie de mayor longitud entre los nematodos con bursa (Anderson, 1992). Esta superfamilia se encuentra dividida a su vez en 14 familias y 24 subfamilias (Durette-Desset y Chabaud, 1977; 1981; Durette-Desset, 1983). Se trata de un grupo de nematodos por lo general pequeños, frecuentes patógenos de los rumiantes en pastoreo, que tienen la apariencia de un pelo, y que suelen alojarse (salvo *Dyctiocaulus* que se localiza en vías respiratorias) en el tracto digestivo de mamíferos y aves (Anderson, 1992; Urquhart *et al.*, 2001). Existen, sin embargo, otros géneros que podemos encontrar en cavidad nasal (género *Nasistrongylus*),

## 2. Revisión Bibliográfica

---

conductos biliares (género *Hepatojarakus*) y glándula mamaria (género *Mammanidula*) de sus hospedadores (Anderson, 1992).

Los miembros de esta superfamilia no presentan estructuras muy llamativas y su cápsula bucal es muy reducida. Sin embargo, en los machos destaca la presencia de bolsas copuladoras desarrolladas, con dos espículas cuyas características morfológicas se utilizan para su diferenciación (Urquhart *et al.*, 2001).

*Haemonchus* sp. (Cobb, 1898), uno de los géneros parásitos del cuajar de diversos rumiantes con mayor potencial patógeno, tiene una longitud que oscila entre los 10-30 mm. Poseen una pequeña cápsula bucal con un fino diente o lanceta, así como papilas cervicales prominentes. La bolsa copuladora del macho es grande, en especial los lóbulos laterales, siendo el lóbulo dorsal pequeño y asimétrico. La vulva se sitúa en el tercio posterior y puede contar con una protuberancia, solapa o proceso lingüiforme. Estas características morfológicas generales pueden mostrar ciertas variaciones entre distintos aislados, por lo que el género puede considerarse en una situación de cambio evolutivo.

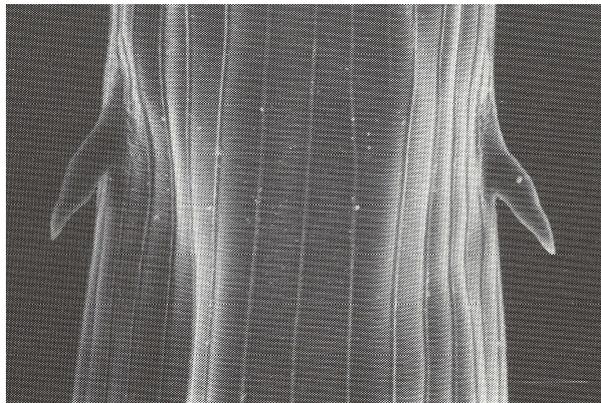
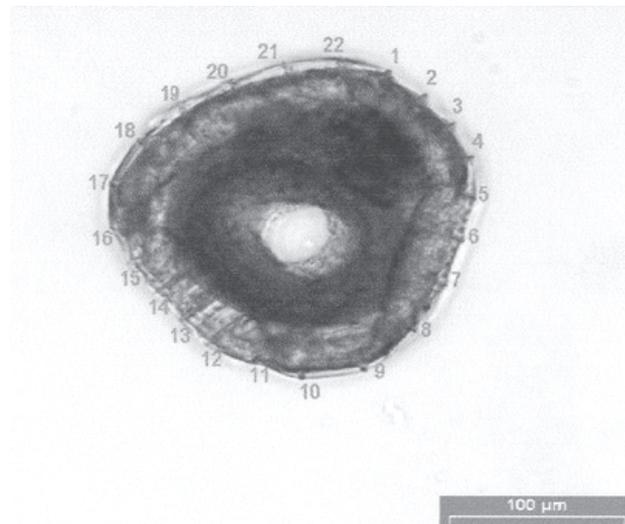


Fig. 1. Crestas cuticulares de un adulto de *H. contortus* (Gibbons, 1986).

*Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) se presenta en el cuajar de ovejas, cabras, vacas y otros numerosos rumiantes, en casi todas las zonas del mundo. Se conoce vulgarmente como gusano rojo del cuajar de los rumiantes y es una de las especies más patógenas. Los machos miden de 10 a 22 mm de longitud, y las hembras de 18 a 34 mm (Soulsby, 1988; Cordero del Campillo, 2000). El macho de esta especie presenta un color rojizo uniforme, mientras que en la hembra, los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo le dan un aspecto rayado. Presenta unas crestas cuticulares en la superficie (Fig. 1 y 2) que van desde el extremo anterior

hasta más allá de la mitad del cuerpo (**Lichtenfels y Pilitt, 2000**), si bien se han observado ciertas diferencias según el grado de adaptación al hospedador (ovino o caprino) (**Wahab y Suhalia, 2007**).



**Fig. 2.** Sección transversal de un adulto de *H. contortus* (**Wahab y Suhalia, 2007**).

Tal y como se refirió previamente en el género, la bolsa copuladora de los machos de *H. contortus* es muy desarrollada y tiene lóbulos laterales alargados sustentados por radios largos y finos. El pequeño lóbulo dorsal es asimétrico y está desviado hacia uno de los lóbulos laterales, estando sustentado por un radio dorsal en forma de Y. Las espículas miden de 0,46 a 0,506 mm de longitud, y cada una de ellas cuenta con una pequeña lengüeta cerca del extremo distal, terminando en forma de espolón (**Urquhart et al., 2001; Cordero del Campillo, 2000**). Estas espículas tienen una parte esclerotizada que está formada por tres estratos compuestos por queratina y colágeno. El eje de cada espícula posee unas alas ventrales y dorsales que se curvan hacia las correspondientes alas de la otra espícula. Tanto las espículas como el gubernáculo, una estructura en forma de cuña que se localiza entre las espículas, son de naturaleza proteica en su mayoría. La vulva de la hembra de *H. contortus* está cubierta normalmente por un proceso lingüiforme (solapa vulvar) que suele ser grande y muy prominente, pero que puede aparecer reducido a una pequeña prominencia en forma de botón en algunos ejemplares, o incluso presentar una superficie lisa (**Wahab y Suhalia, 2007**). La solapa vulvar tiene interés morfológico y presenta asociada una glándula hipodermal denominada poro perivulvar (**Lichtenfels et al., 1995**).

Los huevos liberados por las hembras tienen forma ovoide, son de cáscara fina y presentan un tamaño que oscila entre 67-85 x 41-48 μm. Salen al exterior con las

heces en forma de blástula con 16-32 blastómeros (Fig. 3) (Soulsby, 1988; Anderson, 1992).



Fig. 3. Huevo de *H. contortus*.

La primera fase larvaria (L1) mide 340-350  $\mu\text{m}$  de longitud y presenta un bulbo esofágico, cola puntiaguda prominente y cavidad bucal tubular. El poro genital consta de 2 células. El segundo estadio larvario (L2) es algo mayor, con una longitud de 400-450  $\mu\text{m}$ , y también está provisto de bulbo esofágico. Tras la segunda muda la L2 se transforma en L3, que mide en torno a 754-756  $\mu\text{m}$  de longitud y presenta una vaina, que no es sino la cutícula de la L2. La cola de la larva de tercer estado es de tamaño medio y puntiaguda, y el extremo anterior estrecho y redondeado. Todas estas características que se utilizan para diferenciar el género de otros de la superfamilia (MAFF, 1989). El poro genital de la L3 tiene 16 núcleos, la cavidad bucal está elongada pero cerrada anteriormente (Anderson, 1992), y el número de células intestinales es de 16 (MAFF, 1989).

El cuarto estado larvario (L4) tiene una longitud de 750-850  $\mu\text{m}$  y presenta una cápsula bucal provisional que le permite ingerir sangre. Esta cápsula es globular y relativamente profunda, con unas paredes gruesas (MAFF, 1989). Por último, antes de evolucionar a estado adulto, el parásito pasa por una fase denominada L5 o preadulto, que dispone de una cápsula bucal más globular y desarrollada que la L4 y caracteres sexuales diferenciados.

### 2.1.1.3. CICLO BIOLÓGICO

#### 2.1.1.3.1. Fase exógena

*H. contortus* tiene un ciclo biológico directo típicamente tricostrongiloide (Soulsby, 1988; Urquhart *et al.*, 2001). Los animales parasitados eliminan huevos que salen al medio junto con las heces del hospedador y allí evolucionan hasta el estado de L3 (envainada), que es la forma infectante. La infección se produce por ingestión de larvas de tercer estado o L3, cuyo posterior desarrollo hasta el estado adulto se produce en la localización final, el abomaso, sin llegar a producir ningún tipo de migración orgánica (Fig. 4) (Urquhart *et al.*, 2001).

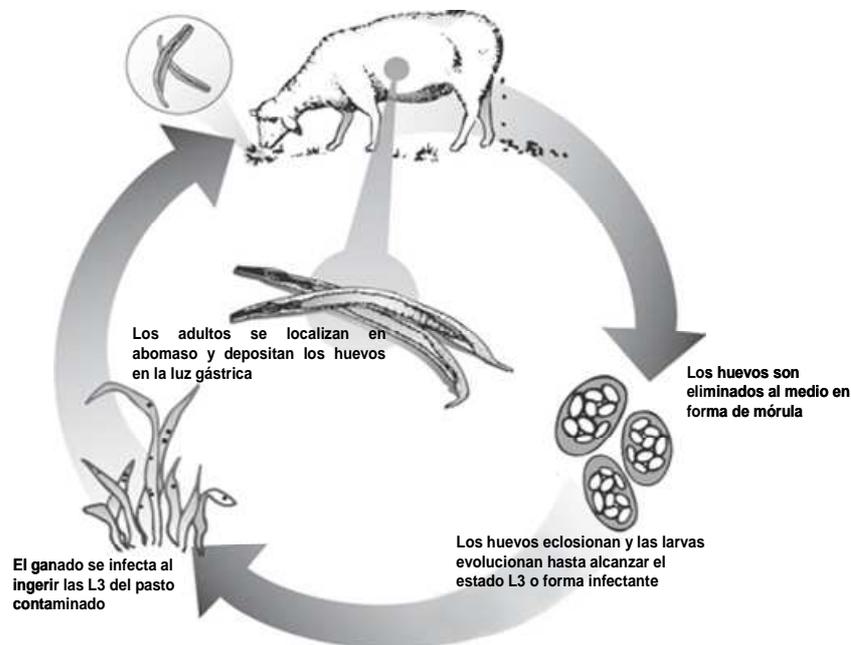


Fig. 4. Ciclo biológico de *H. contortus*.

Veglia (1915) llevó a cabo un estudio detallado de este ciclo vital, con especial atención al desarrollo de las fases larvarias libres. Las hembras son ovíparas y depositan los huevos normalmente en la cuarta fase celular, siendo capaces de eliminar entre 5.000 y 10.000 huevos/día (Cordero del Campillo, 2000). Los huevos se desarrollan a medida que discurren por el intestino del hospedador y posteriormente en el medio, siendo aquellos que alcanzan el estado de pre-eclosión más resistentes a condiciones adversas como la congelación o la desecación (Soulsby, 1988). Según algunos autores la masa fecal serviría de protección frente a las condiciones ambientales (Zajac, 2006) y la humedad favorecería la eclosión de los huevos (O'Connor *et al.*, 2007). Es importante tener en cuenta que, incluso dentro de

condiciones medioambientales aceptables, para cada especie existen evidencias de adaptaciones locales; así pues, los huevos de *H. contortus* de una cepa de Inglaterra, habituada a unas temperaturas en verano más frías, se ha demostrado que eclosionan a temperaturas más bajas que cepas procedentes de regiones más templadas (Zajac, 2006). La temperatura óptima para el desarrollo oscila entre 20 y 30°C. En este rango de temperatura la primera fase larvaria (L1) eclosiona del huevo a las 14-17 horas. Una hora más tarde aproximadamente la larva comienza a alimentarse y en 10-12 horas, cuando alcanza una longitud 400-450 µm, sufre la primera muda. El segundo estado larvario (L2) queda desarrollado a partir de las 60-65 horas después de la eclosión del huevo. Tanto las L1 como las L2 se alimentan de bacterias antes de mudar a L3 (Zajac, 2006). El tiempo que tardan en alcanzar el estado de L3 varía con la temperatura; así, en veranos calurosos, el desarrollo de las larvas puede tardar 3 ó 4 días, mientras que si los huevos son depositados en primavera frías, el desarrollo puede verse retrasado varios meses (Zajac, 2006). Esta fase larvaria se caracteriza por contar con una vaina que le proporciona gran resistencia frente a distintos factores ambientales, pero evita que las larvas se alimenten, por lo que una vez que las L3 consumen sus reservas metabólicas, mueren. Por este motivo, las larvas que eclosionan en periodos con temperaturas más bajas cuentan con menos movilidad y tienden a sobrevivir durante más tiempo (Zajac, 2006).

Los huevos no se desarrollan si la temperatura es inferior a 4°C, y pueden no continuar su desarrollo cuando se elevan las temperaturas. Las larvas sí sobreviven a 4°C pero pueden morir a temperaturas altas (75-85°C), así como en heces en descomposición. Las larvas maduras abandonan el contenido fecal y son más resistentes a la desecación, en parte por la presencia de lípidos en las células intestinales y porque tienden a agruparse. La humedad fecal normal es adecuada para el desarrollo de la L1 y la L2, pero no para la L3, que necesita de mayor humedad (O'Connor *et al.*, 2007). Este factor (humedad), y especialmente la lluvia, son muy importantes para que la L3 abandone la materia fecal para migrar hacia el pasto, por lo que en tiempos secos un mayor porcentaje de larvas quedará retenida en el estiércol (Zajac, 2006). Su migración hacia la hierba no sólo se encuentra afectada por la humedad, sino también por la intensidad de luz, lo que explica que el número máximo de larvas infectantes se encuentre en el pasto en las primeras horas de la mañana y al final de la tarde, cuando la temperatura, humedad e intensidad lumínica son más favorables. Además de la lluvia, otro factor que favorece la desintegración fecal y por tanto la traslación de las larvas a la hierba es el viento. También existe la posibilidad de que algunos invertebrados jueguen cierto papel en la dispersión del material fecal por el simple movimiento mecánico del mismo. Sin embargo, estos mismos elementos pueden jugar un papel negativo sobre la supervivencia del parásito en el medio. La actividad de escarabajos del estiércol y gusanos de tierra, al

desintegrar el material fecal, también reducen el número final de L3 por exposición de las L1 y las L2 a la desecación y a la luz ultravioleta (**Cordero del Campillo, 2000**). Las L3 pueden migrar verticalmente y lateralmente aprovechando las gotas de rocío sobre la hierba, especialmente por la noche, en horas de poca luz y cuando hace poco viento. La habilidad para moverse se ve afectada por la temperatura del aire, la humedad del suelo, humedad relativa, e incluso el tipo de forraje (**Anderson, 1992; Zajac, 2006**). Se estima que esta movilidad podría ser de hasta 90 cm en grandes cúmulos de heces, aunque en la mayoría de los casos sus desplazamientos no son superiores a los 10 cm.

#### 2.1.1.3.2. Fase endógena

A los 30 minutos de su ingestión, aproximadamente, las larvas infectantes (L3) se desprenden de la vaina por efecto de distintos estímulos del hospedador (amortiguador bicarbonato-CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> gaseoso, etc.). Estos estímulos hacen que la larva segregue un fluido de muda que actúa sobre la vaina provocando su ruptura, con lo que la larva, ayudada por sus movimientos, puede salir. La pérdida de la vaina se produce en el rumen y a continuación las fases larvarias del parásito migran al cuajar penetrando entre las glándulas epiteliales gástricas, preferentemente en la mucosa fúndica (**Cordero del Campillo, 2000**). Estas larvas miden 655-840 µm de longitud a las 30-36 horas post-infección (**Anderson, 1992**).

Una vez en la mucosa, las larvas mudan otra vez, y se transforman en L4 en el interior de las glándulas. Estas larvas son capaces de ingerir sangre y causar pequeñas hemorragias a partir de los 3 días post-infección. Después de la última muda, a los 9-11 días, se transforman en L5 o preadultos, que maduran sexualmente y pasan a adultos (**Anderson, 1992; Cordero del Campillo, 2000**). Justo antes de la última muda, las larvas desarrollan una aguda lanceta que las capacita para obtener sangre de las heridas que provocan en la mucosa. Los adultos machos y hembras se mueven libremente por la superficie de la mucosa, y en ella se produce la fecundación. Las hembras son capaces de poner huevos a partir de los 15 días post-infección, aunque en algunos casos el periodo de prepatencia se prolonga hasta las 3 semanas (**Anderson, 1992; Urquhart et al., 2001**).

*H. contortus* tiene la capacidad de detener su desarrollo en el estado L4 y se considera como uno de los recursos primarios para la supervivencia durante periodos con climatología adversa (**Anderson, 1992**). Este aspecto se aborda con mayor profundidad en el apartado de epidemiología.

### 2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

*H. contortus* es un parásito que tiene distribución mundial y se puede hallar parasitando a los pequeños rumiantes de distintas zonas y climas del mundo. En Estados Unidos de América, se ha estimado que el 74% de las ovejas se encuentran parasitadas por vermes gastrointestinales, siendo *H. contortus* la especie más importante (Zajac, 2006). En zonas geográficas con climas tropicales como Nigeria, se ha citado una prevalencia del 64,3% (Behnke *et al.*, 2006), y en áreas de climas subtropicales de América Central se ha observado que un 3,6 % del total de larvas encontradas en el pasto son de *H. contortus* (Abarca, 1990); en nuestro entorno más cercano, considerado también como de clima subtropical (isla de Gran Canaria, España), la prevalencia se ha estimado en un 15,2% (Molina *et al.*, 1997). Una prevalencia similar se ha registrado en la Península Ibérica, con valores en torno al 15-20% en granjas de ovinos del Valle del Ebro (Uriarte *et al.*, 2003). En ciertas regiones de Turquía (con un clima similar a la Península Ibérica), la prevalencia del parásito es cercana al 40% (Altaş *et al.*, 2009). *H. contortus* se ha encontrado también con una elevada prevalencia en zonas climáticas tan distintas como Zimbabwe, de clima semiárido (Pandey *et al.*, 1994), o Suecia, donde la temperatura media anual ronda los 7-8°C (Lindqvist *et al.*, 2001), y en áreas geográficas tan dispares como China (Wang *et al.*, 2006), la Pampa Oeste de Argentina (Suárez y Busetti, 1995) o India (Tariq *et al.*, 2008a).

En cualquier área geográfica (tropical, subtropical o templada), el estudio de los aspectos epidemiológicos de una enfermedad parasitaria permite realizar una estimación de disponibilidad estacional de las larvas, las variaciones de la carga parasitaria, así como de las fuentes de contaminación (Urquhart *et al.*, 2001; Cordero del Campillo, 2000), sin olvidar que el crecimiento de la población en el hospedador y, consecuentemente, el aumento de la excreción de huevos, están sujetos a factores como la disponibilidad de larvas infectantes en el pasto, a la inhibición del desarrollo larvario y al estado inmunitario de los animales (Cordero del Campillo, 2000).

Fuera del hospedador, el desarrollo y la supervivencia dependen, sobre todo, de la temperatura y la humedad, como quedó recogido en el apartado anterior. Las bajas temperaturas retrasan el desarrollo, además de producir una elevada mortalidad en etapas tempranas de la fase larvaria de vida libre, limitándose de este modo la evolución (O'Connor *et al.*, 2006); de hecho, por debajo de 12°C se detiene el desarrollo. A pesar de ello *H. contortus* puede completar su ciclo biológico en regiones del norte de Europa como Suecia (Waller y Chandrawathani, 2005), donde la infección parece mantenerse gracias a los rebaños de ovejas que permanecen estabulados durante la época invernal (Waller *et al.*, 2006). A medida que aumenta la

temperatura, aumenta también la velocidad del desarrollo, hasta alcanzar un desarrollo óptimo a los 26-27°C, temperatura a partir de la cual empezarían a morir las larvas (**Cordero del Campillo, 2000**). La humedad también se considera un factor limitante, puesto que en general se requiere un mínimo del 96% de humedad relativa para el desarrollo larvario; de hecho, se ha observado que la frecuencia y la gravedad de los brotes de haemonchosis están muy ligados a periodos con una elevada pluviosidad (**Urquhart et al., 2001; Cordero del Campillo, 2000**). La radiación ultravioleta en ciertas dosis parece jugar también un papel importante en la epidemiología de estos parásitos, y en este sentido se ha observado que en ciertas zonas la población en el pasto desciende en primavera cuando la intensidad de la radiación solar aumenta rápidamente (**van Dijk et al., 2009**). Una vez que la larva es infectante, la temperatura y la humedad son factores menos limitantes. En general, las L3 son bastante resistentes, pudiendo sobrevivir un tiempo variable que oscilaría entre el mes y los tres meses (**Urquhart et al., 2001**), tal y como se indicó al describir el ciclo biológico.

En áreas tropicales y subtropicales, la aparición de brotes de haemonchosis aguda clínica podrían verse determinados por otros factores, como una elevada presencia de huevos en heces (entre 2.000 y 20.000 huevos por gramo de heces) susceptibles de transformarse rápidamente en poblaciones de L3 en el pasto, y, por otro lado, la dificultad de los hospedadores infectados por *H. contortus* para desarrollar una inmunidad efectiva (**Urquhart et al., 2001**).

En ciertas zonas con este tipo de clima, la supervivencia de los parásitos está también asociada con la capacidad de hipobiosis de las larvas de *H. contortus*. Aunque se desconoce el estímulo para desencadenar este fenómeno, la hipobiosis ocurre al inicio de una prolongada estación seca y permite al parásito sobrevivir en el hospedador como L4 inhibida en lugar de madurar y producir huevos que no se desarrollarían en el pasto árido (**Urquhart et al., 2001**). Parece que la capacidad de inhibición del desarrollo es un carácter heredable, por lo que se considera una adaptación del parásito a la resistencia del hospedador, a factores ambientales adversos, o ambos a la vez (**Cordero del Campillo, 2000**). Durante este arresto larvario se forman unos cristales cilíndricos en las células intestinales. Se desconoce la función de estos cristales, pero se sabe que desaparecen con el posterior desarrollo de las larvas (**Anderson, 1992**). Por su parte, en regiones semiáridas el desarrollo se ve limitado por la desecación, siendo entre los meses de mayo y septiembre cuando los pastos presentan un nivel más alto de infección (**Sissay et al., 2007**), debido a la reactivación del desarrollo de las L4 tras las lluvias de los meses de junio, julio y agosto. El desarrollo de las larvas hipobióticas continúa justo antes del inicio de las estaciones lluviosas de noviembre y diciembre también en Sudáfrica (Sterkfontein),

donde el tipo de clima es tropical seco (**Taylor et al., 2005**). Lo mismo ocurre en zonas de clima tropical lluvioso, como en Kenia, donde, tanto el ganado caprino como el ovino muestran un claro patrón estacional con altos niveles de infección durante las dos principales estaciones de lluvias, especialmente en marzo, abril y octubre (**Nginyi et al., 2001**). En relación con este patrón estacional se ha observado que en regiones semiáridas del mismo país existe un mayor número de las larvas hipobióticas en los meses de verano (**Gatongi et al., 1998**).

En áreas geográficas con climas templados las condiciones ambientales en determinadas épocas del año son, en general, menos favorables para la supervivencia de *H. contortus*, y la epidemiología es diferente a la de zonas tropicales. En estas zonas las infecciones se desarrollan normalmente en dos circunstancias. En una de ellas, y probablemente la más común, acontece el denominado ciclo sencillo anual, donde las larvas infectantes que se han desarrollado de los huevos depositados en primavera son ingeridos por el hospedador a principios de verano, y la mayoría de ellas se inhiben en el abomaso como L4 sin completar el desarrollo hasta la primavera siguiente. En Inglaterra, por ejemplo, durante el mes de agosto ya hay un número significativo de larvas quiescentes en los ovinos. Este número puede alcanzar el 80% en septiembre y el 100% de octubre a marzo (**Connan, 1971**). En el nordeste de Inglaterra, la inhibición puede empezar en julio (57%), y puede llegar al 100% en septiembre. Por su parte, en ciertas regiones de España (Valle del Ebro) se han encontrado poblaciones que presentan larvas inhibidas con valores del 70% en los meses de enero y febrero (**Uriarte et al., 2003**). En estas circunstancias, la maduración de las larvas hipobióticas se encuentra ligada en muchos casos a brotes agudos de haemonchosis. Otra posibilidad de que aparezcan signos clínicos puede acontecer a finales de verano en corderos infectados a partir de pastos contaminados con larvas que no realizaron la hipobiosis al inicio del verano (**Urquhart et al., 2001; Cordero del Campillo, 2000**).

La hipobiosis también se ha observado en climas fríos (Suecia), donde casi el 100% de las L4 detienen su desarrollo durante las épocas con temperaturas más bajas, y no es sino hasta el próximo verano cuando empieza a aumentar el número de parásitos (**Waller et al., 2004a**). La exposición previa también es un factor que influye en el fenómeno de hipobiosis (**Cordero del Campillo, 2000**); así, la retención larvaria es más evidente en ovejas (inicialmente libres de parásitos) que se mantienen en pastos contaminados frente a ovejas libres de parásitos introducidas posteriormente en el rebaño (**Uriarte et al., 2003**). Este retraso en el desarrollo también parece ayudar a evadir el efecto antihelmíntico de algunos productos como el levamisol (**Sargison et al., 2007**).

En regiones de veranos lluviosos y con inviernos suaves, la presencia de larvas en el pasto tiende a incrementarse a finales de primavera, alcanzando un máximo en la segunda mitad del verano. Durante el invierno los niveles de supervivencia suelen ser bajos por lo que el número de larvas en el pasto decrece (**Wharton, 1982; Soulsby, 1988**).

Otro fenómeno epidemiológico importante de las trichostrongylidosis en general, y que también afecta a la especie que nos ocupa, es el incremento de la eliminación fecal de huevos en el parto, y el consiguiente riesgo de contaminación para otros animales. Este fenómeno, que se ha observado fundamentalmente en primavera coincidiendo con la época de partos, parece más relacionado con los hospedadores que con el medio. Existen evidencias que indican que es el resultado de una ruptura inmunitaria temporal que puede estar relacionada con los cambios endocrinos que acontecen en este periodo (**Cordero del Campillo, 2000**), probablemente asociados con la secreción de prolactina (**Płociński et al., 2007**). En ciertos estudios en razas de cabras criollas en trópicos húmedos, se ha señalado incluso que el recuento de huevos en heces es mayor en hembras primíparas que en multíparas, y en hembras con una mayor fecundidad que en aquellas con una sola cría (**Mandonnet et al., 2005**). Por último, en zonas frías como Suecia, *H. contortus* ha evolucionado de tal manera que no sólo detiene su desarrollo como L4 en el hospedador, sino que reactiva su ciclo vital cuando llega la época de partos, siendo este fenómeno necesario para poder completar su ciclo biológico (**Waller et al., 2004a**).

### 2.1.3. PATOGÉNESIS

La principal característica patológica de la infección por *Haemonchus* sp. es la anemia. Tanto los adultos como las larvas de cuarto y quinto estado de *H. contortus* en pequeños rumiantes y de *H. placei* en vacas son hematófagos, considerándose responsables de lesiones hemorrágicas en el cuajar. La pérdida media de sangre se ha calculado en 0,05 ml por parásito y día, tanto por la ingestión del parásito como por lo que se pierde al sangrar la herida, de modo que un hospedador parasitado con 5.000 adultos de *H. contortus* podría perder alrededor de 250 ml de sangre al día. La sangre aparece en las heces a los 6-12 días de la infección (**Clark et al., 1962**). Sin embargo, en condiciones naturales, *H. contortus* coexiste normalmente con varias especies de nematodos parásitos diferentes con mecanismos de acción patógena distintos y localizaciones en diversos tramos del tracto gastrointestinal. La acción patógena total, cuya gravedad depende principalmente de la edad del hospedador y

de la intensidad de la infección es, al menos, la suma de la acción patógena de cada una de las especies que se ven implicadas (**Cordero del Campillo, 2000**).

Mediante técnicas de marcaje de eritrocitos con isótopos  $Cr^{51}$  y  $Fe^{59}$ , **Dargie y Allonby (1975)** estudiaron el desarrollo de la anemia en ovinos infectados con *H. contortus* (haemonchosis aguda), demostrando que ésta se produce en tres fases. En la primera, a los 7-25 días post-infección, el volumen corpuscular medio (VCM) de animales infectados desciende rápidamente del 33 al 22%, mientras que el hierro sérico permanece normal. Esta rápida caída del VCM se debe al periodo que transcurre entre la pérdida de sangre y la activación del sistema eritropoyético del hospedador para compensar la pérdida. En una segunda fase, que dura de 6 a 14 semanas, el VCM se mantiene estacionario, aunque más bajo de lo normal, a pesar de la continua pérdida de sangre, ya que los animales infectados la compensan mediante un incremento en la producción de eritrocitos (aproximadamente triplicada). Durante este periodo hay un incremento del hierro plasmático y un descenso del hierro en heces. Los animales afectados tienen limitada su capacidad de reabsorción de hierro intestinal, que suele caer hasta aproximadamente un 10%. Por último, se produce una grave depleción de las reservas de hierro; el ganado afectado muestra pérdida de hierro sérico, así como de las reservas en médula ósea y comienza así la tercera fase, caracterizada por una rápida pérdida del VCM, como resultado de la dishematopoyesis debida a la deficiencia férrica (**Soulsby, 1988; Urquhart et al., 2001**).

No obstante, la acción patógena de *Haemonchus* comienza a ser patente ya con la presencia de las L3, que son capaces de provocar alteraciones en la permeabilidad de la mucosa abomasal (**Dakkak et al., 1981**). Los estados tempranos larvarios también se ha demostrado que pueden inducir cambios en la actividad secretora del abomaso, aunque mucho menores que los producidos posteriormente por los adultos (**Simpson et al., 1997**). La penetración y crecimiento de las larvas en el interior de la mucosa originan dilatación y protrusión de las glándulas gástricas; estas glándulas serán reemplazadas más tarde por células no diferenciadas (**Cordero del Campillo, 2000**).

Al salir las primeras larvas de la mucosa, entre los 17-21 y los 35 días de la infección, se aprecian alteraciones en las glándulas circundantes a las parasitadas. La salida del parásito produce lisis en las células epiteliales del borde superior de las glándulas, estimulando la rápida división celular y originando una marcada hiperplasia con engrosamiento de la mucosa, edema submucoso y aumento de células plasmáticas. Los espacios intercelulares epiteliales se encuentran dilatados y los complejos de unión entre las células desaparecen (**Cordero del Campillo, 2000**).

La separación entre células da lugar a un aumento de la permeabilidad, que explica parte de la patogenia de estos procesos. Así, la alteración de la integridad de la capa mucosa del abomaso conduce a la modificación de la Diferencia del Potencial Transmural (DPT) – potencial eléctrico a través de la pared gástrica – y de la concentración intraluminal de iones. Se ha observado que a los 30 minutos que siguen a la infección se produce un fuerte aumento de la DPT con variaciones en la concentración de los iones (incremento en la concentración de iones  $\text{HCO}_3$  que contribuye al aumento del pH gástrico), lo que da lugar a la disminución de la secreción de HCl y, como consecuencia, a un aumento del pH gástrico. En un principio se pensó que este aumento de pH se debía a la destrucción de células parietales de la mucosa por los parásitos, pero se ha visto que existe una rápida recuperación de los valores normales tras una desparasitación, mucho antes de que se pueda alcanzar la normalidad celular. Algunos autores proponen que existe una activación de la secreción ácida en los lugares donde los vermes no tienen una acción directa, posiblemente inducido por la acción de la gastrina. También se considera que la inhibición de la secreción de HCl podría estar producida por un factor gástrico de origen desconocido que se ha relacionado con la presencia del verme adulto (Cordero del Campillo, 2000).

De cualquier manera, el aumento del pH repercute negativamente en la digestión proteica porque el pepsinógeno no se transforma en pepsina (Ambrosi, 1995). Lo mismo que ocurre en otras trichostrongylidosis, el resultado final de estas alteraciones es la disfunción del proceso digestivo, que suele acompañarse de una pérdida del efecto bacteriostático del pH gástrico y, por tanto, un aumento del número de bacterias, lo que favorece la aparición de diarreas. También se ha observado un aumento de la síntesis de gastrina, que lleva asociado a su vez un aumento de la contractilidad del cuajar y del peristaltismo intestinal (Cordero del Campillo, 2000). La hipergastrinemia y el aumento del pH abomasal ocurren al mismo tiempo, si bien la gastrina sérica sigue aumentando tras la restauración de los valores normales de pH (Simpson *et al.*, 1997). La génesis del aumento del pepsinógeno plasmático en *H. contortus* no está muy clara aún. Se acepta la teoría según la cual las lesiones y alteraciones funcionales de la mucosa del cuajar, principalmente a nivel glandular, limitarían la secreción del HCl, reduciéndose la transformación del pepsinógeno en pepsina, y facilitando el paso de macromoléculas -como el pepsinógeno- al torrente circulatorio a través de los complejos de unión entre las células endoteliales y epiteliales dañadas. Por otro lado, estudios más recientes afirman que no es necesaria la invasión de la mucosa para que se eleve el pepsinógeno plasmático, pues los valores se elevan ya a las 24-48 horas de la infección. Parece que los parásitos inducen un incremento en el número de células zimógenas y en consecuencia un aumento de la secreción de pepsinógeno, el cual se

vertería directamente en la circulación sanguínea (Scott *et al.*, 1998). La hiperplasia de células mucosas podría mantener la secreción de pepsinógeno en animales infectados, incluso si las células principales tienen reducida su viabilidad (Scott *et al.*, 1998). Sin embargo, otros autores han señalado que no en todas las parasitaciones por *H. contortus* se eleva el nivel del pepsinógeno plasmático, aunque sí el pH abomasal y la gastrina sérica. Además, en los animales en los que sí ocurre un aumento del pepsinógeno en sangre, éste no precede a las variaciones de otros parámetros como ocurre en la hiperpepsinogenemia de las infecciones por *Ostertagia* spp. (Simpson *et al.*, 1997).

También se ha considerado que algunos productos de excreción/secreción de *H. contortus* pudieran estar implicados en la inhibición del ácido gástrico, en la vacuolización de células epiteliales y en la pérdida de células parietales (Przemeck *et al.*, 2005). Estos productos sólo serían producidos por los adultos y no por las fases larvarias (Simpson *et al.*, 1997). También actuarían indirectamente sobre las células denominadas ECL (enterochromaffin-like), bien induciendo la aparición de procesos inflamatorios, o perturbando el sistema de defensa de la mucosa gástrica. La inflamación contribuiría al aumento de la concentración del pepsinógeno plasmático y también podría incrementar la secreción de gastrina (Simpson, 2000).

Los animales infectados pierden gran cantidad de proteínas séricas a través del tracto gastrointestinal, habiéndose citado pérdidas fecales medias de plasma de 210 a 340 ml/día, estimadas mediante la pérdida de polivinilpirrolidona marcada con I<sup>131</sup> (Dargie, 1975). No obstante, la concentración de albúmina sérica puede permanecer en su nivel normal durante varias semanas, lo que puede estar asociado con un notable incremento de la síntesis albuminoidea que se produce hasta que las reservas metabólicas del animal se agotan (Soulsby, 1988).

A partir del día 35 post-infección (p.i.), hay un retorno a la normalidad estructural y funcional de la mucosa gástrica, que empieza a hacerse evidente hacia el día 63-70 p.i. Las células de las glándulas adyacentes a las parasitadas van recuperando su estructura típica, mientras que las glándulas parasitadas continúan revestidas por el epitelio cilíndrico de células mucosas (Cordero del Campillo, 2000).

### 2.1.4. SIGNOS CLÍNICOS

La aparición de signos clínicos está asociada con la influencia de factores relacionados con el propio parásito (ciclo endógeno, hábitos alimentarios y dosis infectante) así como del hospedador (edad, receptividad, estado nutricional, estado

inmunológico), siendo, en general, la anemia el signo clínico más importante (Fig. 5) (Dargie y Allonby, 1975; Scala, 2006).



Fig. 5. Mucosa pálida en ovino debido a la anemia provocada por *H. contortus*.

Otra de las alteraciones más características, tanto en infecciones por *H. contortus* como en las producidas por otros tricostrongiloideos, es la hipoproteinemia (Abbott *et al.*, 1988), con un marcado descenso de la albúmina sérica (Abbott *et al.*, 1986; Scala, 2006). En general, se describe un incremento en la fracción gamma-globulina, relacionada con la respuesta inmunitaria, lo que unido a la hipoalbuminemia origina una disminución en el cociente albúmina/globulinas (Cordero del Campillo, 2000).

Son frecuentes también la anorexia y consiguiente reducción del consumo de alimento, posiblemente debido al dolor gástrico que origina la parasitación, sin que se descarte una reducción del apetito a nivel del sistema nervioso central producida por productos excretados-secretados por el parásito (Abbott *et al.*, 1988; Miller y Horohov, 2006).

Comúnmente, se considera que la haemonchosis puede manifestarse siguiendo tres tipos de cursos clínicos: hiperagudo, agudo y crónico (Soulsby, 1988; Urquhart *et al.*, 2001).

**Haemonchosis hiperaguda o sobreaguda:** es poco común, pero puede ocurrir en animales susceptibles y expuestos a una infección masiva de hasta 30.000 vermes; por ejemplo en animales muy jóvenes durante su primer año de pastoreo. El enorme número de parásitos provoca un rápido desarrollo de la anemia, eliminación de heces de color oscuro y una muerte súbita (Miller y Horohov, 2006) debido a la pérdida de sangre. El cuadro suele estar acompañado de una gastritis hemorrágica intensa y puede producir la muerte del animal incluso durante el periodo prepatente.

**Haemonchosis aguda:** se observa principalmente en animales jóvenes susceptibles con infecciones menos intensas que en la haemonchosis sobreaguda. La anemia puede aparecer muy rápidamente, pero permite que se desarrolle una respuesta eritropoyética. La anemia producida en este caso es menos intensa y va acompañada de hipoproteinemia y edema (submandibular o ascitis), letargia, heces oscuras, y también puede desencadenar la muerte de los animales afectados. Los recuentos de huevos fecales observados en estos casos suelen ser elevados (más de 100.000 por gramo de heces). Los animales afectados muestran en la necropsia edema generalizado y anemia, pudiéndose obtener recuentos de 1.000 a 20.000 parásitos en el cuajar, que causan numerosas y pequeñas lesiones hemorrágicas. El contenido del abomaso es fluido y de color pardo oscuro debido a la presencia de sangre digerida.

**Haemonchosis crónica:** es muy común y de considerable importancia económica, llegado a ser tan relevante como la haemonchosis aguda en áreas tropicales. Suele ser frecuente en estaciones secas prolongadas donde la reinfección no tiene especial importancia, pero en las que el pasto es muy deficiente en nutrientes. La enfermedad se produce por la infección crónica con un número bajo de parásitos (100-1.000) y suele asociarse a una morbilidad del 100% y a una mortalidad baja. Los animales afectados están débiles, puede haber caída de la lana en ovejas, síntomas de agotamiento y emaciación (Scala, 2006). La anemia y la hipoproteinemia podrían llegar a ser graves, dependiendo de la capacidad de regeneración eritropoyética del animal, sus reservas de hierro y las reservas metabólicas nutricionales del hospedador, pero por lo general no suele haber anemia grave ni edemas manifiestos. Los recuentos fecales pueden ser en ocasiones menores de 2.000 huevos por gramo de heces. En el examen *post-mortem* se observan gastritis hiperplásica y alteraciones crónicas de la médula ósea.

Como en otras nematodosis gastrointestinales la haemonchosis tiene un efecto importante sobre los parámetros productivos. Se reduce la ganancia diaria de peso, el crecimiento (Abbott *et al.*, 1988; Bricarello *et al.*, 2005) y la producción láctea o de lana (Cordero del Campillo, 2000). Además, como ocurre en otras enfermedades parasitarias, estas infecciones favorecerían el desarrollo de una serie de

reacciones en el hospedador que pueden traducirse en enfermedades secundarias o incluso la muerte (Biffa *et al.*, 2007).

### 2.1.5. LESIONES

Los signos *post-mortem* observados en los animales parasitados por *H. contortus* varían dependiendo del tipo de cuadro clínico desarrollado. En general, las membranas mucosas y la piel están pálidas, la sangre tiene un aspecto acuoso y los órganos internos están intensamente pálidos (Nettles *et al.*, 2002). Con frecuencia hay hidrotórax, fluido en el pericardio y ascitis, así como una gran caquexia y sustitución de la grasa tisular por un tejido gelatinoso de color marrón brillante; este tejido es frágil y muestra degeneración grasa. El cuajar contiene ingesta pardo-rojiza, y un gran número de gusanos que se mueven activamente si el cadáver está todavía caliente. La mucosa aparece hinchada y cubierta de pequeñas marcas rojizas (petequias), producto de las erosiones producidas por los parásitos. A los 35 días de la infección ya se observan pequeñas úlceras con hemorragias capilares. En ocasiones se observan úlceras superficiales de bordes irregulares en las que se encuentran fijados por su extremo anterior gran número de gusanos, y no es infrecuente que se pueda llegar a producir una fuerte gastritis hemorrágica (Urquhart *et al.*, 2001).

Las lesiones microscópicas han sido tratadas con detalle en el capítulo 2.1.3. **Patogénesis.** Lo más destacado son las alteraciones en las glándulas circundantes a aquellas afectadas por los nematodos gástricos; en ellas se produce una rápida división celular que origina una marcada hiperplasia, con engrosamiento de la mucosa, edema submucoso, así como un aumento del número de células plasmáticas. Los espacios intercelulares epiteliales se encuentran dilatados y los complejos de unión entre las células desaparecen (Cordero del Campillo, 2000).

### 2.1.6. DIAGNOSTICO

Debe realizarse en base a los datos clínicos, al historial epidemiológico, así como a distintos análisis de laboratorio.

#### 2.1.6.1. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS

Es difícil debido a que las manifestaciones más frecuentes (diarrea, adelgazamiento, anemia) pueden aparecer en otros procesos, parasitarios o no. Aún

así, estos signos pueden orientar y aportan información valiosa si los relacionamos con los datos epidemiológicos.

Se puede sospechar de infecciones intensas por nematodos cuando en una explotación ganadera se aprecian signos relacionados con trastornos gastrointestinales, animales en mal estado, anoréxicos e incluso muertes esporádicas. La anemia que provoca *Haemonchus*, sobre todo en animales jóvenes, puede estar asociada en ocasiones con altos índices de mortalidad y puede ser de utilidad para el diagnóstico de esta parasitosis, aunque siempre requiere de confirmación laboratorial (Soulsby, 1988; Cordero del Campillo, 2000).

Durante los últimos años se está poniendo en práctica en zonas endémicas la utilización de métodos basados en el grado de palidez de las mucosas (FAMACHA) para estimar el grado de infección por *H. contortus*. La utilización de este método podría contribuir a identificar aquellos animales con cargas parasitarias más elevadas, con lo que se podría racionalizar el uso de antihelmínticos en términos económicos, a la vez que dificultar la aparición de resistencias debido al excesivo uso de estos productos (van Wyk y Bath, 2002).

### 2.1.6.2. ANÁLISIS DE LABORATORIO

Es imprescindible para establecer un diagnóstico asertivo. Sin embargo, este diagnóstico debe ir acompañado de datos clínicos y epidemiológicos, puesto que ninguna prueba laboratorial disponible tiene por sí sola un valor determinante.

Tradicionalmente, la confirmación de la infección por *H. contortus* se ha realizado mediante estudios coprológicos, estimándose que sería necesario analizar un 10% del número total de cabezas de la explotación para obtener una adecuada estimación del grado de infección (Ballweber, 2006).

El procedimiento más comúnmente usado para detectar huevos fecales de *H. contortus* es la técnica de concentración por flotación, que se basa en la capacidad de los huevos del parásito para flotar en soluciones concentradas de azúcar, cloruro sódico, sulfato de zinc, sulfato magnésico o nitrito de sodio.

La morfología de los huevos de *H. contortus* es similar a la de otros géneros de la misma familia *Trichostrongylidae* (*Ostertagia* sp., *Trichostrongylus* sp., etc.) por lo que un diagnóstico certero debe ir precedido de cultivos fecales y observación de las características morfológicas de las L3 (Cordero del Campillo, 2000).

En ocasiones es necesario realizar un análisis cuantitativo de las muestras fecales, como indicador de la carga parasitaria. Para ello se han descrito varios procedimientos como la técnica de la doble centrifugación, el método de Stoll modificado y la técnica de McMaster, siendo esta última la más usada (MAFF, 1989; Ballweber, 2006).

Algunos autores proponen como método diagnóstico la determinación del valor del pepsinógeno sanguíneo (Cordero del Campillo, 2000), aunque ciertos estudios demuestran que no siempre existe un aumento en el pepsinógeno plasmático en los animales parasitados por *H. contortus* (Simpson *et al.*, 1997).

### 2.1.6.3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Este método de diagnóstico incluye el estudio tanto de las lesiones generales (anemia, ascitis, adelgazamiento, caquexia) como de las locales (gastritis), corroborado con la visualización de los vermes adultos en el cuajar. Es una forma de diagnóstico sencilla, pero también tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, en ovejas que acaban de experimentar el fenómeno de la autocura, o están en fase terminal de la enfermedad, la mayor parte de los parásitos pueden haber desaparecido del abomaso (Cordero del Campillo, 2000; Urquhart *et al.*, 2001). En otros casos, la muerte puede sobrevenir en ausencia de un número abundante de vermes en la luz del abomaso, a consecuencia de la acción patógena ejercida por las formas inmaduras (Miller y Horohov, 2006).

### 2.1.6.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Otros métodos que se han considerado en el diagnóstico de la haemonchosis y otras parasitosis gastrointestinales han sido distintos métodos serológicos, entre los que cabría destacar algunos test inmunoenzimáticos (ELISA), tanto para detectar reacciones serológicas frente a antígenos somáticos como frente a productos de excreción/secreción de *H. contortus* (Schallig *et al.*, 1995b; Li *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2008), bien en forma de antígenos circulantes (en muestras de suero, orina o leche) (Petit *et al.*, 1981) o, incluso, como coproantígenos (Derbala y el-Rahman, 2001). Entre los inconvenientes observados en su utilización destacan la dificultad para detectar infecciones primarias (Gill, 1991), o la aparición de reacciones cruzadas con otros tricostrongílidos (Anderson *et al.*, 1989; Cuquerella *et al.*, 1994). Para evitar las reacciones cruzadas (especialmente frente a *Teladorsagia circumcincta*), se han llevado a cabo distintos estudios en los que se ha analizado la respuesta serológica frente a antígenos específicos de vermes adultos o larvas 4 de *H. contortus*,

tanto en ganado ovino (Schallig *et al.*, 1994; Gómez-Muñoz *et al.*, 1996; Gómez-Muñoz *et al.*, 2000) como en caprino (Molina *et al.*, 1999).

### 2.1.6.5. OTROS MÉTODOS

Algunos autores han conseguido diferenciar la presencia de huevos fecales de *H. contortus* de diversos trichostrongílidos mediante la utilización de algunas lectinas como marcadores. Así, la aglutinina de cacahuete se ha observado que se une de forma específica a la superficie de los huevos de *H. contortus*. (Palmer y McCombe, 1996).

La determinación de sangre oculta en las heces ha sido utilizada también como método para determinar la severidad de la infección por *H. contortus*, a partir de un test denominada FBO (faecal occult blood). Sin embargo, este test podría dar muchos falsos positivos debido a que la presencia de sangre en las heces es compatible con otras infecciones parasitarias como la fasciolosis, coccidiosis o enfermedades de origen bacteriano (Colditz y Le Jambre, 2008).

También mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas específicas del tipo TaqMan MGB (TaqMan minor groove binder probes) para el ITS2 (second internal transcriber spacer) de la unidad de transcripción de ADN ribosómico, se han conseguido diferenciar entre las larvas de los principales nematodos gastrointestinales de rumiantes. Mediante este método, se ha llegado a observar una alta correlación (84%) entre los resultados obtenidos y las características morfológicas de las larvas observadas tras coprocultivos, por lo que se ha propuesto como una herramienta de diagnóstico fiable, rápida y adecuada para el diagnóstico de infecciones mixtas por nematodos gastrointestinales en rumiantes (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2002; Siedek *et al.*, 2006). También se ha considerado la combinación de técnicas microscópicas y moleculares (PCR a partir de ADN aislado de los huevos del parásito) para la diferenciación de géneros de la familia *Trichostrongylidae* (*H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* sp., *Cooperia oncophora*, *Oesophagostomum columbianum*, *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina*) a partir de muestras fecales (Bott *et al.*, 2009).

### 2.1.7. TRATAMIENTO

Actualmente, el control y la profilaxis de las trichostrongilidosis pasa por contemplar un conjunto de acciones que combinan los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de infección. Estas

medidas deberían diseñarse de forma específica de acuerdo con los sistemas de explotación y las condiciones climáticas (Cordero del Campillo, 2000).

### 2.1.7.1. ANTIHELMÍNTICOS SINTÉTICOS

Los fármacos que se utilizan actualmente pertenecen a los siguientes grupos farmacológicos: benzimidazoles y probenzimidazoles, imidazotiazoles, lactonas macrocíclicas y organofosforados.

#### 2.1.7.1.1. Benzimidazoles y probenzimidazoles

Todos se administran por vía oral. Se absorben rápidamente, alcanzando en 2-3 horas los niveles plasmáticos más altos. Los que más se utilizan en los rumiantes son el albendazol y el oxfendazol (Ostlind *et al.*, 2006), además de otros como el oxibendazol, parbendazol, mebendazol, fenbendazol, cambendazol y thiabendazol (Lyons *et al.*, 1993).

Este grupo de fármacos químicamente relacionados comparte los siguientes mecanismos de acción (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006):

- Inhibición de la polimerización microtubular del parásito (unión a la  $\beta$ -tubulina).
- Alteración en el aparato reproductor de los helmintos.
- Otros: inhibición de la rodoquinol fumarato reductasa, con el consiguiente desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

Dentro de los probencimidazoles se encuentra el netobimin, muy soluble en agua, por lo que se puede administrar vía oral o subcutánea. Se utiliza en ovinos por vía oral frente a vermes adultos, estadíos larvarios y larvas inhibidas de los nematodos gastrointestinales; incluso presenta actividad ovicida (Cordero del Campillo, 2000).

#### 2.1.7.1.2. Imidazotiazoles

Dentro de este grupo farmacológico se encuadra el tetramisol y el levamisol, conocidos por su eficacia frente a las formas adultas de distintas especies de nematodos gastrointestinales de los rumiantes (Ostlind *et al.*, 2006), pero no frente a los estados larvarios (menos del 80% de efectividad).

El mecanismo de acción que ejerce en los nematodos se manifiesta sobre los canales iónicos de los receptores nicotínicos de acetilcolina, permitiendo la entrada de calcio y favoreciendo la aparición de una contracción y parálisis espástica que impide su permanencia en el tracto gastrointestinal (Martin y Robertson, 2007).

### 2.1.7.1.3. Lactonas macrocíclicas

Dentro de este grupo se encuentra la ivermectina, fármaco que a dosis muy bajas (0,2 mg/k.p.v.) suele presentar una efectividad del 100% (Ostlind *et al.*, 2006). También se clasifica en este grupo la doramectina que, administrada a la misma dosis en cabras, es efectiva frente a la haemonchosis, y su efecto persiste entre los 14-25 días post-tratamiento (Molina *et al.*, 2005). Este mismo compuesto en ovino también se ha mostrado eficaz frente a otros nematodos gastrointestinales como *Teladorsagia circumcincta*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus filicollis*, *Oesophagostomum venulosum*, y *Trichuris* spp. (Dorchies *et al.*, 2001). Ambos fármacos se administran por vía oral o parenteral, con una eficacia elevada frente a adultos y estados larvarios, incluso en hipobiosis. Además, son eficaces frente a ectoparásitos. Sin embargo, el periodo de supresión es muy alto ya que se mantiene circulando al menos durante 2 semanas. Para carne, el periodo de supresión alcanza los 21 días, y no se pueden administrar en ganado lechero (Cordero del Campillo, 2000).

Otro fármaco perteneciente a este grupo es la eprinomectina, cuya eficacia se ha demostrado frente a nematodos gastrointestinales tanto en cabras como en ovejas. En cabras, mediante aplicaciones “pour-on” a dosis de 500 µg/k.p.v., resulta eficaz frente a *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Hoste *et al.*, 2004), si bien su persistencia se ve aumentada a una dosis de 1000 µg/k.p.v, prolongándose su efecto entre 10 y 17 días tras el tratamiento (Molina *et al.*, 2008). La eficacia de este fármaco también ha sido constatada por otros autores (Cringoli *et al.*, 2003) en ovinos frente a *Haemonchus contortus* y otros nematodos gastrointestinales como *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus capricola*, *Nematodirus* sp., y *Chabertia ovina*. Una ventaja de este fármaco es que puede utilizarse en animales en fase de producción láctea.

En este apartado cabe considerar también a la moxidectina, una milbemicina que ha demostrado ser altamente eficaz frente a *H. contortus*, llegando a reducir los recuentos fecales de huevos en un 90% a las 24 horas, y en un 100% a las 48 horas del tratamiento (Tyrrell *et al.*, 2002). El efecto también se evaluó en cabras, donde se obtuvieron resultados óptimos a dosis de 0,2 mg/kg, con una protección de al menos 29 días tras su aplicación (Torres-Acosta y Jacobs, 1999).

El mecanismo de acción de este grupo de fármacos está relacionado con apertura de los canales de cloro asociados a glutamato. A través de la interacción con este tipo de canales se producen cambios en la polarización neuronal o muscular de manera irreversible (Wolstenholme y Rogers, 2005).

#### 2.1.7.1.4. Organofosforados

Su efecto antihelmíntico deriva de su capacidad para inhibir la acetilcolinesterasa a nivel de las terminaciones nerviosas (Moretto, 1998). Todos tienen buena eficacia frente a los nematodos. Sin embargo, su elevada toxicidad y la aparición de otros fármacos más inocuos y de superior eficacia los ha llevado al desuso (Cordero del Campillo, 2000). Podrían constituir no obstante una alternativa cuando se haya descrito resistencia múltiple frente a otros compuestos (Vieira *et al.*, 1992).

#### 2.1.7.1.5. Derivados del amino-acetonitrilo (AADs)

Monepantel es el primer compuesto de los recientemente descubiertos derivados del amino-acetonitrilo (AADs en inglés), un conjunto de antihelmínticos desarrollados para su uso en el ganado ovino. Los AADs tienen un modo de acción único con respecto a otros antihelmínticos disponibles en el mercado. Monepantel causa una parálisis de los vermes a través de la unión a receptores específicos que sólo se encuentran en nematodos parásitos, de ahí el elevado margen de seguridad en el ganado ovino y de seguridad medioambiental. La efectividad del monepantel ha sido demostrada tanto frente a adultos de *H. contortus* (Kaminsky *et al.*, 2009) como frente a fases larvarias (L4) (Hosking *et al.*, 2009).

#### 2.1.7.2. RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS

La utilización reiterada y de forma inadecuada de estos fármacos ha favorecido el desarrollo de cepas de nematodos gastrointestinales resistentes, lo que complica su control. El fenómeno de resistencia se considera presente en un colectivo cuando el producto aplicado a dosis terapéuticas es incapaz de reducir más del 95% de los parásitos presentes (Cordero del Campillo, 2000).

La resistencia frente a *H. contortus* se ha observado en distintos lugares del mundo y frente a numerosos antihelmínticos como el thiabendazol (Webb *et al.*, 1979; Edwards *et al.*, 1986; Rufener *et al.*, 2009), fenbendazol (Barton *et al.*, 1985; Yadav *et al.*, 1993; Smith, 2007), oxfendazol (Love *et al.*, 1992; Borgsteede *et al.*,

1997; Jabbar *et al.*, 2008), albendazol (Bauer *et al.*, 1988; Gill, 1996; Soutello *et al.*, 2007) y otros benzimidazoles (Green *et al.*, 1981; Dorny *et al.*, 1993). También se ha descrito resistencia antihelmíntica frente a otros fármacos como el levamisol (Barton *et al.*, 1985; Kerboeuf *et al.*, 1988; Howell *et al.*, 2008), closantel (Love *et al.*, 1992; Yadav *et al.*, 1993; Lloyd *et al.*, 2000), morantel (Uppal *et al.*, 1992; Singh y Yadav, 1997), ivermectina (Uppal *et al.*, 1992; Yadav *et al.*, 1993; Höglund *et al.*, 2009), tiofanato (Uppal *et al.*, 1992; Waruiru *et al.*, 1997), rafoxanida (Waruiru *et al.*, 1997; Boersema y Pandey 1997; Ram *et al.*, 2007), pamoato de pirantel (Uhlinger *et al.*, 1992), moxidectina (Sivaraj *et al.*, 1994; Condi *et al.*, 2009) y organofosforados (Green *et al.*, 1981).

A pesar de la elevada eficacia de los antihelmínticos modernos, en la mayoría de las ocasiones es posible la supervivencia de un pequeño número de vermes, cuya progenie, con el tiempo, será responsable de la aparición de problemas de resistencia (Jabbar *et al.*, 2006). Entre los factores que favorecen la aparición de estos fenómenos se encuentran el elevado potencial biótico de los parásitos, así como las condiciones climáticas que favorecen la supervivencia de los estados larvarios o la administración frecuente del mismo fármaco o grupos antihelmínticos. En el caso concreto de *H. contortus*, en zonas tropicales húmedas, este tipo de resistencia llega a observarse tras el establecimiento de 10 a 15 tratamientos, especialmente cuando se utiliza el mismo producto (van Wyk *et al.*, 1989; Shoop, 1993; Dorny *et al.*, 1994).

Otro factor a tener en cuenta es la administración de dosis subterapéuticas (Edwards *et al.*, 1986; Cordero del Campillo, 2000) ya que esta práctica puede permitir la supervivencia de vermes heterocigóticos resistentes (Smith, 1990). En este sentido, es importante tener en cuenta la variación en la biodisponibilidad de diferentes especies hospedadoras también a la hora de adoptar una decisión sobre la dosis de administración correcta (Jabbar *et al.*, 2006). Así, la biodisponibilidad de los benzimidazoles y del levamisol es mucho menor en cabras que en ovejas, por lo que las cabras necesitan, para ser tratadas, dosis 1,5 o 2 veces mayor que las ovejas (Hennessy, 1994). Durante muchos años, sin embargo, ovejas y cabras se han venido tratando de forma sistemática con la misma dosis de antihelmíntico sin tener en cuenta las diferencias en su metabolismo, lo que podría explicar el hecho de que la resistencia a antihelmínticos sea muy frecuente y generalizada en la especie caprina (Jabbar *et al.*, 2006).

Por último, otros factores que parecen favorecer la aparición de fenómenos de resistencia antihelmíntica son el transporte de animales afectados con cepas resistentes de unas explotaciones a otras (Várady *et al.*, 1994), o la explotación conjunta de ovejas y cabras (Jackson, 1993).

La trascendencia de la resistencia antihelmíntica ha suscitado la realización de estudios encaminados a esclarecer los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de su aparición, a fin de prevenir su desarrollo. Así, la resistencia frente a benzimidazoles se ha asociado a mutaciones de los genes de las  $\beta$ -tubulina isotipo I y II en *H. contortus* y otros nematodos gastrointestinales como *Trichostrongylus colubriformis* y *Teladorsagia circumcincta* (Kwa *et al.*, 1994; Roos *et al.*, 1995; Elard *et al.*, 1996).

Inicialmente algunos autores desmintieron que el mecanismo de resistencia frente a ivermectinas estuviese también relacionado con una alteración en la unión de este fármaco a receptores de canales cloruros dependientes de glutamato (Rohrer *et al.*, 1994). Sin embargo, nuevos estudios han desvelado que existía una asociación entre el gen codificador de la subunidad GluCl $\alpha$ 3 (codificador de canales cloruros dependientes de glutamato) y la resistencia a ivermectina de *Cooperia oncophora*, lo cual podría ser aplicado también a *H. contortus* dada la estrecha relación que existe en esta subunidad entre ambos nematodos (Njue y Prichard, 2004). Adicionalmente, se ha encontrado asociación entre el gen codificador de la subunidad- $\alpha$  de un canal cloruro dependiente de glutamato y la resistencia a la ivermectina (Blackhall *et al.*, 1998b) así como con determinadas mutaciones relacionadas con la glicoproteína-P presente en este tipo de nematodos (Xu *et al.*, 1998, Sangster *et al.*, 1999; Bartley *et al.*, 2009).

El mecanismo de resistencia del levamisol no ha sido aclarado completamente, pero se cree que está relacionado, ya sea con una reducción del número de receptores de la acetilcolinesterasa tipo nicotínico o por una disminución de la afinidad de estos receptores para la droga (Sangster, 1996).

### 2.1.7.3. PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

La imposibilidad de algunos ganaderos de disponer de antihelmínticos sintéticos, así como la cada vez más frecuente aparición de resistencia a antihelmínticos han estimulado la búsqueda de alternativas de lucha frente a los nematodos gastrointestinales en diversas regiones del mundo. En este sentido se han estudiado muchas especies de plantas con diversos efectos sobre las distintas fases del ciclo vital de *H. contortus*. Así, diversos componentes de algunas plantas pueden provocar la muerte del verme adulto, la parálisis y/o muerte de las L3 infectantes, la inhibición de la eclosión de los huevos, la alteración en la migración de las L3 o incluso la alteración del desenvainamiento de las mismas.

## 2. Revisión Bibliográfica

**Tabla 1.** Estudios realizados en plantas con actividad antihelmíntica

PLANTA	TIPO DE ENSAYO	EFECTO	REFERENCIA
<i>Acacia nilotica</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Frente a adultos, larvas y huevos	(Bachaya <i>et al.</i> , 2009)
<i>Achillea millifolium</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Frente a adultos	(Tariq <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Albizia anthelmintica</i>	<i>in vivo</i>	Reducción carga parasitaria	(Gradé <i>et al.</i> , 2008)
<i>Annona squamosa L.</i>	<i>in vitro</i>	Inhibición eclosión de huevos	(Souza <i>et al.</i> , 2008)
<i>Artemisia absinthium</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Frente a adultos	(Tariq <i>et al.</i> , 2009)
<i>Azadirachta indica A. Juss.</i>	<i>in vivo</i>	Reducción carga parasitaria	(Chagas <i>et al.</i> , 2008)
<i>Caesalpinia crista</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Adulticida e inhibe eclosión de huevos	(Jabbar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Calotropis procera</i>	<i>in vitro</i>	Parálisis temporal o muerte de vermes	(Iqbal <i>et al.</i> , 2005)
<i>Chenopodium album</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Adulticida e inhibe eclosión de huevos	(Jabbar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>in vitro</i>	Reduce huevos por gramo de heces (HPG) y vermes	(Egualé <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Cucurbita moschata</i>	<i>in vitro</i>	Eclosión de huevos, migración de larvas 3, motilidad de adultos y desarrollo larvario	(Marie-Magdeleine <i>et al.</i> , 2009)
<i>Hedera helix</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Reduce HPG y vermes	(Egualé <i>et al.</i> , 2007a)
<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>in vitro</i>	Frente a L3	(Ademola e Idowu 2006; Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>in vitro</i>	Frente a huevos y larvas	(Camurça-Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008)
<i>Maesa lanceolata</i>	<i>in vitro</i>	Larvicida y ovicida	(Tadesse <i>et al.</i> , 2009)
<i>Melia azedarach</i>	<i>in vitro</i>	Larvicida y eclosión de huevos	(Maciel <i>et al.</i> , 2006)
<i>Nicotiana tabacum L.</i>	<i>in vitro</i>	Parálisis o muerte en los vermes	(Iqbal <i>et al.</i> , 2006b)
<i>Nonomuraea turkmeniaca</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Larvicida y adulticida	(Ayers <i>et al.</i> , 2007a)
<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>in vivo</i>	Reduce la carga parasitaria	(Barrau <i>et al.</i> , 2005; Brunet <i>et al.</i> , 2008)
<i>Plectranthus punctatus</i>	<i>in vitro</i>	Larvicida y ovicida	(Tadesse <i>et al.</i> , 2009)
<i>Scutia myrtina</i>	<i>in vitro</i>	Muerte del parásito	(Ayers <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Sericea lespedeza</i>	<i>in vivo</i>	Reduce HPG y vermes	(Lange <i>et al.</i> , 2006; Terrill <i>et al.</i> , 2007)
<i>Struthiola argentea</i>	<i>in vitro</i>	Inhibición motilidad larvaria	(Ayers <i>et al.</i> , 2008)
<i>Swertia chirata</i>	<i>in vivo</i>	Reduce HPG	(Iqbal <i>et al.</i> , 2006a)
<i>Ziziphus nummularia</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Frente a adultos, larvas y huevos	(Bachaya <i>et al.</i> , 2009)

En la **Tabla 1** se recoge una breve revisión de las principales plantas en las que se ha estudiado el efecto antihelmíntico frente a *H. contortus* y otros nematodos gastrointestinales.

### 2.1.8. PROFILAXIS Y CONTROL

Como se ha comentado en el capítulo de tratamiento y resistencia a antihelmínticos, es obvio y necesario tomar medidas complementarias y/o alternativas al uso de antihelmínticos. Este apartado se ha desarrollado desde distintos enfoques, que podrían ser complementarios entre sí: manejo del pasto, control biológico, nutrición, vacunación, y enfoque genético (Stear *et al.*, 2007).

#### 2.1.8.1. MANEJO DEL PASTO

Se considera de gran importancia la adaptación del tipo de manejo del pasto a las condiciones climáticas de la zona o región, puesto que cada parásito se adapta a las condiciones locales. El objetivo principal de la mayoría de los actuales regímenes de pastoreo consiste en aumentar al máximo la utilización de los pastos disponibles para el ganado, a la vez que disminuir la cantidad de larvas infectantes (L3) en el pasto y en definitiva limitar en lo posible el contacto entre hospedadores y parásitos (Stear *et al.*, 2007).

La rotación de los pastos es una alternativa ampliamente utilizada que consiste en realizar el pastoreo de manera secuencial, de modo que la reutilización de las zonas de pastoreo se desarrolle con seguridad, es decir, una vez que los estados preparásiticos hayan muerto. No obstante, este sistema no es factible en todos los casos, ya que se necesitan amplias zonas de pastoreo y porque existen especies parásitas que muestran una supervivencia prolongada en el medio, como ocurre en el caso de *H. contortus* (Stear *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2009).

Si bien el uso alternativo del pasto ha sido un método utilizado históricamente, la falta de recursos hace que en muchos casos sea necesaria la utilización del mismo pasto año tras año, con el consiguiente aumento de la carga de larvas infectantes y riesgo de infección. Ante estas dificultades, se han planteado otras posibilidades como la alternancia de cultivos agrícolas y posterior pastoreo del ganado, así como la utilización de distintas especies de herbívoros. Este último método sería, no obstante, inadecuado si lo que se pretende es alternar caprino y ovino, puesto que ambas especies pueden verse infectadas por *H. contortus* (Soulsby, 1988; Cordero del Campillo, 2000; Stear *et al.*, 2007). Recientemente también se han conseguido buenos resultados en el control de *H. contortus* gracias al llamado

pastoreo rotacional intensivo, realizando periodos cortos de pastoreo y espaciando varios meses la utilización de la misma zona (Colvin *et al.*, 2008). Así mismo, podría ser una buena opción alternar animales adultos, que normalmente presentan menores cargas parasitarias y menor eliminación de huevos, con animales jóvenes, por lo general más susceptibles (Soulsby, 1988; Cordero del Campillo, 2000; Stear *et al.*, 2007).

Otra posibilidad podría ser la disminución de la densidad del rebaño, puesto que un menor número de hospedadores permitiría una menor eliminación de huevos en el pasto y con ello disminuiría la posibilidad del contagio para otros animales (Soulsby, 1988; Stromberg, 1997). Sin embargo, la reducción del número de huevos no tiene porqué conducir a una reducción proporcional en la disponibilidad de las larvas infectantes, además de que es un método poco rentable en algunos sistemas de producción (Stear *et al.*, 2007).

### 2.1.8.2. CONTROL BIOLÓGICO

Otra alternativa que se puede llevar a la práctica se basa en el control biológico de las formas larvianas. Las opciones son varias, entre ellas el uso de hongos con actividad larvicida sobre las larvas en el pasto, como es el caso de *Duddingtonia flagrans*, que ha demostrado su capacidad de disminuir la intensidad y severidad de las infecciones (Waller *et al.*, 2004b; Casillas Aguilar *et al.*, 2008) sin producir un efecto negativo sobre nematodos no parásitos que viven en el suelo (Knox *et al.*, 2002). Para un control óptimo, las dietas diarias de los animales necesitan suplementos de esporas de este hongo (Waller y Thamsborg, 2005; Casillas Aguilar *et al.*, 2008), considerándose la determinación de la dosis diaria el principal inconveniente de este tipo de control (Stear *et al.*, 2007).

Otro método para el control biológico de *H. contortus* tiene como objetivo la descomposición o el enterramiento del material fecal, ya que un aumento de la tasa de degradación de las heces podría llevar asociada una degradación de las larvas, en ocasiones por su exposición a las inclemencias del tiempo (Williams y Warren, 2004). Aunque lo contrario también puede ocurrir, puesto que una lenta degradación del material fecal puede impedir el movimiento de las larvas hacia el pasto (Vlassoff *et al.*, 2001). La degradación fecal depende del tipo de pasto o forraje (Niezen *et al.*, 1998; Williams y Warren, 2004), de la densidad y distribución espacial de las heces (Williams y Warren, 2004) y de la presencia de animales pastando (Williams y Warren, 2004). También se debe tener en cuenta que las heces enterradas por escarabajos del estiércol pueden servir para proteger las larvas del parásito (Waghorn *et al.*, 2002).

Por último, se han realizado estudios que demuestran que ovejas que pastan en campos con algunas especies de plantas como la achicoria (*Cichorium intybus*) o un tipo de forrajera llamada “cuernecillo” o “loto de los prados” (*Lotus corniculatus*), presentan una menor eliminación de huevos que ovejas que pastan en otro tipo de campos (Waller y Thamsborg, 2005). Así mismo, se ha demostrado, al comparar varios tipos de forraje, que en los de la forrajera *Andropogon gayanus* había una menor cantidad de L3 de *H. contortus* (Oliveira et al., 2009). Entre las posibles circunstancias que podrían explicar el efecto de esta planta estarían: 1) el aumento de proteínas y/o oligoelementos en la dieta del hospedador que pudiesen incrementar su inmunidad y reducir la patología por aumento de la reparación de tejidos; 2) la disminución del desarrollo o supervivencia de las fases larvarias debido a la toxicidad directa de las plantas (Marley et al., 2003).

### 2.1.8.3. SUPLEMENTOS NUTRICIONALES

La alimentación suplementaria es un método de control frente a nematodos. Sin embargo, el principal inconveniente para la adopción más generalizada de esta solución es en gran parte financiero, tanto por el costo de los suplementos como por el trabajo adicional que se requiere (Stear et al., 2007).

Una de las manifestaciones clínicas que se presentan en la haemonchosis, al igual que en otras trichostrongylidosis, es la hipoproteïnemia (Abbott et al., 1988) y, por tanto, los signos clínicos pueden prevenirse o reducirse mediante el suplemento de proteínas en la dieta antes y durante la infección (Coop et al., 1995; Nnadi et al., 2007); además, el aporte proteico alivia algunos cambios fisiopatológicos asociados a esta parasitosis (Nnadi et al., 2007). La utilidad del suplemento de proteínas en la dieta para prevenir o reducir los signos clínicos en infecciones por *H. contortus* también ha sido demostrada por diversos autores (Abbott et al., 1986, 1988; Wallace et al., 1999), algunos de los cuales ha señalado que este tipo de dieta podría favorecer el desarrollo de una la respuesta inmune efectiva frente al parásito (Strain y Stear, 2001), y probablemente ayudar a reparar la mucosa dañada. Un suplemento proteico en la dieta podría ser beneficioso durante el periodo del parto, donde aumenta el recuento de huevos en heces debido a una disminución de la inmunidad, o bien durante las etapas tempranas de la gestación (Valderrábano et al., 2006).

Algunos estudios han demostrado que la dieta suplementada con urea en corderos infectados con *H. contortus* es capaz de elevar los niveles de albúmina plasmáticos y el hematocrito, así como de producir un aumento en la ganancia media diaria de peso y del apetito de los animales (Wallace et al., 1998).

Además del efecto positivo de las dietas con suplementos proteicos, se ha observado que ciertos oligoelementos como el hierro, el zinc, el cobre o el molibdeno podrían actuar reforzando la resistencia del hospedador a las infecciones por nematodos, por lo que su empleo podría incluirse también entre las estrategias de control de las nematodosis gastrointestinales (Koski y Scott, 2003).

### 2.1.8.4. INMUNOPROFILAXIS

Para el control inmunoprolifático de las enfermedades parasitarias producidas por nematodos se han seguido estrategias distintas, en base a las cuales se reconocen actualmente tres tipos principales de vacunas: vacunas atenuadas (Bain, 1999), vacunas frente a antígenos naturales (Meeusen y Piedrafita, 2003) y vacunas frente a antígenos ocultos (Knox *et al.*, 2003).

#### 2.1.8.4.1. Vacunas atenuadas

Las principales vacunas atenuadas ensayadas frente a *Haemonchus contortus* han sido las obtenidas mediante irradiación de L3 infectantes. Este tipo de vacunas no tienen efecto en corderos (Smith y Christie, 1979), pero sí en ovejas adultas, que son ya de por sí menos susceptibles a la enfermedad por medio de otros mecanismos naturales. Probablemente la vacuna sólo funcionaría si se encuentran desarrollados los mecanismos naturales de inmunidad del hospedador (Stear *et al.*, 2007). Frente a otros nematodos gastrointestinales de rumiantes, también se han realizado algunos ensayos de vacunación con larvas irradiadas, como las llevadas a cabo por Smith *et al.* (1982) frente a *Teladorsagia circumcincta* en ovinos adultos. Vacunas que han empleado este tipo de antígenos han sido utilizadas desde hace más de 40 años en ganado vacuno contra el nematodo pulmonar *Dictyocaulus viviparus* (Jarret y Sharp, 1963; Johnson *et al.*, 2003).

#### 2.1.8.4.2. Vacunas frente a antígenos naturales

Durante muchos años se ha intentado inducir la inmunidad frente a nematodos gastrointestinales con antígenos naturales, así como con sus formas recombinantes. Frente a *H. contortus* se han utilizado diferentes tipos, entre ellos antígenos cuticulares, antígenos de excreción/secreción (ES) larvarios y de vermes adultos (totales y fraccionados), etc., con los que se han conseguido reducciones en los recuentos fecales y en el número de vermes en abomaso de hasta el 75% (Emery, 1996). Pero muchos de los datos siguen siendo inéditos por razones comerciales, y ninguno de estos antígenos ha dado lugar a un producto registrado (Newton y Meeusen, 2003).

2.1.8.4.2.1. *Antígenos de E/S*

Los productos de excreción/secreción (ES) de los nematodos gastrointestinales pueden realizar diversas funciones, como por ejemplo permitir la penetración de las formas larvianas en el tejido, facilitar la degradación de proteínas del hospedador para alimentarse (Cox *et al.*, 1990; Karanu *et al.*, 1993), regular la respuesta inmune del hospedador y evitar la coagulación de la sangre, entre otros, lo que los han convertido en candidatos para el desarrollo de vacunas efectivas frente a estos parásitos (Joshi y Singh, 2000; Suchitra y Joshi, 2005).

Se han estudiado ciertos antígenos de E/S de bajo peso molecular (denominados *ES15* y *ES24*), los cuales son expresados tanto por las L4 como por los adultos del parásito. Estos antígenos fueron identificados utilizando anticuerpos séricos obtenidos de ovejas parcialmente inmunes durante una infección secundaria (Schallig *et al.*, 1994). En inmunizaciones con preparaciones enriquecidas con este tipo de antígenos se redujeron los recuentos fecales entre un 32 y un 77%, y la media de vermes adultos en el abomaso se redujo entre un 64 y un 85% (Schallig y van Leeuwen, 1997; Vervelde *et al.*, 2002). El mecanismo de inmunidad conferida por este tipo de antígenos no ha sido definido aún, pero se ha correlacionado con una respuesta de proliferación de células T (Schallig y van Leeuwen, 1997), niveles de anticuerpos específicos en suero IgG1, IgA o IgE (Vervelde *et al.*, 2002), y la presencia de mastocitos en abomaso (Schallig *et al.*, 1997). Se han realizado ensayos con antígenos *ES15* recombinantes con buenos resultados, aunque la eficacia no siempre fue evidente (Vervelde *et al.*, 2002). La escasa inmunoprotección de las vacunas recombinantes, en este caso, estuvo correlacionada con bajos niveles de IgG1 e IgA específicos. Por otro lado, a diferencia de lo observado con los antígenos naturales *ES15* y *ES24*, los productos recombinantes no indujeron una respuesta importante de IgE específicas en ovejas adultas. A pesar de todo, ni los antígenos naturales ni los recombinantes *ES15* y *E24* fueron capaces de inducir anticuerpos IgE o protección en corderos jóvenes (Vervelde *et al.*, 2002), un requisito para cualquier uso comercial de una vacuna frente a *H. contortus* (Newton y Meeusen, 2003).

En un estudio más reciente se ha identificado mediante Western blot la existencia de un producto de E/S de vermes adultos de *H. contortus* de 66k Da (*p66*). La proteína es capaz de inhibir la función de los monocitos *in vitro* y estimular la proliferación en células mononucleares periféricas. Además, se observó una correlación entre los niveles de anticuerpos anti-*p66* y la carga parasitaria, así como una reducción *in vitro* de la motilidad de los parásitos adultos tratados con anticuerpos específicos frente a la proteína (Rathore *et al.*, 2006).

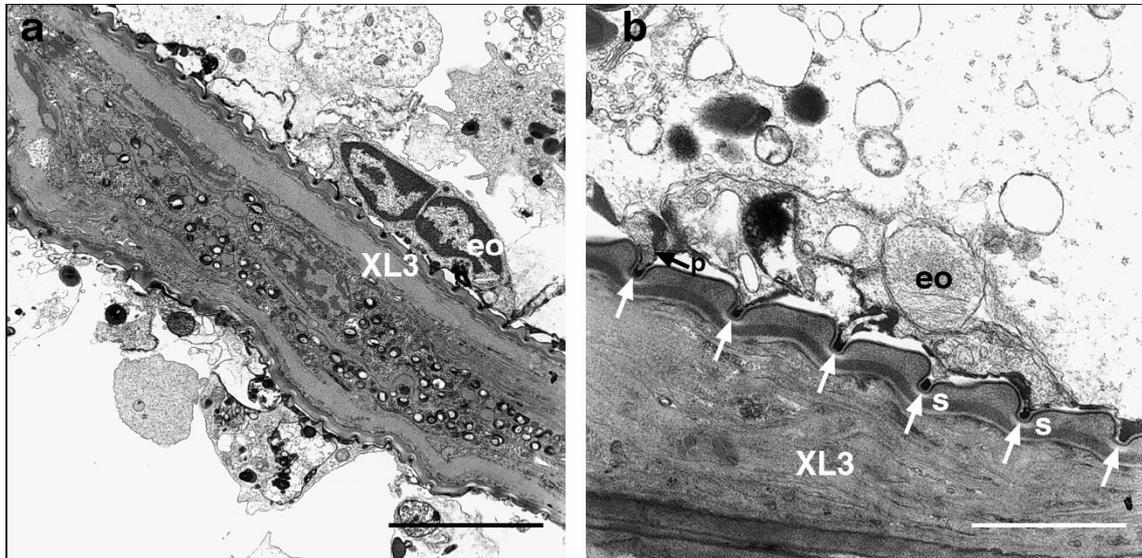
También se han empleado con éxito proteínas de productos de E/S con afinidad por grupos thiol para inmunizar al ganado ovino. El antígeno, obtenido a partir de eluciones de una columna de Thiol Sepharose mediante el uso de cisteína y Dl-dithiothreitol (DTT), fue capaz de reducir el número de huevos en las heces y la carga parasitaria en torno al 50% en ovejas inmunizadas y posteriormente inoculadas experimentalmente con 5.000 L3 de *H. contortus* (Bakker *et al.*, 2004). Así mismo, Ruiz *et al.* (2004a), utilizando fracciones solubles en PBS y enriquecidas para proteinasas tipo cisteína mediante columnas de Thiol-Sepharosa similares a las anteriores, consiguieron una importante protección en caprinos, que se tradujo en una disminución de la eliminación de huevos en heces del 89% y en una reducción del número de vermes en el abomaso del 68%. La solubilidad de las proteinasas en PBS indicaría que se trata de antígenos no necesariamente ocultos (Ruiz *et al.*, 2004a). Estos resultados contrastan con los de Knox *et al.* (1999), quienes no consiguieron inmunoprotección en ovinos inmunizados con fracciones de similares características. Estudios más recientes han revelado la capacidad inmunoprotectora en ovinos frente a *H. contortus* de una vacuna a partir de la proteínasa tipo cisteína AC-5 identificada en los productos de excreción/secreción del parásito (De Vries *et al.*, 2009). Concretamente, se consiguió una reducción de la carga parasitaria del 36% y de los recuentos fecales de huevos del 32%.

La posibilidades inmunoprotectoras de los productos de E/S de *H. contortus* fueron estudiadas en detalle por Yatsuda *et al.* (2003) mediante electroforesis bidimensional. Encontraron más de 100 proteínas, algunas no identificadas, muchas de las cuales serían susceptibles de ser utilizadas como antígenos en futuros ensayos de vacunación.

### 2.1.8.4.2.2. *Hc-sL3*

En un enfoque distinto en la identificación de antígenos mediante el uso de anticuerpos séricos, se investigaron células secretoras de anticuerpos aisladas de linfonódulos de ovejas con inmunidad inducida hacia *H. contortus*. Mediante esta metodología se logró identificar un antígeno de superficie en las L3 con aproximadamente 70-80 kDa, que se denominó *Hc-sL3* (Bowles *et al.*, 1995; Raleigh y Meeusen, 1996; Raleigh *et al.*, 1996) (Fig. 6). Las inmunizaciones con *Hc-sL3* han mostrado reducciones en el recuento fecal de huevos entre el 64 y el 69%, y entre el 45 y el 55% de la carga de vermes del abomaso (Jacobs *et al.*, 1999). La protección parece ser dependiente de la respuesta Th2 (Jacobs *et al.*, 1999), similar al mecanismo inmune desarrollado frente a nematodos en ratones (Grencis, 1996). Finalmente, también se ha observado que los eosinófilos son capaces de destruir las larvas 3 desenvainadas *in vitro* en presencia anticuerpos mono y policlonales específicos para

*Hc-sL3* (Rainbird *et al.*, 1998), en consonancia con las observaciones en las que se correlaciona la eosinofilia adquirida con la inmunidad natural frente a nematodos gastrointestinales en ovejas (Jarrett *et al.*, 1959).



**Fig. 6.** Localización del antígeno *Hc-sL3* en la superficie de L3 de *H. contortus* (Newton y Munn, 1999).

#### 2.1.8.4.2.3. *Hc40*

Es un antígeno extraído de L3 activas capaz de reducir un 65% la carga de *H. contortus* en cobayas (Sharp y Wagland, 1996). Yatsuda *et al.* (2003) encontraron también dicho antígeno junto con un amplio panel de proteínas en productos de E/S de vermes adultos del parásito, entre las que se encontraban diversas proteinasas de distinta actividad (metalo, serina y aspártico proteinasas) y otras proteínas.

#### 2.1.8.4.3. Vacunas frente a antígenos ocultos

Se designan de esta forma a un grupo de antígenos que no son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en el hospedador durante el curso de la infección natural (Munn, 1997), posiblemente porque no son accesibles a los anticuerpos ni a otros componentes del sistema inmune. La especial importancia de estos antígenos ocultos en las estrategias de inmunoprotección se debe a que no ha habido una presión selectiva mediada por la evolución de los parásitos con mecanismos que evadan la respuesta inmune. Entre este tipo de antígenos se encuentran los que se refieren a continuación.

### 2.1.8.4.3.1. H11

El antígeno oculto mejor caracterizado de *H. contortus* es una glicoproteína de la membrana del intestino denominada H11 (Smith *et al.*, 1993b). El antígeno H11 originario, procedente de vermes adultos, ha sido testado en un gran número de ensayos de vacunación en distintas razas, incluyendo corderos jóvenes, en los que induce niveles altos de anticuerpos específicos y una importante reducción de los recuentos fecales de huevos y de la carga de vermes en el abomaso (Newton y Munn, 1999).

Mediante clonación de cDNA se demostró que el antígeno H11 es una aminopeptidasa microsomal (Graham *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997) que posiblemente está implicada en el desglose final de pequeños péptidos que son producidos por la digestión de las proteínas de la dieta (Munn y Munn, 2002), de ahí la hipótesis de que el mecanismo de protección sea inducido por anticuerpos que alteran la absorción de nutrientes. Han sido descritas tres isoformas del H11, que son idénticas en aproximadamente un 65% a nivel de su secuencia de aminoácidos (Graham *et al.*, 1993). También ha sido clonado un cDNA que codifica una cuarta isoforma y una secuencia marcada extraída para una quinta isoforma está ya presente en las bases de datos. La eliminación de la terminal-N de la secuencia de anclaje produce una forma soluble natural del antígeno H11 (denominado H11S) que induce igual protección que la proteína en toda su longitud en los ensayos de vacunación (Graham *et al.*, 1993). Aunque el éxito con la vacuna de antígenos solubles naturales H11 fue el primero que se notificó en la literatura, y unos clones de cDNA fueron patentados en 1993 (Graham *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993b), esta vacuna aún no ha sido comercializada, principalmente debido a problemas con la forma recombinante de los antígenos. De este modo, a pesar de que la inmunización de ovinos con moléculas recombinantes del H11S inducían niveles altos de anticuerpos que reaccionaban de manera cruzada con el antígeno natural H11S y que inhibía la actividad aminopetidasa de ambos (natural y recombinante) en ensayos *in vitro* (Newton y Meeusen, 2003), las ovejas no mostraron protección frente a *H. contortus* (Newton *et al.*, no publicado). Si se consiguieron resultados satisfactorios de inmunoprotección con una nueva forma recombinante de H11 diseñada con posterioridad (Reszka *et al.*, 2007).

### 2.1.8.4.3.2. H-gal-GP

Una segundo tipo de antígeno oculto procedente de la membrana del intestino de *H. contortus*, denominado H-gal-GP, también se ha mostrado capaz de inducir altos niveles de protección, con reducciones en los recuentos de huevos en

heces próximos al 90% y del 60% en las cargas parasitarias (Newton y Munn, 1999; Smith, 2007). El antígeno H-gal-GP es un complejo de proteínas cuyo tamaño oscila entre 31 y 230 kDa cuando se analiza mediante SDS-PAGE (Smith y Smith, 1996; Smith *et al.*, 1999), y está provisto de actividad aspartil proteínasa, metaloproteínasa neutra y proteínasa tipo cisteína (Smith *et al.*, 1999). La presencia de esta actividad proteínasa sugiere que, como ocurría con el antígeno H11, el mecanismo de inmunidad proporcionado por H-gal-GP pudiera estar relacionado con la interrupción de la digestión. Aunque se ha conseguido inmunoprotección parcial con algunas fracciones de H-gal-GP separadas a partir de geles en condiciones no desnaturizantes (Smith *et al.*, 1999), el fraccionamiento completo y, por tanto, la identificación de los componentes realmente activos no ha sido posible (Knox y Smith, 2001). Existen pruebas de que al menos 3 de las 4 metaloproteínasas neutras que integran el complejo no contribuyen a la protección (Smith *et al.*, 2000a), como tampoco contribuyen las formas recombinantes de este tipo de metaloproteínasas y de proteínasas tipo aspartil, también integrantes de H-gal-GP (Redmond *et al.*, 2004). Mediante clonación de ADN complementario se han identificado también un homólogo de la trombospondina (Skuce *et al.*, 2001), una galectina (Newlands *et al.*, 1999) y una cistatina (Newlands *et al.*, 2001) como componentes del antígeno H-gal-GP, pero las versiones recombinantes de estas proteínas no han demostrado tener actividad protectora en ovinos (Skuce *et al.*, 2001). En contraste, otros autores han obtenido porcentajes de reducción en los recuentos fecales de huevos y la carga parasitaria entre el 40-50% en caprino infectado con *H. contortus* utilizando como antígeno galectinas recombinantes (rHco-gal-m y rHco-gal-f) (Yanming *et al.*, 2007).

Más recientemente, algunos autores han probado la eficacia de una vacuna combinada entre el antígeno H11 y el H-gal-GP con resultados satisfactorios en ovinos infectados de forma natural por *H. contortus* a partir de pastos contaminados. Los animales inmunizados presentaron altos niveles de IgG1 e IgG2 específicos frente al antígeno empleado en la vacuna, y los valores de IgA e IgE aumentaron al final de la experiencia, probablemente debido a la exposición natural al parásito (LeJambre *et al.*, 2008). Por último, también se ha intentado sin éxito inducir un sinergismo mediante la inmunización con H-gal-GP y el uso de antihelmínticos como la ivermectina o el fenbendazol en ovejas inoculadas con una cepa del parásito resistente a ambos fármacos (Smith, 2007).

#### 2.1.8.4.3.3. *Proteínasas tipo cisteína*

La vacunación con productos extraídos con detergentes (Triton X-100) procedentes de vermes adultos enriquecidos para proteínasas tipo cisteína de membrana de intestino (TBSP), han mostrado una reducción media del recuento

---

fecal de huevos y de la carga parasitaria del 77% y 47%, respectivamente (**Knox y Smith, 2001**). Las proteinasas tipo cisteína presentes en TBSP han sido clonadas mediante cDNA y han resultado tener secuencias similares a la catepsina B (**Skuce et al., 1999a**), y gran semejanza con proteinasas tipo cisteína previamente obtenidas por extracción acuosa de adultos de *H. contortus* (**Pratt et al., 1992**). Un importante componente de 60 kDa de TSBP ha demostrado ser una glutamato deshidrogenasa (**Skuce et al., 1999b**), sin embargo, esta proteína se expresa en el citoplasma de las células intestinales y parece no contribuir a la protección (**Skuce et al., 1999b; Knox et al., 1995a**). Los anticuerpos de ovejas inmunizadas con TBSP son capaces de inhibir la actividad proteínasa tipo cisteína de TBSP *in vitro* (**Knox et al., 2005**) por lo que el mecanismo de inmunidad podría estar mediado por anticuerpos que inhibirían la digestión de proteínas.

También los productos recombinantes de proteinasas tipo cisteína parecen ser capaces de reducir la carga parasitaria (27%) y el recuento fecal de huevos (29%) en ovejas (**Redmond y Knox, 2006**). A partir de estos resultados, se ha propuesto incluso la posibilidad de obtener una vacuna recombinante a partir de la extracción y purificación de proteinasas tipo cisteína (del tipo de la catepsina L) de *Caenorhabditis elegans*. Aunque se ha demostrado que las proteinasas extraídas son enzimáticamente activas y están glicosiladas (**Murray et al., 2007**), hasta el momento no hay datos de efectividad *in vivo*.

Todo lo referente a las proteinasas tipo cisteína, incluyendo su potencial como antígenos inmunoprotectores será abordado con mayor profundidad en capítulos posteriores.

#### 2.1.8.4.3.4. Otros antígenos ocultos

Se han ensayado igualmente otros antígenos ocultos que confieren inmunoprotección frente a *H. contortus*. Un ejemplo es el polímero denominado *contortina* obtenido a partir de adultos del parásito, que es capaz de reducir la carga parasitaria en un 78% en ovinos vacunados (**Munn et al., 1987**). Por su parte, los antígenos denominados *p52* y *p46* indujeron protección en cabras y ovejas inmunizadas reduciendo la carga de vermes adultos en el abomaso (33% en ovino y 60% en caprino) y el recuento de huevos en heces (78% en ovino y 50% en caprino) (**Jasmer et al., 1993; Smith et al., 2000b**). Los antígenos *p52* y *p46* formarían parte de una poliproteína denominada GA1 (**Jasmer et al., 1993; Jasmer et al., 1996**). **Smith et al. (1993b)** detectaron también un grupo de tres proteínas que fueron separadas de la denominada H11 por cromatografía de intercambio iónico, logrando reducir en aproximadamente un 70% los recuentos fecales, y en torno al 30% los recuentos de

vermes de *H. contortus*. Se identificaron tres péptidos de 45, 49 y 53 kDa (p45, p49 y p53, respectivamente) y se incluyeron dentro del denominado complejo p150, que presentaba cierta similitud con la proteína GA1. También se han obtenido resultados positivos a partir de fracciones somáticas purificadas de bajo peso molecular, las denominadas *p26/23*, que fueron capaces de estimular la respuesta inmune tanto a nivel local como general, con reducciones en torno al 60% tanto en los recuentos fecales como en la carga parasitaria. Además, los animales inmunizados que desarrollaron un mayor grado de protección pudieron reconocer algunos péptidos de alto peso molecular (34 a 65 kDa) en extractos del parásito adulto (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Domínguez-Toraño *et al.*, 2003). Recientemente, en estudios de aislamiento e inmunocalización, se ha observado que dichos antígenos se encuentran en los cordones hipodermales del parásito (García-Coiradas *et al.*, 2009).

#### 2.1.8.5. ENFOQUE GENÉTICO

Existen razas genéticamente resistentes a las gastroenteritis parasitarias de los pequeños rumiantes. Suelen ser razas locales, muy adaptadas al hábitat en el que viven, y que pueden proporcionar *per se* una alternativa para el control de la haemonchosis. Estos animales poseen la habilidad de evitar el establecimiento y/o el consiguiente desarrollo de la infección parasitaria, pudiendo llegar a mantener la producción a pesar de presentar una parasitación por nematodos gastrointestinales. Es por este motivo por lo que la FAO enfatiza sobre en la importancia de conservar y potenciar este tipo de razas (FAO, 2004).

Se han realizado numerosos estudios que demuestran la mayor resistencia de ciertas razas de ovino frente a otras más susceptibles a la enfermedad. Así, en Kenya, la raza local Red Massai es más resistente que razas importadas como la Dorper (Nguti *et al.*, 2003; Mugambi *et al.*, 2005). Razas como la Gulf Coast Native han mostrado también ser más resistentes que otras como la Suffolk (Bahirathan *et al.*, 2000; Shakya *et al.*, 2009). Así mismo, se han documentado razas con un gran grado de resistencia frente a la haemonchosis, como la St Croix (Gamble y Zajac, 1992), la Garole india (Nimbkar *et al.*, 2003) y la Barbados Blackbelly (Aumont *et al.*, 2003). La oveja de pelo Caribeña y la Katahdin también han demostraron ser más resistentes a la enfermedad que razas más seleccionadas como la Dorper y la Dorset (Vanimisetti *et al.*, 2004; MacKinnon *et al.*, 2009). Por último, la oveja canaria de pelo conocida como pelibuey ha mostrado ser más resistentes a la infección por *H. contortus* que otras razas ovinas (González *et al.*, 2008a).

Aunque es menos evidente que en ovino, también existen razas de ganado caprino resistentes de manera natural, o capaces de tolerar mejor una infección por

*H. contortus*, como por ejemplo la cabra enana de África Occidental (**Chiejina et al., 2002; Behnke et al., 2006**). Otras razas caprinas, como la natural de Thai ha mostrado una mayor resistencia a la infección por *H. contortus* que el cruce con la Anglo-Nubian (50% natural de Thai-50% Anglo-Nubian) (**Pralomkarn et al., 1997**). También la cabra pequeña del este de África (**Baker et al., 1998**) y la raza caprina Creole se han descrito como razas con cierta resistencia frente a las nematodosis gastrointestinales (**Mandonnet et al., 2001; Bambou et al., 2009**).

Hay también estudios que señalan una mayor resistencia frente a las nematodosis gastrointestinales en los cruces entre razas. En este sentido se ha demostrado que el cruce entre las razas Border Leicester y Merino es más resistente que la raza merina pura (**Donald et al., 1982**), del mismo modo que el cruce de Merino con Rhoen (**Hielscher et al., 2006**). Un fenómeno similar se ha observado en Nueva Zelanda al cruzar ovejas Texel y Romney (**Niezen et al., 1996**).

Habitualmente, las razas locales resistentes, o sus cruces, son más pequeñas en tamaño que las razas susceptibles, probablemente debido a la necesidad de emplear los recursos en combatir la enfermedad y reparar los daños (**Stear et al., 2007**). Por este motivo, en algunos casos es muy difícil sustituir una raza por otra de menor productividad. Es lo que ocurre en Australia en la industria de la lana y en la industria lechera en el mundo occidental. En estos casos, se está tratando de aprovechar la variación genética dentro del colectivo, seleccionando aquellos individuos dentro de la misma raza con características ventajosas en términos productivos y de resistencia natural a las infecciones por nematodos gastrointestinales (**Kloosterman et al., 1978; Gray et al., 1987; González et al., 2008b**).

### 2.1.8.6. CONTROL INTEGRADO

Como se ha revisado en los apartados anteriores, el control de las nematodosis gástricas puede enfocarse de distinta manera, y son muchas las posibilidades de elección, pero no existe un método que recomiende excluir a los otros. Lo apropiado sería más bien tratar de combinar distintos métodos de control. El control integrado implica un uso racional de una combinación de controles biológicos, biotecnológicos y químicos, con medidas de manejo o estrategias genéticas para así reducir el uso de agentes químicos al mínimo.

Como ejemplo, una de las combinaciones que ha sido investigada es la actuación sobre dieta y resistencia genética. En este sentido, **Abbott et al. (2000)** investigaron el efecto de un suplemento de proteínas en la dieta en animales

relativamente resistentes, raza ovina de cara negra escocesa (Scottish Blackface breed), y en ovinos relativamente susceptibles Finn-Dorset. Tras la infección con *H. contortus* se observó que los efectos más severos en la raza Finn-Dorset se presentaban en los grupos en los que se administró una dieta baja en proteínas, mientras que en la raza resistente no se encontraron diferencias entre los animales que recibieron un suplemento proteico y los que no (Abbott *et al.*, 2000). Estos mismos resultados se obtuvieron al comparar la raza Hampshire Down con la Scottish Blackface (Wallace *et al.*, 1995; 1996) y en corderos de una raza seleccionada de Merino (Kahn *et al.*, 1999).

## 2.2. PROTEINASAS

### 2.2.1 ESTRUCTURA, TIPOS Y FUNCIÓN

Las proteinasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas y para ello utilizan una molécula de agua, por lo tanto se pueden clasificar como hidrolasas. Hoy día los términos “peptidasa”, “proteasa”, “proteínasa” y “enzima proteolítica”, pueden ser utilizados como sinónimos, si bien “peptidasa” es el término que recomienda el Comité de Nomenclatura del IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (Barrett y Rawlings, 2007).

Una de las características más importantes de estas enzimas es su alta especificidad. Para que una proteinasa hidrolice un enlace peptídico es necesario, entre otras cosas, una secuencia de aminoácidos concreta alrededor del enlace, ya que la mayoría reconoce aminoácidos o secuencias específicas. Otro aspecto a tener en cuenta es la accesibilidad estérica del enlace, de tal manera que si éste se encuentra en el interior hidrofóbico de las proteínas globulares, o en porciones hidrofóbicas poco accesibles, no podrá ser atacado por la proteinasa a menos que se produzca una desnaturalización previa de la proteína que permita la accesibilidad al enlace. Además de esto, son importantes las condiciones fisico-químicas del medio, puesto que las proteinasas presentan un rendimiento óptimo en unas determinadas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de factores orgánicos y/o metálicos.

El mecanismo de acción catalítico de las proteinasas suele consistir en la polarización del enlace peptídico por el ataque nucleofílico sobre el enlace carbono-oxígeno, y la donación paralela de un protón al átomo de nitrógeno. Cada tipo de proteinasa cuenta con residuos específicos que cumplen las funciones de nucleófilos

y de donadores de protones. Las proteinasas que hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de una cadena polipeptídica se clasifican como endopeptidasas, mientras que aquellas que hidrolizan los enlaces peptídicos de los aminoácidos situados en los extremos NH<sub>2</sub> o COOH se clasifican como exopeptidasas (Thomas, 2004).

Se reconocen alrededor de 2.000 tipos (especies) de peptidasas hoy en día, pero se espera que este número llegue a superar las 25.000. En la década de los 90, la mejora de los métodos de secuenciación de nucleótidos dio lugar a un rápido aumento de las posibilidades de deducir las secuencias de aminoácidos de las peptidasas. Las peptidasas fueron asignadas a familias basándose en importantes similitudes en la secuencia de aminoácidos. Algunas de esas familias fueron además agrupadas en clanes. Un clan de peptidasas fue definido como un grupo de familias para los que hay indicios de relación en su evolución, a pesar de que falten similitudes en su secuencia (Barrett y Rawlings, 2007). En 1996, un nuevo sistema de clasificación fue publicado en *World Wide Web* como base de datos de peptidasas MEROPS, y ha estado siendo actualizado cada 3 meses desde entonces (Fig. 7) (Barrett y Rawlings, 2007). Las peptidasas, según la base de datos MEROPS, se clasifican de acuerdo a las similitudes de su estructura tridimensional. Si la estructura tridimensional no está disponible, la clasificación se hace basándose en el orden de los residuos catalíticos de la cadena peptídica y las secuencias que los flanquean.

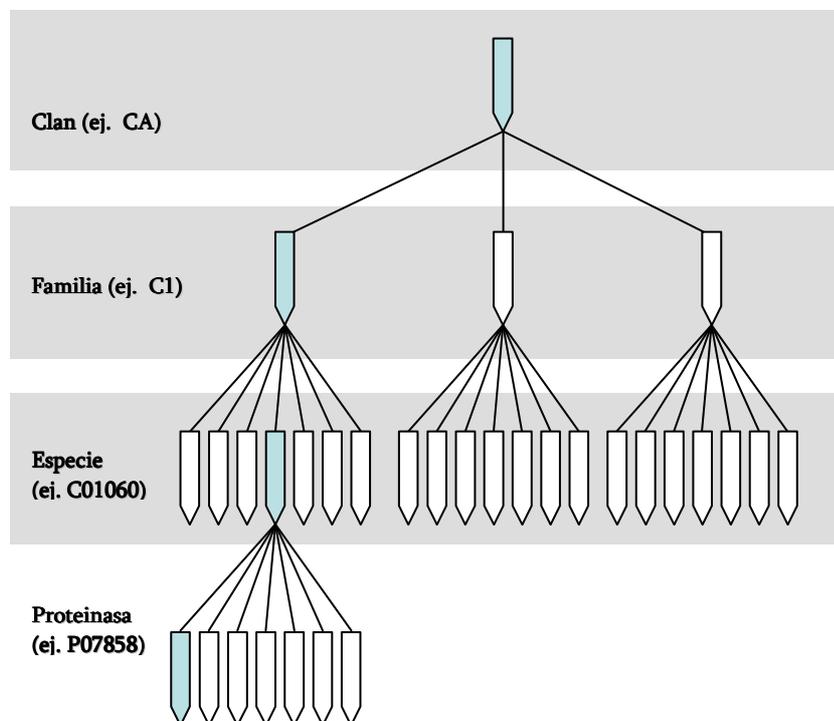


Fig. 7. Sistema de clasificación de una proteínasa (Barrett y Rawlings, 2007).

Las proteinasas pueden clasificarse siguiendo distintos criterios: especificidad de sustrato, mecanismo catalítico, localización intracelular, función en el organismo, etc., aunque su diferenciación en base al mecanismo catalítico sea quizás lo más común. Según este criterio se distinguen los siguientes tipos de proteinasas: serina proteinasas, cisteína proteinasas, aspártico proteinasas, metaloproteinasas, glutámico proteinasas, treonina proteinasas y proteinasas de mecanismo catalítico desconocido.

#### 2.2.1.1. Serina proteinasas

Las serina proteinasas son un grupo muy amplio y está formado por un total de 13 clanes, 43 familias y 15 subfamilias (Rawlings *et al.*, 2008). Constituyen una familia de enzimas que en su sitio de fijación de sustrato utilizan un residuo de serina activado de forma especial para hidrolizar catalíticamente enlaces peptídicos. Esta serina puede ser caracterizada mediante una reacción irreversible entre el grupo hidroxilo de su cadena lateral y el diisopropilfluorofosfato (DFP) (Thomas, 2004).

Estas enzimas participan en procesos fisiológicos cuidadosamente controlados, tales como la coagulación de la sangre, la fibrinólisis, la activación del complemento, la fertilización y la producción de hormonas. Se cree que diversas enfermedades como enfisemas, artritis, trombosis, metástasis cancerosas y algunas formas de hemofilia provienen de la ausencia de regulación de serina proteinasas específicas (Thomas, 2004).

Se han encontrado en *Schistosoma mansoni* (cercaria) y *Taenia saginata* (oncosfera), y en ambos casos su función parece relacionarse con la degradación de la de los tejidos para facilitar la penetración, si bien se desconoce la localización exacta de las mismas (McKerrow *et al.*, 1985a; McKerrow *et al.*, 1985b). Numerosas publicaciones describen la presencia de este tipo de proteinasas en otros parásitos. Por ejemplo, se ha demostrado que están presentes en otros nematodos como *Trichinella pseudospiralis* (Cwiklinski *et al.*, 2009), en protozoos como *Plasmodium falciparum* (Koussis *et al.*, 2009) e incluso en ácaros como *Sarcoptes scabiei* (Bergström *et al.*, 2009).

#### 2.2.1.2. Aspártico proteinasas

Este tipo de proteinasas utiliza un aspartato para llevar a cabo su función catalítica (Thomas, 2004). También conocidas como proteinasas ácidas o carboxil proteinasas, se caracterizan por la presencia de un residuo Asp en el centro activo, por ser endopeptidasas y por su dependencia de un medio de reacción muy ácido. Están clasificadas en 7 clanes, 14 familias y 16 subfamilias (Rawlings *et al.*, 2008),

entre las que se encuentra la pepsina, la renina o la retropepsina (endopeptidasa del virus del SIDA), etc.

Se han localizado en distintos parásitos, como por ejemplo *Schistosoma mansoni* (adulto) (luz intestinal), *Taenia solium* (metacestodo) o *H. contortus* (L4 y adulto), donde tienen por función la hemoglobinolisis que les ayuda en su nutrición (White *et al.*, 1992; Longbottom *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2003). En *Taenia solium* se encontró además una aspártico proteinasa con capacidad para hidrolizar inmunoglobulinas, por lo que se ha asociado con mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador (White *et al.*, 1992). Por último, la función de este tipo de proteinasas también se ha relacionado con la invasión y migración en el hospedador de las larvas del nematodo *Ancylostoma caninum* (Yang *et al.*, 2009). Este tipo de proteinasas también se han descrito en parásitos protozoos como *Plasmodium falciparum* (Bhaumik *et al.*, 2009) o *Trypanosoma cruzi* (Pinho *et al.*, 2009).

### 2.2.1.3. Metaloproteinasas

Se caracterizan por utilizar un ión metálico para poder realizar su función (Thomas, 2004). El conjunto de metaloproteinasas engloba una amplia variedad de estructuras y familias, la mayoría de las cuales son dependientes del zinc. Se conocen hasta 54 familias, con 40 subfamilias, agrupadas en 15 clanes (Rawlings *et al.*, 2008), entre las que se incluyen tanto endopeptidasas (termolisina, colagenasa y astacina) como exopeptidasas (carboxipeptidasas y aminopeptidasas).

Se han encontrado distintos tipos de metaloproteinasas en nematodos parásitos como *H. contortus* (L4 y adulto), concretamente en las células apicales intestinales, donde la proteinasa parece realizar funciones digestivas (Redmond *et al.*, 1997). En otros parásitos como *Taenia solium* (metacestodo), además del efecto favorecedor de la nutrición del parásito, se ha observado la capacidad de determinadas metaloproteinasas para hidrolizar las inmunoglobulinas (White *et al.*, 1992), al igual que se describió anteriormente para las aspártico proteinasas. Además de estas funciones, en otros parásitos como *Schistosoma mansoni* se ha observado que ciertas metaloproteinasas afectan a la actividad motora, al desarrollo de los huevos y a la viabilidad del parásito (Day y Chen, 1998). Las metaloproteinasas también se han descrito en protozoos como *Leishmania* sp. (Jaffe y Dwyer, 2003) o *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo, 2002).

#### 2.2.1.4. Glutámico proteinasas

Se han descubierto recientemente y contribuyen a la nutrición del hongo en el que se produce. Sólo se reconoce un clan con una familia (Rawlings *et al.*, 2008). Hasta el momento no se han descrito en parásitos.

#### 2.2.1.5. Treonina proteinasas

Este grupo de proteinasas se ha identificado también recientemente y sólo se ha descrito hasta el momento un clan con 4 familias y 2 subfamilias. Un ejemplo de treonina proteinasa es el precursor de la ornitina acetiltransferasa que se encuentra en *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de cerveza (Rawlings *et al.*, 2008), un hongo unicelular utilizado en la fabricación del pan, cerveza y vino. Tampoco se han descrito en parásitos.

#### 2.2.1.6. Proteinimasas tipo cisteína

Las proteinimasas tipo cisteína se catalogan como una amplia familia de enzimas genéricamente conocidas como catepsinas, que están relacionadas con la papaína. Según la base de datos de peptidasas MEROPS, existe un total de 9 clanes, 70 familias y 15 subfamilias (Rawlings *et al.*, 2008).

Estas enzimas proteolíticas desempeñan un papel importante en muchos procesos celulares normales, especialmente en relación con el recambio tisular (Gunette *et al.*, 1994; Berdowska, 2004). Además, parecen estar involucradas en determinados procesos patológicos benignos (Golde *et al.*, 1992; Berdowska, 2004), así como en el proceso de invasión cancerosa y las metástasis (Murnane *et al.*, 1991; Herszényi *et al.*, 2000). Hasta el momento, se han aislado y caracterizado 10 proteinimasas tipo cisteína lisosomales humanas: catepsinas B, L, H, S, O, K, C, W, L2 y Z. Todas ellas contienen un residuo de cisteína en el centro activo de la molécula y, en prácticamente todos los casos, se sintetizan como proenzimas que deben ser activadas para su actuación, pero que difieren en algunas características enzimáticas, incluyendo su especificidad de sustrato y su estabilidad en función del pH (Vizoso *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que las catepsinas B, L y O pueden ser secretadas por una variedad de tumores humanos o animales (Kane y Gottesman, 1990; Sloane *et al.*, 1990; Velasco *et al.*, 1994). Además, existen estudios que demuestran que las catepsina B y L están involucradas en la degradación de constituyentes de la membrana basal, como la laminina, fibronectina y el colágeno tipo IV (Kane y

Gottesman, 1990), y que la catepsina B puede favorecer la angiogénesis (Sinha *et al.*, 1995a). De acuerdo con esas observaciones, existen también estudios que indican una asociación significativa entre los valores de expresión tumoral de las catepsina B (Sinha *et al.*, 1995b) o L (Maciewicz *et al.*, 1989) con ciertos parámetros de agresividad tumoral en carcinomas de colon y próstata. Además, la expresión tumoral de la catepsina B ha sido también asociada con un peor pronóstico de los pacientes afectados de carcinoma de colon (Campo *et al.*, 1994) o mama (Foekens *et al.*, 1998; McGuire *et al.*, 1998).

Las proteinasas tipo cisteína de los parásitos tienen mucho interés, debido a que su actividad parece estar relacionada con la capacidad de invasión de los tejidos del hospedador, así como con procesos vitales de la muda de la cutícula y la digestión de la sangre que sirve de alimento a ciertos nematodos. Este tipo de proteinasas, análogas a las catepsinas B humanas, se han encontrado en nematodos como *H. contortus*, *Ancylostoma duodenale*, *Toxocara canis* y *Onchocerca volvulus* (Lustigman *et al.*, 1996; Skuce *et al.*, 1999a; Falcone *et al.*, 2000; Shompole y Jasmer 2001), pero también en platelmintos como *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* y *Paragonimus westermani* (Brady *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 2000), e incluso en protozoos como *Entamoeba histolytica* (Freitas *et al.*, 2009) o *Plasmodium falciparum* (Pandey *et al.*, 2009).

Las proteinasas tipo cisteína pueden desempeñar distintas funciones en los parásitos:

- ***Hemoglobinolisis***: Esta capacidad se ha observado en *H. contortus* (L4 y adulto) (Cox *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 1990; Rhoads y Fetterer, 1995; Fetterer y Rhoads, 1997), *Fasciola hepatica* (Yamasaki *et al.*, 1992), *Schistosoma mansoni* (forma migratoria de las larvas dentro del hospedador y en el adulto) (Smith *et al.*, 1994; Ghoneim y Klinkert, 1995; Wasilewski *et al.*, 1996), *Schistosoma japonicum* (adulto) (Caffrey y Ruppel, 1997), *Necator americanus* (Ranjit *et al.*, 2009) y en *Taenia solium* (metacestodo) (White *et al.*, 1992), y en todos los casos se cree que favorece la nutrición del parásito.

Estudios llevados a cabo con inhibidores de proteinasas tipo cisteína han sugerido que también están presentes en *Plasmodium falciparum* donde, además de esta capacidad de hidrólisis de la hemoglobina, parecen estar implicadas en la ruptura y penetración en el eritrocito de las formas eritrocitarias del parásito (Rosenthal, 2004).

- ***Degradación de la matriz tisular.*** Entre otras funciones atribuibles a este tipo de proteinasas se encuentra la degradación de la matriz tisular. Esta posibilidad se ha descrito en helmintos como *Fasciola hepatica* (Berasain *et al.*, 1997), *Taenia saginata* (oncosfera) (White *et al.*, 1996), *H. contortus* (L4 y adulto) (Rhoads y Fetterer, 1996), así como en el protozoo *Entamoeba histolytica* durante las primeras fases de invasión del intestino (Que *et al.*, 2002).

- ***Hidrólisis de inmunoglobulinas.*** También en este grupo de proteinasas existen algunas capaces de hidrolizar inmunoglobulinas para evadir la respuesta inmune del hospedador. Esta capacidad se ha observado en *Fasciola hepatica* (Chapman y Mitchell, 1982; Wilson *et al.*, 1998), en *Taenia crassiceps* (metacestodo) (White *et al.*, 1997; Khalil *et al.*, 1998) y *Taenia solium* (metacestodo) (White *et al.*, 1992).

- ***Otras funciones.*** En nematodos filáridos se ha demostrado que las proteinasas tipo cisteína están implicadas en los procesos de muda (Gregory y Maizels, 2007). En *Paragonimus westermani* se ha observado que cumple funciones relacionadas con la reproducción y la escisión de la metacercaria de este trematodo (Park *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004) y también parecen poder perturbar los mecanismos de defensa del hospedador inactivando el complemento o los mediadores citotóxicos expresados por los linfocitos (Leid, 1987).

#### 2.2.1.7. Proteinasas de mecanismo catalítico desconocido

Existe además un grupo de proteinasas cuyo mecanismo catalítico es desconocido, o no se encuentran dentro de las descritas en los demás grupos. En este grupo se encuentra un clan con 9 familias (Rawlings *et al.*, 2008), entre los que destaca el proteosoma, un complejo proteico encargado de la mayor parte de la degradación no lisosomal de proteínas. El mecanismo catalítico de estas proteinasas es diferente al de la mayoría de proteinasas conocidas, y se expresa en función del entorno proteico en cinco actividades proteásicas diferentes. Gracias a esto, el proteosoma puede hidrolizar prácticamente cualquier enlace peptídico de las proteínas sustrato. Hasta el momento no se han descrito en parásitos.

#### 2.2.2. PROTEINASAS EN *HAEMONCHUS CONTORTUS*

La penetración de *H. contortus* en los tejidos huéspedes y la utilización de la sangre del hospedador como fuente nutricional están mediados por procesos mecánicos y por la liberación de productos histolíticos (Trap y Boireau, 2000).

Un análisis de los productos de excreción-secreción potencialmente histolíticos en adultos utilizando geles de poliacrilamida ha permitido la identificación de cuatro fracciones (**Karanu et al., 1993**) de 32, 35, 38 y 40 kDa con actividad proteínasa tipo cisteína. También fueron identificadas aspartil proteinasas y metaloproteinasas en estos productos de excreción/secreción. Hasta el momento se han descrito las secuencias génicas de los siguientes grupos de proteinasas tipo cisteína en *H. contortus*: familia AC (**Pratt et al., 1990; Pratt et al., 1992**), GCP-7 (**Rehman y Jasmer, 1998**), hmcp 1, hmcp 4 y hmcp 6 (**Skuce et al., 1999a**), HC58 (**Muleke et al., 2006**) y cistatina (**Newlands et al., 2001**). En general, las proteinasas de *H. contortus* son más similares entre sí de lo que lo son con respecto a la catepsina B humana (38-44% identidad de aminoácidos), o a la proteínasa tipo cisteína de Sm31 de *Schistosoma mansoni* (36-40% de identidad) (**Pratt et al., 1992**).

Esta gran diversidad de familias de proteinasas permitiría al adulto de *H. contortus* desarrollar funciones muy diversas, como por ejemplo la degradación de los tejidos conjuntivos. En este sentido, las larvas L4 y los adultos de *H. contortus* son capaces de degradar el 42% y el 100%, respectivamente, de una matriz extracelular compuesta de glicoproteínas, de elastina y de colágeno.

También se ha observado que los productos de excreción/secreción de los adultos pueden degradar el 64% de la matriz, incrementándose este porcentaje en presencia de dithiothreitol (activador de proteinasas tipo cisteína). A la inversa, la degradación de las matrices es inhibida cuando estos mismos productos de excreción/secreción son coincubados con un inhibidor específico de proteinasas tipo cisteína (**Rhoads y Fetterer, 1996**). Por tanto, una o varias proteinasas tipo cisteína de *H. contortus* tendrían la capacidad de degradar componentes mayores de la matriz extracelular (elastina y colágeno) en condiciones fisiológicas y participarían en la lisis de los tejidos favoreciendo la penetración en el cuajar y/o en los capilares sanguíneos del hospedador (**Trap y Boireau, 2000**).

Existen también diferentes trabajos que demuestran la capacidad de las proteinasas tipo cisteína de *H. contortus* para digerir la hemoglobina del huésped. Así, una proteínasa con actividad cisteína del tipo catepsina L identificada en el estadio de larva L4 y en adultos se ha demostrado que inhibe la coagulación de la sangre en ovino mediante hidrólisis del fibrinógeno, presentando por tanto una función hemoglobinolítica (**Rhoads y Fetterer, 1995**). En este sentido se ha demostrado que en presencia de inhibidores de proteinasas tipo cisteína, la incorporación de hemoglobina radiomarcada se reduce en un 78%, y la viabilidad parasitaria disminuye, mientras que utilizando un inhibidor de serina proteinasas sólo se consigue una disminución de la incorporación de un 40% (**Fetterer y Rhoads,**

1997). Más tarde **Muleke et al. (2006)** describieron una proteína que a pH ácido no sólo tenía capacidad para degradar la hemoglobina, sino también la cadena mayor de la IgG caprina y la azocaseína. Dicha proteína se conoce como HC58 y también ha mostrado capacidad para degradar el fibrinógeno a pH básico.

En *H. contortus* se pueden encontrar también otro tipo de proteinasas, como aspartil proteinasas (**Longbottom et al., 1997; Smith et al., 2003**) o metaloproteinasas (**Redmond et al., 1997; Smith et al., 1999; Newlands et al., 2006**), pero sus funciones no se han investigado con tanta profundidad como las proteinasas tipo cisteína.

### 2.2.3. UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS PROTEINASAS

Las proteinasas tipo cisteína no sólo están involucradas en procesos fisiopatológicos sino que pueden resultar también útiles como marcadores de diagnóstico y pronóstico de determinadas enfermedades en el hombre y en los animales (**Berdowska, 2004**). En este sentido, extractos de una proteinasa tipo cisteína de 28 kDa del trematodo *Fasciola gigantica* han sido utilizados como antígeno para el inmunodiagnóstico mediante ELISA de la fasciolosis en vacuno, ovino y caprino (**Fagbemi y Guobadia, 1995**). La misma catepsina L de 28 kDa ha sido empleada por otros autores para el diagnóstico de la fasciolosis en ganado ovino utilizando otras técnicas diferentes al ELISA, como el Western blotting y/o el Dipstick ELISA (**Dixit et al., 2002; Yadav et al., 2005**). Más recientemente, se ha valorado la sensibilidad y eficacia del inmunodiagnóstico mediante ELISA de esta parasitosis en búfalos de agua usando en la detección dos tipos de antígenos, proteinasas tipo cisteína del tipo catepsina L (**Dixit et al., 2008**) y proteinasas recombinantes tipo catepsina L1-D. La sensibilidad de la técnica fue superior al 97% y se obtuvo una especificidad del 100%. Además, no se observaron reacciones cruzadas con otros parásitos como, por ejemplo, *Schistosoma indicum*, *S. spindale*, *Paramphistomum epiclitum*, *Gastrothylax* spp., *Gigantocotyle explanatum* y *Strongyloides papillosus* (**Raina et al., 2006**). También se han obtenido resultados satisfactorios a partir de la construcción de 3 péptidos sobre la base de la región amino terminal del sitio enzimático de la catepsina L de *F. gigantica* (aminoácidos 110-123) (**Jezek et al., 2007**).

El valor diagnóstico de las proteinasas tipo cisteína de *Fasciola gigantica* no sólo se ha evaluado en animales sino también en medicina humana, donde se ha llegado a poner a punto un test ELISA de alta sensibilidad y precisión que detecta IgG (subclase 4, IgG4) frente a una catepsina L1 del parásito (**Wongkham et al., 2005**). Otros estudios obtuvieron resultados similares empleando el antígeno recombinante de la misma proteinasa tipo cisteína (**Tantrawatpan et al., 2005**).

Finalmente, algunos autores han demostrado que el serodiagnóstico mediante ELISA usando proteínas tipo cisteína purificadas de *Fasciola gigantica* era más concluyente y permitía discriminar mejor entre poblaciones de individuos seropositivos y seronegativos que cuando se utilizaban extractos somáticos (Rokni *et al.*, 2003).

*Fasciola hepatica*, otro trematodo del mismo género, ha sido estudiado en numerosas ocasiones para evaluar la capacidad diagnóstica de sus proteínas. Cornelissen *et al.* (1999) pusieron de manifiesto el valor inmunodiagnóstico de las proteínas tipo cisteína del tipo catepsina L mediante ELISA en vacuno. Además, se observó que la forma recombinante de dicho antígeno poseía un valor inmodiagnóstico de alta sensibilidad y fiabilidad en fases tempranas de la infección, tanto en ovino como en vacuno (Cornelissen *et al.*, 2001). Otros estudios ha evaluado la eficacia de estos métodos diagnósticos en medicina humana. De esta manera, al igual que en rumiantes, existen métodos de detección de anticuerpos mediante ELISA frente a una forma recombinante de proteínas tipo cisteína del tipo procatepsina L (Carnevale *et al.*, 2001). El diagnóstico de la fasciolosis también se ha abordado mediante ELISA utilizando proteínas tipo cisteína de 26 kDa (Fas1) (Timoteo *et al.*, 2005) y de 25 kDa (Fas2), tanto en animales (alpacas) (Neyra *et al.*, 2002; Timoteo *et al.*, 2005) como en humana (Espinoza *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2007). Por último, fracciones proteolíticas de 28 y 34 kDa (P28 y P34 respectivamente) con actividad cisteína proteínasa fueron identificadas y empleadas con éxito para diagnosticar mediante ELISA indirecto la fasciolosis producida por *F. hepatica* en ganado caprino (Ruiz *et al.*, 2003).

Más recientemente, se ha demostrado que en los productos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* figuran dos sustancias altamente inmunogénicas y específicas con actividad cisteína proteínasa, con pesos moleculares de 31/32 kDa y 38/40 kDa (Planchart *et al.*, 2007). Los autores de este trabajo propusieron la utilización de estos antígenos como una buena estrategia de diagnóstico de la schistosomosis, capaz de determinar el grado de intensidad de la infección, la eficacia de la quimioterapia y la presencia de infecciones activas.

### 2.2.4. UTILIDAD INMUNOPROFILÁCTICA DE LAS PROTEINASAS

La actividad proteínasa ha sido identificada en extractos y secreciones de un gran número de nematodos y trematodos, tanto en el hombre como en los animales. Dada la importancia de estas enzimas proteolíticas en la supervivencia de los parásitos por su intervención en procesos fisiológicos fundamentales como la invasión de los tejidos, la alimentación, la embriogénesis y la evasión de la respuesta

inmune, se han propuesto como candidatas para el desarrollo de vacunas. Han sido numerosas las publicaciones que han descrito niveles variables de protección frente a diversos helmintos usando un gran número de antígenos, entre los cuales las proteínas representan un grupo de moléculas de poder inmunógeno ampliamente reconocido.

Como breve reseña bibliográfica se puede mencionar que tanto el ganado ovino como el vacuno han resultado protegidos frente a *Fasciola hepatica* tras la inmunización con cisteína y metaloproteinasas (Dalton y Mulcahy, 2001). Además, tal como se ha indicado en el apartado de **Inmunoprofilaxis**, se ha conseguido inmunoprotección en ovejas frente a *H. contortus* empleando extractos de membrana de intestino ricos en proteínas (H-gal-GP) (Knox y Smith, 2001) con actividad aspartil proteínasa, metaloproteínasa neutra y proteínasa tipo cisteína (Smith *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha observado que perros inmunizados con una vacuna recombinante a partir de una aspártico proteínasa presentaron una reducción de la carga parasitaria de *Ancylostoma caninum* (Hotez *et al.*, 2002) y que una proteínasa tipo catepsina F secretada por las larvas L4 de *Teladorsagia circumcincta* fue capaz de inducir una respuesta de IgA local en ovino asociada a un retraso en el crecimiento de los vermes adultos y retención de las L4 (Redmond *et al.*, 2006).

#### 2.2.4.1. Utilidad inmunógena de las aspártico proteinasas

Este tipo de proteínas se expresa en el intestino de nematodos y trematodos hematófagos, e interviene en los primeros eventos que tienen lugar en el hospedador en la digestión de la hemoglobina (Brindley *et al.*, 1997; Brindley *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2002). Se han realizado estudios con vacunas recombinantes del tipo catepsina D en *Schistosoma japonicum*, donde se generó una leve protección (21-38%) frente a una posterior infección, pero no se observó efecto frente a la fecundidad del parásito; además, la protección no se correlacionó con niveles de anticuerpos (Verity *et al.*, 2001). También se han realizado ensayos con una catepsina D (Ac-APR-1) en perros frente a *Ancylostoma caninum*, sin llegarse a generar un gran nivel de protección (18%) (Hotez *et al.*, 2002). Un grado de protección mayor frente a *Ancylostoma caninum* ha sido obtenido recientemente por Pearson *et al.* (2009) al inmunizar a perros con una aspártico proteínasa similar a la Ac-APR-1, concretamente con la Na-APR-1 extraída de *Necator americanus*. Los perros vacunados presentaron menores recuentos de huevos, menor carga parasitaria, menor pérdida de peso, así como una menor sintomatología que los no vacunados.

Otro tipo de aspártico proteinasas relacionadas con la pepsina se ha encontrado en el intestino de *H. contortus* (Longbottom *et al.*, 1997) y en *Necator americanus* (Na-APR-2) (Williamson *et al.*, 2003). En los estudios de inmunoprotección realizados con este tipo de antígenos se ha observado que Na-APR-2 es capaz de inhibir *in vitro* el 50% de la infección percutánea por larvas y los antisueros, tanto frente a APR-2 como frente a APR-1, son capaces de inhibir la capacidad de las respectivas proteinasas de digerir substratos peptídicos *in vitro* (Williamson *et al.*, 2002). Otros autores identificaron proteinasas tipo aspártico en el complejo H-gal-GP, las denominadas HcPEP1 y HcPEP2, que fueron empleadas con éxito como antígenos inmunógenos en ovino, también frente a *H. contortus*, obteniéndose reducciones en la eliminación de huevos en las heces y de la carga parasitaria entre el 30-50% (Smith *et al.*, 2003).

### 2.2.4.2. Utilidad inmunógena de las metaloproteiniasas

Las metaloproteiniasas de los helmintos parásitos están involucradas en procesos como la invasión de los tejidos por las larvas y la alimentación de los vermes adultos. Dentro de este tipo de proteinasas se encuentran las metaloproteiniasas dependientes de Zinc que son secretadas por el adulto (Hotez *et al.*, 1985; Jones y Hotez, 2002) y las larvas (Zhan *et al.*, 2002) de gusanos ganchudos y *Strongyloides stercoralis* (Brindley *et al.*, 1995). La forma recombinante de una de estas enzimas, obtenidas a partir de larvas de *A. caninum* (Ac-MTP-1), no indujo sin embargo protección frente a una infección posterior con larvas. Coincidiendo con esta falta de protección, esta proteína recombinante no desarrolló actividad enzimática (Dalton *et al.*, 2003). Otras metaloendopeptidasas expresadas por los adultos de *Ancylostoma* en su luz intestinal, y que muestran un alto grado de semejanza en su secuencia de aminoácidos con la metaloendopeptidasas de *H. contortus* (Jones y Hotez, 2002) y la neprilisina humana, como las denominadas Ac-MEP-1, se han propuesto como antígenos ocultos susceptibles de ser utilizados en ensayos de vacunación. Éstos tendrían propiedades similares a los antígenos ocultos que han demostrado gran eficacia en vacunas frente a las ixodidosis del ganado bovino (Wong y Opdebeeck, 1993).

También se han realizado estudios de vacunación en ovejas con leucina aminopeptidasa, una metaloproteiniasa de *F. hepatica* que fue capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y una protección del 89% frente a la fasciolosis (Piacenza *et al.*, 1999). Finalmente, como ya se ha mencionado en el capítulo de **Profilaxis y Control**, la inmunización de ovejas con aminopeptidasa M, denominada H11, es también altamente eficaz frente a *H. contortus*, siendo posibles

reducciones del número de vermes adultos que pueden llegar hasta un 90% (**Smith et al., 1993b**).

#### 2.2.4.3. Utilidad inmunógena de las proteinasas tipo cisteína

Ciertos estudios revelan que la actividad enzimática de las proteinasas tipo catepsina L destaca entre los productos de excreción/secreción de las fases juveniles de *Fasciola hepatica*, y han sido asociadas a la proteólisis de IgG (**Chapman y Mitchell, 1982; Smith et al., 1993a**). También se ha observado que impiden la adherencia de eosinófilos (**Carmona et al., 1993**) y son capaces de suprimir la respuesta de las células T (**O'Neill et al., 2001; Prowse et al., 2002**). Todas estas actividades podrían explicar el hecho de que la inmunización de ganado vacuno con catepsinas L1 y L2 purificadas de *F. hepatica* sean capaces de inducir más de un 60% de protección frente al establecimiento de vermes adultos, además de una inhibición de la embriogénesis de los huevos (**Dalton et al., 1996a; Mulcahy et al., 1998**). La inmunización en ratas frente a este trematodo también ha resultado eficaz utilizando vacunas recombinantes de proteinasas tipo cisteína que fueron clonadas a partir de vermes adultos del parásito. Este mismo antígeno se ha mostrado eficaz tanto en bovinos (**Dabrowska et al., 2006**) como en ovinos (**Wedrychowicz et al., 2007**). Recientemente, **Jayaraj et al. (2009)** han realizado ensayos de inmunización en ratas utilizando como antígeno la forma recombinante de otros 3 tipos de proteinasas tipo cisteína de *F. hepatica* (catepsina L5, catepsina L1g y catepsina B). La utilización tanto de cada antígeno por separado como de las combinaciones de todos ellos se tradujo en una reducción significativa de la carga parasitaria, siendo la combinación de catepsina B y catepsina L5 la que ofreció mejores resultados.

En extractos de otros trematodos como *Schistosoma* spp. también se encuentran proteinasas del tipo catepsina B y L que parecen participar en la cascada proteolítica de la hemoglobina en el intestino (**Dalton et al., 1996b; Brindley et al., 1997; Tort et al., 1999**). Algunos ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado el efecto frente a la fecundidad del parásito de estas proteinasas (**Brindley et al., 1997**) y otras como la calpaína (**Ohta et al., 2004**). Más recientemente, se ha observado que la administración de IL-4 puede mejorar el efecto protector de la vacuna de ADN de catepsina B contra la infección por *S. japonicum* en ratones (**Chen et al., 2005**). En otras especies de este género, concretamente *S. mansoni*, se han realizado también ensayos de vacunación utilizando una asparaginil endopeptidasa (*Sm32*) que desde el punto de vista funcional se trata de una proteinasa tipo cisteína, que sin embargo no está relacionada con la secuencia de las catepsinas L o B. También en este caso la vacunación provocó una alteración en la fecundidad de *Schistosoma* sp. en roedores (**Chlichlia et al., 2001**).

En los nematodos gastrointestinales de los rumiantes se han realizado estudios de inmunoprotección frente a *Ostertagia ostertagi* en ganado vacuno utilizando como antígeno fracciones enriquecidas de proteinasas tipo cisteína. Las purificaciones se realizaron mediante cromatografía en thiol-sepharose a partir de extractos de vermes adultos obtenidos con Triton X-100 (S3-thiol) y de productos de ES también de adultos (ES-thiol). De los dos tipos de antígeno, solamente el ES-thiol fue capaz de inducir inmunoprotección en bovinos frente a *Ostertagia ostertagi*. La protección se tradujo en una disminución significativa de los recuentos fecales (60%), un alto porcentaje de larvas L4 inhibidas (9,8%) y un menor número de vermes adultos (18% menos). Además, tanto las hembras como los machos adultos fueron significativamente más pequeños, y las hembras presentaron un menor número de huevos intrauterinos. Los niveles de anticuerpos locales específicos de *Ostertagia* mostraron una correlación negativa con el tamaño de los vermes adultos del parásito, el número de huevos por hembra y el recuento acumulado de huevos en heces. Sin embargo, estas correlaciones fueron bastante débiles (**Geldhof et al., 2002**).

Posteriormente, el antígeno ES-thiol fue fraccionado mediante cromatografía de intercambio de iones (Sepharose-Q) para separar las proteínas secretadas asociadas por activación (ASPs), las proteinasas tipo cisteína y el resto de fracciones. Los tres tipos de fracciones fueron empleadas como inmunógenos y se obtuvieron reducciones en el recuento fecal de huevos del 74, 80 y 70% respectivamente. Aunque no hubo disminución de la carga parasitaria en ninguno de estos grupos, sí se observó que todos los vermes eran de menor tamaño que los del grupo control (**Geldhof et al., 2008**). Los animales inmunizados con ASPs no presentaron reacciones cruzadas mediante Western blot con los otros dos grupos y sólo reconocieron las ASPs por lo que se propuso que era precisamente esta fracción la principal responsable de la protección (**Meyvis et al., 2007**). No obstante, la vacunación mediante la forma recombinante de este antígeno (Oo-ASP1) no mostró ningún efecto inmunoprotector (**Geldhof et al., 2008**).

### **2.2.4.3.1. Utilidad inmunógena de las proteinasas tipo cisteína en *Haemonchus contortus***

Como ya se ha indicado, las cisteína proteinasas desempeñan funciones vitales en *H. contortus*. La importancia de todas estas funciones justifica el hecho de que cualquier alteración de su actividad a través de la respuesta inmune del hospedador pueda dificultar la penetración, asentamiento y pervivencia del parásito en el mismo.

En la actualidad se han evaluado con fines inmunoprotectores, con distinta efectividad, diversas fracciones de *H. contortus* con actividad proteínasa tipo cisteína. Una de ellas contiene un complejo formado por dos proteínas de 35 y 55 kDa con capacidad de degradar el fibrinógeno, la primera de las cuales mostraría una homología con la catepsina B (Cox *et al.*, 1990; Boisvenue *et al.*, 1992), no llegando a mostrar dicho complejo gran efectividad como inmunógeno frente a la haemonchosis ovina (Boisvenue *et al.*, 1992). Otra fracción con actividad proteínasa tipo cisteína, peso molecular de 70 kDa, y cierta homología con la anterior, fue aislada por Knox *et al.* (1995b). Posteriormente, estos mismos autores (Knox *et al.*, 1999) aislaron 3 tipos de extractos en función del solvente empleado: PBS (S1) (phosphate-buffered saline soluble), Tween 20 (S2) y Tritón X-100 (S3). Todos los extractos se pasaron a través de columnas Thiol-Sepharosa, confirmando la presencia de proteínasas tipo cisteína. Las proteínasas tipo cisteína halladas en las fracciones S1 y S2 se encontraron en un rango de 50-55 kDa, coincidentes con las descritas por Karanu *et al.* (1993), mientras que en el extracto S3 se encontraron fracciones de 35 y 70 kDa similares a las descritas por Boisvenue *et al.* (1992).

Al evaluar la capacidad inmunoprotectora de estas fracciones se observó que las fracciones S1 y S2 no inducían un considerable nivel de protección, únicamente una ligera disminución en los recuentos fecales de huevos y en la cantidad de vermes en los animales vacunados. Sin embargo, la fracción S3 sí mostró mayor potencial inmunógeno, detectándose descensos en los recuentos fecales de huevos de hasta el 95% (Knox *et al.*, 1999).

En otros estudios realizados en ovino, la vacunación con extractos de detergente procedentes de vermes adultos enriquecidos para proteínasas tipo cisteína de membrana de intestino (TBSP) han dado lugar a una reducción media del recuento fecal de huevos y de la carga parasitaria del 77% y 47%, respectivamente (Knox y Smith, 2001). La presencia de anticuerpos de ovejas vacunadas con TBSP natural con capacidad para inhibir la actividad proteínasa tipo cisteína de TBSP *in vitro* (Knox *et al.*, 2005) pone de manifiesto la posibilidad de que el mecanismo de inmunidad pudiese estar mediado por anticuerpos capaces de inhibir la digestión de proteínas.

Posteriormente, Ruiz *et al.* (2004a) aislaron fracciones proteicas solubles en PBS enriquecidas para proteínasas tipo cisteína con columnas de Thiol-Sepharosa, cuyo principal componente era una proteínasa tipo cisteína de 35 kDa, similar a la encontrada por Cox *et al.* (1991). Dicha fracción se mostró capaz de inmunizar eficazmente a caprinos frente a la haemonchosis, registrándose una reducción significativa tanto en el HPG como en la carga parasitaria. Recientemente, De Vries

**et al. (2009)** utilizando la proteinasa tipo cisteína AC-5 identificada en productos de excreción/secreción del parásito, han conseguido una reducción de la carga parasitaria del 36% y de los recuentos fecales del 32% en ovinos inmunizados.

Se ha demostrado también que vacunas recombinantes a partir de proteinasas tipo cisteína son capaces de reducir la carga parasitaria (27%) y el recuento fecal de huevos (29%) en ovejas (**Redmond y Knox, 2006**). Aunque sin éxito, también se ha propuesto la posibilidad de obtener una vacuna recombinante eficaz a partir de la extracción y purificación de proteinasas tipo cisteína del tipo de la catepsina L a partir de *Caenorhabditis elegans* (**Murray et al., 2007**).

### 2.3. POLIMORFISMO GENÉTICO

El genoma representa el material genético presente en una sola célula de un organismo. Está constituido por moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) que están repartidas en un número determinado de cromosomas según la especie. A su vez, cada gen es una secuencia de bases de ADN que codifica o contiene la información para sintetizar una proteína determinada.

Una cadena de ADN es un largo polímero ramificado compuesto únicamente de cuatro subunidades distintas. Estas subunidades son los desoxirribonucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los nucleótidos están unidos por enlaces covalentes fosfodiéster entre el carbono 5' de un grupo desoxirribosa y el carbono 3' del siguiente. Las cuatro bases están fijadas a esta cadena azúcar-fosfato repetitiva, casi como cuatro tipos diferentes de cuentas ensartadas en un collar (**Alberts et al., 1994**).

La secuencia de los genes generalmente es estable, pero a veces puede sufrir cambios que reciben el nombre de mutaciones. Las consecuencias de estos errores son dobles. Por un lado, el error será copiado en todas las generaciones futuras, ya que las secuencias de ADN “malas” se copian con igual fidelidad que las “buenas”. Por otro lado, el error puede tener efectos importantes sobre la célula, según el lugar donde se haya producido la mutación (**Alberts et al., 1994**). Las mutaciones pueden provocar la modificación de la síntesis de la proteína que codifica el gen mutado y por tanto pueden afectar a la función de dicha proteína en el organismo al que pertenecen. Las mutaciones constituyen la base principal de variabilidad en las poblaciones y sirven además como herramienta para diferenciar individuos (**Alberts et al., 1994**).

La selección es más probable a favor de la diploidía (2n) en los hospedadores y a favor de la haploidía (n) en los parásitos. Cuando un parásito debe evadir una respuesta inmune, la selección favorece a los individuos parásitos que expresan una estrecha gama de antígenos, por tanto favorece a los parásitos haploides frente a los parásitos diploides. En cambio, cuando un hospedador dispone de un amplio abanico para reconocer moléculas, la selección irá en su favor (Nuismer y Otto, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de la secuencia específica en cuestión. Una vez obtenidas las múltiples copias del gen, el análisis de los polimorfismos genéticos en una determinada población, por ejemplo de parásitos, puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas:

- 1) **Fragmentos de restricción de longitud variable o RFLPs (“Restriction Fragments Length Polymorphisms”)**: Gracias a esta técnica se pueden detectar cambios o mutaciones que tienen lugar en la secuencia de nucleótidos o ADN. Fue una de las primeras técnicas que se usó ampliamente para detectar variaciones a nivel de la secuencia del ADN. Esta tecnología se basa en comparar patrones de bandas generados a partir de moléculas de ADN de diferentes individuos que han sido sometidas a digestión con enzimas de restricción, ya que las diversas mutaciones que afectan a las moléculas de ADN pueden producir fragmentos de longitud variable. Estas diferencias de longitud pueden posteriormente observarse mediante electroforesis y tinción específica. Esta técnica se ha empleado, por ejemplo, en la detección de resistencia a los benzimidazoles en el gen  $\beta$ -tubulina isotipo I de *H. contortus* (Tiwari *et al.*, 2006).
- 2) **Polimorfismos de ADN amplificados de forma aleatoria o RAPDs (“Random Amplified Polimorphic DNA”)**: En este caso la técnica de amplificación en cadena (PCR) se realiza a baja temperatura de unión y en un alto número de ciclos, de tal forma que se amplifican fragmentos aleatorios de ADN que posteriormente se visualizan mediante electroforesis en geles de agarosa. Se cree que los RAPDs pueden detectar cambios en una sola base. Los polimorfismos generados con RAPD-PCR sirven como marcadores genéticos dominantes, heredados de forma mendeliana, ya que la mayoría de estos marcadores son fragmentos de ADN de una determinada longitud que pueden ser amplificados en un individuo pero no en otro.

Esta técnica fue empleada para diferenciar genéticamente 3 especies distintas de *Haemonchus*: *H. longistipes* (dromedario), *H. placei* (bovino) y *H. contortus* (cabras y ovejas). Los resultados mostraron diferencias entre las tres especies, si bien *H. contortus* y *H. placei* fueron más similares. Por otro lado, *H. contortus* presentó el doble de variedad intraespecífica que las otras dos especies (Jacquet *et al.*, 1995).

- 3) **Polimorfismos de cadenas simples de ADN o SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”)**: Esta técnica es de interés en aquellos casos en los que las mutaciones no afectan a ninguna diana de restricción conocida, con lo cual pasarían por alto al utilizar las técnicas anteriores. La SSCP detecta cambios en la secuencia de nucleótidos de un gen cuando los productos de PCR son sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. La separación de las cadenas simples de ADN se hace en base a su conformación espacial y esto determina la identificación de los diferentes alelos en la población de parásitos analizada. Esta técnica ha sido empleada por Ruiz *et al.* (2004b) para demostrar la variabilidad genética existente en los genes que codifican algunas de las proteinasas tipo cisteína de *H. contortus*. Estos autores demostraron la variabilidad existente entre dos cepas de distinta procedencia, una cepa ovina de origen norteamericano y otra cepa caprina de origen español, así como la variación genética existente dentro de cada cepa. Más recientemente, se han realizado estudios empleando esta misma técnica para diferenciar distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* mediante el análisis de cuatro genes del parásito (mini-exon, 24Salpha rRNA, 18Sr RNA y cruzipaina). El estudio se completó con un análisis RAPD de una región del ADN denominada P7-P8. Todas las cepas que fueron estudiadas pertenecían a *T. cruzi* I o a subgrupos de *T. cruzi* II. Los patrones de SSCP de los genes 24Salpha rRNA y 18Sr RNA fueron muy variables en las cepas de *T. cruzi* I, por lo que el análisis de ambos genes podría considerarse un método de caracterización de cepas dentro de *T. cruzi* I (Higo *et al.*, 2007). Esta técnica también ha sido utilizada recientemente por Gudewar *et al.* (2009) para caracterizar cepas de *Echinococcus granulosus* a partir de estados larvarios del parásito (Muzulin *et al.*, 2008).

### 2.3.1. POLIMORFISMO GENÉTICO EN NEMATODOS

Dentro de la clase Nematoda se diferencian dos subclases, Adenophorea y Secernentea, y en estas dos subclases se engloban todas las especies de nematodos que se conocen actualmente. Esta clasificación se basa fundamentalmente en las características morfológicas de los parásitos, pero cada vez más se tiende a recurrir a técnicas basadas en la biología molecular como herramienta taxonómica, ya que en

muchos casos no es suficiente el estudio morfológico, especialmente cuando se trata de diferenciar entre distintas variedades geográficas o cepas de un mismo parásito que han surgido de la variación y, por tanto, de la selección génica.

El polimorfismo genético es importante, no sólo desde el punto de vista morfológico (Mendoza-León, 2001), sino también biológico (Watkins y Fernando, 1984), terapéutico (De Lourdes Mottier y Prichard, 2008) e inmunológico (Goyal y Wakelin, 1993).

### 2.3.1.1. Implicaciones epidemiológicas y patológicas

La interacción existente entre hospedador, parásito y medio ambiente es un aspecto clave a tener en cuenta en las infecciones parasitarias. Como ya se ha indicado previamente, en el conocimiento de la relación entre esos tres factores radica el éxito de muchos métodos de control, tratamiento y/o diagnóstico de dichas parasitosis.

En los parásitos que están altamente adaptados a un ambiente concreto, la variabilidad genética es muy pequeña, tal y como demostraron Chollet *et al.* (1997) al realizar un análisis isoenzimático y genético mediante RAPD en especímenes del endoparásito del dromedario *Haemonchus longistipes* procedentes de animales de regiones desérticas extremas. La variabilidad genética relacionada con las adaptaciones epidemiológicas también se ha demostrado entre cepas de *H. contortus*. Así, un estudio de polimorfismo genético llevado a cabo mediante pirosecuenciación entre aislados de este parásito en ovejas de Kenia, ovejas de Suecia y cabras también de Suecia, reveló que los vermes procedentes de ovino y de caprino estaban más estrechamente relacionados que las dos cepas de *H. contortus* de ovejas de diferentes regiones geográficas. Esto indicaría una mayor variabilidad genética entre vermes geográficamente separados que entre vermes de distintas especies hospedadoras de la misma región, a pesar de que en Suecia no se practica comúnmente el pastoreo mixto entre las dos especies (Troell *et al.*, 2003).

En determinados estudios genéticos en poblaciones de *Ascaris* sp. se ha podido constatar que, si bien *Ascaris lumbricoides* y *A. suum* constituyen dos poblaciones con una subdivisión genética importante (Anderson y Jaenike, 1997), es posible encontrar en aislados geográficamente diferentes la presencia de híbridos de ambas especies, lo que permite concluir la posibilidad de transmisión cruzada entre las poblaciones de *Ascaris* sp. de humanos y de cerdos (Criscione *et al.*, 2007).

La capacidad de hipobiosis que presentan algunos nematodos también se ha observado que tiene un trasfondo genético (**Grant, 1994**). Por ejemplo, se ha demostrado que dos cepas diferentes de *O. ostertagi* sometidas a condiciones ambientales idénticas presentaron un grado de hipobiosis distinto, lo que demuestra que las aptitudes para el desarrollo de hipobiosis estaban determinadas genéticamente (**Dame et al., 1993; Grant, 1994**).

Por otro lado, es probable que alteraciones en la secuencia de un gen puedan provocar cambios en la patogenicidad del parásito. Por ejemplo, se ha observado una correlación entre la virulencia de *Trypanosoma cruzi* y la expresión de distintos genes de la familia de las sialidasas (**Weston et al., 1999; Barrio et al., 2007**), y que mutaciones nulas en el gen LYT1 de este mismo parásito derivan en cepas con menor capacidad patógena (**Zago et al., 2008**).

Finalmente, los análisis de polimorfismo son de utilidad para evaluar el flujo genético entre poblaciones distintas de un mismo parásito. Con este objetivo, usando AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y secuencias *nad4* del genoma mitocondrial, se analizaron un total de 150 vermes adultos de 19 cepas distintas de *H. contortus* representando 14 países de todos los continentes habitados. En general, la variación genética fue alta y se relacionó más con diferencias individuales dentro de una población que con diferencias entre poblaciones dentro de áreas de un mismo continente (**Troell et al., 2006a**).

### 2.3.1.2. Implicaciones en el diagnóstico

Como se ha mencionado previamente, a la hora de establecer un diagnóstico certero de las parasitosis que afectan a los animales se suele recurrir al análisis morfológico de los parásitos adultos o de sus elementos de diseminación, aunque cada vez son más utilizados los métodos inmunológicos. Sin embargo, todas las técnicas son, en general, insuficientes cuando el diagnóstico quiere realizarse a nivel de cepa, variedad geográfica, o incluso especie. En estos casos la aplicación de las técnicas de biología molecular, incluyendo las moleculares descritas anteriormente y otras como el análisis isoenzimático, ADN mitocondrial y microsatélites, constituye una herramienta importante.

Así, utilizando la técnica PCR-SSCP se han conseguido diferenciar especies de ascarídidos en base al denominado ITS-2, una secuencia de nucleótidos de ADN ribosómico que sirve como marcador de especies. La amplificación del segmento ITS-2 mediante PCR y su posterior análisis mediante SSCP permitió discriminar además entre distintos aislados geográficos de una misma especie (**Gasser et al., 1997**).

Las diferencias genéticas encontradas entre cepas dentro de una misma especie han servido también para la identificación de nuevas especies dentro del género *Steinernema* sp., la diferenciación entre dos líneas de ovino y caprino de *Teladorsagia circumcincta* (Gasnier y Cabaret, 1996), así como en el linaje de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* (Higo *et al.*, 2004). Otras técnicas como nested-PCR, seguidas de análisis de restricción, también se han usado en el diagnóstico para diferenciar especies de *Entamoeba histolytica* de distintas regiones geográficas (Samie *et al.*, 2008).

Por otro lado, el análisis de polimorfismo también se ha utilizado para determinar el modo de herencia que tienen determinados rasgos o características de ciertos individuos, así como el mapa de los *loci* que controlan esos rasgos, tal y como han descrito Humbert y Cabaret (1995) mediante la amplificación y posterior PCR del ADN de distintos tricostrongídeos (*H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Ashworthius gagarini*, *Spiculopteragia boehmi*, *Ostertagia leptospicularis*, *Cooperia oncophora*, *Trichostrongylus colubriformis* y *T. vitrinus*).

El principal problema de estas técnicas moleculares es el coste que suponen, ya que tanto los equipos necesarios, como los componentes y reactivos empleados en ellas suelen ser costosos, por lo que en la práctica estos métodos sólo se han empleado con finalidad investigadora o para solucionar problemas taxonómicos concretos, pero no en el diagnóstico rutinario de las parasitosis.

### 2.3.1.3. Implicaciones en el control

En el control de las nematodosis está muy extendido el uso de drogas antihelmínticas, pero el uso masivo de fármacos ha provocado la aparición de resistencias, hoy día reconocidas en la mayoría de los grupos farmacológicos. La aparición de dicha resistencia se vería favorecida por la gran diversidad genética que existe dentro de las poblaciones de nematodos, tal y como se ha demostrado en *Teladorsagia* sp. (Braisher *et al.*, 2004). Reconocido el trasfondo genético de la resistencia antihelmíntica, el conocimiento de los mecanismos responsables de la aparición y difusión de los alelos que confieren la resistencia podría constituir una herramienta para evitar su propagación.

De esta forma, la resistencia a los benzimidazoles se ha asociado a mutaciones de los genes de las  $\beta$ -tubulina isotipo I y II en *H. contortus* y otros nematodos gastrointestinales como *Trichostrongylus colubriformis* y *Teladorsagia circumcincta* (Kwa *et al.*, 1994; Roos *et al.*, 1995; Elard *et al.*, 1996). Recientemente, se ha

demostrado que en *H. contortus* existe una correlación entre la exposición y/o resistencia a las lactonas macrocíclicas y un aumento de la frecuencia de alelos codificadores de  $\beta$ -tubulina que contienen codones determinantes para la resistencia a los benzimidazoles. El uso de estas lactonas macrocíclicas podría por tanto predisponer para que los nematodos obtengan resistencia a los benzimidazoles, lo cual tendría importantes implicaciones en los programas de control de parásitos dependientes de rotaciones entre estos dos tipos de fármacos y en programas donde se combinen los mismos (De Lourdes Mottier y Prichard, 2008).

Como ya se ha mencionado en el capítulo de **Profilaxis y Control**, la problemática existente con las resistencias a antihelmínticos ha motivado el estudio de numerosas alternativas para el control de las nematodosis gastrointestinales. Entre esas alternativas se encuentra el control inmunológico mediante el empleo de vacunas. Sin embargo, de la misma forma que se producen cambios en la respuesta a los antihelmínticos, también se pueden producir cambios en los vermes para evadir la respuesta inmunológica del hospedador. Esto se puede conseguir de dos formas, por un lado mediante la supresión de la respuesta y por otro lado mediante la evasión de la misma. Esta capacidad se ha observado en *Fasciola hepatica*, cuyo mecanismo de evasión se desarrolla a través de la expresión de una enzima proteolítica tipo catepsina B capaz de degradar las inmunoglobulinas del hospedador (Chapman y Mitchell, 1982; Wilson *et al.*, 1998). Este mismo mecanismo de evasión de la respuesta inmune también ha sido descrito en otros parásitos, como *Taenia crassiceps* (cisticerco) (White *et al.*, 1997; Khalil *et al.*, 1998) y *Taenia solium* (metacestodo) (White *et al.*, 1992). Estos hallazgos se han observado también en experimentos *in vivo* realizados con ratones tras la creación de líneas resistentes al nematodo *Heligmosomoides polygyrus*. Los parásitos mutantes fueron capaces de suprimir la respuesta inmune de los hospedadores y el nivel de resistencia de los vermes se vio relacionado con la intensidad de la selección, siendo mucho mayor en aquellos que habían sido seleccionados de hospedadores más resistentes.

Del mismo modo que existen razas seleccionadas que son capaces de resistir una infección por nematodos gastrointestinales, algunos autores han sugerido que la variabilidad genética de los nematodos puede conducir a una evolución de la resistencia, también a nivel inmunológico, tal y como se ha sugerido tras estudios realizados con *Trichostrongylus colubriformis* (Wendon, 1991).

### 2.3.1.4. Polimorfismo en proteinasas tipo cisteína

Debido al potencial de las proteinasas tipo cisteína como posibles vacunas frente a *H. contortus*, son de interés los estudios preliminares que indican que estas

enzimas podrían variar entre diferentes aislados geográficos (**Karanu et al., 1993; Knox et al., 1993**).

La existencia de esta variabilidad ha sido también sugerida por **Karanu et al. (1997)** al estudiar mediante zimoensayos las proteinasas de productos de excreción-secreción de *H. contortus* en aislados geográficos procedentes de Kenia y Estados Unidos. Las proteinasas de ambos aislados no sólo difieren de forma significativa en relación a su peso molecular sino también en cuanto a su actividad: mientras que las estadounidenses mostraron actividad tipo cisteína, la actividad observada en las de origen africano fue mayoritariamente del tipo de las metaloproteinasas y proteinasas tipo serina. Es importante destacar de este trabajo que, además de las variaciones intergeográficas, también se observaron este tipo de variaciones entre los dos aislados de Kenia estudiados (KI y KII).

Diferentes estudios a nivel molecular han demostrado igualmente gran variabilidad entre las proteinasas presentes en *H. contortus*. A partir de tales proteinasas, catalogadas como catepsinas tipo B (CTB), se identificaron inicialmente cinco genes diferentes pertenecientes a una misma familia (**Pratt et al., 1990; Pratt et al., 1992**) y con posterioridad un gen que codificaba un polipéptido CTB (GCP) distinto de los cinco genes CTB anteriores (**Rehman y Jasmer, 1998**).

**Skuce et al. (1999a)**, tras realizar un panel de cDNAs codificadores de cisteína proteinasas tipo catepsina B, observaron mediante Southern blot genómico que algunas de esas enzimas estaban codificadas por una única copia de genes, mientras que otras lo estaban por múltiples copias. Un posterior análisis secuencial de estas proteinasas demostró que existían claras diferencias a nivel molecular entre las procedentes de dos aislados geográficos distintos, uno del Reino Unido (UK) y otro de los Estados Unidos de América (USA). Estos autores lograron identificar 3 proteinasas tipo cisteínas en la cepa de UK (hcmp1, 4 y 6) y localizarlas específicamente mediante inmunofluorescencia en el intestino de *H. contortus*. Estas proteinasas eran distintas de las de la familia AC y al GCP-7, llegando sólo al 60% de similitud en la secuencia de aminoácidos. **Skuce et al. (1999a)** intentaron sin éxito amplificar mediante una PCR genérica algún gen de la familia AC o el GCP-7, en su lugar, se amplificó un panel de 4 homólogos de cisteína proteinasas (hcmp1- 4). Además, el esfuerzo por clonar el gen AC-1 (**Cox et al., 1990**) sólo tuvo como consecuencia la amplificación de un nuevo homólogo de la catepsina B, que denominaron hmcp5. Este compartía mayor homología con hmcp3 y 4 (68% aprox.), si bien su secuencia de nucleótidos fue más similar al grupo AC (1-5) (58% aprox.) que a hmcp1 y 2. Es poco probable que los genes codificados de proteinasas tipo cisteína de ambas cepas se hayan distanciado tanto como para que sus productos sean

proteinasas de familias distintas. Más bien representan distintos grupos de proteinasas tipo cisteína relacionados. De hecho, los análisis filogenéticos indican que el grupo de genes AC y hmcp están suficientemente relacionados como para ocupar un único clan (**Tort et al., 1998**).

Por su parte, **Ruiz et al. (2004b)** evaluaron la variabilidad genética en las proteinasas tipo cisteína procedentes de dos cepas de *H. contortus*, una aislada en ganado caprino de Gran Canaria y otra de ovinos de Norteamérica, en un total de 5 *loci* amplificados previamente por PCR a partir de las secuencias de los genes AC-1 (**Pratt et al., 1990**), AC-3, AC-4 y AC-5 (**Pratt et al., 1992**) y GCP-7 (**Rehman y Jasmer, 1998**). Con excepción del locus AC-5, el resto de *loci* fueron polimórficos, con valores de variabilidad genética total (Ht) que oscilaron entre 0,353 y 0,669. Se observaron un total de 20 alelos diferentes mediante la técnica SSCP, cuyas frecuencias génicas difirieron significativamente entre las dos cepas analizadas. El análisis de la secuencia de nucleótidos de los diferentes alelos reveló igualmente la existencia de un importante grado de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) con valores que oscilaron entre 0,0334 y 0,1037 (**Ruiz et al., 2004b**).

Tal como se ha comentado previamente, numerosos han sido los estudios que describen la importancia de la variación genética en los nematodos desde distintos puntos de vista. **Rehman y Jasmer (1999)** realizaron un estudio donde valoraron la variabilidad funcional de las catepsinas tipo B en distintos nematodos, entre ellos *H. contortus*, e identificaron los principales lugares de variación: las subregiones S2 y S2' del "occluding loop" y los aminoácidos que constituyen la subregión S2. Los análisis secuenciales descritos en este estudio apoyan los trabajos de otros autores en los que se subraya las implicaciones funcionales de las variaciones en las catepsinas tipo B (**Larminie y Johnstone, 1996**); de ahí la importancia de definir los alelos con mayor potencial inmunoprotector a la hora de instaurar un control inmunológico de la haemonchosis mediante este tipo de enzimas.

Por el contrario, **Redmond y Windham (2005)** observaron que las proteinasas asociadas con fracciones de proteínas integrales de membranas de adultos de *H. contortus* mostraban una limitada variación geográfica entre las diferentes cepas del parásito en función de su pH óptimo, tamaño molecular y especificidad del sustrato, tal vez debido a una menor presión selectiva que aquellas enzimas que son capaces de generar una respuesta inmune en el hospedador. Por este motivo sugieren que este tipo de proteinasas podrían resultar eficaces como inmunógenos frente a en un amplio rango de aislados, tal vez a nivel de especie.

### *3. MATERIAL Y MÉTODOS*

## 3.1. ANIMALES

### 3.1.1. ANIMALES DONANTES

Se utilizaron animales de unos 4 meses de edad como donantes de vermes adultos y larvas infectantes de tercer estado que posteriormente se destinarían a la preparación del antígeno necesario en las inmunizaciones y al desafío de los animales que se emplearon en las inoculaciones experimentales.

Por su parte, se emplearon 5 ovejas de lana de raza Canaria para el mantenimiento de la cepa ovina de *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) procedente de Norteamérica (cepa NA) y 5 cabras de la ACC (Agrupación Caprina Canaria, variedad Majorera) para el mantenimiento de la cepa caprina del parásito aislada originalmente en Gran Canaria (cepa SP). Ambos grupos de animales se mantuvieron en un ambiente libre de nematodos en cubículos independientes del área de inoculación de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y se alimentaron con maíz, alfalfa deshidratada, paja y agua *ad libitum*. Para el manejo se utilizó vestimenta y calzado exclusivo para cada cepa con el fin de evitar contaminaciones.

Todos los animales se inocularon vía intraruminal con 10.000 L3 infectantes de la correspondiente cepa de *H. contortus*. A partir de la segunda semana de infección se realizó un chequeo coprológico diario a todos los animales para determinar el comienzo de la eliminación de los huevos, para lo cual se utilizó el método de concentración por flotación en solución saturada de cloruro sódico. Una vez constatada la presencia de huevos se colocó un arnés de cuero a los animales para la recogida de las heces con el fin de obtener la mayor cantidad de heces posible y minimizar las contaminaciones con nematodos de vida libre. La obtención de larvas 3 infectantes y la recogida de adultos se realizaron mediante procedimientos estándar (ver apartados 3.2.1. y 3.2.2 de **Material y Métodos**).

### 3.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en los experimentos fueron cabras de la Agrupación Caprina Canaria (ACC) (variedad Majorera) y ovejas canarias de lana procedentes del sureste de la isla de Gran Canaria. Se utilizaron un total de 35 cabras y 35 ovejas.

Todos los animales se alojaron en las instalaciones de la Granja Agrícola Experimental del Cabildo de Gran Canaria, situada en el municipio de Arucas en las proximidades de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Dichas instalaciones fueron previamente limpiadas y desinfectadas.

Antes de comenzar la experiencia se analizó el estado de parasitación de los animales. Para ello se tomaron las heces directamente de recto y se analizaron mediante técnicas de concentración (flotación en solución sobresaturada de cloruro sódico y sedimentación formol-éter). Se observaron ooquistes de *Eimeria* spp., pero las heces estuvieron libres de nematodos en todos los análisis efectuados. Aún así, los animales fueron desparasitados simultáneamente con Diclazuril (Vecoxan ®, Esteve veterinaria) a una dosis de 2 ml/5 k.p.v. y Levamisol (Cyver ®) a una dosis de 1ml/10 k.p.v. Adicionalmente se les administró vitaminas vía IM (Amino-Tiersan ®, Boehringer Ingelheim España, S.A.).

Todos los animales se mantuvieron en un ambiente libre de nematodos y se alimentaron con maíz, alfalfa deshidratada, remolacha, paja y agua *ad libitum*. A fin de evitar infecciones cruzadas entre las cepas utilizadas, los animales infectados con cepas distintas, así como los grupos controles, se mantuvieron en instalaciones independientes y aisladas entre sí.

## 3.2. PARÁSITOS

Se utilizaron dos cepas de *H. contortus*, una de ellas procedente de Norteamérica (cepa NA) y cedida por el Dr. Prichard del Instituto de Parasitología de la Universidad McGill (Montreal-Canadá) y la otra aislada de caprinos de Gran Canaria (cepa SP) mediante el cultivo *in vitro* de macerados de hembras del parásito de animales infectados de forma natural. Ambas cepas se mantuvieron en animales donantes según se ha descrito previamente en el apartado anterior 3.1.2. de **Material y Métodos**.

### 3.2.1. OBTENCIÓN, CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LARVAS 3

Con el objeto crear condiciones favorables para el desarrollo larvario, las heces recogidas de los correspondientes animales donantes se mezclaron en un recipiente con turba estéril en relación 1/3 aproximadamente (una parte de turba y tres de heces) y se humedecieron con agua destilada hasta conseguir una mezcla

homogénea con un grado de humedad alto, aunque procurando que no hubiese exceso de líquido. Para evitar la contaminación vehiculada por artrópodos y facilitar al mismo tiempo la aireación, los cultivos se cubrieron con una tela tipo tul sellada con elástico. Las incubaciones se realizaron a 22–23°C en una estufa o a temperatura ambiente, según la época del año, durante 12 días. Durante este tiempo, y con una frecuencia de 48 horas, el material fecal se volteó para facilitar la aireación de las capas más profundas del cultivo y minimizar el crecimiento de hongos, añadiendo agua, en caso necesario, para mantener un grado de humedad óptimo.

Las larvas infectantes (L3) se obtuvieron mediante el método de Baerman. El material cultivado se colocó sobre una rejilla en un embudo en el que se añadió agua destilada hasta cubrir la parte inferior del material fecal. Transcurridas 24 horas a temperatura ambiente, el líquido del embudo se recogió en una copa de decantación para proceder a la concentración y purificación de las larvas. Con esta finalidad, el líquido recogido del embudo se mantuvo a 4°C durante aproximadamente 24 horas para que las larvas sedimentaran en el fondo. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se transfirió y se dejó secar en un papel de filtro durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez seco el papel de filtro se depositó sobre otra copa de decantación con agua limpia y se mantuvo en esta posición durante 24 horas a la misma temperatura; de esta forma se conseguía que las larvas migraran hacia el agua desprendiéndose del papel y que el detritus quedase adherido al filtro. Una vez limpias, las larvas se concentraron mediante decantación y frío de la forma descrita anteriormente y el sedimento con larvas limpias y concentradas se conservó a 4°C hasta su uso en frascos de cultivo de fondo plano. Para favorecer la viabilidad y vitalidad de las larvas el agua se renovó cada 2-3 días (Fleck y Moody, 1988; MAFF, 1989; Colville, 1991).

La determinación de la concentración de las larvas se realizó en base a la media obtenida en los recuentos de 10 alícuotas de 20 µl extraídas del volumen total de líquido, previamente mantenido a temperatura ambiente durante 24 horas para favorecer la activación larvaria. En el recuento solamente se consideraron las larvas que mostraban movilidad (MAFF, 1989).

### 3.2.2. RECOGIDA Y PURIFICACIÓN DE VERMES ADULTOS

La técnica utilizada para la recogida de adultos de *H. contortus* se basa en la capacidad de los vermes para migrar activamente desde una película semisólida de agar hacia un medio de cultivo mantenido a 37°C. El material empleado en la técnica y la metodología seguida se describen a continuación.

### 3. Material y Métodos

---

Se cortaron paños de teflón de manera que su tamaño se ajustase al fondo de bandejas de plástico de aproximadamente 40 X 20 cm (un total de 10-12 bandejas por abomaso). Se dejó más largo el extremo que ha de conectar con la barra soporte para que se pudiese fijar bien a ella mediante pinzas. La longitud real del paño tenía que ser inferior a la del tanque de incubación para que los vermes pudieran migrar al fondo. Una vez fijados los paños a los soportes de madera con pinzas, el conjunto se dispuso en las bandejas ajustando el paño completamente al fondo para evitar que se formasen pliegues; para ello se sumergió previamente el paño en agua tibia, se escurrió y se amoldó luego al fondo de la bandeja.

Se preparó suficiente medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) para llenar el tanque y se mantuvo a 38°C (unos 5 litros por tanque y dos tanques por abomaso). Aunque la viabilidad de los vermes disminuye más rápidamente, se han observado resultados aceptables utilizando PBS 0,01 M como medio de incubación. En cualquier caso, la temperatura de la estufa donde se colocaron las urnas se mantuvo a 42°C para que al abrir y cerrar no disminuyese la temperatura por debajo de los 38°C. Además de estos materiales, para cada abomaso se prepararon 14 g de agar (Sigma-Aldrich), 700 ml de agua destilada próximos a ebullición y 700 ml de agua a 38°C.

Antes del sacrificio de los animales fue necesario mantenerlos en ayuno entre 24-36 horas con el fin de limitar la cantidad de contenido gástrico. Tras el sacrificio se ligó el abomaso por ambos extremos fuertemente con una cuerda, se identificó convenientemente, se introdujo en una bolsa de plástico y a continuación se pasó a una nevera-termo que contenía agua a unos 40°C para que se mantuviese en lo posible a temperatura corporal hasta su llegada al laboratorio, que se realizó de la manera más rápida posible.

Una vez que los abomasos llegaron al laboratorio, se añadieron los 14 g de agar a los 700 ml de agua destilada próximos a ebullición y se siguió calentando y agitando hasta que la mezcla hirvió al menos tres veces consecutivas. Se enfrió entonces la mezcla en hielo, agitando con frecuencia y comprobando la temperatura hasta que alcanzaron los 43°C. Cuando la temperatura del agar líquido estuvo próxima a los 43°C, se colocó el abomaso en una bandeja y se abrió por la curvatura mayor. A continuación se lavó la mucosa del abomaso con agua a 38°C (hasta 700 ml) tratando de recoger el mayor número de vermes posible. El lavado se mezcló con el agar líquido, dispensando rápidamente la mezcla resultante en las bandejas de manera que se formase una fina capa que cubriese todo el paño.

Una vez que el agar solidificó, los paños se colocaron rápidamente en el tanque con medio RPMI a 38°C, manteniendo el conjunto en la estufa una hora y media como mínimo con el objeto de que los vermes se desprendiesen del agar y pasasen al RPMI. Durante este tiempo se prepararon tubos eppendorf, placas de petri, así como lancetas y se mantuvo una placa caliente a 38°C. Transcurrida una hora y media, se retiraron los paños de la estufa comprobando que estuviesen libres de vermes.

Tras desechar el RPMI sobrenadante del tanque, el sedimento con vermes se recogió en un vaso de precipitado, desde donde se fueron transfiriendo pequeñas cantidades de RPMI y vermes a placas de petri de plástico que se mantenían a 38°C sobre la placa caliente. Después de realizar tres lavados consecutivos en medio RPMI, los vermes limpios se conservaron a -20°C en tubos de 10 ml hasta la realización de los homogenizados, o bien a -80°C en tubos eppendorf para el estudio de polimorfismo genético.

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Se realizaron un total de 14 grupos experimentales que se distribuyeron de la siguiente forma (Tablas 2A y 2B):

**Tabla 2A.** Ensayos de inmunización con la cepa NA o SP, y posterior infección con la cepa NA de *H. contortus*.

	INMUNIZADOS FRENTE A NA		NO INMUNIZADOS	CONTROL
<b>OVINO</b>	NA/NA	SP/NA	Ø/NA	Ø/Ø (*)
<b>CAPRINO</b>	NA/NA	SP/NA	Ø/NA	Ø/Ø (*)

**Tabla 2B.** Ensayos de inmunización con la cepa NA o SP, y posterior infección con la cepa SP de *H. contortus*.

	INMUNIZADOS FRENTE A SP		NO INMUNIZADOS	CONTROL
<b>OVINO</b>	SP/SP	NA/SP	Ø/SP	Ø/Ø (*)
<b>CAPRINO</b>	SP/SP	NA/SP	Ø/SP	Ø/Ø (*)

(\*) Los grupos controles de infección fueron los mismos para las dos cepas

### 3.3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En la siguiente tabla se recogen de forma gráfica todas las actuaciones llevadas a cabo en cada semana a lo largo de la experiencia en los diferentes grupos de animales: inmunización (V), infección (I), toma de muestras de heces (H), toma de muestras de sangre (S) y sacrificio (SC) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Esquema del protocolo experimental.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Inmunización	V	V	V	V	V										
Infección							I								
Heces									H	H	H	H	H	H	H
Sangre	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sacrificio															SC

### 3.3.3. INMUNIZACIONES

#### 3.3.3.1. Obtención y preparación del antígeno

Los antígenos que se utilizaron en los diferentes ensayos fueron fracciones proteicas enriquecidas para proteinasas tipo cisteína mediante cromatografía de afinidad a partir de homogenizados de vermes adultos de *H. contortus*. La metodología para la obtención de dichos antígenos se describe a continuación.

##### 3.3.3.1.1. Preparación de homogenizados

La preparación de los homogenizados de vermes adultos de *H. contortus* se realizó, de forma independiente para las dos cepas del parásito, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ruiz *et al.* (2004a).

Los vermes conservados a -20°C se descongelaron y se transfirieron a una placa de petri de plástico que se mantuvo en frío en una bandeja de corcho con hielo durante el proceso de homogenización. Los homogenizados se prepararon en frío con PBS 0,01 M a una concentración de 100 adultos/ml usando un homogenizador

automático Ultra-Turrax T8 Ika®-Werke. La solución resultante se dejó reposar en hielo durante 60 minutos agitando periódicamente los tubos donde se había realizado el homogenizado, para a continuación centrifugar a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Tras pasar el sobrenadante a través de filtros Acrodisc® Syringe (Pall) de 0,2 µm de diámetro de poro, se realizaron alícuotas de 9 ml que se conservaron a -20°C.

#### **3.3.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (**Bradford, 1976**) utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.3.3.1.3. Purificación del antígeno mediante cromatografía de afinidad**

Una vez obtenidos los homogenizados de los vermes adultos de ambas cepas, el antígeno se purificó mediante cromatografía de afinidad con el fin de obtener fracciones proteicas enriquecidas para proteinasas tipo cisteína. Para ello se siguió un protocolo similar al propuesto por **Knox et al. (1999)** con ligeras modificaciones.

##### **3.3.3.1.3.1. Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra tiene como objetivo eliminar las sales y pequeños grupos “tiol” que puedan interferir con la cromatografía. Para ello se utilizaron columnas Hitrap-Desalting de 5 ml (Pharmacia Biotech) y un sistema cromatográfico FPLC. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar que se alterasen las proteinasas purificadas. Como tampón se empleó una solución 10 mM de Trizma base (Sigma) y 0,5 M de ClNa (Panreac) a pH 7,4. A esta solución se le denominó buffer A.

Para incrementar el volumen de muestra susceptible de desalación, se trabajó con 5 columnas Hitrap-desalting en serie (25 ml en total) sujetas mediante soportes a un cromatógrafo Biorad Biologic LP provisto de bomba peristáltica, sistema de lectura espectrofotométrica y colector de fracciones. Inicialmente se hicieron pasar dos volúmenes de buffer A a un flujo de 5 ml/min con el fin de equilibrar el sistema. Tras el equilibrado se hicieron circular a este mismo flujo 9 ml de muestra y cuatro volúmenes de buffer A, de forma que la absorbancia volviese a niveles basales. Con esto se conseguía que toda la muestra circulase por el sistema y que éste quedase equilibrado para una nueva cromatografía.

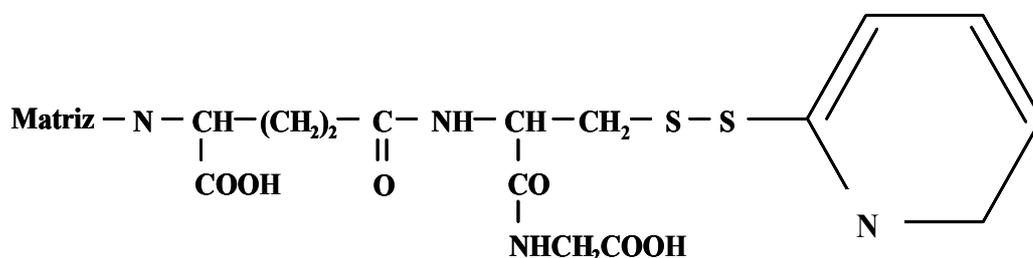
Todo el proceso se realizó de forma semi-automática mediante un programa que se diseñó para la recogida de fracciones de 2 ml. La absorbancia a 280 nm de dichas fracciones fue interpretada mediante el software informático LP Data View (Biorad). Si el proceso de desalado se había desarrollado correctamente, la gráfica resultante habría de presentar un pico, correspondiéndose con la muestra purificada. Las fracciones que constituían ese pico se mezclaron, se dispensaron en tubos en volúmenes de 9 ml y se conservaron a -20°C.

#### 3.3.3.1.3.2. Preparación de la columna cromatográfica

En la preparación de la columna cromatográfica se utilizó un nuevo tampón, que se denominó buffer C, similar al buffer A empleado en el desalado pero con una concentración más elevada de Trizma base (100 mM).

##### a) Hidratación y estabilización de la matriz

Se pesaron 1,25 g de Thiol Sepharose 4B (Amershan-Pharmacia) (**Fig. 8**) y se hidrataron haciendo circular por la columna 300 ml de dH<sub>2</sub>O de forma progresiva. La matriz hidratada, que quedó con un 25% de dH<sub>2</sub>O de su volumen total, se desgasificó y se mantuvo a 4°C.



**Fig. 8.** Estructura parcial de Thiol Sepharose 4B activada.

##### b) Montaje de la columna

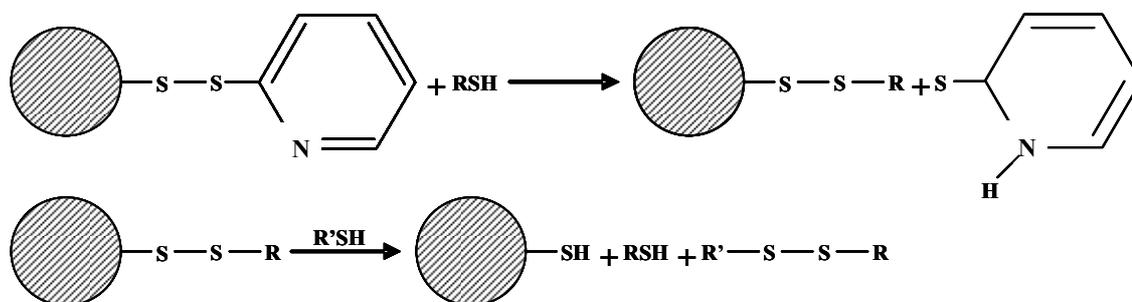
La columna utilizada en el sistema cromatográfico fue una Columna C 10/10 (Pharmacia Biotech). Para el montaje del sistema se mantuvo todo el material a 4°C y a continuación se incorporó la columna utilizando un adaptador de flujo AC 10 (Pharmacia Biotech). Tras purgar, se cerró el sistema, se retiró el adaptador de flujo y se dejaron unos 3-4 cm de buffer en la columna. A continuación se añadió la matriz

progresivamente para que decantase y se formase el lecho por la acción de la gravedad.

Posteriormente se conectó de nuevo la columna a la bomba y se hizo pasar buffer C a un flujo de 5 ml/min durante 30 min para conseguir el empacado de la matriz. Una vez acoplado el adaptador de flujo y cerrado de nuevo el sistema, se insertó el émbolo del adaptador hasta pocos milímetros de la superficie del lecho. Para equilibrar el gel, se pasaron por el sistema 32 ml de buffer C a un flujo de 0,1 ml/min durante 2 horas. El flujo de trabajo también se estableció en 0,1 ml/min.

#### 3.3.3.1.3.3. Prueba "binding"

El objetivo que se perseguía en esta fase de la técnica cromatográfica era la unión por afinidad de las tiol-proteinasas presentes en los homogenizados de *H. contortus* a las moléculas de Sepharose-4B de la columna mediante enlaces covalentes (Fig. 9). Para ello, se detuvo el sistema y se pasaron por la columna 10 ml de la muestra previamente desalada. Agotada la muestra, se volvió a conectar el sistema y se hicieron circular 35 ml del buffer C al flujo de trabajo (7 h). Simultáneamente se fueron recogiendo fracciones de 2 ml y registrando la absorbancia de cada una de ellas.

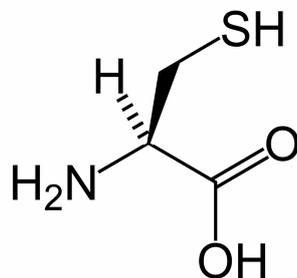


**Fig. 9.** Esquema de la reacción para la cromatografía covalente de una sustancia tiolada (RSH) en columna de Thiol Sepharose 4B activada. R'SH representa un tiol de poco peso molecular tal como el dithiothreitol o la L-cysteine.

#### 3.3.3.1.3.4. Elución

La etapa de elución consistió en la separación de las proteinasas retenidas en la matriz de Sepharose-4B, para lo cual se hizo circular un tampón que contenía un ligando con mayor afinidad que las proteinasas por los grupos tiol de la matriz. Este

buffer fue similar al buffer C pero con 25 mM de L-Cysteine (pH 7,4) (Merck) (**Fig. 10**).



**Fig. 10.** Estructura química del ligando utilizado para la elución (L-Cysteine).

Una correcta elución quedaba reflejada en el cromatograma como un pico en el que se encontraban mezcladas las fracciones proteicas enriquecidas con los productos de reacción de la L-Cysteine ( $R' - S - S - R'$  en la **Fig. 9**).

#### 3.3.3.1.3.5. Separación de las fracciones proteicas enriquecidas para proteinasas tipo cisteína

El objetivo de esta fase de la cromatografía fue separar los productos de reacción de la L-Cysteine de las fracciones proteicas enriquecidas obtenidas tras la elución. Con esta finalidad se realizó un pool con las fracciones que constituyeron el pico de elución, generalmente 5 fracciones (10 ml). La mezcla se hizo pasar por el sistema cromatográfico siguiendo el mismo protocolo descrito para la preparación de la muestra.

En el cromatograma resultante se observaron 2 picos. Las proteinasas se encontraron en las fracciones correspondientes al primer pico, normalmente 5 fracciones (10 ml), mientras que el segundo correspondió a los productos de reacción de la L-Cysteine, con menor peso molecular. Las fracciones que contenían las proteinasas se recogieron, se mezclaron y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 3.3.3.1.3.6. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (**Bradford, 1976**) de forma similar a lo descrito en el apartado 3.3.3.1.2. En este caso se utilizó como blanco el buffer C.

### 3.3.3.2. Preparación del inmunógeno y protocolo de inmunización

Una vez determinada la cantidad de antígeno necesaria para cada inmunización, un volumen igual de adyuvante se añadió a tubos de 10-50 ml y a continuación se fueron aplicando alícuotas de 500 µl de antígeno hasta completar el volumen total del inóculo; la relación de antígeno/adyuvante fue por tanto 1/1. Para conseguir una mezcla homogénea, cada vez que se añadía una alícuota de antígeno, la mezcla se agitaba en vórtex durante 1 minuto. Todo el proceso se realizó en cámara fría a 4°C para mantener la estabilidad de las proteínas.

La mezcla final resultante se dispensó en jeringas con agujas de diámetro interno grueso (BD Microlance TM 3 18G x 1 ½", 1,2 mm x 40 mm) para facilitar el manejo y aplicación del inmunógeno. Todas las jeringas se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la administración. El inmunógeno se administró vía intramuscular procurando no inyectar más de 1 ml en un mismo punto, y realizando un masaje de la zona para evitar la formación de encapsulamientos.

El antígeno se suministró en adyuvante completo de Freund (Sigma) en la primera dosis, e incompleto en las cuatro dosis restantes. El proceso de inmunización se llevó a cabo durante las primeras cinco semanas de la experiencia a razón de una inmunización por semana, siendo las dosis de antígeno administradas de 50, 75, 100, 100 y 300 µg hasta un total de 625 µg/animal, respectivamente. Los animales no inmunizados se sometieron a un protocolo idéntico, pero usando buffer C en lugar de antígeno en todos los casos.

### 3.3.4. INFECCIONES EXPERIMENTALES

En la séptima semana de experiencia, todos los animales, tanto inmunizados como no inmunizados, fueron infectados con 7.000 L3 de *H. contortus* vía intraruminal (**Fig. 11**) utilizando para ello jeringas con agujas BD Microlance TM 3 18G x 1 ½", 1,2 mm x 40 mm. Antes de dosificar los inóculos, se determinó la cantidad de larvas tal y como se describió en el apartado 3.2.1. del apartado **Material y Métodos**.

### 3.3.5. TOMA DE MUESTRAS Y SACRIFICIO

Se tomaron **muestras de heces** de forma seriada y con una frecuencia de dos veces por semana desde que se detectó la presencia de huevos hasta el final de la experiencia. Las muestras se recogieron de todos los animales, incluidos los controles, para verificar la ausencia de contaminaciones por *H. contortus* u otros

### 3. Material y Métodos

---

nematodos gastrointestinales. Para minimizar las fluctuaciones diarias en el número de huevos liberados todas las muestras se recogieron a la misma hora y fueron analizadas inmediatamente mediante el método de McMaster con ligeras modificaciones (MAFF, 1989). Las muestras se tomaron de forma individual directamente del recto de los animales.

La toma de **muestras de sangre** se realizó una vez por semana durante las 15 semanas de la experiencia. Las muestras se tomaron mediante punción yugular en tubos de Silicona SST (BD Vacutainer) para la obtención del suero y posterior determinación de los niveles de IgG específicos (apartado 3.4.2).



**Fig. 11.** Inoculación intraruminal de L3 de *H. contortus* en caprinos.

Una vez finalizada la experiencia, a la decimoquinta semana, todos los animales se sacrificaron siguiendo el protocolo recogido en la legislación vigente. Tras ligar con cuerda las aberturas anterior y posterior, todos los abomasos se trasladaron inmediatamente al laboratorio para realizar los análisis parasitológicos detallados en el apartado 3.4.1.2 de la sección **Material y Métodos**.

### 3.4. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN

Como parámetros de la evaluación de la inmunoprotección se tuvieron en cuenta tanto los análisis parasitológicos como los niveles séricos de IgG. Complementariamente se tomaron algunos datos clínicos.

#### 3.4.1. ANÁLISIS PARASITOLÓGICOS

##### 3.4.1.1. Recuentos fecales

La concentración de huevos de nematodos en heces se estimó por el método de McMaster modificado (Paracount-EPG™). Para el recuento se utilizaron 2 gramos de heces y el número de huevos observado se multiplicó por 50 para obtener el resultado en huevos por gramo de heces (HPG) (MAFF, 1989; Colville, 1991; Sloss *et al.*, 1994). De todos los animales investigados se tomaron 2 muestras de heces por semana a partir de la tercera semana post-infección, momento en el cual comenzó la eliminación de huevos en la mayoría de los grupos experimentales.

##### 3.4.1.2. Recuentos de vermes adultos

Para estimar el número total de vermes adultos de *H. contortus* presentes en el abomaso, se realizó un lavado de la mucosa gástrica con 700 ml de agua con el fin de arrastrar el mayor número de vermes posible. Tras el lavado se midió el volumen total obtenido (volumen de agua más contenido abomasal), y a partir de él se recogieron alícuotas de 200 ml que se fijaron con formaldehído 40% (Panreac) a una concentración final del 4% v/v (modificado de MAFF, 1989; Strain y Stear, 2001).

El recuento se realizó en un estetoscopio (Wild M38 Heerbrugg Switzerland) (x 6) a partir de las muestras fijadas. El análisis se efectuó en placas petri de 15 cm fraccionando los 200 ml obtenidos de cada animal en alícuotas de 10-15 ml.

#### 3.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IgGs ESPECÍFICAS EN SUERO

Los análisis serológicos se llevaron a cabo por duplicado sobre las muestras séricas recogida a lo largo del estudio, para lo cual se empleó un test ELISA indirecto en placas microtitre de 96 pocillos (Costar, Corning Incorporated). La antigenación de dichas placas se realizó con las fracciones proteicas enriquecidas con proteínas tipo cisteína solubles en PBS y purificadas mediante cromatografía de afinidad con

### 3. Material y Métodos

---

Tiol-Sheparose, según se describió en apartados anteriores (PBS-TSBP), utilizando una concentración final de 1 µg/ml en buffer carbonato pH 9,6 (NaHCO<sub>3</sub> al 0,36% p/v; NaCO<sub>3</sub> al 0,19% p/v en agua destilada).

Para la antigenación se añadieron 100 µl del antígeno diluido a cada pocillo y la placa se mantuvo 12 h a 4°C, transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u con 200 µl de PBS-TWEEN 20 al 0,05% v/v. A continuación se procedió a neutralizar las reacciones inespecíficas, para lo cual se incubó la placa a 37°C durante 45 minutos tras añadir a cada pocillo 200 µl de PBS-BSA al 3% p/v (Sigma).

Tras nuevos lavados con PBS-TWEEN 20 al 0,05% v/v se añadieron 100 µl de los sueros seleccionados para el análisis, previamente diluidos (1/100) con PBS y 0,02% p/v de azida de sodio (Sigma). Los sueros se incubaron a 37°C durante 1 hora y a continuación se realizaron nuevos lavados con PBS-TWEEN 20 al 0,05% en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Las incubaciones con el conjugado (anti-goat IgG peroxidase) (Sigma) se llevaron a cabo a 37°C durante 45 minutos sobre un volumen total de 100 µl a una dilución de 1/3.000 v/v en PBS (**Tabla 4**). Tras la incubación con el conjugado se realizó un último lavado (x 3) y la reacción inmunoenzimática se reveló añadiendo 100 µl de sustrato/pocillo durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. El sustrato consistió en una mezcla de tampón cítrico-fosfato (ácido cítrico al 1,02% v/v; fosfato sódico al 1,44% v/v) con OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma) al 0,04% p/v, a la que se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% v/v a una concentración final del 0,1% v/v. Finalmente, la reacción se frenó con 50 µl/pocillo de una solución 2 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Panreac) y la reacción colorimétrica resultante se midió en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Termo Labssystem) a una longitud de onda de 492 nm.

**Tabla 4.** ELISA IgG para la determinación de anticuerpos específicos.

<b>Tipo de ELISA</b>	INDIRECTO
<b>Conjugado</b>	Anti-goat IgG peroxidase (Sigma)
<b>Especie de obtención del conjugado</b>	Conejo
<b>Control positivo</b>	Pool de animales inmunizados correspondiente a la semana 14
<b>Dilución utilizada (suero)</b>	1:100
<b>Dilución utilizada (conjugado)</b>	1:3.000

---

Los datos se expresaron en base al porcentaje relativo de los niveles de IgG específica del suero con mayor respuesta. Como control positivo se usó el pool de animales inmunizados correspondiente a la semana 14.

## 3.5. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO

### 3.5.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE VERMES

A partir de los abomasos de los animales sacrificados en el día último de la experiencia se recogieron un total de 100 vermes adultos machos de cada grupo experimental para el estudio del polimorfismo genético. En dicho análisis se incluyeron sólo los vermes machos ya que las hembras podrían contener esperma procedente de machos o huevos fecundados, con los que los resultados de variabilidad genética no corresponderían a un solo individuo.

Cada verme macho se lavó tres veces en PBS a 4°C durante 5 min sobre una base de hielo, transfiriéndose posteriormente a un vial “eppendorf” que fue congelado rápidamente a -80°C para minimizar la degradación de su ADN. Cada vial se identificó individualmente indicando el experimento del que procedía y la fecha de recogida.

### 3.5.2. SELECCIÓN DE LOS GENES

El análisis de polimorfismo genético se realizó sobre cuatro genes codificadores de proteinasas tipo cisteína que han demostrado tener variabilidad genética según trabajos previos (Ruiz *et al.*, 2004b). En la siguiente tabla se recogen la fuente bibliográfica donde se publicaron por primera vez estos genes y los “primers” utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su amplificación y posterior análisis de polimorfismo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Genes seleccionados para la realización de los estudios de polimorfismo genético.

<i>Gen</i>	<i>Fuente bibliográfica</i>	<i>Primer forward (F)</i>	<i>Primer reverse (R)</i>
GCP-7	(Rehman y Jasmer, 1998)	5'GCATGCTGTGGAAAGTTC3'	5'CGGAGTGGCATAGGGATG3'
AC-1	(Pratt <i>et al.</i> , 1990)	5'TTTCTGCCACTGACATCA3'	5'ACGGTGGGGTTGGCGCTG 3'
AC-3	(Pratt <i>et al.</i> , 1992)	5'GACATCCTGTACGCCAAC3'	5'GTTGACGCCTCTTCAGGA 3'
AC-4	(Pratt <i>et al.</i> , 1992)	5'ATTTTGACATGCTGCAAT3'	5'TGGAGTTGCCGCCTCTCG3'

#### 3.5.3. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó por separado para cada uno de los vermes machos de *H. contortus* utilizando la técnica de doble extracción fenólica propuesta por Sambrook *et al.* (1989).

A cada muestra se le añadieron 100 µl de una solución de digestión compuesta por 9,410 µl de TE1X (Tris-EDTA) (Sigma), 50 µl de Proteinasa K (Roche) (20 mg/ml), 40 µl de RNasa (Roche) (10 µg/µl) y 500 µl de SDS (Sigma) 20% p/v en agua MilliQ. La mezcla se mantuvo a 52°C en agitación durante 24 horas.

Tras la digestión enzimática se añadieron 100 µl de fenol con hidroxiquinoleína y las muestras se mantuvieron en agitación durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes (unos 75 µl aproximadamente por cada muestra). Sobre el sedimento obtenido en el paso anterior se añadieron 75 µl de TE1X y se realizó el mismo proceso (agitación y centrifugación) con el objeto de recuperar la mayor cantidad de ADN posible. Los nuevos sobrenadantes se mezclaron con los anteriores en el mismo vial.

A los productos obtenidos se añadieron 150 µl de la solución de fenol y, tras la agitación de las muestras (10 min.), se realizó un nuevo proceso de centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro vial, al que se añadieron 300 µl de etanol absoluto y 15 µl de acetato sódico 3M (pH 6) mantenidos previamente a 4°C. La mezcla resultante se dejó en reposo 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 12.000 x g durante 30 minutos a la misma temperatura.

Tras dicha centrifugación, se eliminó todo el sobrenadante con la precaución necesaria para no aspirar el “pellet” de ADN que había quedado en el fondo del vial. La muestra se lavó una vez más, en esta ocasión con 300 µl de etanol al 70% mediante centrifugación (12.000 x g durante/ 10 min.), y se volvió a retirar el líquido sobrenadante.

Para finalizar, las muestras se deshidrataron mediante un evaporador centrífugo (Eppendorf concentrador 5301) a 30°C durante 15 minutos y posteriormente se resuspendieron en 50 µl de TE 1X. Todas las muestras extraídas según este procedimiento se mantuvieron almacenadas a 4°C.

### 3.5.4. AMPLIFICACIONES MEDIANTE PCR

Una vez extraído el ADN de los vermes se procedió a la amplificación de los genes AC-1, AC-3, AC-4, y GCP-7 utilizando los primers descritos previamente. Las amplificaciones se realizaron en viales “eppendorf” de 200  $\mu$ l sobre un volumen final de 25  $\mu$ l. Para cada gen se estandarizó cada componente de la reacción de PCR hasta optimizar el proceso de amplificación, tal y como se detalla en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de PCR para cada uno de los genes analizados.

	GCP-7	AC-1	AC-3	AC-4
<b>Primer F</b>	0,8 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
<b>Primer R</b>	0,8 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 mM	2 mM	1 mM	1 mM
<b>dNTPs</b>	0,2 mM/nucl.	0,4 mM/nucl.	0,2 mM/nucl.	0,2 mM/nucl.
<b>10x TaqBuffer</b>	10% v/v	10% v/v	10% v/v	10% v/v
<b>Taq Polim.</b>	0,2 U	0,2 U	0,2 U	0,2 U
<b>DNA/TE1X</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

Para todos los genes se usaron cebadores (“primers”) comercializados por Invitrogen y una solución de nucleótidos (A, T, U y G) producidos por Roche. El resto de reactivos (Taq polimerasa, 10x TaqBuffer y MgCl<sub>2</sub>) fueron suministrados por la casa comercial Bioline. La preparación de la mezcla para la reacción de PCR se realizó siempre a 4°C y en condiciones de esterilidad. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Biorad, Cycler™ Thermal Cycler) utilizando programas específicos para cada gen (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Programas de amplificación utilizados para los diferentes genes.

Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
94	2:00 min	1
94	0:15 seg	34 ciclos
52,2 (*)	0:30 seg	
70	1:00 min	
70	5:00 min	1
15	2:00 min	1
4	hasta recoger la muestra	

(\*) La temperatura de "annealing" fue la única que varió según el fragmento de gen amplificado, siendo de 52,2°C para los genes AC-1, AC-4, de 53°C para el gen AC-3 y de 54°C para el gen GCP-7.

Entre las muestras se incluyó siempre un control positivo (ADN de un verme amplificado con resultados positivos previamente), así como un control negativo (TE1X). El chequeo de la amplificación de las muestras se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,2% (ROCHE) en TBE 1X utilizando una cubeta de Biorad (Sub-Cell®, Model 96). Tras la polimerización de la agarosa, el gel se estabilizó en buffer de electroforesis TBE 1X durante unos 15 minutos, y a continuación se cargaron las muestras amplificadas previamente mezcladas con tampón de carga (6 µl de producto de PCR y 2 µl de tampón de carga 6X). Además de los productos de PCR, se incluyó un marcador para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados ( $\lambda$  125, Amersham Biosciences). La electroforesis se realizó a un voltaje constante (100 V) durante 30 minutos utilizando una fuente de alimentación PowerPac Basic (Biorad). Para visualización de las bandas amplificadas, los geles se tiñeron durante 30 minutos en bromuro de etidio (Sigma) y se lavaron en agitación durante 10 minutos en agua destilada. La visualización se llevó a cabo en un transiluminador Gel Doc™ XR (Biorad) con un equipo de fotografía ChemiDoc™ XRS (Biorad) que permitía registrar las imágenes en formato \*.JPG. En los fragmentos amplificados de los genes AC-1, AC-3 y AC-4 se observó una única banda de 350 bps aproximadamente, mientras que para el gen GCP-7 dicha banda presentó un tamaño próximo a los 625 bps.

#### 3.5.5. SSCP (*SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM*)

Una vez obtenidos los distintos productos de PCR, se procedió a evaluar el polimorfismo genético para cada uno de los genes indicados. Para ello las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones no desnaturizantes siguiendo la metodología que se describe a continuación.

##### 3.5.5.1. Preparación del soporte de electroforesis

El gel de acrilamida sobre el que se llevó a cabo la electroforesis de los distintos productos amplificados se realizó sobre cristales de 42 cm de largo x 20 cm de ancho, que fueron previamente limpiados con alcohol 70% v/v. Al cristal que sirvió de soporte al gel de electroforesis se le añadieron 500 µl de una solución de adherencia que contenía 6,25 µl de alcohol del 70%, 25 µl de ácido acético glacial (Panreac) y 2,5 µl de Bind Silane (Amersham Biosciences). La superficie del cristal se lavó con alcohol del 70% y, finalmente, con agua Milli-Q.

Por último, se unieron las dos caras de los cristales colocando dos separadores de teflón de 0,4 mm de grosor en los márgenes, y el conjunto se fijó con pinzas.

### 3.5.5.2. Preparación del gel de acrilamida

Todos los análisis electroforéticos de las muestras amplificadas se realizaron sobre geles de acrilamida en los que se utilizó una solución “madre” 49:1 que contenía acrilamida al 49% p/v (Sigma) y N-N' Methilenebisacrilamide al 1% p/v (Sigma) en Agua Milli-Q.

Dado el tamaño de los cristales, así como el grosor de los separadores utilizados, se prepararon rutinariamente volúmenes de 40 ml que contenían la mezcla necesaria para formar el gel (**Tabla 8**). Este volumen incluía un 40% v/v de la solución “madre” de acrilamida en buffer, un 20% v/v de buffer TBE 5X (1,11 M Tris, 1,11 M Ácido bórico, 0,003 M EDTA, pH 8,0), un 0,13% v/v de N,N,N,N'-tetramethyl-ethylenediamine (Temed) (Sigma) y un 0,07% p/v de amonio persulfato (APS) (Sigma) en Agua Milli-Q. Los dos últimos compuestos (Temed y APS) se añadieron en último lugar y a continuación la mezcla se introdujo entre los dos cristales con la ayuda de una jeringa.

**Tabla 8.** Condiciones de los análisis mediante SSCP para los distintos genes. La dilución de la muestra corresponde a la proporción producto de PCR/tampón de carga (con formamida).

	GCP-7	AC-1	AC-3	AC-4
<b>Acrilamida 49:1</b>	40%	40%	40%	40%
<b>TBE 5X</b>	20%	20%	20%	20%
<b>Temed</b>	0,13 % v/v	0,13 % v/v	0,13 % v/v	0,13 % v/v
<b>APS</b>	0,07% p/v	0,07% p/v	0,07% p/v	0,07% p/v
<b>Agua Milli-Q</b>	Hasta 40 ml	Hasta 40 ml	Hasta 40 ml	Hasta 40 ml
<b>Dilución muestra</b>	1:20	1:50	1:50	1:50
<b>Voltios</b>	500	600	600	600
<b>Tiempo (horas)</b>	22	22	22	22

Tras acoplar el peine al ensamblaje se esperó a la polimerización del gel durante aproximadamente 60 minutos. Tras la polimerización se retiró el peine y se equilibró el sistema en una cubeta de electroforesis (Scientific CO, Model # SG-400-20) sometida a 60 V constantes durante 15 minutos utilizando TBE 1X como buffer.

#### 3.5.5.3. Preparación de las muestras

Solamente se analizaron aquellos productos de PCR que, tras ser analizados en geles de agarosa, mostraron una única banda con un tamaño correspondiente al producto amplificado (350 bps para los genes AC-1, AC-3 y AC-4 y 625 bps para el gen GCP-7, aproximadamente). Cada muestra se colocó en el gel a una dilución en tampón de carga que contenía formamida al 95% (Sigma), NaOH 10mM, Bromophenol Blue 0,25% (Sigma) y Xylene Cyanol 0,25% (Sigma). Las diluciones empleadas para cada gen se recogen en la **Tabla 8**. Las muestras diluidas se calentaron a 94°C durante 2 minutos para facilitar la deshibridación de las cadenas de ADN y se matuvieron a 4°C antes de someterlas a electroforesis. Se cargaron 2 µl por pocillo de cada una de las muestras.

#### 3.5.5.4. Condiciones de la electroforesis

Las condiciones de electroforesis fueron similares para todos los genes. Por lo general, se utilizó un voltaje constante de 600 V durante 22 horas a temperatura ambiente, a excepción de en los análisis realizados sobre los productos de amplificación del gen GCP-7 (500 V) (**Tabla 8**). Como buffer de electroforesis se empleó el mismo buffer utilizado para equilibrar el gel (TBE 1X).

#### 3.5.5.5. Tinción de plata

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados y desnaturalizados de cada una de las muestras se visualizaron mediante una tinción de plata. Con este objetivo, el gel adherido al cristal se colocó en una bandeja de tinción y se fijó mediante un lavado durante 20 minutos con una solución de ácido acético glacial al 10% v/v en agua Milli-Q a 4°C. A continuación se realizaron dos **lavados** de dos minutos cada uno con 500 ml de Agua Milli-Q a 4°C, y posteriormente se procedió a la **tinción** propiamente dicha con plata utilizando para ello una solución con 0,1% p/v de nitrato de plata (Merck) en agua Milli-Q con 0,2% v/v de formaldehído al 37% (Fluka). El proceso de tinción se realizó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Una vez finalizada la tinción, el gel se lavó durante 5 segundos en agua Milli-Q a 4°C. Para el **revelado** de la tinción, el gel se incubó con una solución 0,24 M de carbonato sódico (Fluka) hasta que se visualizaron las bandas. Una vez que se consiguió un grado de definición óptimo, la reacción se detuvo añadiendo la misma solución utilizada en el proceso de fijación. Para finalizar, se realizó un último lavado con agua Milli-Q a 4°C durante 2 minutos.

### 3.5.6. SECUENCIACIÓN

La secuenciación de los diferentes alelos encontrados en cada gen se realizó en el Servicio de Genética Forense de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Para ello se utilizaron productos de PCR que habían mostrado bandas nítidas tras el chequeo en geles de agarosa, preferentemente de homocigotos.

Sin embargo, no todos los alelos pudieron encontrarse en homocigosis sino que algunos sólo aparecieron en forma de heterocigotos. Para aislar el ADN de este tipo de alelos, se utilizó un kit de extracción de ADN de geles de poliacrilamida QIAEX II (Qiagen). Una vez realizada la electroforesis de la SSCP y antes de que solidificara del todo el gel de poliacrilamida, se cortó con bisturí únicamente la banda correspondiente al alelo que se pretendía aislar. Tras pesar el gel cortado, se añadieron 2 volúmenes de buffer de difusión pH 8,0 (0,5 M Acetato amónico (Sigma); 10mM Acetato magnésico (Sigma); 1mM EDTA (Sigma); 0,1 SDS (Sigma)) por cada volumen de gel, y la mezcla se incubó a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, tras centrifugar la muestra durante 1 minuto a 10.000 x g, se recolectó el sobrenadante y se pasó a través de un filtro Whatman GF/C (Whatman®) para eliminar restos de acrilamida. A continuación se añadieron aproximadamente 3 volúmenes de Buffer QX1 (Qiagen) y el conjunto se resuspendió mediante vórtex durante 30 segundos. A esta mezcla se le añadió 10 µl de QIAEX II (Qiagen) y posteriormente se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras una nueva centrifugación a 10.000 x g durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con 500 µl de Buffer PE (Qiagen) y se dejó secar la muestra de 10 a 15 minutos. Por último se resuspendió el ADN obtenido en 20 µl de TE1X. El ADN del alelo aislado fue amplificado nuevamente mediante PCR y posteriormente se comprobó su patrón SSCP para verificar el proceso de aislamiento y purificación.

Como paso previo a la reacción de secuenciación, los productos de PCR se purificaron utilizando columnas MicroSpin con resina Sephacryl™ S-400 HR (Amersham Biosciences). El proceso de purificación incluyó un primer paso de homogenización de la resina mediante agitación en vórtex. Posteriormente, y tras romper la parte distal de la columna, se colocó en un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se centrifugó a 800 x g durante 1 minuto, observándose que la resina formaba una rampa en el interior. Seguidamente se colocó la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y se aplicó la muestra en el centro de la rampa formada previamente. El proceso finalizó con una nueva centrifugación de 2 minutos a 800 x g.

El método de secuenciación utilizado en este trabajo se basa en la reacción enzimática desarrollada por **Sanger *et al.* (1977)**, que consiste en la extensión por Taq polimerasa de una cadena de ADN a partir de un primer específico y siguiendo una cadena molde, con la particularidad de que la síntesis se efectúa en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs), aparte de los habituales desoxinucleótidos (dNTPs).

En la adaptación del método Sanger utilizado (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) se emplearon ddNTPs marcados con fluorocromos dicloro [R6G] para ddATP, dicloro [TAMRA] para ddTTP, dicloro [R110] para ddGTP y dicloro [ROX] para ddCTP. La reacción generó de esta forma numerosas cadenas de ADN marcadas en los extremos 3' por la incorporación de un ddNTP. El producto de la reacción se analizó mediante el secuenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). En este equipo los fragmentos simplificados se separan por peso molecular a través de un polímero especial (POP 6; Performance Optimizad Polymer 6) en medio desnaturizante sometido a un campo eléctrico. La lectura final se realizó mediante un láser que, al incidir sobre los fluorocromos situados al final de las diferentes cadenas ya ordenadas, emite un espectro de fluorescencia que es interpretado por un software específico y traducido en forma de secuencia de nucleótidos. La secuenciación se expresa en forma de un electroferograma en el que cada una de las cuatro bases está representada por un color diferente.

El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante, que consistió en añadir en un tubo de centrífuga de 0,2 ml, 8 µl de terminador Ready Reaction Mix (que contiene las cantidades necesarias de dNTPs, ddNTPs, tampón, Taq polimerasa y MgCl<sub>2</sub>), 3,2 pmoles de primer, 50 ng de ADN molde y agua Milli-Q hasta un volumen de 20 µl. Esta mezcla se introdujo en un termociclador con un programa que constaba de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 4°C. Posteriormente, se precipitó el producto de extensión de cada reacción de secuenciación en un tubo de centrífuga de 1,5 ml que contenía 2 µl de acetato sódico 3M a pH 4,6 y 50 µl de etanol al 95%. Al volumen anterior se le añadieron los 20 µl de muestra y la mezcla se agitó en vórtex. Tras mantener las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, el tubo se centrifugó a una velocidad de 12.000 x g durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 250 µl de etanol al 70% para volver a centrifugarlo en las mismas condiciones anteriores durante 5 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el resto de alcohol a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Las muestras se resuspendieron en 20 µl de formamida y se transfirieron a una placa de secuenciación. Tras realizar una desnaturización a 95°C durante 3 minutos y posterior incubación en hielo durante otros 3 minutos, las muestras se inyectaron en

el secuenciador automático aplicando un voltaje de 1,5 kilovoltios (Kv) durante 30 segundos. La electroforesis propiamente dicha se realizó a un voltaje constante de 12,2 Kv durante 6.500 segundos.

Una vez obtenidos los archivos informáticos que facilitó el Servicio de Genética Forense, se procedió a su análisis con el programa MEGA 4.0.1 (**Tamura *et al.*, 2007**), gracias al cual se obtuvieron los alineamientos y la secuencia completa de cada alelo. Las secuencias de nucleótidos completas de los diferentes alelos de cada gen se encuentran en las **Figuras 58, 59, 60 y 61** (ver Anexos “Figuras”). Ese mismo programa, junto con el programa informático DnaSP 4.50.3 (**Giaglis *et al.*, 2007**), se utilizó para realizar los análisis de variabilidad genética, de polimorfismo y los estudios filogenéticos. A partir de las secuencias nucleotídicas de cada alelo, se dedujo la secuencia de aminoácidos utilizando el programa BLASTX, así como la estructura (secuencia de intrones y exones) de los diferentes alelos (**Ruiz *et al.*, 2004b**). Las secuencias inferidas de aminoácidos de los diferentes alelos de cada gen se encuentran en las **Figuras 62, 63, 64 y 65** (ver Anexos “Figuras”).

## 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.6.1. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN

Una vez obtenidos los resultados de recuentos fecales de huevos, de la carga parasitaria y de los niveles séricos de IgG, se procedió a su análisis estadístico utilizando el programa estadístico SPSS 13.0 (SPSS Inc., 2000) (**González *et al.*, 2008a**) para Windows XP.

En el caso de distintas tomas de muestras que se repiten a lo largo del tiempo, como por ejemplo HPG o niveles séricos de IgG, en primer lugar se comprobó que los datos seguían una distribución normal, utilizando para ello las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk según cada caso. Los datos no normalizados se transformaron mediante distintas funciones ( $\log_{10}+1$ , raíz cuadrada), para posteriormente, una vez comprobada su normalidad, aplicar el Modelo General Lineal de Muestras Repetidas.

Los datos correspondientes a los recuentos fecales de huevos, se normalizaron utilizando la función  $\log_{10}+1$  de los recuentos acumulados a lo largo de toda la experiencia, mientras que los valores de IgG ya se encontraban normalizados. Los valores  $P < 0,05$  fueron considerados significativos.

Por su parte, los recuentos de vermes en abomaso se analizaron tras normalizar los valores mediante la raíz cuadrada y posteriormente aplicando la prueba *t* de Student ya que las poblaciones siguieron distribuciones normales. También se consideró significación estadística a partir de valores  $P < 0,05$ .

#### 3.6.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO MEDIANTE SSCP

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SigmaStat 3.1 para Windows XP. Las diferencias en las frecuencias alélicas entre todas los lotes comparados fueron valorados usando el test G, agrupando los alelos cuando el número fue inferior a 5 individuos (**Ruiz *et al.*, 2004b**). Las diferencias entre los grupos comparados se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $P < 0,05$ .

Se llevaron a cabo todas aquellas comparaciones que se consideraron necesarias para valorar todos los factores objeto de estudio (inmunización, cepa y hospedador). Se realizaron incluso agrupaciones de varios lotes a fin de evaluar dichos parámetros de manera más global (Ver **Tabla 15** en Anexos “Tablas”). El factor inmunización se analizó comparando grupos de animales inmunizados con no inmunizados, distinguiéndose entre inmunizaciones homólogas (aquellas en las que se inmunizó y se infectó con la misma cepa del parásito) y heterólogas (aquellas en las que se inmunizó y se infectó con cepas diferentes). Los factores cepa y hospedador se evaluaron comparando entre grupos infectados con distinta cepa (NA vs SP) o diferentes hospedadores, respectivamente. En todos los casos se comparó cada factor de manera independiente, sin tener en cuenta a los otros dos.

#### 3.6.3. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Tras obtener la secuencia completa de cada alelo y agruparlos por taxones para cada cepa con el “software” MEGA 4.0.1, se realizó un estudio de filogenia. Para ello se determinaron las distancias genéticas usando el método Jukes-Cantor (**Ruiz *et al.*, 2004b**) estimando parámetros tales como: distancia media dentro de grupos, distancia media entre grupos (entre ambas cepas) y distancia máxima, mínima y media del total de la población.

Se construyó un dendrograma basado en las distancias genéticas entre los distintos *loci*, mediante el método Neighbour-Joining Tree. En todos los casos se estimó el error estándar mediante un procedimiento de muestreo aleatorio con un total de 500 réplicas (**Ruiz *et al.*, 2004b**).

Mediante al programa DnaSP 4.50.3 se obtuvieron también diversos parámetros relacionados con el polimorfismo, tales como el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ). Ambos programas (MEGA 4.0.1, DnaSP 4.50.3) se utilizaron en el entorno de Windows XP.

#### *4. RESULTADOS*

## 4.1. ESTUDIO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN

Tal y como se comentó en el capítulo de **Material y Métodos**, en el presente trabajo se ha llevado a cabo la inmunización de ganado ovino y caprino con proteínas tipo cisteína aisladas de vermes adultos de dos cepas distintas del parásito *Haemonchus contortus* (*H. contortus*), una cepa norteamericana (NA) y una cepa aislada en Gran Canaria (SP). El efecto inmunoprotector de este tipo de antígenos se valoró teniendo en cuenta tres parámetros: la eliminación de huevos por gramo de heces (HPG) a lo largo de la experiencia, la carga parasitaria de vermes adultos en abomaso al final del ensayo, y los niveles de IgG en sangre como respuesta a la inmunización.

### 4.1.1. RECUENTO DE HUEVOS POR GRAMO DE HECES

La eliminación de huevos en las heces comenzó a partir de la 10ª semana del inicio de la experiencia (3ª semana p.i.) en todos los ovinos infectados con la cepa aislada en ovino de Norteamérica (NA). Sin embargo, en la mayoría de los caprinos infectados con dicha cepa el periodo de prepatencia fue de 4 semanas. La única salvedad la constituyó el grupo de caprinos inmunizado con proteínas procedentes de la cepa aislada en Gran Canaria o cepa SP (SP/NA), en los que comenzaron a detectarse huevos fecales a finales de la 3ª semana post-infección. Por otro lado, todos los ovinos y caprinos que fueron infectados con la cepa SP tuvieron un periodo prepatente de 4 semanas.

La sintomatología clínica se tomó como parámetro complementario para evaluar el efecto inmunoprotector de las inmunizaciones. Se observó que los animales no inmunizados que presentaron recuentos altos de HPG, mayores de 8.000 HPG, mostraban síntomas compatibles con la haemonchosis, que incluían la presencia de heces blandas no diarreicas, mucosas pálidas, anorexia, adelgazamiento y mal aspecto general. En algún ovino no inmunizado e infectado con la cepa NA, se observó incluso algún caso de edema submandibular debido a la hipoproteïnemia. Los animales que fueron inmunizados no presentaron síntomas clínicos o los presentaron de forma muy leve.

#### 4.1.1.1. Inmunización en ovinos frente a infecciones con la cepa NA

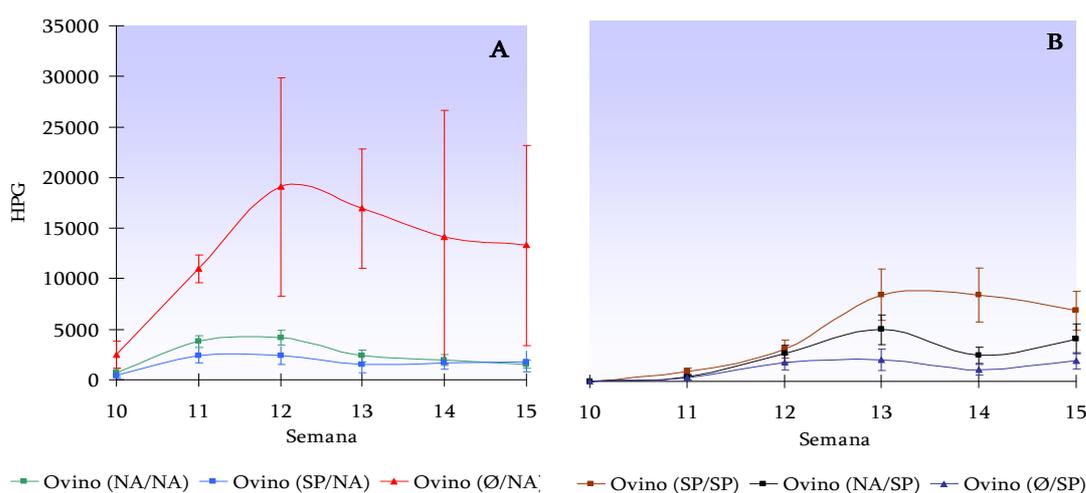
Como ya se indicó, todos los ovinos infectados con la cepa NA (NA/NA, SP/NA y Ø/NA) mostraron resultados coprológicos positivos a partir de la 3ª semana p.i.; a partir de este momento, los recuentos fecales se incrementaron

#### 4. Resultados

progresivamente hasta alcanzar sus máximos valores a la 5ª semana p.i. Posteriormente fueron decreciendo de manera progresiva hasta el último muestreo (8ª semana p.i.) (**Tabla 9**). Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron una clara disminución en la eliminación de HPG en todos los animales que fueron previamente inmunizados (NA/NA y SP/NA) frente a los animales del grupo control ( $\emptyset$ /NA) desde la 3ª semana p.i. hasta la 8ª semana p.i., siendo más evidente la diferencia a medida que avanzó la experiencia (**Fig. 12**). Estos datos fueron estadísticamente significativos tanto para el ensayo homólogo (NA/NA) (oscilando el valor  $P$  entre  $< 0,001$  y  $< 0,05$ ) como para el heterólogo (SP/NA) (obteniéndose valores de  $P < 0,05$ ), desde la 4ª semana p.i. hasta el final del estudio.

##### 4.1.1.2. Inmunización en ovinos frente a infecciones con la cepa SP

En todos los ovinos infectados con la cepa SP (SP/SP, NA/SP y  $\emptyset$ /SP) el periodo prepatente fue de 4 semanas p.i. Los recuentos fecales se incrementaron progresivamente a medida que avanzaba la experiencia hasta alcanzar sus máximos valores a la 6ª semana p.i., para posteriormente ir decreciendo ligeramente hasta el final del estudio (**Tabla 9**). En ninguno de los muestreos realizados, los ovinos inmunizados (SP/SP y NA/SP) presentaron recuentos de HPG significativamente menores que los no inmunizados ( $\emptyset$ /SP) (**Fig. 12B**). Por otro lado, tal y como puede apreciarse en esta misma figura, los recuentos fecales de los animales no inmunizados e infectados con esta cepa ( $\emptyset$ /SP) fueron similares a los del grupo de animales inmunizados e infectados con la cepa NA (NA/NA y SP/NA) (**Fig. 12A**).



**Fig. 12.** Evolución semanal comparativa del número de HPG. A la izquierda (Fig. 12A) se representan todos los ovinos inmunizados e infectados con NA y su grupo control ( $\emptyset$ /NA). A la derecha (Fig. 12B) todos los ovinos inmunizados e infectados con SP y su grupo control ( $\emptyset$ /SP). Se representan las medias de los dos muestreos semanales de cada grupo  $\pm$  SEM (error estándar de la media).

**Tabla 9.** Evolución semanal de la eliminación de huevos por gramo de heces (HPG) en los diferentes grupos experimentales de ovinos. En cada una de las semanas investigadas, se realizaron dos muestreos (A, B). Se representa la media de los datos acumulados de cada muestreo semanal para cada grupo junto al error estándar.

<i>Grupo S.p.i..</i>	<i>OV (NA/NA)</i>	<i>OV (SP/NA)</i>	<i>OV (Ø/NA)</i>	<i>OV (SP/SP)</i>	<i>OV (NA/SP)</i>	<i>OV (Ø/SP)</i>
<b>3<sup>a</sup> A</b>	140 ± 102,04	162,5 ± 71,81	256,25 ± 256,25	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>3<sup>a</sup> B</b>	1.510 ± 742,57	862,5 ± 17,02	4.856,2 ± 2.348,50	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>4<sup>a</sup> A</b>	5.490 ± 1.778,56	3.600 ± 1.689,80	17.443,7 ± 4.213,20	380 ± 251,30	220 ± 207,72	12,5 ± 12,5
<b>4<sup>a</sup> B</b>	9.110 ± 1.928,90	5.662,5 ± 2.346,66	26.812,5 ± 4.732,78	1.840 ± 785,24	810 ± 639,02	137,5 ± 89,85
<b>5<sup>a</sup> A</b>	15.115 ± 2.089,51	8.337,5 ± 2.998,84	50.337 ± 7.113,64	3.900 ± 1.581,69	2.350 ± 1.323,25	1.300 ± 462,33
<b>5<sup>a</sup> B</b>	17.395 ± 2.184,94	10.512,5 ± 4.452,26	64.925 ± 11.072,30	8.080 ± 3.054,73	6.140 ± 2.631,80	2.982,5 ± 1.383,79
<b>6<sup>a</sup> A</b>	20.275 ± 1.791,11	12.962,5 ± 5.836,14	88.537,5 ± 20.141,15	20.467,2 ± 6.958,27	13.582,8 ± 4.566,05	4.895 ± 2.704,52
<b>6<sup>a</sup> B</b>	22.175 ± 2.168,77	13.550 ± 5.994,20	98.793,7 ± 22.134,21	24.847,2 ± 8.546,01	16.291,2 ± 5.051,97	7.332,5 ± 4.609,27
<b>7<sup>a</sup> A</b>	24.061 ± 2.698,02	15.703,7 ± 6.823,42	113.862 ± 27.681,86	36.647,6 ± 12.978,78	19.061,2 ± 6.008,40	8.720 ± 5.818,43
<b>7<sup>a</sup> B</b>	26.018 ± 3.463,66	16.991,2 ± 7.606,10	127.081,2 ± 31.045,97	41.587,6 ± 14.794,47	21.381,2 ± 6.690,35	9.907,5 ± 6.441,77
<b>8<sup>a</sup> A</b>	27.868 ± 3.921,83	19.442,5 ± 9.414,40	144.343,7 ± 35.812,1	50.577,6 ± 17.914,57	27.121,2 ± 9.092,89	11.532,5 ± 7.334,51
<b>8<sup>a</sup> B</b>	29.113 ± 4.351,84	20.630 ± 10.339,53	153.687, ± 38.832,08	55.307,6 ± 19.584,71	29.641,2 ± 9.654,08	13.920 ± 8.737,39

#### 4.1.1.3. Inmunización en caprinos frente a infecciones con la cepa NA

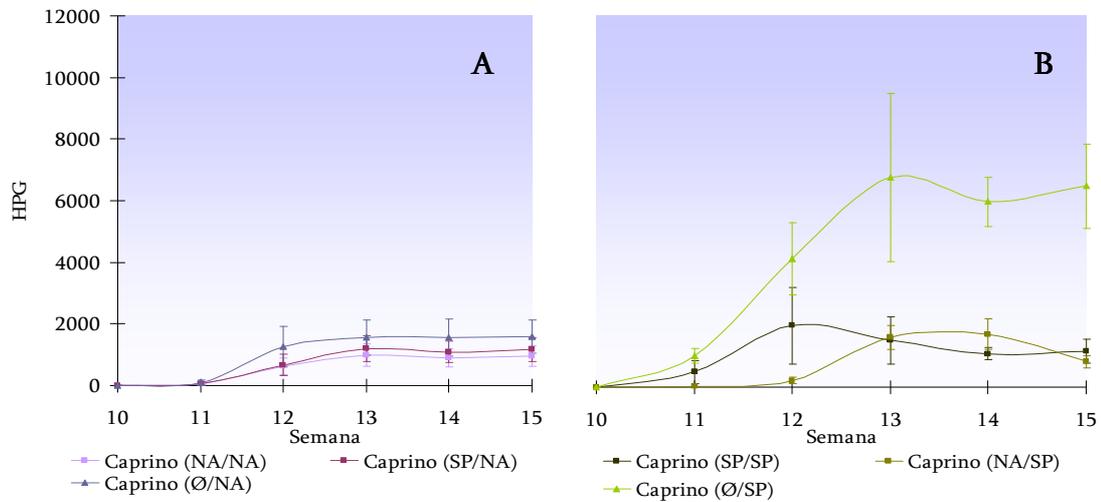
Los caprinos infectados experimentalmente con L3 de la cepa NA, previamente inmunizados con proteínas de SP (SP/NA) comenzaron a eliminar huevos del parásito a la 3<sup>a</sup> semana p.i, mientras que los animales del ensayo homólogo (NA/NA) y los del grupo control (Ø/NA) lo hicieron una semana más tarde (**Tabla 10**). Los valores de HPG alcanzaron el máximo a la 6<sup>a</sup> semana p.i. y a partir de ahí se mantuvieron con escasas variaciones.

Los resultados obtenidos con este protocolo de inmunización mostraron una reducción no significativa del número de HPG en los animales inmunizados del ensayo homólogo (NA/NA) cuando se comparó con los datos observados en el grupo control ( $\emptyset$ /NA) (**Tabla 10**). En la inmunización heteróloga (SP/NA) los recuentos fecales fueron incluso mayores que los del grupo control. Por último, los recuentos de huevos en heces del grupo control ( $\emptyset$ /NA) fueron similares a los obtenidos en los animales inmunizados que sí resultaron protegidos frente a inoculaciones con la cepa SP (**Fig. 13B**).

##### 4.1.1.4. Inmunización en caprino frente a infecciones con la cepa SP

La observación de huevos fecales en el grupo control fue aumentando progresivamente desde la 4ª semana p.i. hasta alcanzar valores máximos a la 6ª semana post-infección y estos valores se mantuvieron elevados hasta el momento del sacrificio. El grupo de caprinos inmunizados con la cepa homóloga (SP/SP) alcanzó el pico de eliminación de huevos a la 5ª semana post-infección y a partir de ese momento los recuentos fueron decreciendo ligeramente hasta el final de la experiencia. En el grupo inmunizado con la cepa heteróloga (NA/SP) se encontraron los valores máximos de HPG entre la 6ª y 7ª semana p.i. y a partir de ahí fueron decreciendo progresivamente.

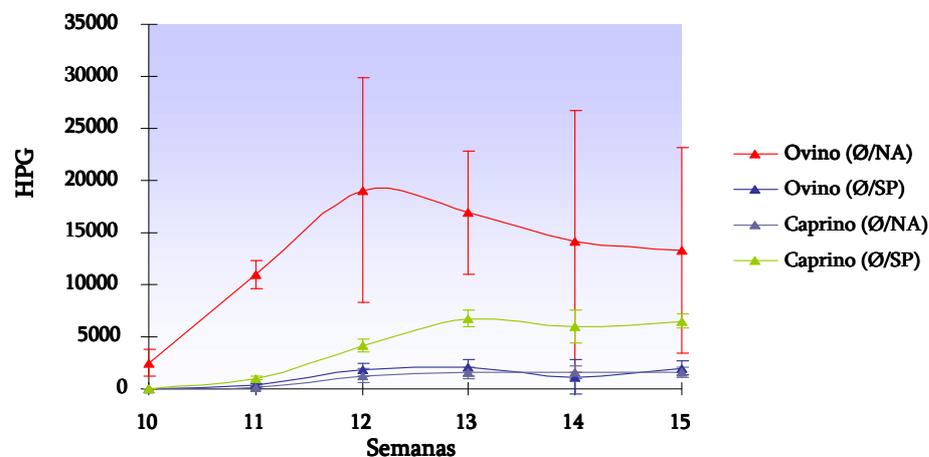
Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron una clara disminución en la eliminación de HPG en todos los animales que fueron previamente inmunizados (SP/SP y NA/SP) frente a los animales del grupo control ( $\emptyset$ /SP), desde la 5ª semana p.i. hasta la 8ª semana p.i, siendo más evidente la diferencia a medida que avanzó la experiencia (**Fig. 13B**). Estos datos fueron estadísticamente significativos para ambos grupos de animales inmunizados al compararlos con el grupo control ( $\emptyset$ /SP), tanto para el ensayo homólogo (SP/SP) como para el ensayo heterólogo (NA/SP). En el ensayo homólogo (SP/SP) la significación se registró a partir de la 4ª semana p.i., mientras que en el ensayo heterólogo (NA/SP) comenzó a partir de la 5ª semana p.i., y en ambos casos dicha significación continuó hasta el final del estudio, habiéndose obtenido, en cualquier caso, un valor de  $P < 0,05$  tanto para el homólogo como para el heterólogo.



**Fig. 13.** Evolución semanal comparativa del número de HPG. A la izquierda (Fig. 13A) se representan todos los caprinos inmunizados e infectados posteriormente con NA y su grupo control (Ø/NA). A la derecha (Fig. 13B) los caprinos inmunizados e infectados con la cepa SP y su grupo control (Ø/SP). Se representan las medias de los dos muestreos semanales de cada grupo  $\pm$  SEM.

#### 4.1.1.5. Animales no inmunizados

En aquellos animales controles no inmunizados e infectados con una cepa procedente de una especie hospedadora distinta, se observaron recuentos menores de HPG que en los controles infectados con la correspondiente cepa homóloga. Es decir, los ovinos (Ø/SP) y los caprinos (Ø/NA) presentaron recuentos de HPG sensiblemente más bajos que los ovinos (Ø/NA) y los caprinos (Ø/SP) (**Fig. 14**). Dentro de los grupos control, los recuentos encontrados en ovino (Ø/NA) fueron significativamente mayores que los del caprino (Ø/SP) ( $P < 0,001$  y  $< 0,05$ ).



**Fig. 14.** Evolución semanal comparativa de HPG de los animales controles no inmunizados. Se representan las medias de los dos muestreos semanales de cada grupo  $\pm$  SEM.

#### 4. Resultados

**Tabla 10.** Evolución semanal de la eliminación de huevos por gramo de heces (HPG) en los diferentes grupos experimentales de caprinos. Se representa la media de los datos acumulados de cada muestreo semanal junto al error estándar.

<i>Grupo S.p.i.</i>	<i>CA (NA/NA)</i>	<i>CA (SP/NA)</i>	<i>CA (Ø/NA)</i>	<i>CA (SP/SP)</i>	<i>CA (NA/SP)</i>	<i>CA (Ø/SP)</i>
<b>3ª A</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>3ª B</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>4ª A</b>	5 ± 5,00	6,25 ± 6,25	40 ± 40,00	0 ± 0	16,66 ± 16,66	0 ± 0
<b>4ª B</b>	116 ± 98,33	145 ± 121,29	207 ± 192,12	275 ± 246,22	50 ± 28,87	508,33 ± 149,12
<b>5ª A</b>	626 ± 436,38	688,75 ± 557,50	922 ± 511,05	987,5 ± 768,65	233,33 ± 158,99	2.183,3 ± 601,76
<b>5ª B</b>	1.391 ± 882,54	1.482,5 ± 1.133,23	2.721,6 ± 1.642,99	2.288,33 ± 1.634,74	483,33 ± 358,62	6.041,66 ± 1.851,55
<b>6ª A</b>	2.456 ± 1.337,55	2.813,75 ± 1.663,86	4.096,6 ± 2.409,28	4.961,67 ± 3.211,35	2.196,66 ± 960,91	10.300 ± 2.778,49
<b>6ª B</b>	3.376 ± 1.739,30	3.876,25 ± 2.150,55	5.834 ± 3.317,17	6.901,66 ± 4.427,65	3.713,33 ± 1.356,47	16.208,3 ± 4.370,13
<b>7ª A</b>	4.386 ± 2.139,39	5.063,75 ± 2.619,68	7.604 ± 4.300,28	7.976,66 ± 4.696,48	6.244 ± 2.072,53	23.833,3 ± 7.706,92
<b>7ª B</b>	5.176,8 ± 2.555,40	6.039,75 ± 3.105,21	8.949 ± 5.126,16	9.235 ± 4.744,26	7.127,33 ± 2.102,26	31.533,33 ± 7.168,32
<b>8ª A</b>	6.326,8 ± 3.135,95	7.446 ± 3.781,88	10.689 ± 5.962,76	10.126,66 ± 4.758,14	8.085,66 ± 1.930,35	35.798,33 ± 7.581,55
<b>8ª B</b>	7.096,8 ± 3.467,04	8.383,5 ± 4.156,28	12.114 ± 6.628,81	11.281,6 ± 4.945,80	8.769 ± 2.110,71	42.266,6 ± 8.432,96

#### 4.1.2. RECUENTO DE VERMES ADULTOS RECOGIDOS EN ABOMASO

##### 4.1.2.1. Inmunización en ovinos frente a infecciones con las cepas NA y SP

Los ovinos inmunizados e infectados con L3 de la cepa NA, tanto los del grupo homólogo (NA/NA) como los del grupo heterólogo (SP/NA), presentaron una reducción en el número de vermes adultos presentes en abomaso con respecto al grupo control (Ø/NA) (**Fig. 15**). Dicha reducción sólo resultó estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) cuando se comparó el grupo perteneciente al ensayo homólogo (NA/NA) con el grupo no inmunizado (Ø/NA).

Los ovinos inmunizados que fueron infectados con la cepa SP (SP/SP y NA/SP) no mostraron una reducción significativa con respecto al grupo no inmunizado ( $\emptyset$ /SP). Por otro lado, en los tres grupos de ovinos infectados con la cepa SP, inmunizados o no, los recuentos de vermes fueron inferiores a los observados en los ovinos controles no inmunizados e infectados con la cepa NA ( $\emptyset$ /NA), aunque sin llegar a ser estadísticamente significativos (Fig. 15).

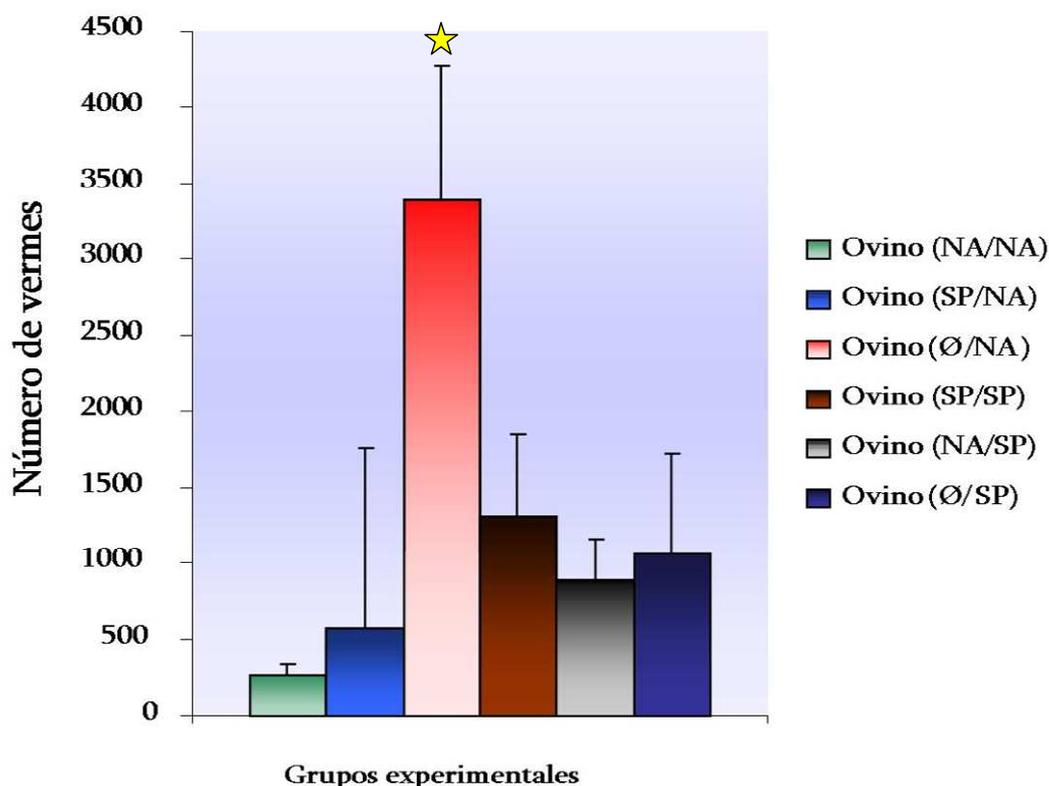


Fig. 15. Número de vermes en abomaso en los grupos de ovinos. Se representa la media de cada grupo junto con el error estándar.

#### 4.1.2.2. Inmunización en caprinos frente a infecciones con las cepas NA y SP

Los caprinos inmunizados e infectados con la cepa NA (grupos NA/NA y SP/NA) mostraron una carga parasitaria similar que la observada en el correspondiente grupo control ( $\emptyset$ /NA) (Fig. 16).

En los grupos inmunizados e infectados con SP (grupos SP/SP y NA/SP) se observó una reducción en el número de vermes con respecto al grupo control ( $\emptyset$ /SP), siendo esta reducción estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en el ensayo homólogo (SP/SP) (Fig. 16).

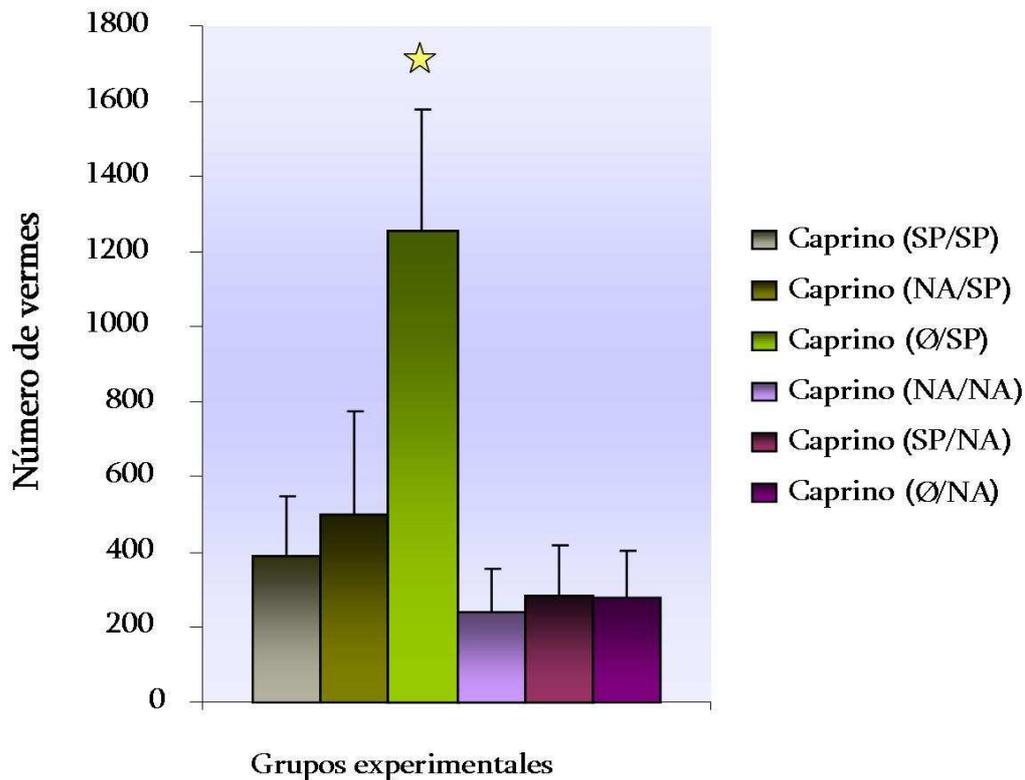


Fig. 16. Número de vermes en abomaso al finalizar el ensayo en todos los grupos de caprinos. Se representa la media de cada grupo junto con el error estándar.

### 4.1.3. SEGUIMIENTO DEL NIVEL DE PROTECCIÓN MEDIANTE ELISA

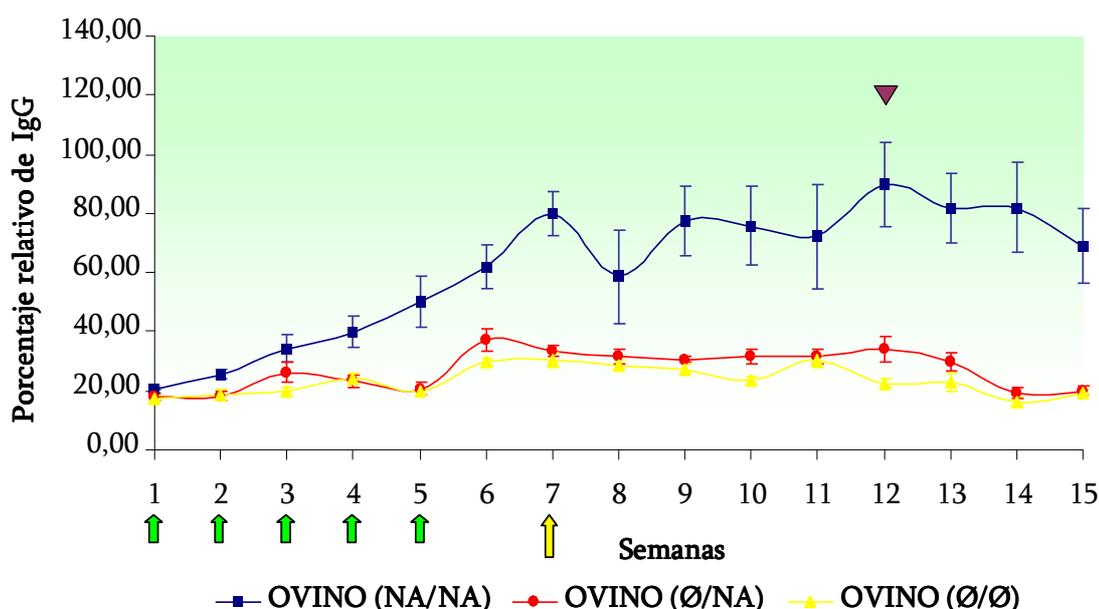
Se tomaron muestras de sangre semanalmente a todos los animales para realizar un seguimiento de la respuesta desarrollada durante la inmunización y subsiguiente infección con el parásito. Para ello, se analizó la evolución de los niveles de anticuerpos (IgG) específicos mediante un test ELISA indirecto, utilizando como antígeno las proteínas utilizadas en las inmunizaciones. Los resultados obtenidos se analizaron de forma individual en cada animal, y a partir de ellos se calculó la media y el error estándar de cada grupo experimental durante todas las semanas del estudio. Los valores que se obtuvieron se expresaron en porcentaje relativo, como ya se indicó en el apartado de **Material y Métodos**. Esta transformación se realizó a fin de eliminar posibles variaciones entre placas.

#### 4.1.3.1. Inmunización en ovinos frente a infecciones con la cepa NA

En los ovinos inmunizados e infectados experimentalmente con la cepa NA (NA/NA) se observaron valores significativamente más elevados de IgG que en el

grupo control ( $\emptyset$ /NA) en los muestreos llevados a cabo entre la semana 4 ( $P < 0,05$ ) y el final del estudio ( $P < 0,05$ ). Excepcionalmente, también se apreciaron diferencias significativas a las dos semanas del estudio ( $P < 0,01$ ), coincidiendo con el periodo de inmunización.

Como se observa en la **Fig. 17**, los niveles de IgG específicos fueron aumentando progresivamente a lo largo del estudio en los animales inmunizados (NA/NA), sufrieron una ligera disminución a partir de la 7ª semana, coincidiendo con el infección experimental, y volvieron a incrementarse a partir de la 8ª semana, alcanzándose los mayores valores en la semana 12 de la experiencia. Los niveles de IgG del grupo control ( $\emptyset$ /NA) permanecieron prácticamente inalterables desde el comienzo del estudio y fueron similares a los de los animales no inmunizados ni infectados ( $\emptyset$ / $\emptyset$ ).



**Fig. 17.** Representación comparativa semanal de la evolución de los niveles de IgG específicas entre el grupo de ovinos inmunizados e infectados con NA (NA/NA), el grupo control ovino no inmunizado e infectado ( $\emptyset$ /NA) y el grupo control ovino no inmunizado y no infectado ( $\emptyset$ / $\emptyset$ ). Se representa la media semanal de cada grupo con su error estándar. Están marcadas con flechas las cinco semanas donde se llevaron a cabo las inmunizaciones, así como la semana donde se inocularon las larvas infectantes (semana 7).

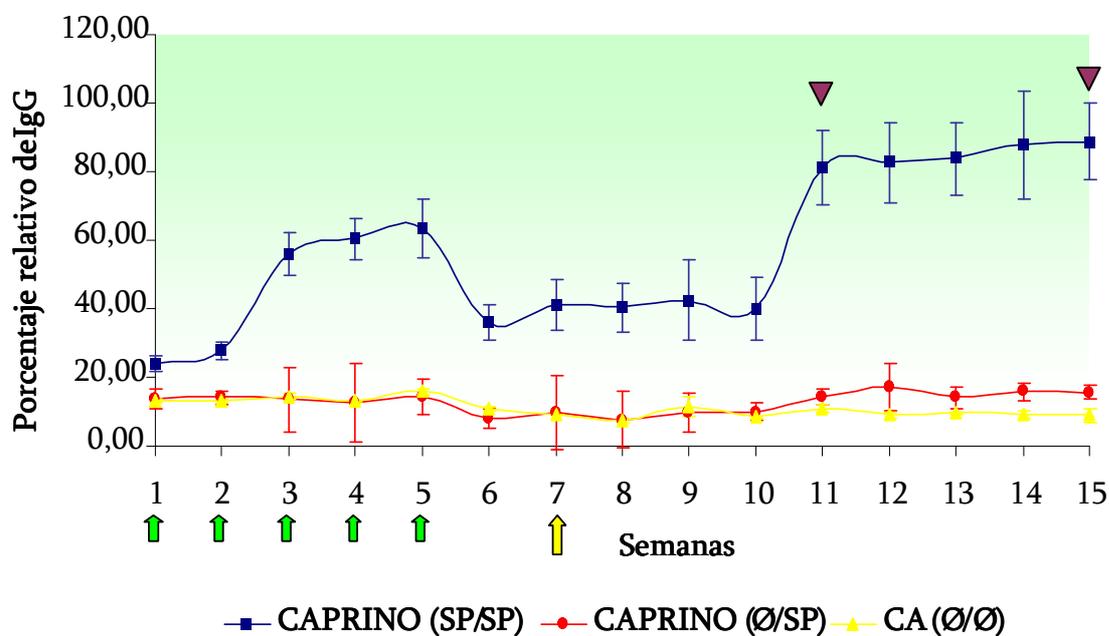
#### 4.1.3.2. Inmunización en caprino frente a infecciones con la cepa SP

Los caprinos inmunizados e infectados con L3 de la cepa SP (SP/SP) presentaron niveles de IgG específicos más elevados que los observados en el grupo

#### 4. Resultados

control ( $\emptyset$ /SP) (valores de  $P$  entre  $< 0,001$  y  $< 0,05$ ) durante todas las semanas de la experiencia.

Como puede observarse en la Fig. 18, los niveles de IgG específicos aumentaron progresivamente a lo largo del estudio en los animales inmunizados (SP/SP), alcanzándose valores máximos al finalizar la experiencia. Los valores de IgG disminuyeron desde la 6ª semana, coincidiendo con la semana posterior a la última dosis del antígeno, hasta la semana 10, pero aún así se mantuvieron las diferencias significativas entre animales inmunizados (SP/SP) y no inmunizados ( $\emptyset$ /SP). A la 11ª semana de comenzado el estudio se produjo un nuevo incremento de los niveles de IgG, que se mantuvieron elevados hasta el final de la experiencia.

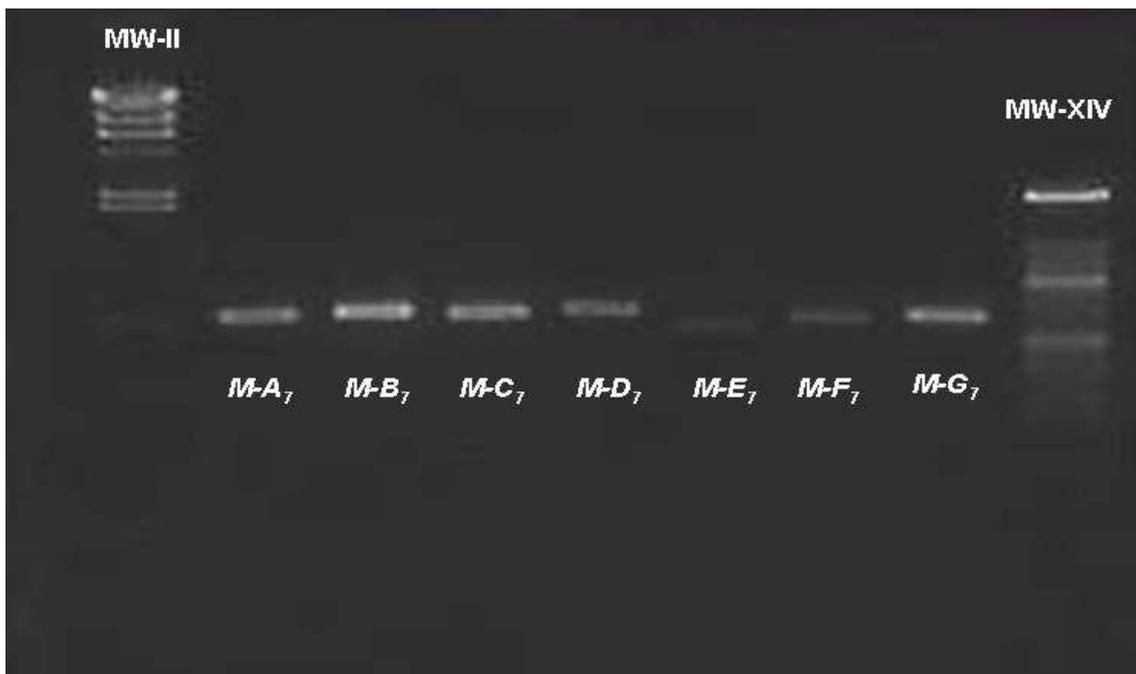


**Fig. 18.** Representación comparativa semanal de la evolución de los niveles de IgG entre el grupo de caprinos inmunizados e infectados con SP (SP/SP), el grupo control caprino no inmunizado e infectado ( $\emptyset$ /SP) y el grupo control caprino no inmunizado y no infectado ( $\emptyset$ / $\emptyset$ ). Se representa la media semanal de cada grupo con su error estándar. Están marcadas con flechas las cinco semanas donde se llevaron a cabo las inmunizaciones y la semana donde se inocularon las larvas infectantes (semana 7).

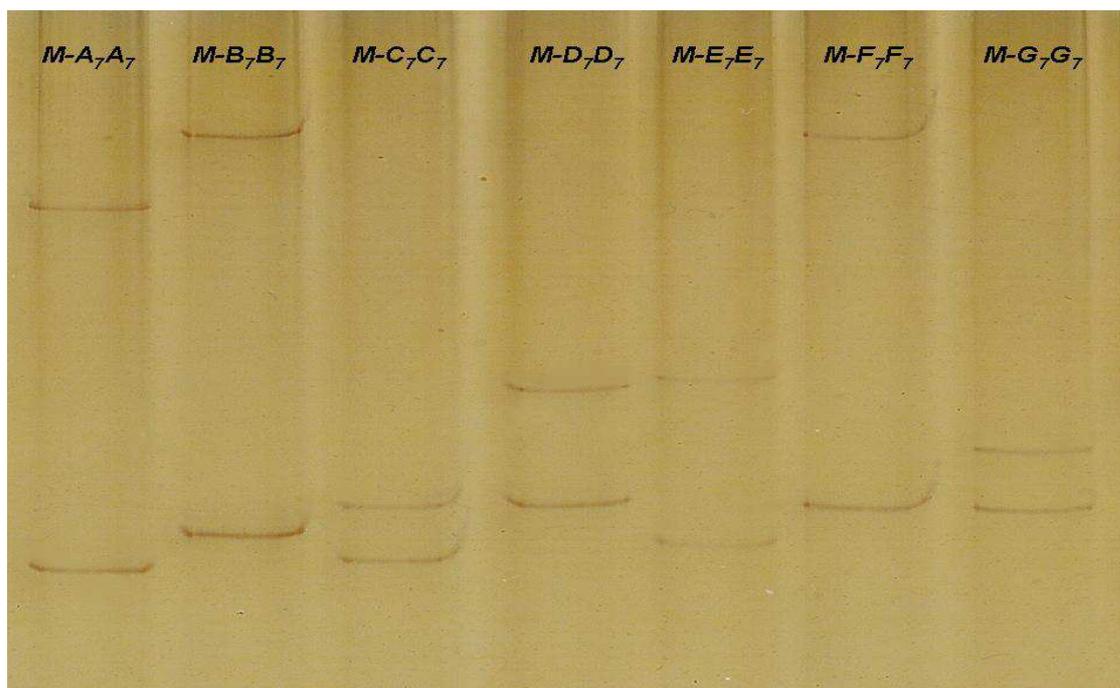
## 4.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMO GENÉTICO MEDIANTE SSCP.

### 4.2.1. GEN GCP-7

El producto de PCR amplificado para este gen mostró un tamaño de 620 bp aproximadamente. Al evaluar todas las muestras en los diferentes grupos experimentales se obtuvo un total de 7 alelos (*M-A<sub>7</sub>*, *M-B<sub>7</sub>*, *M-C<sub>7</sub>*, *M-D<sub>7</sub>*, *M-E<sub>7</sub>*, *M-F<sub>7</sub>* y *M-G<sub>7</sub>*), 4 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) (*M-D<sub>7</sub>*, *M-E<sub>7</sub>*, *M-F<sub>7</sub>* y *M-G<sub>7</sub>*), y los otros 3 en ambas cepas. En la **Fig. 19** se representan los productos amplificados de estos 7 alelos en un gel de agarosa al 1,2%. Como puede apreciarse en la imagen, únicamente el alelo *M-E<sub>7</sub>* presentó diferencias de peso molecular con respecto al resto de alelos. En la **Fig. 20** se representan los patrones SSCP para cada alelo.



**Fig.19.** Productos de PCR en gel de agarosa al 1,2% para el *locus* GCP-7 De izquierda a derecha: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kbp), homocigotos para los alelos *M-A<sub>7</sub>* al *M-G<sub>7</sub>* y DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1.500 bp).



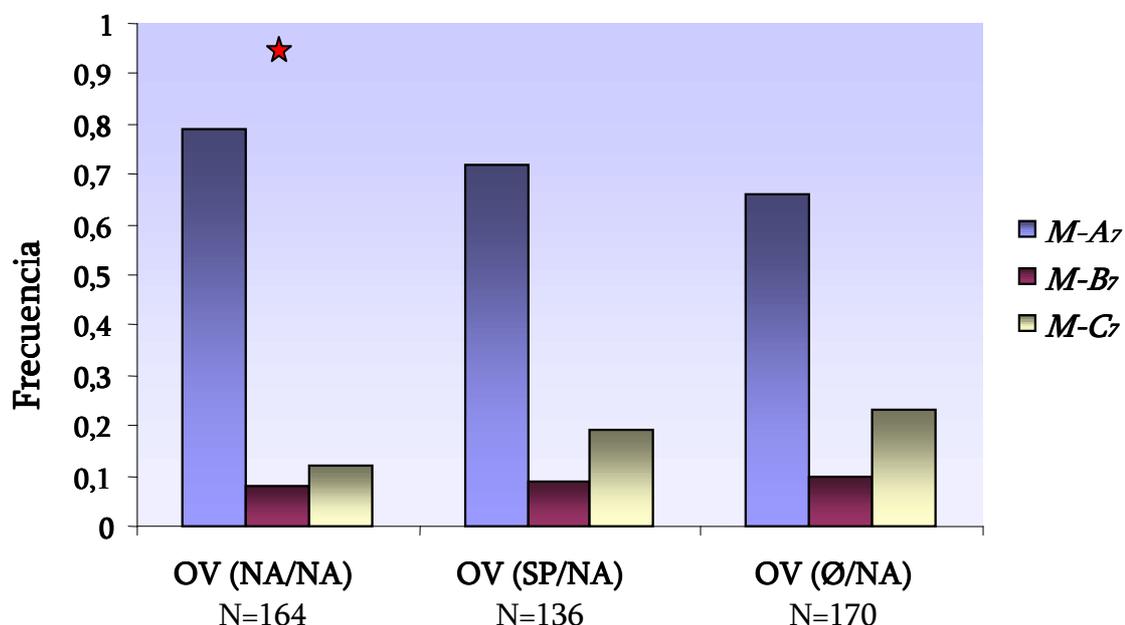
**Fig. 20.** Patrones de SSCP encontrados en el gen codificador de proteasas tipo cisteína GCP-7. Se representan los homocigotos encontrados para los 7 alelos.

Las frecuencias de los diferentes patrones de SSCP para el gen GCP-7 en los diferentes grupos experimentales estudiados están recogidas en las **Tablas 16 y 18** (ver Anexo “Tablas”), al igual que las correspondientes frecuencias alélicas (**Tablas Anexo 17 y 19**). Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas de todos los grupos fueron evaluados comparativamente con el fin de valorar los distintos factores objeto de estudio, tal y como se recoge en la **Tabla 31** (ver Anexo “Tablas”). A continuación se describen los resultados de las comparaciones en las que se observaron diferencias significativas o, en su defecto, las que fueron relevantes para la valoración global del estudio de polimorfismo genético planteado.

##### 4.2.1.1. Factor inmunización

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre las frecuencias alélicas de vermes aislados de los ovinos inmunizados e infectados con la cepa NA (NA/NA) y su correspondiente grupo control ( $\emptyset$ /NA). Tales diferencias fueron probablemente debidas a una menor presencia del alelo *M-C<sub>7</sub>* en el grupo inmunizado, como puede apreciarse en la **Fig. 21**. El menor número de alelos *M-C<sub>7</sub>* también se observó en ovinos inmunizados con la cepa SP e infectados con la cepa NA (SP/NA), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. No hubo diferencias entre los dos grupos de ovinos inmunizados (**Fig. 21**). Coincidiendo

con la disminución del alelo  $M-C_7$ , se observó un aumento del alelo  $M-A_7$  en los grupos en los que se observó inmunoprotección (ovino NA/NA y ovino SP/NA).



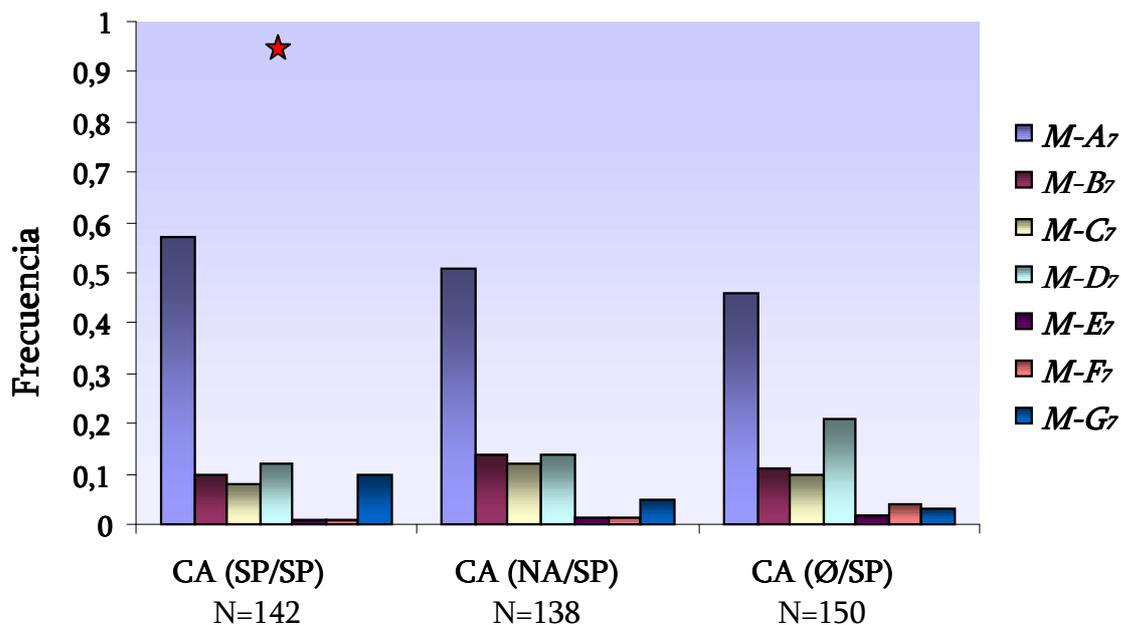
**Fig. 21.** Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de machos obtenidos de ovinos infectados con la cepa NA. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (NA) como con la heteróloga (SP), y el grupo control no inmunizado.

También se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) cuando se compararon las frecuencias alélicas de los caprinos inmunizados e infectados con la cepa SP (SP/SP) con las del correspondiente grupo control (Ø/SP). En esta ocasión, el grado de significación se atribuyó a la menor presencia del alelo  $M-D_7$  en el grupo inmunizado (**Fig. 22**). Estas diferencias, sin llegar a ser significativas, también se observaron en vermes obtenidos en caprinos inmunizados con enzimas aisladas de la cepa NA e infectados con larvas de la cepa SP (NA/SP). No hubo diferencias entre los grupos de caprinos inmunizados, si bien el alelo  $M-D_7$  se observó con menor frecuencia en el grupo de caprinos inmunizados con la cepa homóloga (SP/SP) (**Fig. 22**). Al igual que en los ovinos, en los grupos en los que se observó inmunoprotección (caprinos SP/SP y caprinos NA/SP), la frecuencia del alelo  $M-A_7$  se encontró aumentada con respecto a los controles.

Al igual que en el ensayo homólogo con NA en ovino (NA/NA), en el grupo de ovinos inmunizados con proteinasas de la cepa SP y posteriormente infectados con esta misma cepa de *H. contortus* (SP/SP) se observó una disminución del alelo  $M-C_7$  y un aumento del  $M-A_7$ . En este mismo grupo de animales (SP/SP) y en los

#### 4. Resultados

inmunizados con NA (NA/SP), el alelo *M-D7* estuvo también disminuido con respecto al grupo control ( $\emptyset$ /SP). Por su parte, los caprinos infectados con la cepa NA (tanto inmunizados como no inmunizados) (SP/NA, NA/NA y  $\emptyset$ /NA) presentaron frecuencias alélicas con tendencias también similares a las de los correspondientes grupos inmunoprotegidos (caprinos SP/SP y NA/SP).



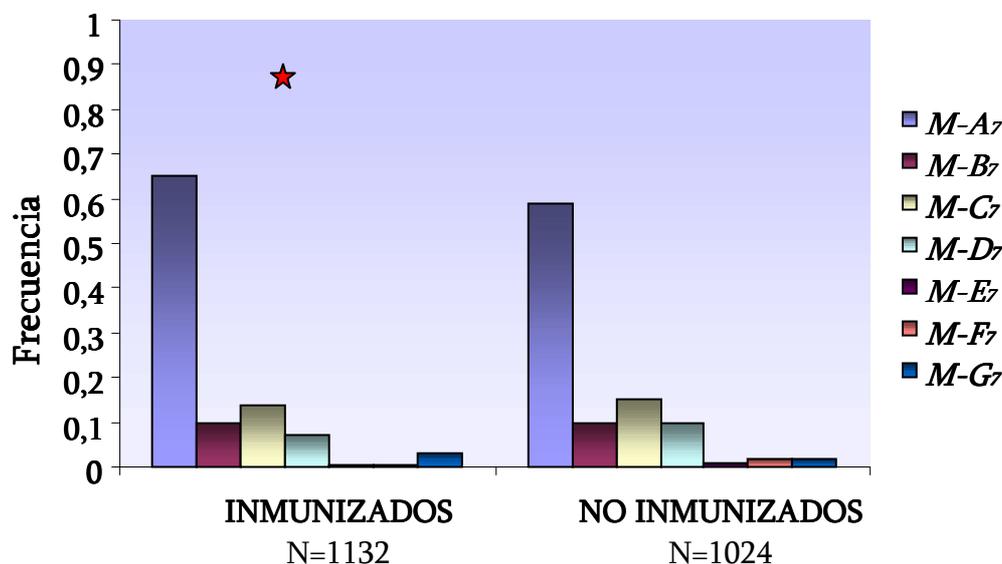
**Fig. 22.** Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de machos obtenidos de caprinos infectados con la cepa SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (SP) como con la heteróloga (NA), y el grupo control no inmunizado.

Excepcionalmente también se observó variación de la frecuencia en otros alelos. Por ejemplo, el alelo *M-G7* se encontró aumentado en los ovinos inmunizados con NA e infectados con SP y en los caprinos inmunizados e infectados con SP, presentando valores muy superiores al resto de los grupos.

Al agrupar todos los lotes de animales inmunizados y los no inmunizados y compararlos entre sí, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Tales diferencias podrían atribuirse a un menor número de los alelos *M-C7*, *M-D7* y *M-F7*, y a un aumento de los alelos *M-A7* y *M-G7* en los animales inmunizados. Por el contrario, los alelos *M-B7* y *M-E7* permanecieron con valores semejantes en los animales inmunizados y en los controles (**Fig. 23**).

Cuando se agruparon todos los ovinos inmunizados y se compararon con los no inmunizados, se observó no sólo una disminución del alelo *M-C7* sino un

aumento destacado del alelo  $M-G_7$  en los animales inmunizados. En la misma comparación realizada en caprino también se observó la misma tendencia, aunque de forma menos destacada; además de esta circunstancia se encontró una disminución del alelo  $M-F_7$  en los caprinos inmunizados.



**Fig. 23.** Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7. Se representan agrupados todos los vermes procedentes de grupos inmunizados con independencia del hospedador y la cepa utilizada en las inmunizaciones y en las inoculaciones, comparando siempre con el correspondiente lote control.

#### 4.2.1.2. Factor cepa

Al realizar las comparaciones teniendo en cuenta la cepa inoculada, se observó que la cepa SP presentaba de forma constante un número adicional de alelos, que se sumaba a los encontrados en la cepa de origen norteamericano (NA), lo que propició diferencias significativas en todas las comparaciones.

El alelo  $M-A_7$  fue el predominante en ambas cepas. Sin embargo, en la cepa SP el segundo alelo predominante fue el alelo  $M-D_7$ , que no estuvo presente en la cepa NA, donde el alelo  $M-C_7$  fue el que ocupó esa categoría. Debido a la diferencia en el número de alelos entre las cepas SP y NA, cuando se compararon las frecuencias alélicas correspondientes tras inoculaciones en hospedadores ovinos y caprinos, se observaron importantes variaciones en el número de alelos presentes en cada población de machos, lo que provocó que los alelos  $M-A_7$  y  $M-C_7$  se viesen disminuidos en la cepa SP, un fenómeno que se ha convenido denominar “efecto de redistribución alélica”. A diferencia, el alelo  $M-B_7$  no sufrió variación significativa en

#### 4. Resultados

ninguna de las comparaciones realizadas, si bien se mantuvo siempre con valores más elevados en la cepa SP (Fig. 24 y 25).

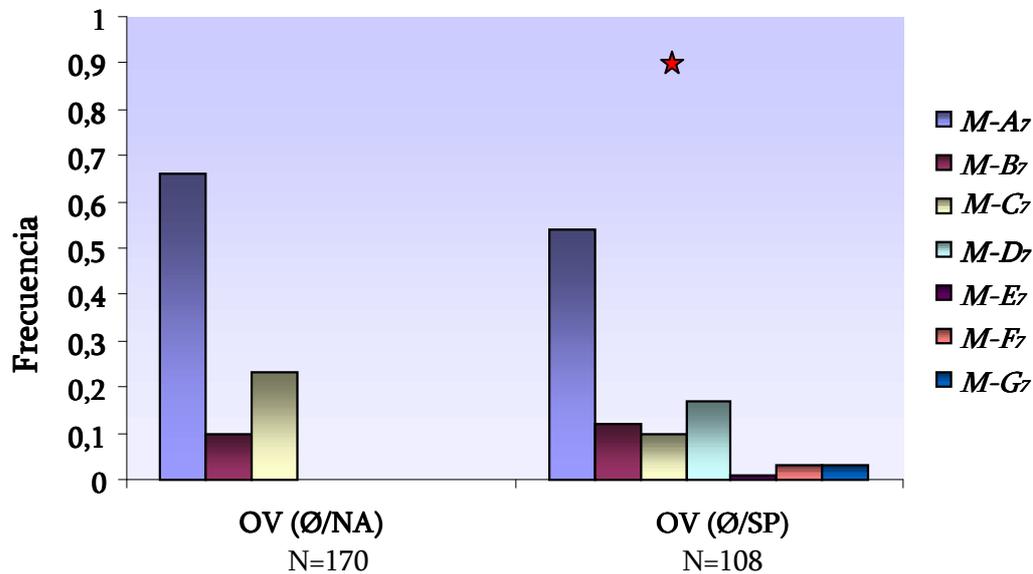


Fig. 24. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos no inmunizados e infectados con las cepas NA y SP.

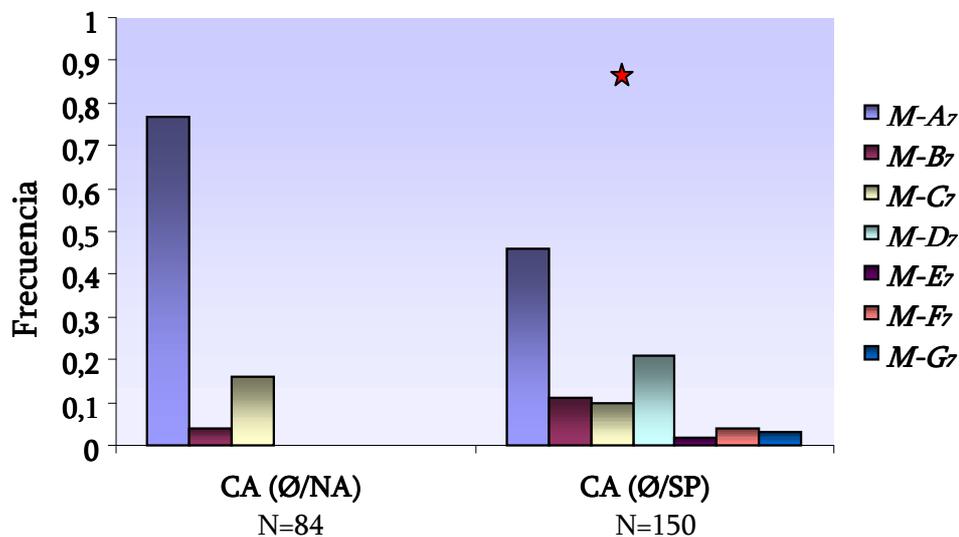


Fig. 25. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de machos obtenidos de caprinos no inmunizados e infectados con las cepas NA y SP.

#### 4.2.1.3. Factor hospedador

Cuando se compararon los grupos de ovinos y caprinos inmunizados e infectados con la cepa NA se observó que, aunque no de manera significativa, el

ovino presentaba un menor número de alelo  $M-C_7$  que el caprino (Fig. 26), no apreciándose diferencias en el resto de alelos.

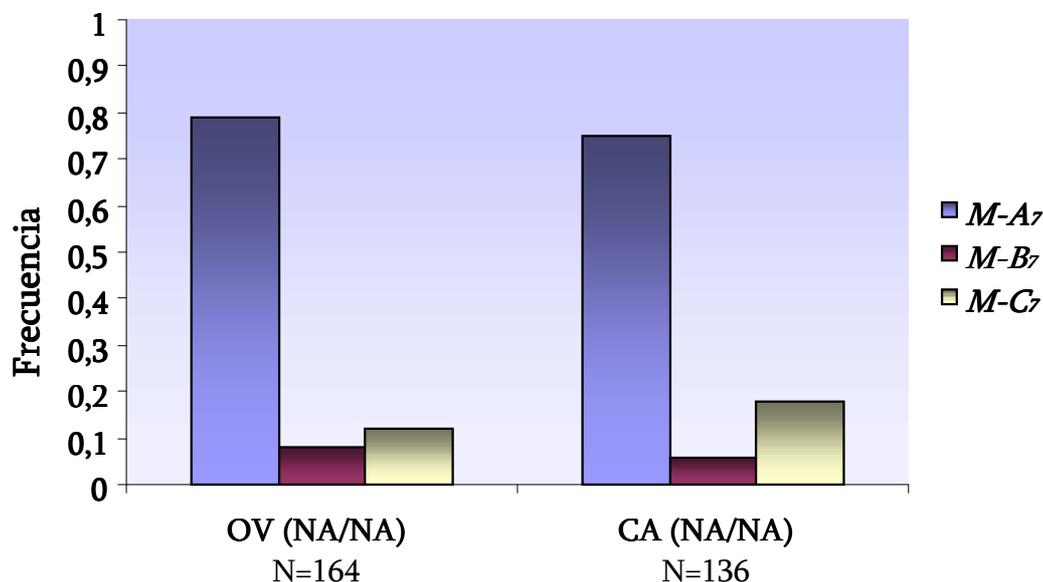


Fig. 26. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de vermes machos obtenidos en los grupos de ovinos y caprinos inmunizados e infectados con la cepa NA.

En la misma comparación entre inmunizaciones homólogas, pero utilizando la cepa SP (SP/SP), se observó que el alelo  $M-D_7$  estaba disminuido en caprino de forma similar a como lo estaba el  $M-C_7$  en el ovino, aunque tampoco las diferencias fueron significativas (Fig. 27). Por el contrario, los alelos  $M-C_7$  y  $M-G_7$  se encontraron aumentados en los caprinos con respecto a los ovinos.

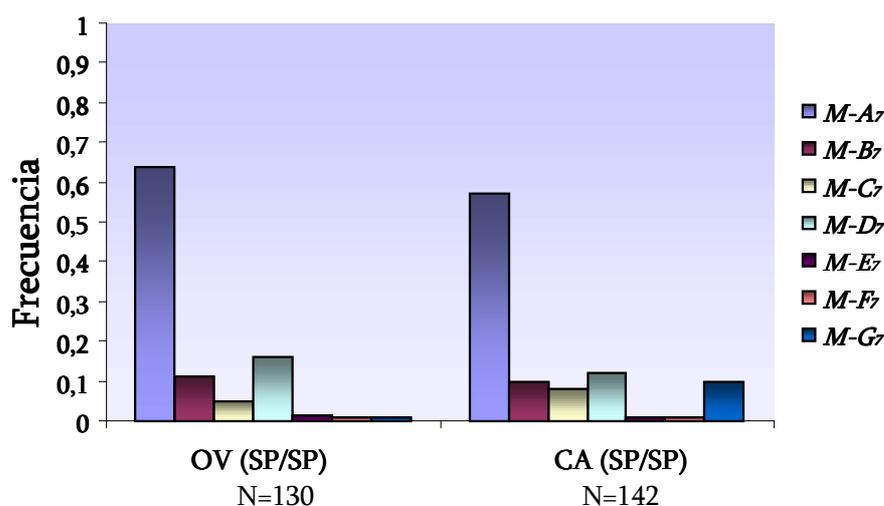


Fig. 27. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de vermes machos obtenidos en los grupos ovinos y caprinos inmunizados e infectados con la cepa SP.

#### 4. Resultados

Por último, cuando se compararon los grupos control de inmunización infectados con la cepa NA, se observó que el alelo *M-C7* se encontraba aumentado en el ovino (Fig. 28); mientras que cuando la inoculación se realizó con la cepa SP fue el alelo *M-D7* el que se encontró aumentado en el caprino (Fig. 29).

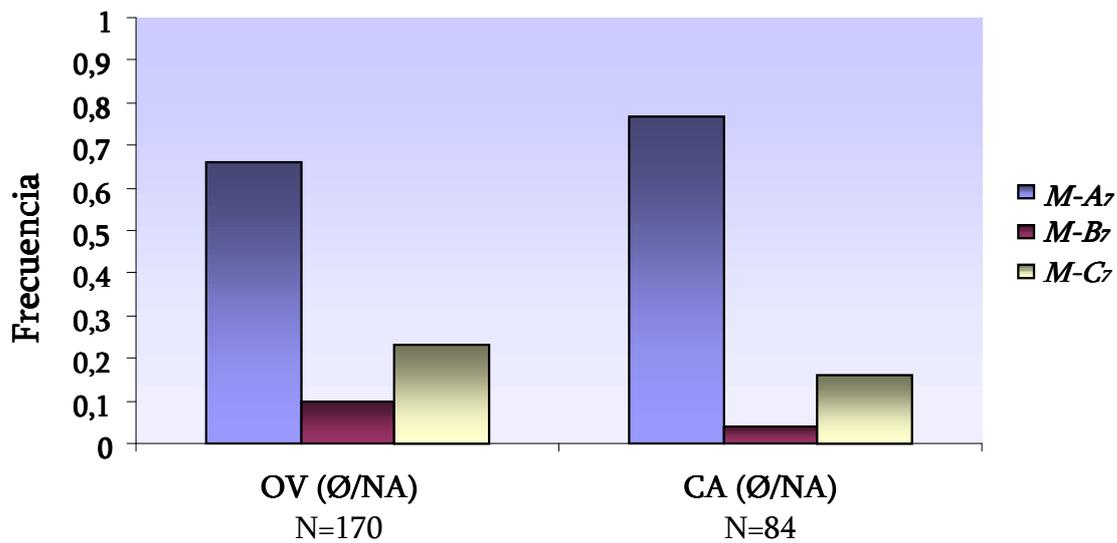


Fig. 28. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de vermes machos obtenidos en ambos hospedadores tras la inoculación con L3 de la cepa NA.

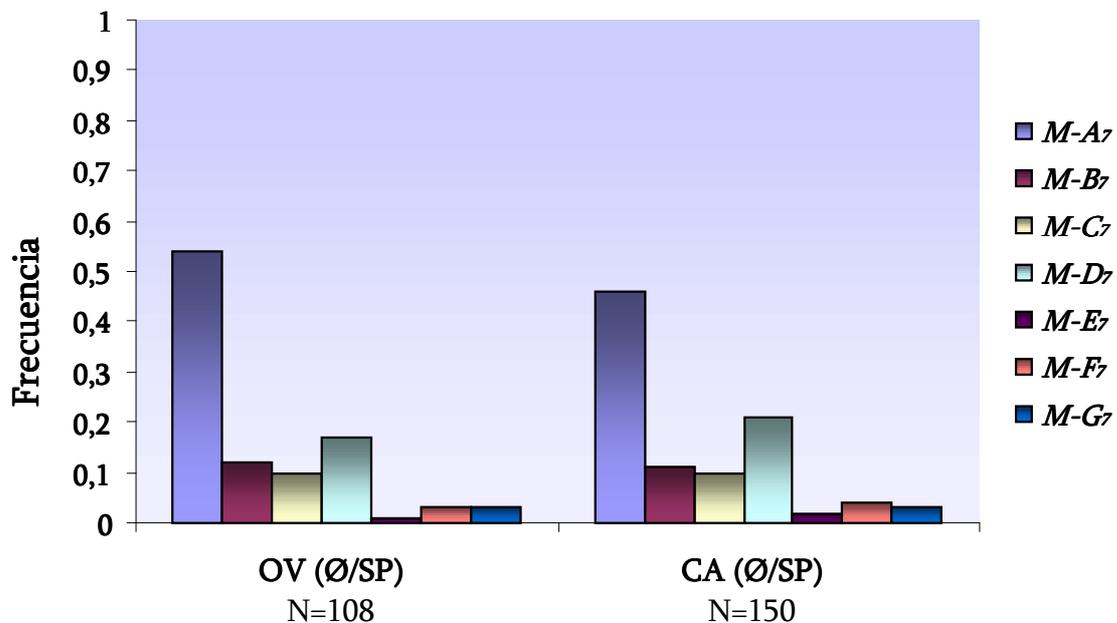
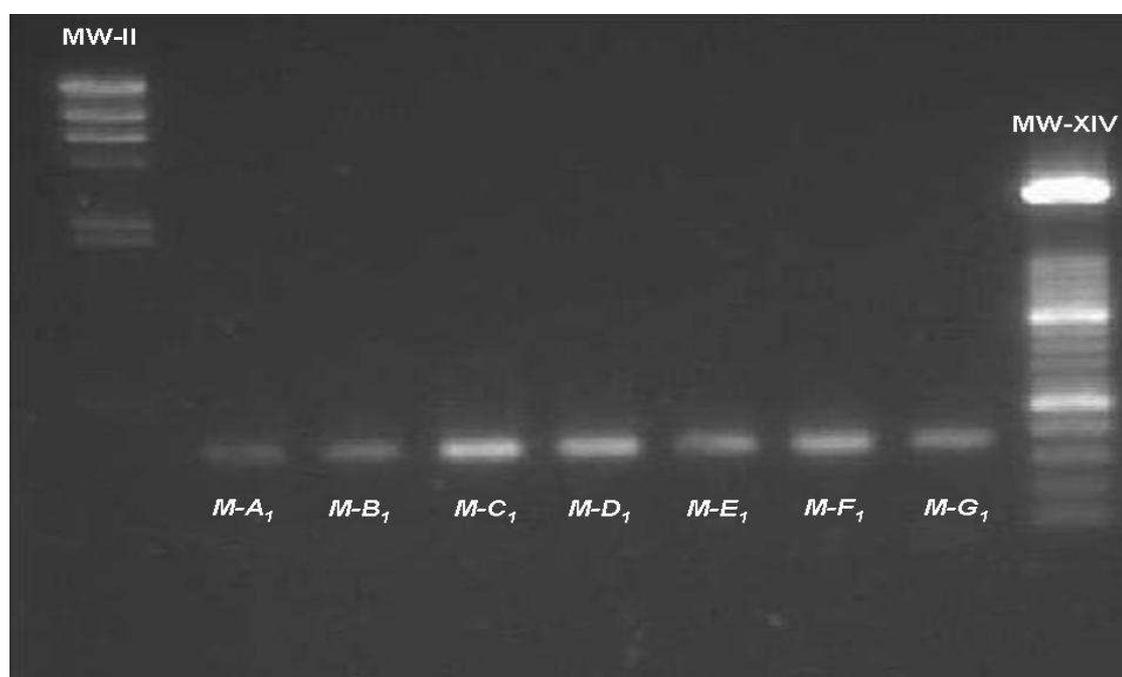


Fig. 29. Distribución comparada de alelos para el gen GCP-7 en la población de vermes machos obtenidos en ambos hospedadores tras la inoculación con L3 de la cepa SP.

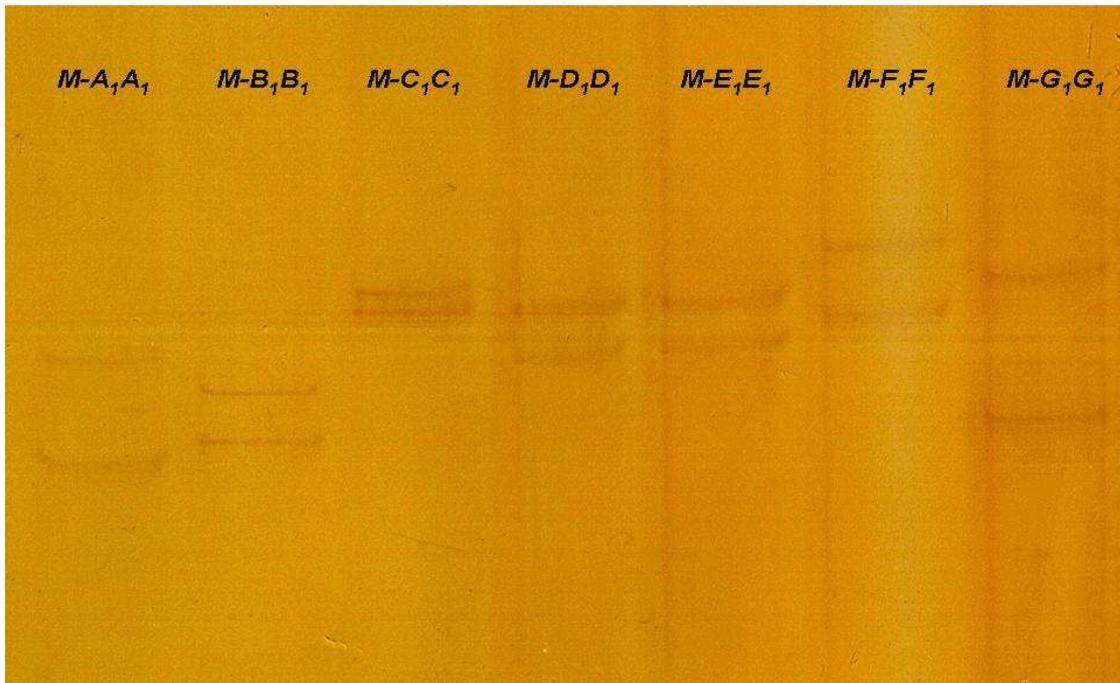
#### 4.2.2. GEN AC-1

El producto de PCR amplificado para este gen presentó un tamaño de 360 bp aproximadamente. Al evaluar las muestras de todos los grupos experimentales se obtuvo un total de 7 alelos para este gen ( $M-A_1$ ,  $M-B_1$ ,  $M-C_1$ ,  $M-D_1$ ,  $M-E_1$ ,  $M-F_1$  y  $M-G_1$ ), 3 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-D_1$ ,  $M-E_1$  y  $M-G_1$ ), y otros 4 presentes en ambas cepas. En la **Fig. 30** se representan los productos amplificados de estos 7 alelos en un gel de agarosa al 1,2% y en la **Fig. 31** los patrones para cada alelo obtenidos mediante SSCP.



**Fig. 30.** Productos de PCR en gel de agarosa al 1,2% para el *locus* AC-1. De izquierda a derecha: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kbp), homocigotos para los alelos  $M-A_1$  al  $M-G_1$  y DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1.500 bp).

Las frecuencias de los diferentes patrones de SSCP para el gen AC-1 en los vermes obtenidos de los diferentes grupos experimentales estudiados están recogidas en las **Tablas 20** y **22** (ver Anexo “Tablas”), al igual que las correspondientes frecuencias alélicas (**Tablas 21** y **23**). Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas de todos los grupos fueron evaluados comparativamente con el fin de valorar los distintos factores objeto de estudio, tal y como se describe a continuación.

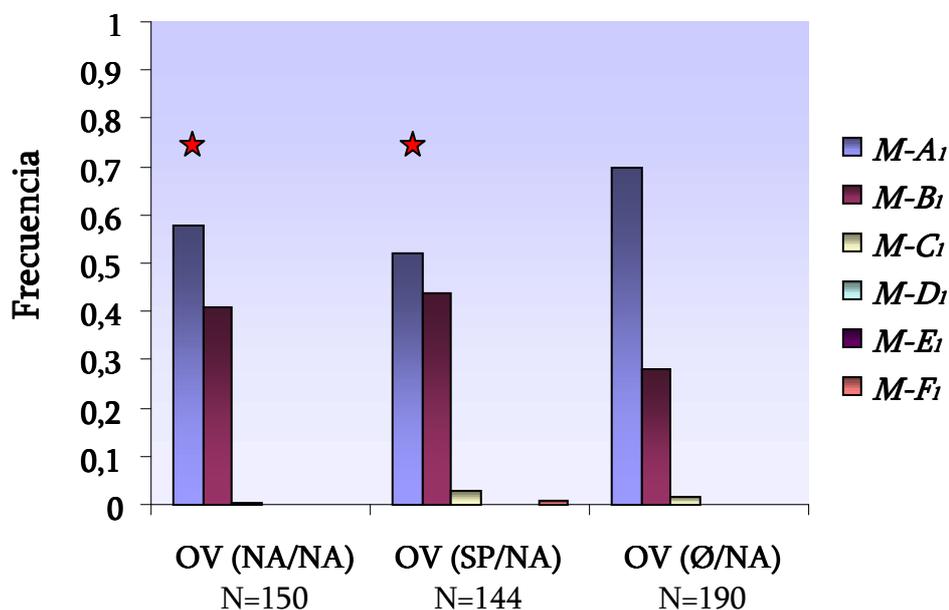


**Fig. 31.** Patrones de SSCP encontrados en el gen codificador de proteasas tipo cisteína AC-1. Se representan los homocigotos encontrados para los 7 alelos.

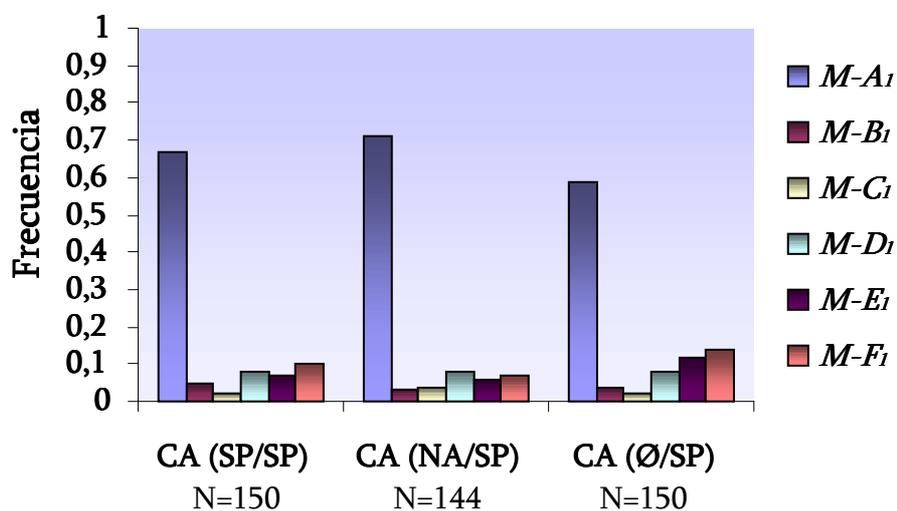
##### 4.2.2.1. Factor inmunización

Al comparar los vermes procedentes de ovinos inmunizados (ya sea con NA o con SP) y posteriormente infectados con la cepa NA, y aquellos correspondientes al grupo control ( $\emptyset$ /NA), se observó una menor frecuencia del alelo  $M-A_I$  y mayor frecuencia del alelo  $M-B_I$  (**Fig. 32**), diferencias que resultaron estadísticamente significativas con valores de  $P < 0,05$  y  $< 0,01$  para los inmunizados con la cepa NA y con la cepa SP, respectivamente. Comparando los dos grupos de ovinos inmunizados entre sí, se observó que las diferencias en las frecuencias alélicas eran más acusadas en los inmunizados con inmunógenos procedentes de la cepa SP.

En los caprinos infectados con L3 de la cepa SP, los grupos inmunizados tanto con productos purificados de la cepa SP (SP/SP) como de la cepa NA (NA/SP) presentaron frecuencias del alelo  $M-A_I$  más elevadas que las del correspondiente grupo control ( $\emptyset$ /SP), y frecuencias inferiores de los alelos  $M-E_I$  y  $M-F_I$  (**Fig. 33**). Estas diferencias resultaron en un valor  $P$  próximo a la significación al comparar las frecuencias observadas en vermes procedentes de caprino inmunizado con proteasas tipo cisteína de la cepa NA respecto a su correspondiente grupo control ( $\emptyset$ /SP) ( $P = 0,084$ ).



**Fig. 32.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de machos obtenidos de ovinos infectados con la cepa NA. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (NA) como con la heteróloga (SP), y el grupo control no inmunizado.



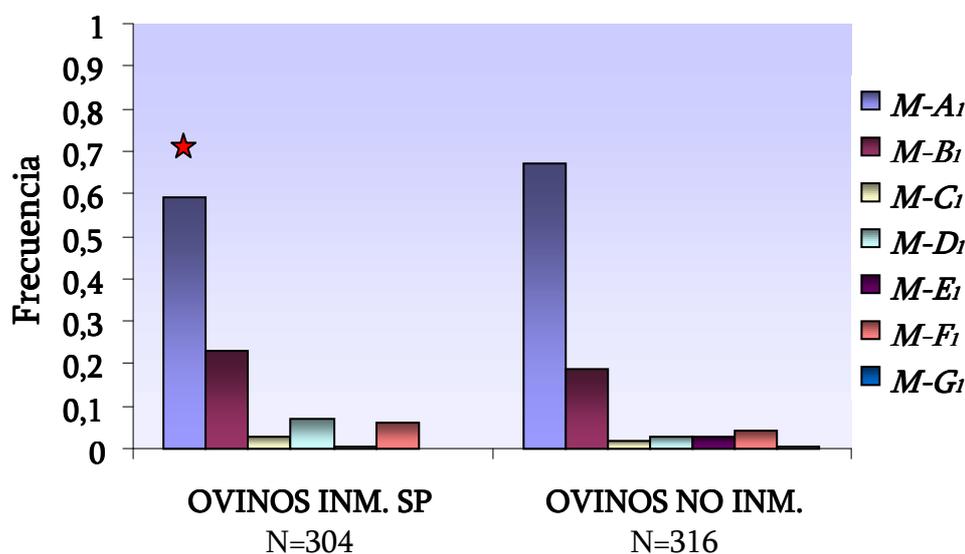
**Fig. 33.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de machos obtenidos de caprinos infectados con la cepa SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (SP) como con la heteróloga (NA), y el grupo control no inmunizado.

#### 4. Resultados

En los ovinos inmunizados e infectados con la cepa SP (SP/SP), las frecuencias de los alelos comunes a la cepa NA ( $M-A_I$ ,  $M-B_I$  y  $M-C_I$ ) permanecieron prácticamente iguales. Este mismo grupo de animales y el grupo de ovinos inmunizados con la cepa NA (NA/SP) presentaron además una disminución del alelo  $M-E_I$  y un aumento del  $M-D_I$ , al compararlos con el grupo control ( $\emptyset$ /SP). Las diferencias encontradas estuvieron próximas a la significación, con valores de  $P = 0,064$  y  $P = 0,059$ , respectivamente.

En los vermes obtenidos de caprinos infectados con L3 de la cepa NA no hubo significación estadística en ninguna de las comparaciones realizadas entre las frecuencias alélicas de los vermes de los grupos inmunizados y los no inmunizados.

Al agrupar las frecuencias alélicas obtenidas en muestras procedentes de todos los ovinos inmunizados con la cepa NA y los ovinos inmunizados con SP, y compararlos con todos los ovinos no inmunizados, los grupos que recibieron inmunización presentaron una disminución del alelo  $M-A_I$  y un aumento de los alelos  $M-B_I$  y  $M-F_I$ . Esta diferencia fue más acusada en los inmunizados con SP, cuya comparación resultó ser estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 34**). Al realizar la misma comparación pero en caprino, en los animales inmunizados se observó un aumento del alelo  $M-A_I$  y una disminución de los alelos  $M-E_I$  y  $M-F_I$ , siendo estas diferencias estadísticamente significativas en los caprinos inmunizados con la cepa NA ( $P < 0,05$ ).

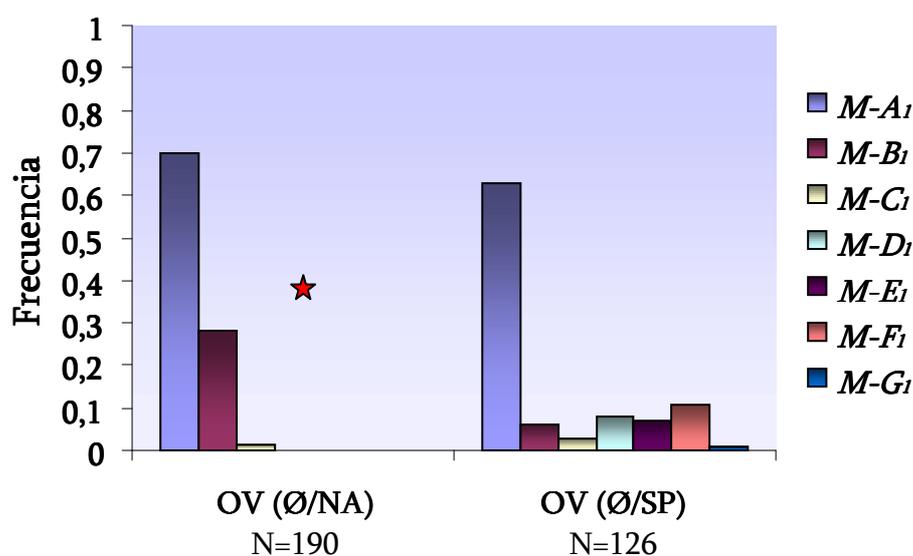


**Fig. 34.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos inmunizados con SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (NA) como con la heteróloga (SP), y el grupo control no inmunizado.

#### 4.2.2.2. Factor cepa

Al realizar las comparaciones teniendo en cuenta la cepa inoculada se observó que la cepa SP presentaba de forma constante un mayor número de alelos que la cepa de origen norteamericano (NA), lo que propició diferencias significativas en todas las comparaciones (**Fig. 35 y 36**).

El alelo  $M-A_1$  fue el predominante en ambas cepas. En cambio, en todas las comparaciones se observó que la frecuencia alélica del alelo  $M-B_1$  fue inferior en la cepa SP. De esta forma, que en la cepa NA dicho alelo era el segundo mayoritario, mientras que en la cepa SP esta categoría recayó en el alelo  $M-F_1$  (**Fig. 35 y 36**). El alelo predominante  $M-A_1$  presentó una frecuencia relativa inferior en la cepa SP, sólo en vermes procedentes de grupos experimentales no inmunizados (tanto en ovino como en caprino).



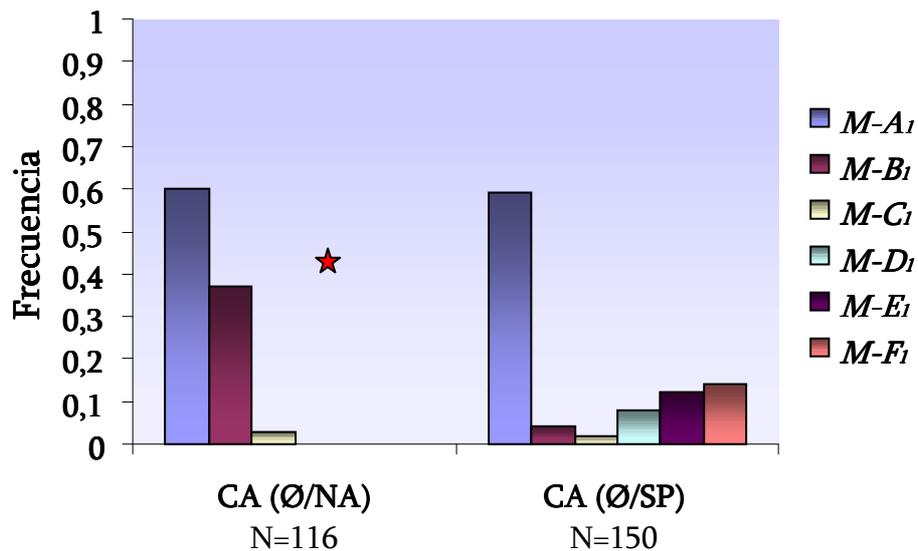
**Fig. 35.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos no inmunizados tras la infección con L3 de las cepas NA y SP.

#### 4.2.2.3. Factor hospedador

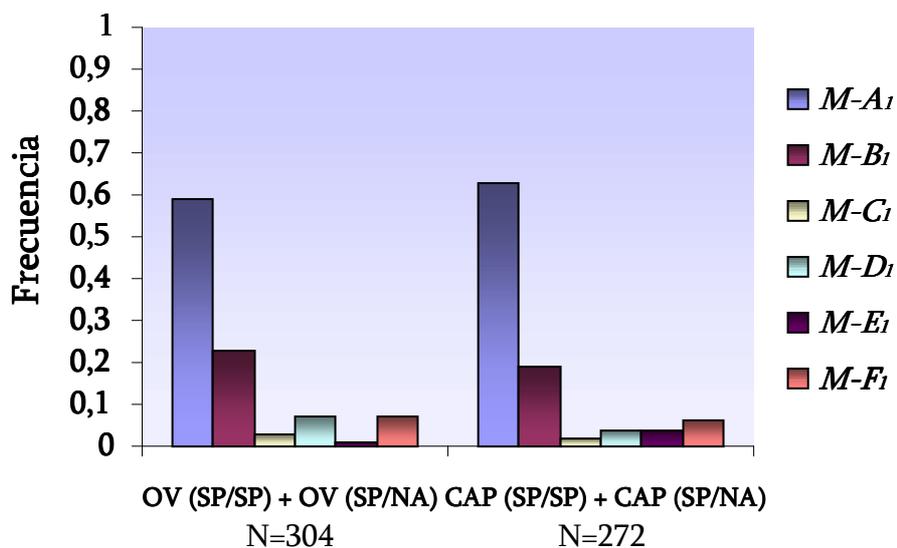
Cuando se compararon todos los grupos inmunizados entre sí, los ovinos presentaron una menor frecuencia del alelo  $M-A_1$  que los respectivos caprinos, y justo lo contrario se observó cuando las comparaciones se realizaron entre los grupos no inmunizados.

#### 4. Resultados

En las muestras obtenidas de los ovinos inmunizados con la cepa NA, además de la disminución del alelo  $M-A_1$  ya indicada, se observó un aumento del alelo  $M-B_1$ , ligera disminución del alelo  $M-C_1$  y un aumento del alelo  $M-F_1$  en comparación con los resultados obtenidos en caprino.



**Fig. 36.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de vermes machos obtenidos de caprinos no inmunizados tras la infección con L3 las cepas NA y SP.

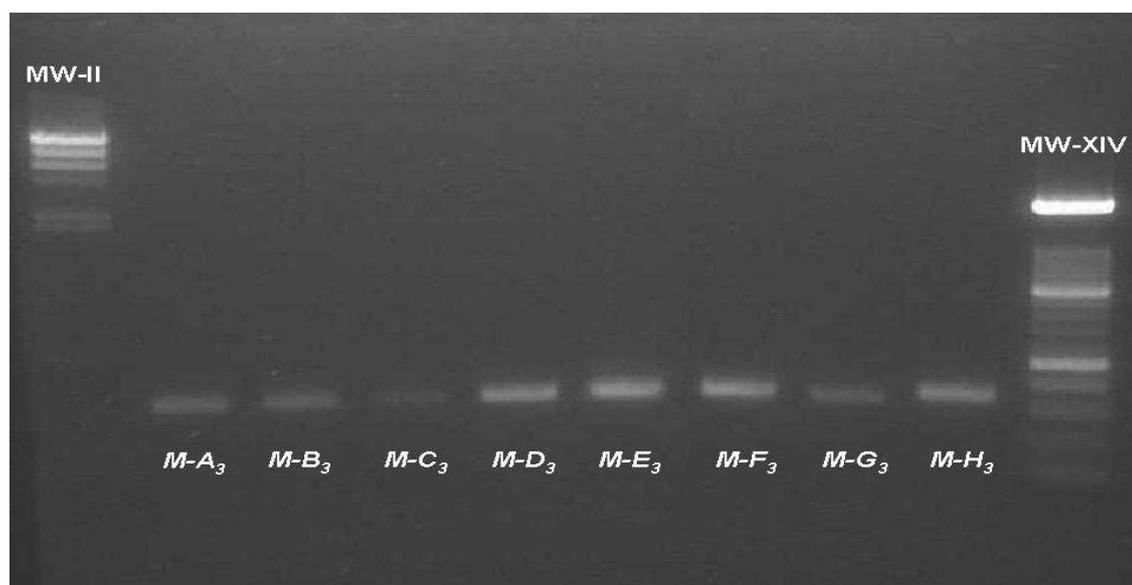


**Fig. 37.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-1 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos y caprinos inmunizados con la cepa SP [(SP/SP) + (SP/NA)]

Cuando se compararon los grupos inmunizados con SP entre sí se observó una mayor frecuencia alélica del alelo *M-F<sub>1</sub>* en los ovinos, circunstancia que se invirtió al comparar entre hospedadores no inmunizados. Además de esto, al agrupar todos los ovinos inmunizados con la cepa SP (SP/SP y SP/NA) y compararlos con la correspondiente agrupación en hospedadores caprinos, no sólo se observó una disminución de la frecuencia del alelo *M-A<sub>1</sub>* (como ya se ha indicado) sino también del *M-E<sub>1</sub>*; los alelos *M-B<sub>1</sub>*, *M-C<sub>1</sub>* y *M-D<sub>1</sub>* estuvieron por el contrario aumentados. En este caso las diferencias significativas estuvieron cercanas a la significación ( $P = 0,064$ ) (**Fig. 37**). El alelo *M-G<sub>1</sub>* sólo estuvo presente en el ovino, si bien su frecuencia (0,1% del total de la población) fue poco representativa.

### 4.2.3. GEN AC-3

El producto de PCR amplificado para este gen tenía un tamaño de 345 bp aproximadamente. Al evaluar las muestras de todos los grupos experimentales se obtuvo un total de 8 alelos (*M-A<sub>3</sub>*, *M-B<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>*, *M-D<sub>3</sub>*, *M-E<sub>3</sub>*, *M-F<sub>3</sub>*, *M-G<sub>3</sub>* y *M-H<sub>3</sub>*), 3 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) (*M-F<sub>3</sub>*, *M-G<sub>3</sub>* y *M-H<sub>3</sub>*) y 2 sólo en la cepa de Norteamérica (NA) (*M-B<sub>3</sub>* y *M-D<sub>3</sub>*), mientras que los restantes 3 alelos (*M-A<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>*) se observaron en ambas cepas. En la **Fig. 38** se representan los productos amplificados de estos 8 alelos en un gel de agarosa al 1,2% y en la **Fig. 39** los diferentes patrones obtenidos mediante SSCP para cada alelo.



**Fig. 38.** Productos de PCR en gel de agarosa al 1,2% para el *locus* AC-3. De izquierda a derecha: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kbp), homocigotos para los alelos *M-A<sub>3</sub>* al *M-H<sub>3</sub>* y DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1.500 bp).

#### 4. Resultados

---



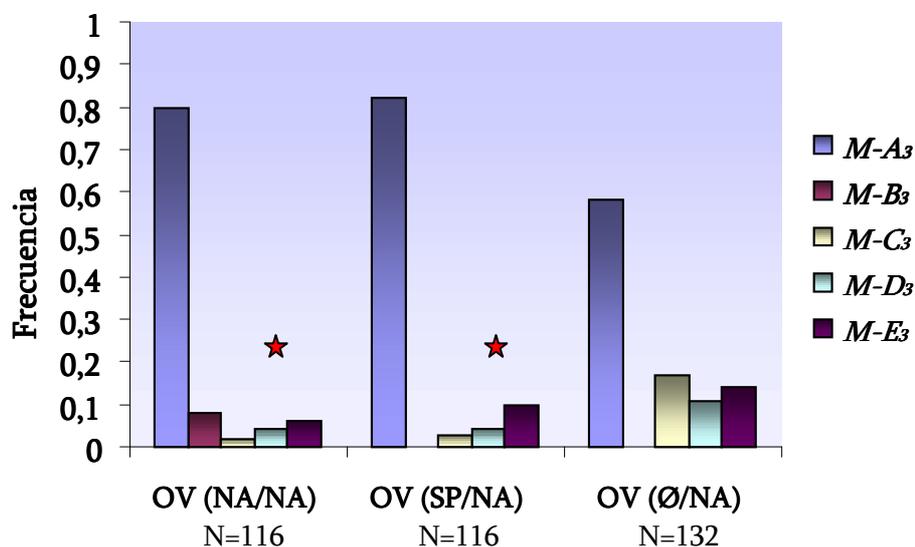
**Fig. 39.** Patrones de SSCP encontrados en el gen codificador de proteasas tipo cisteína AC-3. Se representan los homocigotos encontrados para los 8 alelos.

Las frecuencias de los diferentes patrones de SSCP para el gen AC-3 en los diferentes grupos experimentales estudiados están recogidas en las **Tablas 24** y **26** (ver Anexo “Tablas”), al igual que las correspondientes frecuencias alélicas (**Tablas 25** y **27**). Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas de todos los grupos fueron evaluados comparativamente con el fin de valorar los distintos factores objeto de estudio, tal y como se describe a continuación.

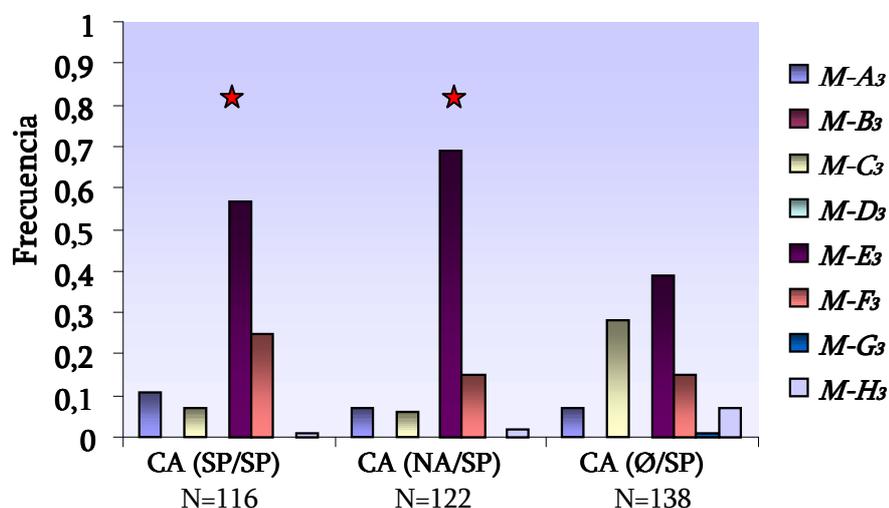
##### 4.2.3.1. Factor inmunización

Independientemente de la cepa utilizada en la inmunización, las muestras obtenidas en los ovinos inmunizados e infectados con la cepa de NA presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,001$ ) al compararlas con su correspondiente grupo control no inmunizado ( $\emptyset$ /NA) (**Fig. 40A**). En ambos grupos (NA/NA y SP/NA) se observó una mayor frecuencia del alelo *M-A<sub>3</sub>*, y menor frecuencia de los alelos *M-C<sub>3</sub>*, *M-D<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>*. Además, al comparar los dos grupos de ovinos inmunizados entre sí se observó que los valores de las frecuencias alélicas eran similares, salvo la de los alelos *M-B<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>*, el primero de ellos sólo presente en los inmunizados con NA y el segundo en menor proporción en el mismo grupo. Estas

dos circunstancias motivaron que las frecuencias alélicas de ambos grupos fueran estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 40A).



**Fig. 40A.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos infectados con la cepa NA. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (NA) como con la heteróloga (SP), y el grupo control no inmunizado.



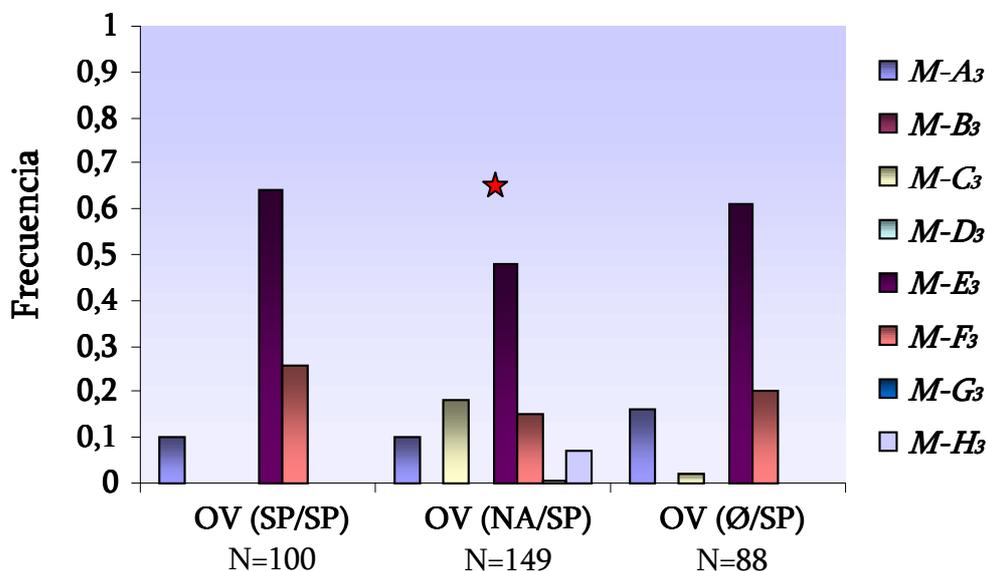
**Fig. 40B.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos infectados con la cepa SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (SP) como con la heteróloga (NA), y el grupo control no inmunizado.

Todos los grupos de caprinos infectados con L3 de la cepa SP, previamente inmunizados con cualquiera de las dos cepas (SP/SP y NA/SP), presentaron un aumento del alelo *M-E3*, mientras que los alelos *M-C3* y *M-H3* presentaron frecuencias relativas menores cuando se compararon con el grupo control. Estas

#### 4. Resultados

variaciones en las frecuencias alélicas se tradujo en diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) (Fig. 40B).

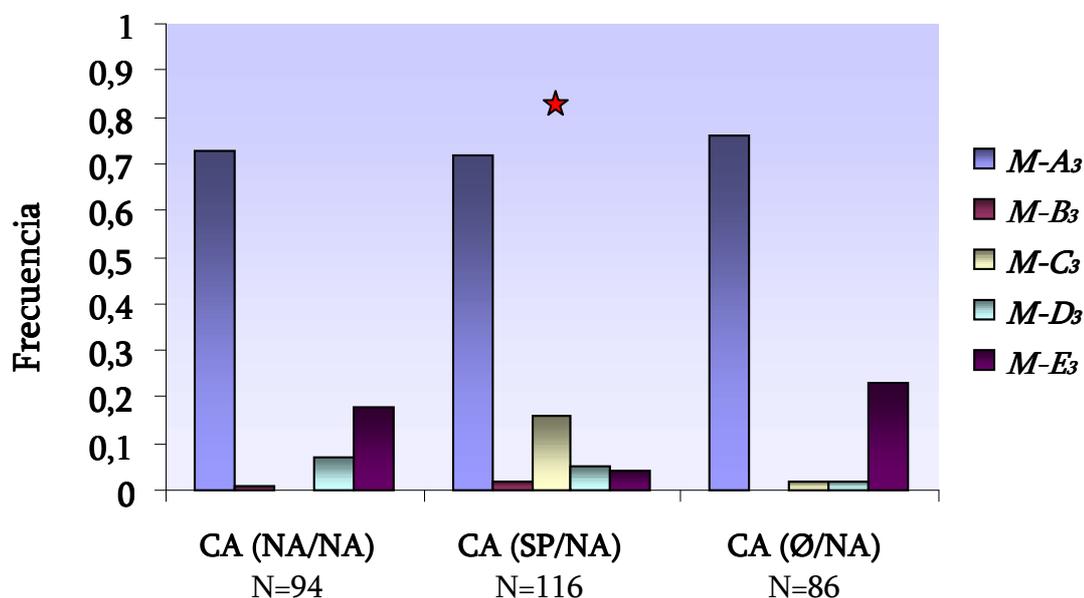
En las infecciones de ovinos con la cepa SP de origen caprino hay que destacar varios aspectos. Por un lado, al analizar los dos grupos de ovinos inmunizados e infectados con esta cepa (SP/SP y NA/SP) se observó una frecuencia similar para el alelo  $M-A_3$ , mientras que los alelos  $M-E_3$  y  $M-F_3$  estuvieron aumentados en el grupo homólogo SP/SP. Aparte, en este último grupo no se encontraron los alelos  $M-C_3$ ,  $M-G_3$  y  $M-H_3$ , todo lo cual motivó que hubieran diferencias significativas ( $P < 0,001$ ), tanto al comparar los dos grupos inmunizados entre sí, como al comparar los resultados del grupo inmunizado con NA (NA/SP) con el control ( $\emptyset$ /SP) (Fig. 41A).



**Fig. 41A.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos infectados con la cepa SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (SP) como con la heteróloga (NA), y el grupo control no inmunizado.

Por su parte, en las muestras procedentes de caprinos infectados con la cepa de origen ovino (NA), al comparar los grupos inmunizados e infectados (SP/NA y NA/NA) con el grupo control correspondiente ( $\emptyset$ /NA), sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando la inmunización se realizó con la cepa SP, si bien en todos los inmunizados la proporción de alelos  $M-A_3$  y  $M-E_3$  fue menor, y mayor la del alelo  $M-D_3$  (Fig. 41B). La única pero importante diferencia fue la ausencia de alelo  $M-C_3$  en los vermes de animales inmunizados de forma homóloga (NA/NA) en comparación con los inmunizados de forma heteróloga (SP/NA), en los que este alelo se encontró con una frecuencia del 16%. Esta

característica, unida a una menor frecuencia del alelo  $M-E_3$  en este mismo grupo motivó que hubiese diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los dos lotes de caprinos inmunizados.



**Fig. 41B.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos de caprinos infectados con la cepa NA. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (NA) como con la heteróloga (SP), y el grupo control no inmunizado.

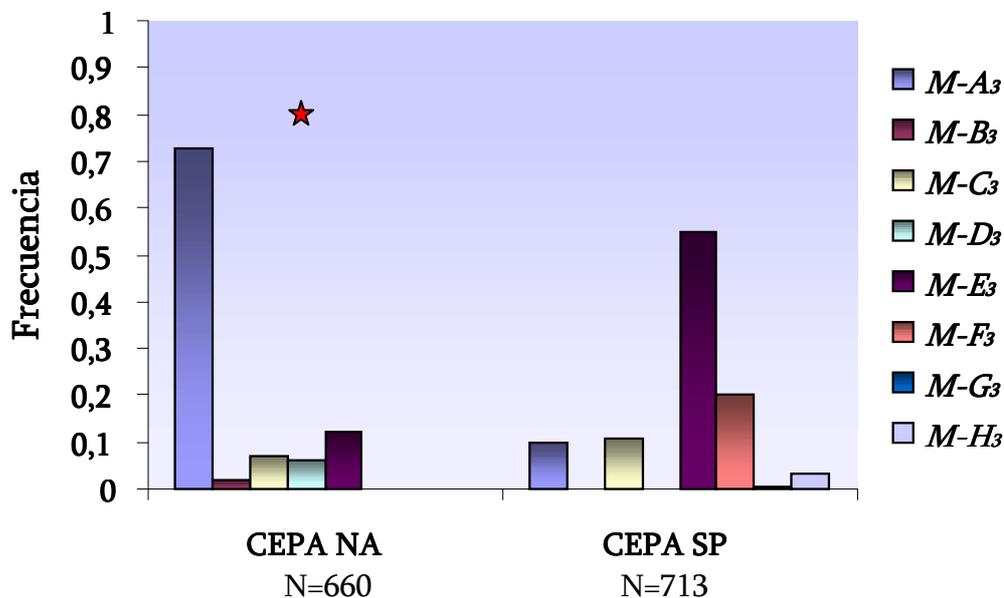
Al agrupar y comparar los resultados procedentes de todos los infectados con L3 de la cepa NA que previamente habían sido inmunizados, se observó una menor proporción del alelo  $M-E_3$  con respecto a los no inmunizados ( $\emptyset/NA$ ). Estas diferencias fueron más acusadas cuando las inmunizaciones se realizaron con su hospedador originario, es decir, grupos NA/NA en el ovino.

#### 4.2.3.2. Factor cepa

Como ya se ha indicado, el gen AC-3 presentó 8 alelos distintos. Tres de ellos fueron alelos comunes de ambas cepas ( $M-A_3$ ,  $M-C_3$  y  $M-E_3$ ), otros tres sólo se observaron en la cepa SP ( $M-F_3$ ,  $M-G_3$  y  $M-H_3$ ) y dos sólo aparecieron en la cepa NA ( $M-B_3$  y  $M-D_3$ ) (**Fig. 42**). La presencia o ausencia de alelos junto con las variaciones de frecuencia alélica entre ambas cepas provocaron que en todas las comparaciones analizadas hubiese diferencias estadísticamente significativas con el mayor grado de significación ( $P < 0,001$ ).

#### 4. Resultados

En la cepa NA el alelo que se presentó en mayor proporción fue el *M-A<sub>3</sub>*, seguido del *M-E<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>*, *M-D<sub>3</sub>* y *M-B<sub>3</sub>*, mientras que en la cepa SP el alelo mayoritario fue el *M-E<sub>3</sub>*, seguido del *M-F<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>*, *M-A<sub>3</sub>*, *M-H<sub>3</sub>* y *M-G<sub>3</sub>*.



**Fig. 42.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos tras la inoculación con L3 de ambas cepas a partir de todos los grupos experimentales, independientemente del hospedador, de la inmunización y tipo de antígeno utilizado en las inmunizaciones.

Cuando se compararon los grupos de ovinos no inmunizados e infectados con las distintas cepas entre sí ( $\emptyset$ /NA vs  $\emptyset$ /SP), se observó que los alelos *M-A<sub>3</sub>* y *M-C<sub>3</sub>* estaban muy disminuidos en la cepa SP, todo lo contrario que el alelo *M-E<sub>3</sub>*. Por el contrario, al realizar la misma comparación en el ganado caprino, el alelo *M-C<sub>3</sub>* se encontró muy aumentado en la cepa SP, y se detectaron los alelos *M-G<sub>3</sub>* y *M-H<sub>3</sub>* en dicha cepa.

En los vermes procedentes de caprinos infectados con NA donde únicamente hubo mayor presencia del alelo *M-C<sub>3</sub>* fue en aquellos que previamente se habían inmunizado con proteínas de la cepa SP.

#### 4.2.3.3. Factor hospedador.

Una vez realizadas todas las comparaciones, se observó que las muestras de ovinos no inmunizados e infectados con NA ( $\emptyset$ /NA) presentaron menor frecuencia de los alelos *M-A<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>* que los caprinos (**Fig. 43**), mientras que todo lo contrario ocurrió con los alelos *M-C<sub>3</sub>* y *M-D<sub>3</sub>*. Sin embargo, en la misma comparación pero con

la cepa SP ( $\emptyset$ /SP) se observó justo la situación inversa (con la salvedad de que en esta cepa no se encontró el alelo  $M-D_3$ ), es decir, mayor presencia de los alelos  $M-A_3$  y  $M-E_3$ , y menor del  $M-C_3$  en los grupos ovinos. Por otro lado, en los vermes aislados de caprinos infectados con la cepa SP no se encontraron alelos  $M-B_3$  ni  $M-D_3$  (Fig. 44). En ambas comparaciones las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

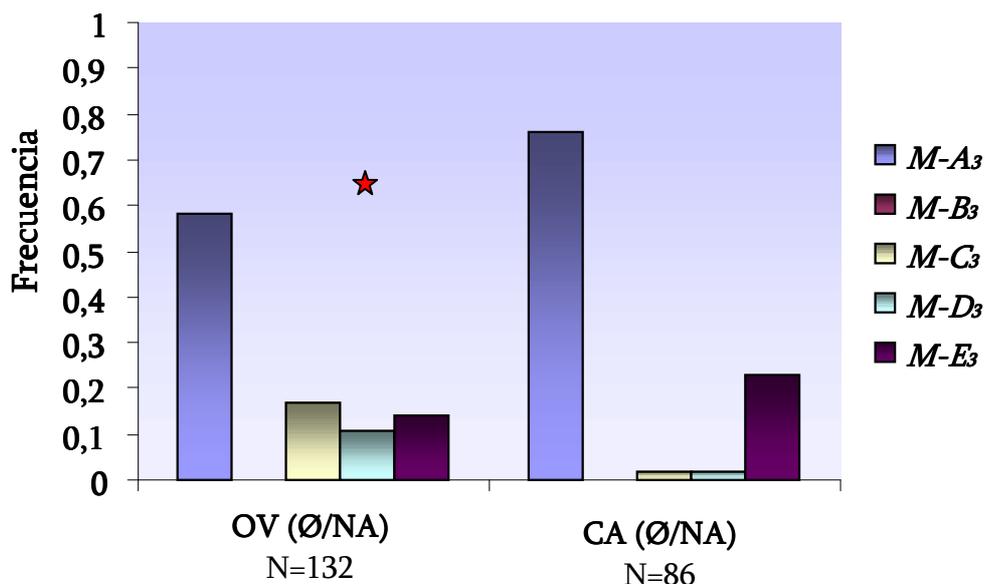


Fig. 43. Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos en ovinos y caprinos no inmunizados e infectados con la cepa NA.

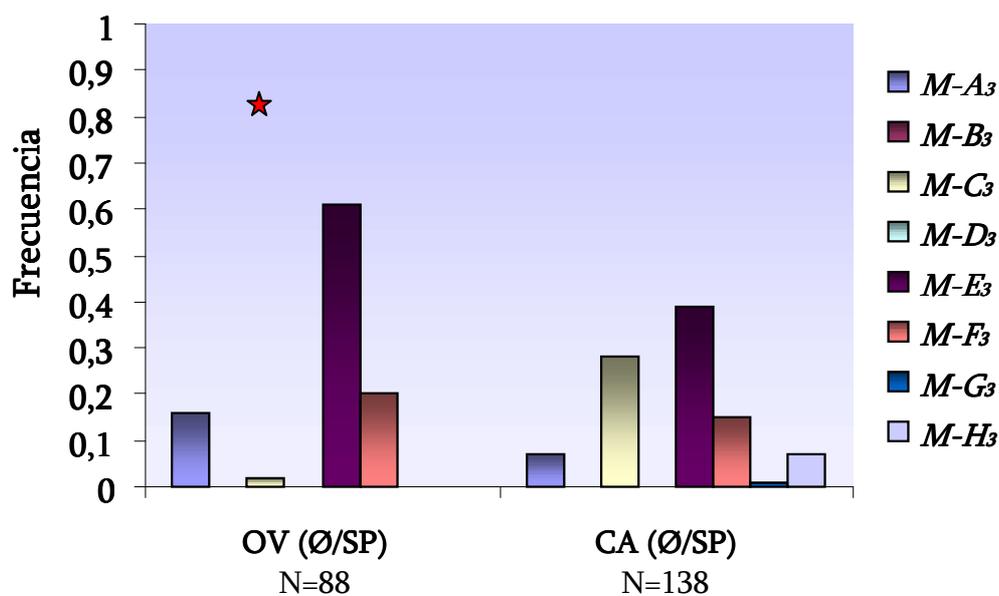


Fig. 44. Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos en ovinos y caprinos no inmunizados e infectados con la cepa SP.

#### 4. Resultados

Cuando se valoraron los animales inmunizados con proteinasas de la cepa NA (independientemente de la cepa con que fueron posteriormente infectados (NA/NA, NA/SP)), y se compararon con los controles correspondientes, se observó un aumento de la frecuencia alélica del alelo  $M-C_3$  y una menor frecuencia del alelo  $M-E_3$  en los grupos ovinos en relación a las correspondientes de caprinos. Por el contrario, cuando se compararon los grupos inmunizados con SP (independientemente de con qué cepa fueron posteriormente infectados (SP/SP, SP/NA)) y se compararon los controles de dicha cepa, se observó un aumento de la frecuencia alélica del alelo  $M-E_3$  y una menor del alelo  $M-C_3$  en las muestras aisladas de ovinos en relación a las correspondientes de caprinos. En ambos casos estas diferencias fueron significativas ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ , respectivamente).

Al agrupar todos los datos de ovinos no inmunizados y compararlos con la misma agrupación pero en caprino, se observó un alto nivel de significación ( $P < 0,001$ ), presentándose en las muestras de origen ovino una mayor frecuencia de los alelos  $M-A_3$  y  $M-D_3$  y menor del  $M-C_3$ , no estando presentes los alelos  $M-G_3$  y  $M-H_3$ . En todas las comparaciones donde se agruparon distintos lotes experimentales para evaluar el factor hospedador se observó una única tendencia del alelo  $M-A_3$ , presente siempre con una mayor frecuencia en los grupos de ovino (Fig. 45).

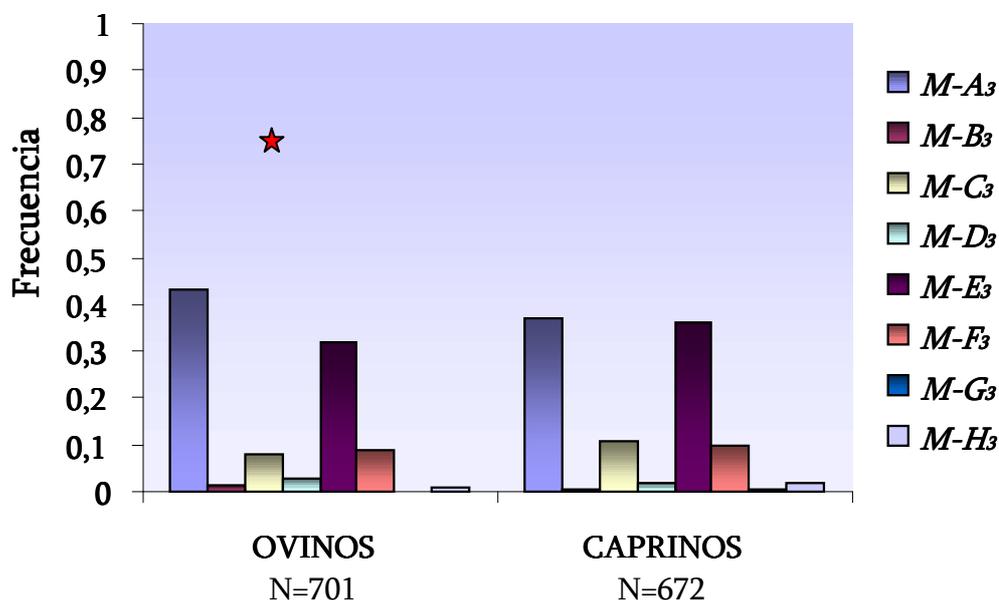


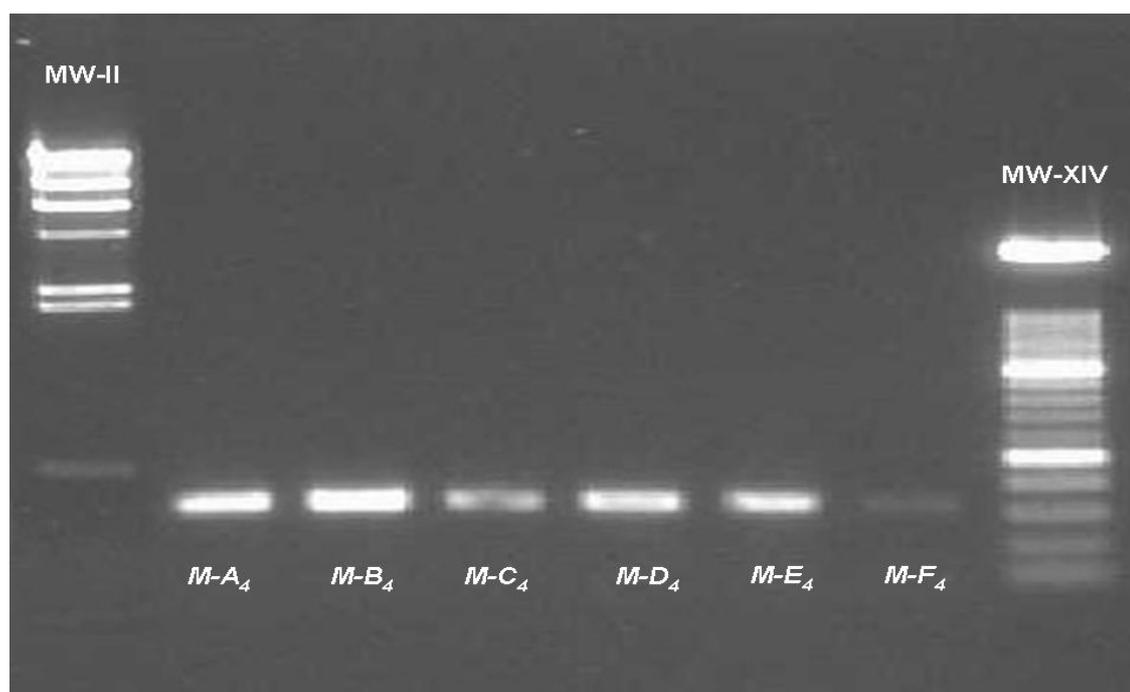
Fig. 45. Distribución comparada de alelos para el gen AC-3 en la población de vermes machos obtenidos en ambos hospedadores.

Por otro lado, cuando se agruparon todos los lotes ovinos y todos los caprinos, con independencia de los factores “inmunización” y “cepa”, hubo diferencias

próximas a la significación ( $P = 0,057$ ), con mayor frecuencia de los alelos  $M-A_3$ ,  $M-B_3$  y  $M-D_3$  en los ovinos y mayor frecuencia de los alelos  $M-C_3$  y  $M-E_3$  en los caprinos. Los valores de los alelos  $M-F_3$ ,  $M-G_3$  y  $M-H_3$  fueron prácticamente similares en ambos hospedadores (Fig. 45).

#### 4.2.4. GEN AC-4

El producto de PCR amplificado para este gen tuvo un tamaño de 330 bp aproximadamente. Al evaluar todas las muestras de todos los grupos experimentales se obtuvo un total de 6 alelos ( $M-A_4$ ,  $M-B_4$ ,  $M-C_4$ ,  $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$ ), 3 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$ ) y el resto en ambas cepas. En la Fig. 46 se representan los productos amplificados de estos 6 alelos en un gel de agarosa al 1,2% y en la Fig. 47 los patrones obtenidos mediante la técnica SSCP.



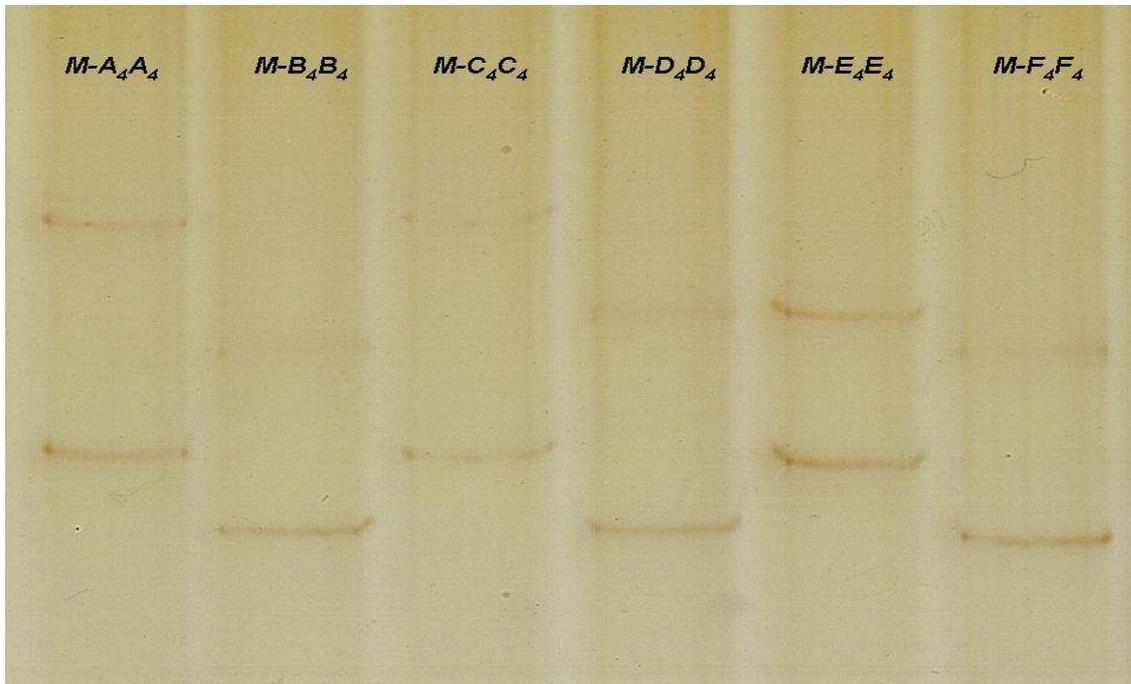
**Fig. 46.** Productos de PCR en gel de agarosa al 1,2% para el *locus* AC-4. De izquierda a derecha: DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kbp), homocigotos para los alelos  $M-A_4$  al  $M-F_4$  y DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1.500 bp).

Las frecuencias de los diferentes patrones de SSCP para el gen AC-4 en los diferentes grupos experimentales estudiados están recogidas en las Tablas 28 y 30 (ver Anexo “Tablas”), al igual que las correspondientes frecuencias alélicas (Tablas 29 y 31). Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas de todos los grupos

#### 4. Resultados

---

fueron evaluados comparativamente con el fin de valorar los distintos factores objeto de estudio, tal y como se describe a continuación.

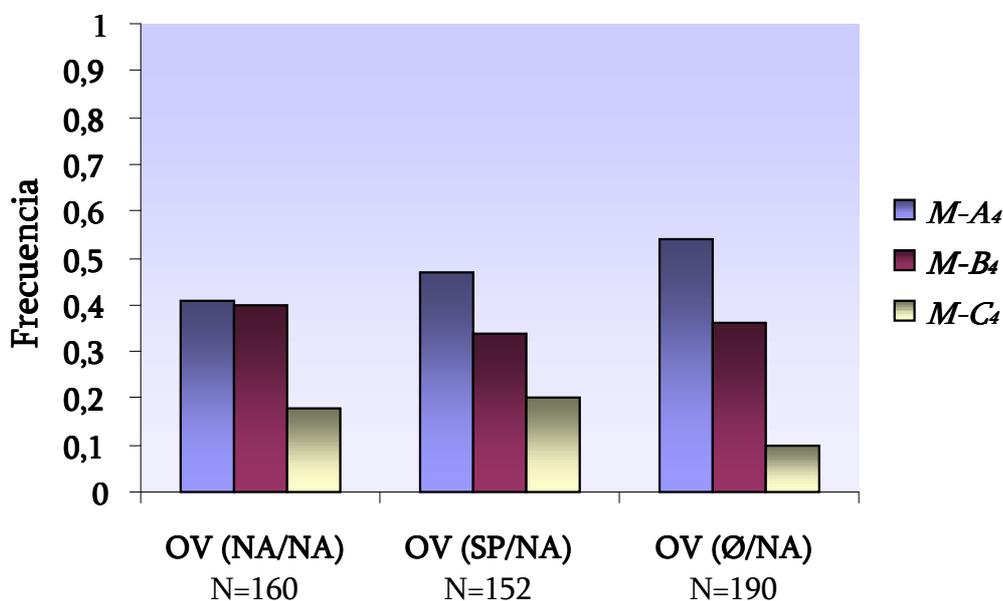


**Fig. 47.** Patrones de SSCP encontrados en el gen codificador de proteasas tipo cisteína AC-4. Se representan los homocigotos encontrados para los 6 alelos.

##### 4.2.4.1. Factor inmunización

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las muestras de vermes procedentes de ovinos inmunizados con productos procedentes de la cepa NA e infectados con la misma cepa (NA/NA) ( $P < 0,05$ ) al compararlas con los resultados obtenidos en su correspondiente grupo control ( $\emptyset$ /NA). A su vez, al comparar este mismo grupo control con el grupo de vermes procedentes de ovinos inmunizados con antígenos de la cepa SP e infectados con L3 de la cepa NA (SP/NA), se obtuvo un nivel próximo a la significación ( $P = 0,053$ ). En ambos casos, las diferencias fueron probablemente debidas a una menor proporción del denominado alelo  $M-A_4$ , como puede apreciarse en la **Figura 48**. Por otro lado, en los dos grupos inmunizados (NA/NA y SP/NA) se observó un ligero aumento del alelo  $M-C_4$  y en los vermes obtenidos en ovinos inmunizados con antígenos de la cepa NA, también del alelo  $M-B_4$ . No hubo diferencias entre los grupos de ovinos inmunizados pero las variaciones de las frecuencias alélicas fueron más acentuadas en el grupo inmunizado

con proteinasas obtenidas a partir de la cepa homóloga (grupo NA/NA); en dicho grupo la proporción del alelo  $M-A_4$  se encontró especialmente disminuida.



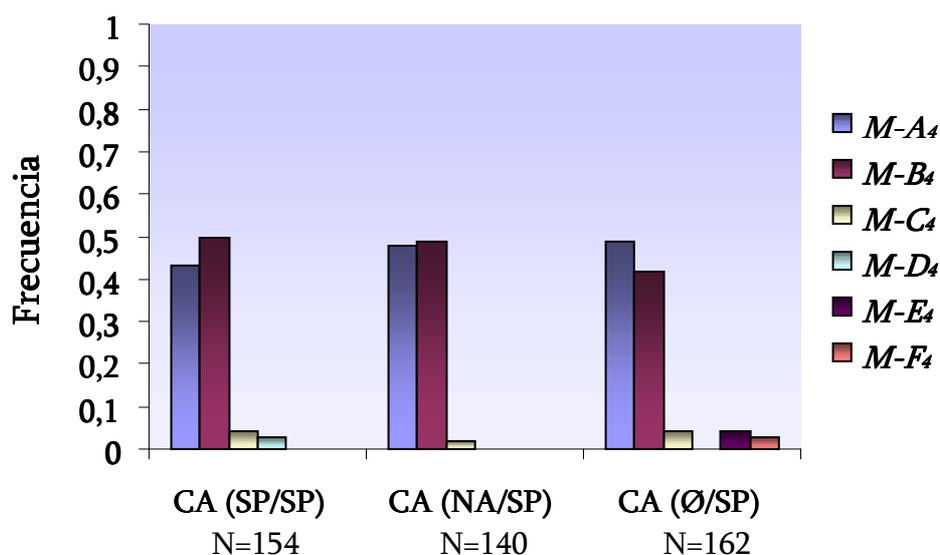
**Fig. 48.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos infectados con L3 de la cepa NA. Se representan los grupos inmunizados, tanto con antígenos de la cepa homóloga (NA) como de la heteróloga (SP), así como el grupo control no inmunizado.

Al igual que ocurrió en el ganado ovino, en las muestras obtenidas de los caprinos infectados experimentalmente con la cepa SP que fueron inmunizados (SP/SP y NA/SP), se observó una disminución del alelo  $M-A_4$  y una mayor presencia del alelo  $M-B_4$ , mientras que el  $M-C_4$  se mantuvo en valores similares al realizar las respectivas comparaciones con el correspondiente grupo control (Ø/SP). Las diferencias no llegaron a ser significativas pero volvieron a estar más acentuadas en el ensayo homólogo (SP/SP) (**Fig. 49**).

Esta tendencia fue idéntica en los ovinos infectados con L3 de la cepa SP, es decir, todos los inmunizados (SP/SP y NA/SP) presentaron una menor proporción del alelo  $M-A_4$  y una mayor frecuencia de los alelos  $M-B_4$  y  $M-C_4$ , si bien estas diferencias no llegaron a ser significativas respecto al control (Ø/SP). En este caso, tanto los ovinos inmunizados con enzimas obtenidas a partir de la cepa SP (SP/SP) como los ovinos inmunizados con proteinasas de la cepa NA (NA/SP) presentaron la misma proporción de alelos  $M-A_4$ .

#### 4. Resultados

Finalmente, en las muestras procedentes de ganado caprino infectado con la cepa de origen ovino NA, no se observó ningún tipo de tendencia en las frecuencias alélicas a destacar, salvo que los vermes de caprinos inmunizados con proteinasas de la cepa SP y posteriormente infectados con larvas NA (SP/NA) presentaron unos niveles de alelos  $M-A_4$  similares a los observados en las muestras de los ovinos del grupo control para la cepa NA ( $\emptyset$ /NA).



**Fig. 49.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de machos obtenidos de caprinos infectados con la cepa SP. Se representan los grupos inmunizados, tanto con la cepa homóloga (SP) como con la heteróloga (NA), y el grupo control no inmunizado.

Independientemente de las diferencias en las frecuencias alélicas, sólo se observaron alelos  $M-E_4$  en los grupos control de la cepa SP ( $\emptyset$ /SP) en ambos hospedadores, y alelos  $M-F_4$  sólo en los caprinos del grupo control de dicha cepa ( $\emptyset$ /SP). El alelo  $M-F_4$  fue el tercer-cuarto alelo predominante, de hecho, su ausencia en el grupo control unido a la menor presencia del alelo  $M-A_4$  en los vermes aislados en los caprinos inmunizados (SP/SP y NA/SP) propició que existiesen diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas obtenidas en los caprinos inmunizados y los no inmunizados tras la infección experimental con la cepa SP, con valores de significación más altos en el ensayo homólogo (SP/SP).

Al agrupar los datos procedentes de todos los animales inmunizados y compararlos con los correspondientes a los no inmunizados, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ), acentuándose los patrones de frecuencias ya descritas anteriormente, es decir, frecuencias alélicas  $M-A_4$  disminuidas y aumento de la frecuencia de los alelos  $M-B_4$  y  $M-C_4$ .

#### 4.2.4.2. Factor cepa

Tras analizar todos los patrones de SSCP, se encontró que la cepa SP presentaba 3 alelos más que la cepa de Norteamérica, concretamente los alelos  $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$  (Fig. 50 y 51). Esto motivó que al hacer las comparaciones las diferencias asociadas al factor cepa fueran estadísticamente significativas en todos los casos.

La cepa SP, tanto en muestras obtenidas en ovino como en caprino, presentó una mayor proporción del alelo  $M-B_4$  y menor proporción del alelo  $M-C_4$  en todas las comparaciones con respecto a la cepa NA.

En ambas cepas los alelos predominantes fueron el  $M-A_4$  y el  $M-B_4$ , siendo el  $M-C_4$  el tercer alelo más frecuente. A pesar de que la cepa SP presentó mayor variedad de alelos, estos tres alelos se mantuvieron en frecuencias similares a los de la cepa NA. Los alelos  $M-D_4$  y  $M-E_4$  se encontraron como alelos minoritarios en las dos cepas, y el alelo  $M-F_4$ , que sólo se presentó en muestras de caprino no inmunizado e infectado experimentalmente con la cepa SP, mostró una frecuencia alélica similar a la del alelo  $M-C_4$  (Fig. 50 y 51).

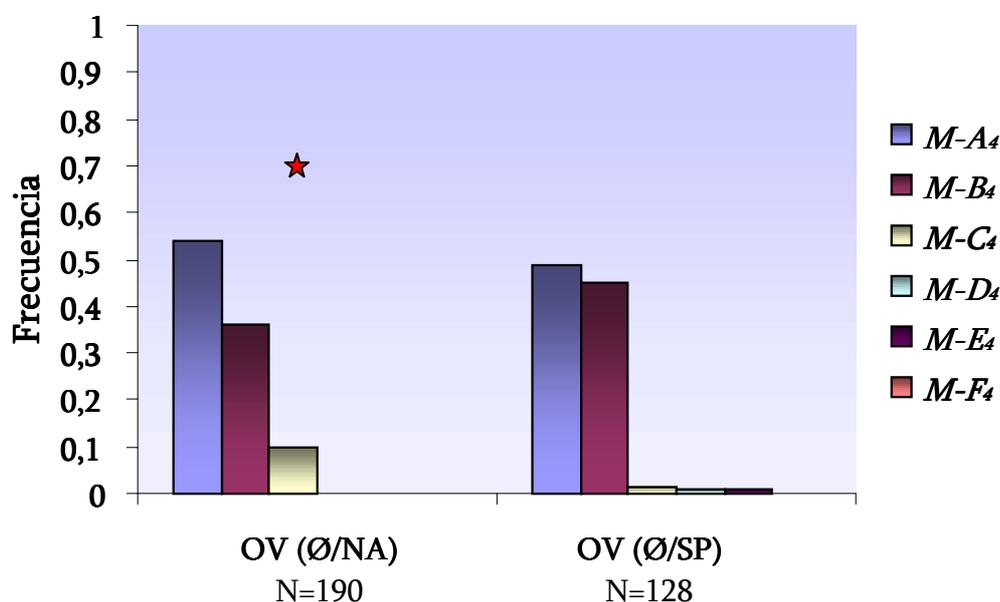
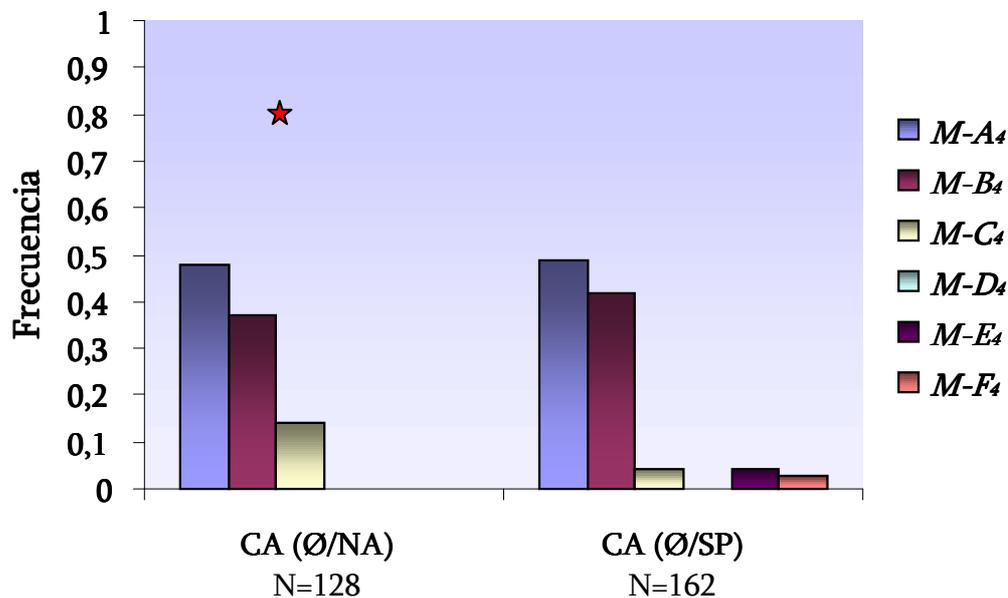


Fig. 50. Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de vermes machos obtenidos de ovinos infectados experimentalmente con las cepas NA y SP.



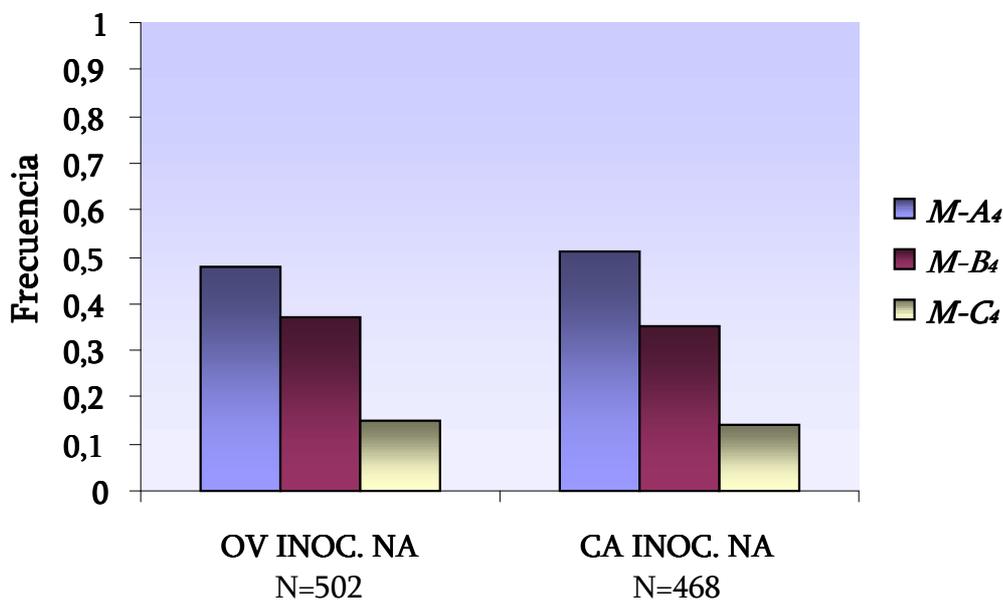
**Fig. 51.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de vermes machos obtenidos de caprinos infectados experimentalmente con las cepas NA y SP.

#### 4.2.4.3. Factor hospedador

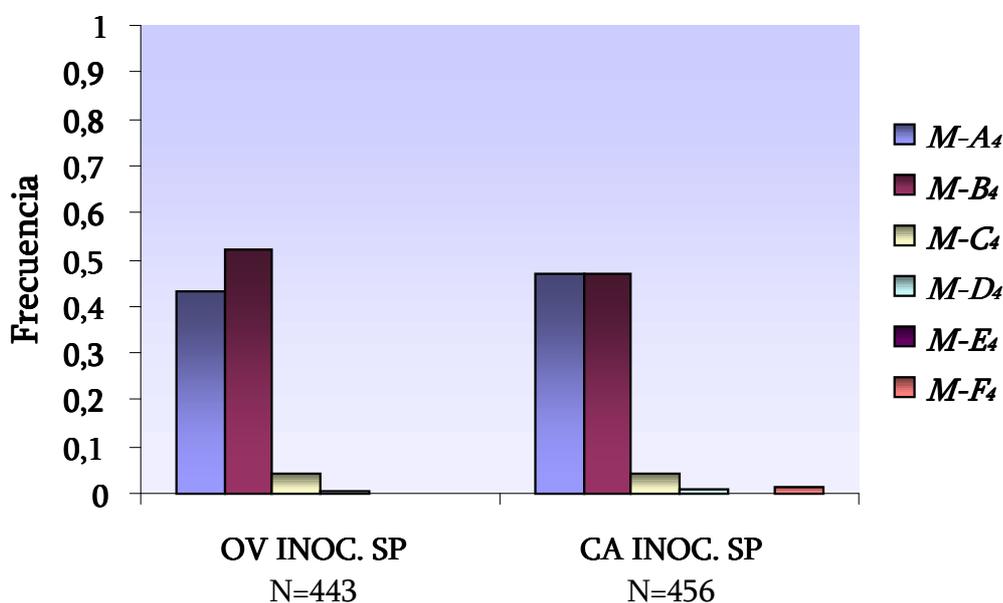
Las muestras de vermes machos procedentes de ovinos no inmunizados (Ø/NA) presentaron una mayor frecuencia del alelo *M-A<sub>4</sub>* al compararlo con los resultados del correspondiente grupo caprino (Ø/NA), aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. Esta tendencia se invirtió cuando se compararon los ovinos inmunizados (independientemente de la cepa utilizada en las inmunizaciones) con los respectivos grupos caprinos.

En relación a la cepa SP, también los vermes machos de ovinos inmunizados (SP/SP y NA/SP) presentaron una menor frecuencia del alelo *M-A<sub>4</sub>*, sin tampoco llegar a ser significativas las diferencias con respecto a sus homólogos caprinos. No se observaron diferencias entre ambos hospedadores en los grupos no inmunizados e infectados con esta cepa (Ø/SP).

En general, las frecuencias de los alelos *M-B<sub>4</sub>* y *M-C<sub>4</sub>* se mantuvieron con valores ligeramente más elevados en las muestras procedentes de ovinos. Las únicas excepciones se encontraron en el grupo control de la cepa NA (Ø/NA), donde el alelo *M-B<sub>4</sub>* se presentó ligeramente en menor proporción en los grupos ovinos, y en el grupo control de la cepa SP (Ø/SP), donde el alelo *M-C<sub>4</sub>* presentó también valores menores en dicho hospedador.



**Fig. 52.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de vermes machos obtenidos en todos los animales infectados experimentalmente con la cepa NA. Se representan los ovinos infectados con dicha cepa frente a sus homólogos caprinos, independientemente de la inmunización y tipo de antígeno utilizado en las inmunizaciones.



**Fig. 53.** Distribución comparada de alelos para el gen AC-4 en la población de vermes machos obtenidos en todos los animales infectados experimentalmente con la cepa SP. Se representan los ovinos infectados con dicha cepa frente a sus homólogos caprinos, independientemente de la inmunización y tipo de antígeno utilizado en las inmunizaciones.

## 4. Resultados

Al agrupar los resultados de los grupos ovinos infectados experimentalmente con la cepa NA y compararlos con los grupos caprinos infectados con L3 de la misma cepa, se confirmó que todos los vermes aislados de ovinos infectados con la cepa NA presentaron menor frecuencia del alelo  $M-A_4$  y mayor frecuencia de los alelos  $M-B_4$  y  $M-C_4$  (Fig. 52); no obstante, estas diferencias no fueron lo suficientemente importantes como para alcanzar una significación estadística.

Al igual que en la cepa NA, cuando se agruparon todos los resultados obtenidos en los animales infectados con la cepa SP, se observó menor frecuencia del alelo  $M-A_4$  y mayor presencia del alelo  $M-B_4$  en los ovinos, mientras que tanto el alelo  $M-C_4$  como el  $M-D_4$  permanecieron aproximadamente iguales en ambos hospedadores (Fig. 53).

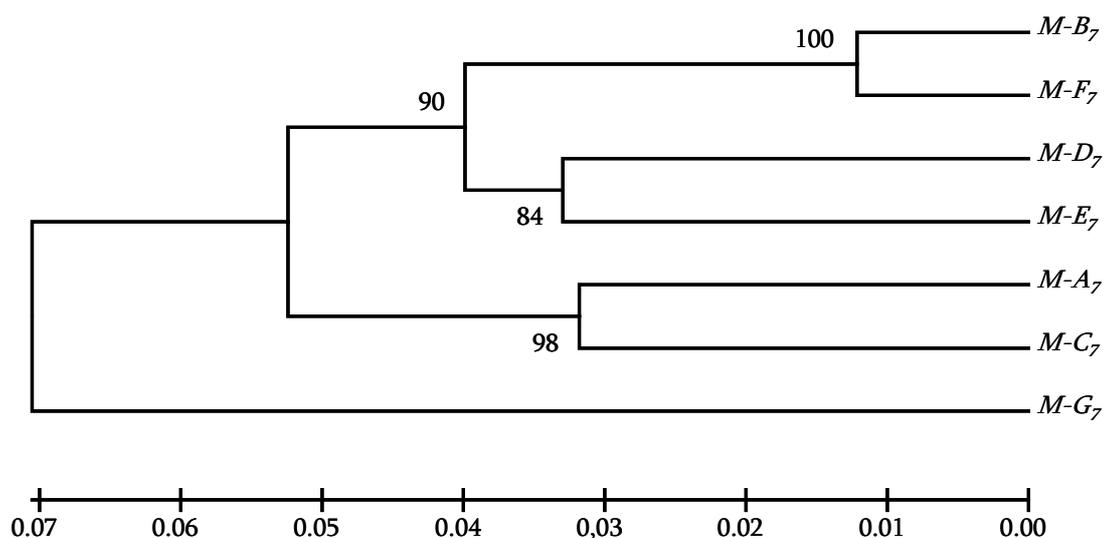
Agrupando todos los resultados obtenidos en ovinos y comparándolos con todos los obtenidos en caprinos, se confirmó lo descrito con anterioridad en las comparaciones sectoriales, es decir, menor frecuencia del alelo  $M-A_4$  y mayor frecuencia de los alelos  $M-B_4$ ,  $M-C_4$  y  $M-D_4$  en los ovinos.

### 4.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

#### 4.3.1. GEN GCP-7

**Tabla 11.** Estimación de la variabilidad nucleotídica dentro y entre las distintas cepas (NA y SP) en el gen GCP-7 de *Haemonchus contortus*. Se representa el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

	CEPA NA	CEPA SP
<b>S</b>	82	109
<b><math>\pi</math></b>	0,1024 (0,0283)	0,0954 (0,0130)
<b><math>\theta</math></b>	0,1018 (0,0615)	0,0969 (0,0440)
<b>Distancia media dentro de grupos</b>	0,0890 (0,0120)	0,1030 (0,0100)
<b>Distancia media entre grupos</b>	0,0830 (0,0090)	
<b>Distancia mínima del total de la población</b>	0,0240 (0,0070)	
<b>Distancia máxima del total de la población</b>	0,1570 (0,0200)	
<b>Diversidad media del total de la población</b>	0,0930 (0,0090)	



**Fig. 54.** Dendrograma de las secuencias del gen GCP-7 de proteinasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* de España y Norte América. El árbol se obtuvo mediante 500 réplicas usando los métodos Jukes Cantor y Neighbour-Joining en MEGA versión 4.0. Los números junto a las ramas son los porcentajes de probabilidad en base a los 500 muestreos aleatorios. La escala representa las distancias Jukes Cantor entre los alelos de los diferentes *loci* analizados.

El gen GCP-7 mostró mayor número de sitios polimórficos (S) en la cepa SP, con un total de 109, frente a los 82 que se encontraron en la cepa NA. Por otro lado, también en la cepa SP fue donde la distancia media dentro de grupos fue mayor, con un valor de 0,103 frente al valor de 0,089 encontrado en la cepa NA.

### 4.3.2. GEN AC-1

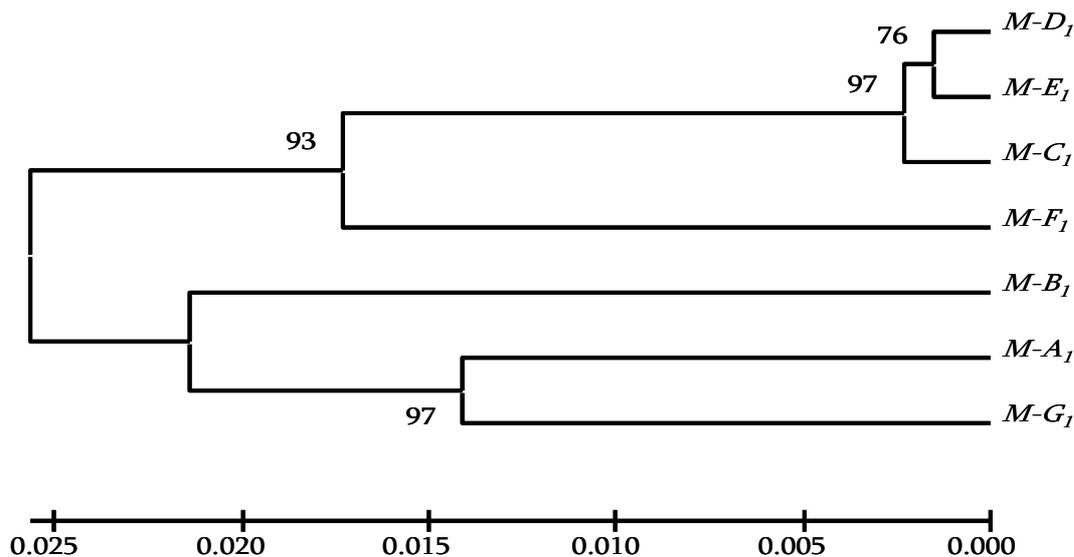
En el gen AC-1 también se encontró un mayor número de sitios polimórficos (S) en la cepa SP, con un total de 30, frente a los 27 de la cepa NA. Sin embargo, fue la cepa NA la que mostró una mayor distancia media dentro de grupos, con un valor de 0,049.

En el gen AC-1 se diferenciaron 2 grandes grupos que partieron de un tronco común para conformar dos ramas filogenéticas bien diferenciadas. Una de ellas englobó a los alelos  $M-A_1$  y  $M-G_1$  (éstos más relacionados entre sí) y al alelo  $M-B_1$ . La otra rama incluyó al resto de alelos, de los cuales el  $M-F_1$  se encontró más distanciado filogenéticamente (**Fig. 55**).

#### 4. Resultados

**Tabla 12.** Estimación de la variabilidad nucleotídica dentro y entre las distintas cepas (NA y SP) en el gen AC-1 de *Haemonchus contortus*. Se representa el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

	CEPA NA	CEPA SP
$S$	27	30
$\pi$	0,0477 (0,0099)	0,0389 (0,0066)
$\theta$	0,0453 (0,0254)	0,0376 (0,0179)
Distancia media dentro de grupos	0,0490 (0,0090)	0,0400 (0,0070)
Distancia media entre grupos	0,0370 (0,0070)	
Distancia mínima del total de la población	0,0030 (0,0030)	
Distancia máxima del total de la población	0,0640 (0,0140)	
Diversidad media del total de la población	0,0400 (0,0070)	



**Fig. 55.** Dendrograma de las secuencias del gen AC-1 de proteinasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* de España y Norte América. El árbol se obtuvo mediante 500 réplicas usando los métodos Jukes Cantor y Neighbour-Joining en MEGA versión 4.0. Los números junto a las ramas son los porcentajes de probabilidad en base a los 500 muestreos aleatorios. La escala representa las distancias Jukes Cantor entre los alelos de los diferentes *loci* analizados.

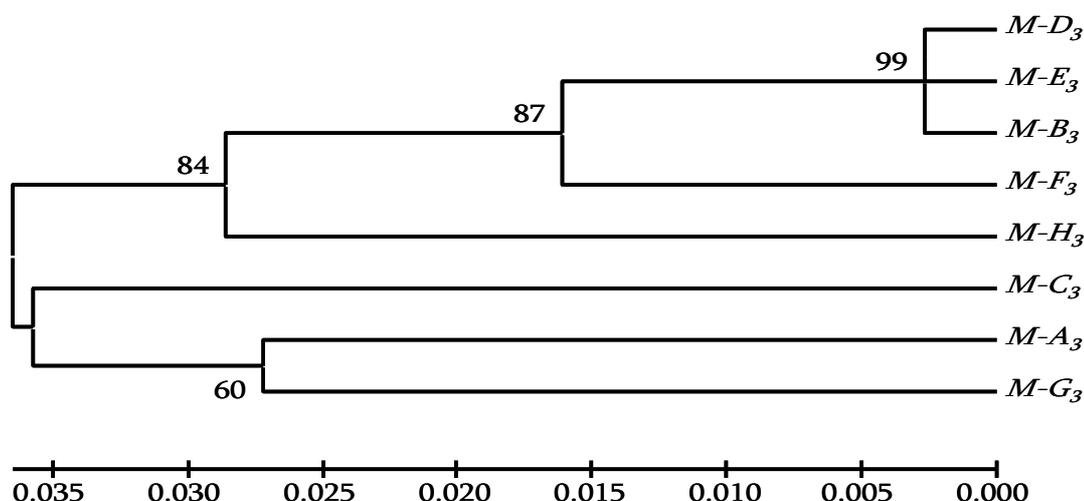
#### 4.3.3. GEN AC-3

El gen AC-3 mostró mayor número de sitios polimórficos ( $S$ ) en la cepa SP, con un total de 47, frente a los 37 de la cepa NA. Así mismo, la cepa SP fue la que

mostró mayor distancia media dentro grupos, con un valor de 0,067 tal y como puede apreciarse en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Estimación de la variabilidad nucleotídica dentro y entre las distintas cepas (NA y SP) en el gen AC-3 de *Haemonchus contortus*. Se representa el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

	CEPA NA	CEPA SP
$S$	37	47
$\pi$	0,0552 (0,0161)	0,0636 (0,0074)
$\theta$	0,0584 (0,0302)	0,0719 (0,0349)
<b>Distancia media dentro de grupos</b>	0,0560 (0,0090)	0,0670 (0,0090)
<b>Distancia media entre grupos</b>	0,0560 (0,0080)	
<b>Distancia mínima del total de la población</b>	0,0040 (0,0030)	
<b>Distancia máxima del total de la población</b>	0,0890 (0,0180)	
<b>Diversidad media del total de la población</b>	0,0580 (0,0090)	



**Fig. 56.** Dendrograma de las secuencias del gen AC-3 de proteasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* de España y Norte América. El árbol se obtuvo mediante 500 réplicas usando los métodos Jukes Cantor y Neighbour-Joining en MEGA versión 4.0. Los números junto a las ramas son los porcentajes de probabilidad en base a los 500 muestreos aleatorios. La escala representa las distancias Jukes Cantor entre los alelos de los diferentes *loci* analizados.

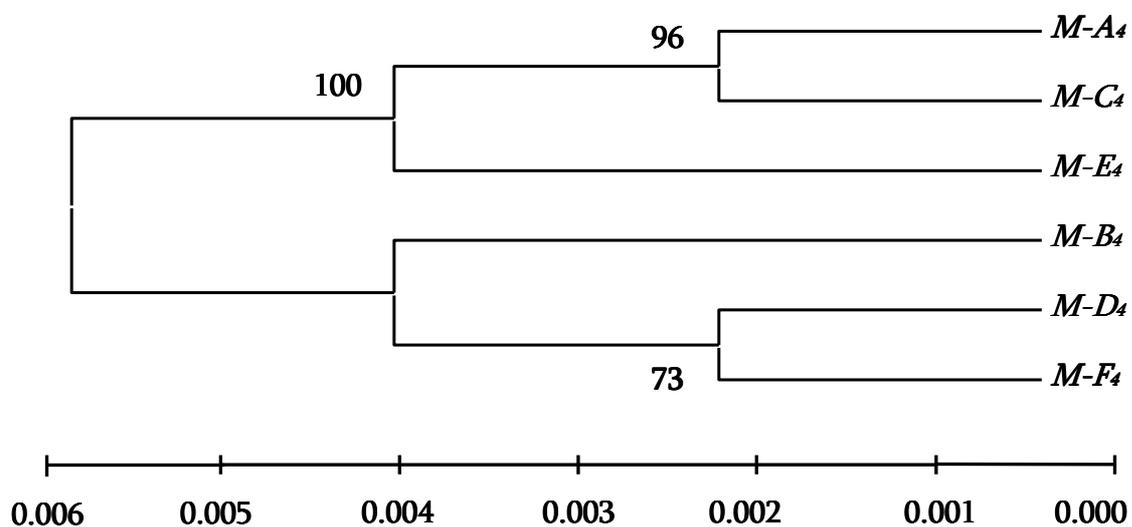
El gen AC-3 presentó 2 ramas filogenéticas bien distintas, en una de ellas se agruparon los alelos  $M-A_3$ ,  $M-C_3$  y  $M-G_3$  y en la otra el resto. En esta última rama, el alelo  $M-H_3$  estuvo claramente separado del resto (**Fig. 56**).

### 4.3.4. GEN AC-4

El gen AC-4 mostró mayor número de sitios polimórficos (S) en la cepa SP, con un total de 17 sitios polimórficos, frente a los 14 de la cepa NA. Por el contrario, en la cepa SP fue donde la distancia media dentro de grupos fue menor (**Tabla 14**).

**Tabla 14.** Estimación de la variabilidad nucleotídica dentro y entre las distintas cepas (NA y SP) en el gen AC-4 de *Haemonchus contortus*. Se representa el número de sitios polimórficos (S), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

	CEPA NA	CEPA SP
S	14	17
$\pi$	0,0318 (0,0104)	0,0273 (0,0049)
$\theta$	0,0318 (0,0202)	0,0254 (0,0130)
Distancia media dentro de grupos	0,0330 (0,0090)	0,0280 (0,0070)
Distancia media entre grupos	0,0240 (0,0060)	
Distancia mínima del total de la población	0,0030 (0,0030)	
Distancia máxima del total de la población	0,0490 (0,0140)	
Diversidad media del total de la población	0,0270 (0,0060)	



**Fig. 57.** Dendrograma de las secuencias del gen AC-4 de proteasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* de España y Norte América. El árbol se obtuvo mediante 500 réplicas usando los métodos Jukes Cantor y Neighbour-Joining en MEGA versión 4.0. Los números junto a las ramas son los porcentajes de probabilidad en base a los 500 muestreos aleatorios. La escala representa las distancias Jukes Cantor entre los alelos de los diferentes loci analizados.

El árbol filogenético del gen AC-4 agrupó los seis alelos encontrados en dos ramas. En una de ellas se englobaron los alelos *M-A<sub>4</sub>*, *M-C<sub>4</sub>* y *M-E<sub>4</sub>*, los dos primeros con un origen común. En la segunda rama se incluyeron a los alelos *M-B<sub>4</sub>*, *M-D<sub>4</sub>* y *M-F<sub>4</sub>*, de los cuales el *M-B<sub>4</sub>* presentó un origen distinto (**Fig. 57**).

## *5. DISCUSIÓN*

### 5.1. Aspectos generales sobre la variabilidad genética e inmunoprotección frente a proteinasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus*

Son varios los trabajos que han señalado la variación a nivel molecular de las poblaciones de parásitos (Maizels y Kurniawan-Atmadja, 2002; Jiménez *et al.*, 2005; Nolan y Cribb, 2005; Troell *et al.*, 2006a). En general, las modificaciones de las secuencias génicas de un organismo, a veces debidas a diferencias en un único nucleótido, pueden provocar cambios en la secuencia de aminoácidos y, por tanto, la síntesis de proteínas distintas, o con conformaciones distintas (Lozano *et al.*, 2005). Esto naturalmente podría significar que las proteínas resultantes pudieran tener diferentes funciones en el parásito (Lehninger *et al.*, 1993; Lozano *et al.*, 2005). De hecho, como ya se ha comentado previamente, el desarrollo de mutaciones constituye uno de los mecanismos que tienen los organismos para su supervivencia y evolución.

Si bien el cambio en un nucleótido puede modificar hasta la función de una proteína, también es posible que haya cambios a nivel genético que no influyan en la síntesis proteica. De hecho, existen regiones en los genes (intrones) que no se expresan, y que por tanto no juegan ningún papel en la síntesis de aminoácidos. Incluso, el hecho de que la variación tenga lugar en las regiones de la secuencia que sí codifican la síntesis de aminoácidos (exones) tampoco tendría por qué significar un cambio en la funcionalidad de la proteína que codifica (Lehninger *et al.*, 1993).

En el nematodo *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) la variabilidad genética se ha observado en varios genes (Karanu *et al.*, 1993; Knox *et al.*, 1993; Karanu *et al.*, 1997; Jasmer *et al.*, 2004; Troell *et al.*, 2006b), entre ellos, genes que codifican proteinasas tipo cisteína (Ruiz *et al.*, 2004b). Debido a las importantes funciones que se adscriben a este tipo de proteinasas, ya descritas en capítulos anteriores, un acercamiento al conocimiento de los genes que las codifican podría aportar información valiosa sobre el control inmunológico de la nematodosis producida por este parásito. Las proteinasas codificadas por los diferentes alelos de cada uno de estos genes no necesariamente tendrían por qué desempeñar funciones idénticas (Larminie *et al.*, 1996) y, por consiguiente, podrían jugar un papel más o menos importante en el ciclo vital de este organismo. Aparte, su poder inmunógeno, y por tanto la capacidad del sistema inmune del hospedador para reconocer y actuar frente a las diferentes proteinasas, podría ser diferente. En cualquier caso, aunque el sistema inmune interaccionase frente a todas las proteinasas de forma similar, es posible que la neutralización de algunas de ellas fuese más determinante debido al rol que pudiesen estar jugando en la supervivencia del parásito en el hospedador.

---

En el presente estudio se ha realizado una evaluación detallada de la variabilidad genética en proteinasas tipo cisteína mediante ensayos guiados de inmunoprotección frente a la haemonchosis, tratando de identificar aquellos alelos con mayor potencial inmunoprotector y evaluando el resultado de dicha protección sobre las poblaciones parásitas resultantes. Tanto la inmunoprotección como la propia variabilidad genética se valoraron en base a la influencia del tipo de cepa y tipo de hospedador utilizados en las inmunizaciones (factores cepa y hospedador, respectivamente), para lo cual se realizaron inoculaciones cruzadas con dos aislados geográficos de *H. contortus* (SP y NA) en hospedadores ovinos y caprinos.

Tal y como se ha detallado en el capítulo de **Resultados**, los análisis estadísticos realizados entre las frecuencias génicas de grupos inmunizados y no inmunizados demostraron que en algunos de los genes analizados existían diferencias significativas. Teniendo en cuenta que *a priori* la única diferencia entre algunos grupos estuvo determinada por la inmunización, las diferencias en las frecuencias alélicas de las poblaciones de los vermes adultos en estos grupos podrían deberse a la influencia de este factor. Una disminución importante de un alelo en animales inmunizados podría por tanto significar que las proteinasas codificadas por dicho alelo habían sido más fácilmente interceptadas por el sistema inmune del hospedador. Como se señaló anteriormente, o bien tales proteinasas tendrían mayor poder inmunógeno que las demás, o bien estarían implicadas de una forma más determinante en funciones vitales para la supervivencia del parásito.

A la hora de interpretar los resultados, se ha de tener presente que se ha realizado un estudio comparativo entre dos especies distintas (ovino-caprino), y que los sustratos que supuestamente digieren las proteinasas no tienen por qué ser los mismos, es decir, las enzimas proteolíticas de los parásitos procedentes de Canadá podrían ser específicas para degradar proteínas de ovino y, a su vez, las mismas enzimas del parásito aislado en caprino podrían sólo digerir sustratos presentes en dicho hospedador. Esta circunstancia, si bien parece obvia, se encuentra avalada por numerosos trabajos que ponen en evidencia las peculiaridades fisiológicas de cada una de estas especies, como las relacionadas con la eficacia digestiva de algunos nutrientes. Por ejemplo, se ha demostrado la mayor capacidad del caprino frente al ovino para digerir determinados tipos de fibra (Reid *et al.*, 1990), mientras que en otros trabajos se ha encontrado que la digestibilidad de la materia seca y la materia orgánica en los ovinos es mayor que en los caprinos (Ademosum, 1970). Las diferencias metabólicas entre ambos hospedadores no se deben sólo a la capacidad para digerir el alimento sino también, por ejemplo, a la capacidad para metabolizar fármacos. A pesar de esto, la mayoría de fármacos de uso veterinario para pequeños rumiantes se prescriben generalmente para ovinos, siendo pocos los productos que

incluyen también al caprino, en parte debido a la falta de ensayos comparativos para identificar las dosis eficaces particulares de cada hospedador. De hecho, existen estudios que atribuyen la frecuente aparición de resistencias a antihelmínticos en cabras al continuo uso de dosis terapéuticas similares a las de ovino (Jabbar *et al.*, 2006). A estos datos, cabría añadir las diferencias relacionadas con los mecanismos inmunes desarrollados por ambas especies frente a distintos agentes patógenos.

En el presente estudio, la capacidad inmunoprotectora de las proteinasas tipo cisteína se ha evaluado mediante el análisis coprológico de los animales investigados (recuentos fecales de huevos), la determinación de la carga parasitaria, así como mediante la determinación de los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas. Por su parte, el estudio de la variabilidad genética se llevó a cabo mediante el análisis de polimorfismo genético utilizando la técnica SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) y posterior secuenciación. Esta metodología ha sido utilizada en estudios similares, como en la determinación del polimorfismo de ADN en la región central de 432-pb del gen de la cruzipaína, que codifica el sitio activo de una proteinasa tipo cisteína del grupo de la catepsina L (De León *et al.*, 1998); también en la determinación de la variabilidad genética de genes de canales de cloro ligados al glutamato en cepas de *Cooperia oncophora* resistentes y susceptibles a la ivermectina (Njue y Prichard, 2004), o en el análisis de la variación de la secuencia de ADN mitocondrial del parásito de humanos *Gnathostoma spinigerum* (Ngarmamonpirat *et al.*, 2005). La utilidad de la técnica empleada en este trabajo para detectar el polimorfismo en genes codificadores de proteinasas tipo cisteína del grupo catepsina-B sólo ha sido previamente demostrada por Ruiz *et al.* (2004b). Al igual que estos autores, los patrones de bandas obtenidos mediante SSCP para cada uno de los 4 *loci* evaluados en este estudio, amplificados previamente por PCR a partir de las secuencias de los genes AC-1 (Pratt *et al.*, 1990), AC-3 y AC-4 (Pratt *et al.*, 1992) y GCP-7 (Rehman y Jasmer, 1998), fueron caracterizados fácilmente una vez determinadas las condiciones óptimas para dicho método. Se han podido distinguir alelos con diferencias en un solo nucleótido, como es el caso de los alelos *M-B<sub>3</sub>* y *M-D<sub>3</sub>*. La variación en los patrones de SSCP entre todos los alelos encontrados (28 patrones) demostró la existencia de variabilidad genética, siendo dicha variación ligeramente superior a la descrita previamente por Ruiz *et al.* (2004b) (19 alelos). Este hecho, junto con la reproducibilidad de los resultados de la SSCP, indica que la PCR unida a la SSCP proporcionan un método fiable para demostrar variaciones en la secuencia de genes de proteinasas tipo cisteína de *H. contortus*.

Si bien no era el objetivo de este trabajo, se encontró variación en las secuencias de aminoácidos correspondientes a los diferentes alelos encontrados para

---

cada uno de los genes investigados. La interpretación de estos resultados debería ser evaluada y analizada en mayor profundidad en futuros estudios.

### 5.2. Diferencias intrínsecas entre cepas y variabilidad genética

Uno de los objetivos planteados en el trabajo fue la valoración del comportamiento biológico-epidemiológico de las dos cepas utilizadas, la relación parásito-hospedador, y sus posibles correlaciones con la variabilidad genética en genes codificadores de proteinasas tipo cisteína de vermes adultos del parásito. Con esta finalidad se pretendió esclarecer observaciones de trabajos previos realizados en nuestra unidad (**datos no publicados**) sobre la distinta adaptabilidad de cepas foráneas de *H. contortus* en distintas especies de hospedadores.

Todos los ovinos infectados experimentalmente con la cepa NA de *H. contortus* (cepa homóloga) tuvieron un periodo prepatente de 3 semanas, coincidiendo con lo publicado por otros autores para distintas cepas ovinas (**Anderson, 1992; Urquhart et al., 2001; Alunda et al., 2003; Vanimisetti et al., 2004; Smith, 2007**), aunque también se han descrito periodos de prepatencia ligeramente menores (**Knox et al., 1999; Bakker et al., 2004; González et al., 2008a**), o incluso mayores, como ocurre en razas ovinas consideradas resistentes al parásito (**Yazwinski et al., 1980**). En el presente estudio, la evolución de los recuentos fecales de huevos (HPG) se produjo de la misma forma que en infecciones naturales de ovinos por *H. contortus*, con un aumento paulatino del número de HPG a partir de la tercera semana post-infección (p.i.), observándose niveles máximos a las dos semanas siguientes (5ª semana p.i.) (**Alunda et al., 2003; Vanimisetti et al., 2004; Smith et al., 2007**), o bien en torno a los 10 días del comienzo de la eliminación de huevos en cepas con menor periodo de prepatencia (**Knox et al., 1999; Bakker et al., 2004; González et al., 2008a**).

La eliminación media de huevos en ovinos infectados con la cepa NA fue de aproximadamente 13.000 HPG, llegando incluso a valores próximos a los 30.000 HPG en algunos animales a la 5ª semana p.i.. En función de ciertos factores, como la dosis infectante o la cepa utilizada, los recuentos medios y máximos de HPG descritos por otros autores son muy dispares, aunque en general menores a los registrados en el presente trabajo. Así, **Alunda et al. (2003)**, utilizando una cepa española (Península Ibérica), obtuvieron unos recuentos máximos de aproximadamente 4.000 HPG (30 días p.i) tras inocular ovinos con 300 L3/Kg peso vivo. En concordancia, **Smith (2007)** describió recuentos máximos de 1.500 HPG a los 40 días p.i. en ovinos infectados con 5.000 L3 de una cepa sudafricana de *H. contortus* y **Bakker et al. (2004)** recuentos medios de aproximadamente 2.000 HPG y

máximos de 3.500 HPG a los 27 días p.i. en ovinos de raza Zwart-Bles infectados con 5.000 L3 de una cepa ovina de UK. Por su parte, **Knox et al. (1999)** encontraron recuentos máximos de 5.500 HPG a los 25 días p.i. en un cruce de raza ovina Greyface/Suffolk con la misma cantidad de L3 infectantes de la cepa UK, lo que indicaría que, aparte de la dosis infectante y de la cepa de *H. contortus*, el tipo de hospedador rumiante sería otro factor condicionante de los recuentos fecales. La influencia del hospedador en el nivel de HPG también se pone de manifiesto en los trabajos de **González et al. (2008a)**, que encontraron recuentos medios en el día 27 p.i. próximos a los 25.000 HPG en la raza canaria de lana (la misma empleada en el presente estudio) en contraste con los 5.500 HPG de media observados en la raza ovina de pelo Pelibuey, ambas inoculadas con 20.000 L3 de una cepa procedente de UK. Al igual que con los recuentos fecales de huevos, el número de adultos también fue variable en función de la dosis inoculada, la cepa del parásito y la raza hospedadora. **Alunda et al. (2003)** obtuvieron recuentos de algo más de 1.000 adultos y **Bakker et al. (2004)** valores sensiblemente superiores a los 2.000 vermes, en ambos casos comparativamente inferiores a los resultados del presente estudio, donde la carga parasitaria media fue ligeramente superior a los 3.000 vermes adultos en abomaso. También fueron inferiores los recuentos de vermes observados por **González et al. (2008a)** en ovinos de pelo Pelibuey (unos 2.000 vermes), en contraste con los más de 4.000 registrados en la raza ovina canaria de lana. De todo lo anterior se puede concluir que la tasa de infección y la prolificidad de la cepa NA en ovinos canarios de lana son comparables a las obtenidas al inocular la cepa UK procedente de Moredun Research Institute al mismo hospedador (**González et al., 2008a**), en ambos casos superiores a los resultados de otras cepas de *H. contortus* inoculadas en diferentes razas de ovinos (**Knox et al., 1999; Alunda et al., 2003; Bakker et al., 2004; Vanimisetti et al., 2004; Smith, 2007**).

En el segundo ensayo de inoculación homóloga (caprinos infectados experimentalmente con la cepa SP de *H. contortus*) el periodo de prepatencia fue de 4 semanas, una semana más que lo descrito anteriormente para la cepa NA ovina. Estos datos coinciden con lo descrito por otros autores que utilizaron la misma cepa SP en ganado caprino (**Molina et al., 2005**), aunque también se han encontrado periodos de prepatencia ligeramente superiores (5 semanas) (**Ruiz et al., 2004a**) o incluso inferiores (3 semanas) (**Jasmer y McGuire, 1991; Yanming et al., 2007**) en otras cepas caprinas de *H. contortus*. En cualquier caso, tanto en este estudio como en otras inoculaciones experimentales llevadas a cabo en ganado caprino, los niveles máximos de HPG se produjeron a la 6ª semana p.i. (**Ruiz et al., 2004a; Molina et al., 2005; Yanming et al., 2007**).

---

Los recuentos medios de HPG en la cepa SP inoculada al ganado caprino estuvieron próximos a los 4.000 HPG, llegando hasta 9.000 HPG aproximadamente en algunos animales (6ª semana p.i.). Recuentos ligeramente superiores (en torno a 5.000 HPG a la sexta semana de la primera infección) han sido descritos previamente tras inocular de forma seriada caprinos con 12.000 L3 de la misma cepa SP utilizada en este estudio (Molina *et al.*, 2005). Por el contrario, Ruiz *et al.* (2004a) obtuvieron recuentos medios considerablemente más bajos (unas 10 veces menores a los observados en el presente trabajo) inoculando caprinos con 10.000 L3 de otra cepa caprina aislada con anterioridad en Gran Canaria. Finalmente, Jasmer y McGuire (1991) registraron valores similares a los del presente estudio (entre 3.000 y 4.000 HPG) al inocular una cepa estadounidense de *H. contortus*, en ambos casos inferiores a los valores medios próximos a los 12.000 HPG observados a partir de infecciones con 5.000 L3 de una cepa de origen chino (Yanming *et al.*, 2007). Los recuentos de vermes adultos en abomaso también mostraron diferencias en caprinos infectados con diferentes cepas de *H. contortus*. En el presente trabajo, la carga parasitaria obtenida al utilizar la cepa SP fue ligeramente superior a los 1.000 vermes, valores muy similares a los encontrados por otros autores (Ruiz *et al.*, 2004a; Molina *et al.*, 2005), incluso cuando los recuentos fecales fueron mucho más bajos (Ruiz *et al.*, 2004a). Esta misma tendencia entre recuentos fecales de huevos y carga parasitaria también se ha observado en los trabajos de Jasmer y McGuire (1991) y Yanming *et al.* (2007), quienes en relación con los recuentos descritos anteriormente citaron cargas de vermes abomasales en torno a 3.000 y 1.000, respectivamente.

En su conjunto, las evidencias descritas anteriormente ponen de manifiesto que existen claras diferencias entre las distintas cepas de *H. contortus*, incluso entre cepas aisladas de un mismo tipo de hospedador rumiante. Las discrepancias entre las cepas empleadas en el presente estudio fueron igualmente evidentes. En concreto, la cepa NA ovina presentó una tasa de infección y una prolificidad tres veces superior a la cepa SP caprina, al tiempo que un menor periodo de prepatencia (una semana menos aproximadamente). Hasta el momento se ha hecho referencia a aspectos de índole biológica o epidemiológica, pero son numerosos los trabajos en los que también se señalan diferencias a nivel genético entre diferentes cepas de *H. contortus* (Karanu *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2004b; Redmond y Windham, 2005; Troell *et al.*, 2006a; Hunt *et al.*, 2008; Redman *et al.*, 2008). Aunque es sabido que todo cambio fenotípico tiene un trasfondo genético, no se conoce hasta el momento qué tipo de correlación existe entre las peculiaridades biológicas de las diferentes cepas y la variabilidad a nivel molecular. Siguiendo un procedimiento similar al utilizado por Ruiz *et al.* (2004b), se confirmó que también a nivel molecular se observaban importantes diferencias entre las dos cepas, tal y como se discute a continuación.

Según se recoge en el capítulo de resultados, el gen AC-1 (Pratt *et al.*, 1990) presentó un total de 7 alelos ( $M-A_1$ ,  $M-B_1$ ,  $M-C_1$ ,  $M-D_1$ ,  $M-E_1$ ,  $M-F_1$  y  $M-G_1$ ), 3 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-D_1$ ,  $M-E_1$  y  $M-G_1$ ). Cuatro de los alelos encontrados en este trabajo en el gen AC-1 no habían sido descritos en trabajos previos (Ruiz *et al.*, 2004b). En concreto, no se encontraron los alelos  $M-D_1$ ,  $M-E_1$  y  $M-G_1$ , todos ellos presentes sólo en la cepa española (SP), ni el alelo  $M-F_1$ , que sí fue descrito en el presente estudio en ambas cepas. Las secuencias de los demás alelos ( $M-A_1$ ,  $M-B_1$ , y  $M-C_1$ ) coincidieron en un 100% con los alelos  $A_1$ ,  $B_1$ , y  $D_1$  descritos por Ruiz *et al.* (2004b), respectivamente. Estos autores describieron además 2 alelos distintos a los encontrados en este trabajo para este gen, los alelos  $C_1$  y  $E_1$ , el primero descrito en ambas cepas y el segundo sólo en la cepa norteamericana (NA).

Por otro lado, en el gen AC-3 (Pratt *et al.*, 1992) se obtuvieron un total de 8 alelos ( $M-A_3$ ,  $M-B_3$ ,  $M-C_3$ ,  $M-D_3$ ,  $M-E_3$ ,  $M-F_3$ ,  $M-G_3$  y  $M-H_3$ ), 3 de ellos presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-F_3$ ,  $M-G_3$  y  $M-H_3$ ) y 2 sólo en la cepa de Norteamérica (NA) ( $M-B_3$  y  $M-D_3$ ), mientras que los otros 3 ( $M-A_3$ ,  $M-C_3$  y  $M-E_3$ ) se observaron en ambas cepas. Cinco de estos ocho alelos ( $M-A_3$ ,  $M-C_3$ ,  $M-D_3$ ,  $M-F_3$  y  $M-G_3$ ) fueron 100% coincidentes con alelos descritos en un estudio previo realizado por Ruiz *et al.* (2004b):  $M-A_3 = D_3$ ,  $M-C_3 = A_3$ ,  $M-D_3 = E_3$ ,  $M-F_3 = H_3$  y  $M-G_3 = G_3$ . En el presente trabajo se encontraron tres nuevos alelos: el  $M-B_3$ , sólo presente en la cepa NA, el  $M-H_3$ , sólo en la cepa de Gran Canaria (SP), y el  $M-E_3$ , presente en ambas cepas. En contrapartida no se hallaron secuencias coincidentes con las de los alelos  $B_3$ ,  $C_3$  y  $F_3$  descritos por Ruiz *et al.* (2004b).

También se observó variabilidad entre ambas cepas al analizar el gen AC-4 (Pratt *et al.*, 1992). Se obtuvieron un total de 6 alelos ( $M-A_4$ ,  $M-B_4$ ,  $M-C_4$ ,  $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$ ), 3 de los cuales aparecieron sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$ ), mientras que los otros 3 se observaron en ambas cepas. De los seis alelos encontrados para este gen dos coincidieron con los descritos en trabajos previos realizados por Ruiz *et al.* (2004b) ( $M-B_4 = A_4$  y  $M-C_4 = B_4$ ). Se encontraron por tanto cuatro nuevos alelos en este estudio:  $M-A_4$ ,  $M-D_4$ ,  $M-E_4$  y  $M-F_4$ , el primero de ellos presente en ambas cepas de *H. contortus* y los otros tres presentes sólo en la cepa SP.

Finalmente, el cuarto gen objeto de estudio, GCP-7 (Rehman y Jasmer, 1998), mostró un total de 7 alelos distintos ( $M-A_7$ ,  $M-B_7$ ,  $M-C_7$ ,  $M-D_7$ ,  $M-E_7$ ,  $M-F_7$  y  $M-G_7$ ). Cuatro de estos alelos estuvieron presentes sólo en la cepa de Gran Canaria (SP) ( $M-D_7$ ,  $M-E_7$ ,  $M-F_7$  y  $M-G_7$ ), mientras que los otros 3 se observaron en ambas cepas. De los siete alelos encontrados para este gen cuatro fueron 100% coincidentes con los descritos en trabajos previos realizados por Ruiz *et al.* (2004b):  $M-A_7 = A_7$ ,  $M-C_7 = D_7$ ,

$M-D_7 = C_7$  y  $M-F_7 = B_7$ . Aparte se encontraron tres nuevos alelos ( $M-B_7$ ,  $M-E_7$ , y  $M-G_7$ ) el primero de ellos presente en ambas cepas y los otros dos sólo en la cepa española (SP).

Los nuevos alelos encontrados en este trabajo y las diferencias con los descritos por **Ruiz et al. (2004b)** podrían ser atribuidas a varias razones, entre ellas las diferentes condiciones de electroforesis y sistemas de tinción empleados en el desarrollo de la técnica SSCP. En concordancia con esta posibilidad, los alelos  $M-F_7$  y  $M-B_7$ , muy próximos entre sí genéticamente, presentaron patrones SSCP en sus correspondientes homocigotos prácticamente indistinguibles (**Fig. 20**). Otras posibles causas, menos probables, pudieron haber sido el diferente número de vermes adultos analizados, que fue sensiblemente mayor en el presente estudio, o bien que en el transcurso de las diferentes inoculaciones a donantes se hubiese establecido un proceso selectivo que incrementara la presencia de alelos y variase la frecuencia de los mismos.

Según los resultados de SSCP, los genes que codifican proteinasas tipo cisteína en *H. contortus* mostraron un considerable grado de polimorfismo. Todos los *loci* analizados fueron polimórficos y se encontró un total de 28 alelos, con un rango entre 6 y 8 por *locus*, frente a los 19 alelos descritos previamente (**Ruiz et al., 2004b**). El *locus* AC-3 fue el más polimórfico seguido del GCP-7 y del AC-1, siendo el AC-4, con 6 alelos distintos, el que menos variabilidad presentó. Este mismo rango de polimorfismo entre los cuatro *loci* fue el observado por **Ruiz et al. (2004b)**. Como señalaron estos autores, el grado de variación alélica detectado mediante SSCP en el presente estudio también coincidió con las estimaciones de la variabilidad nucleotídica para todos los *loci*, excepto para el gen GCP-7, en el que el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la heterocigosidad por sitio nucleotídico ( $\theta$ ) presentaron valores más altos de lo que cabría esperar para la variación alélica, tanto para la cepa española (SP) como para la norteamericana (NA). La discrepancia entre los resultados de la SSCP y los análisis de variabilidad nucleotídica para el *locus* GCP-7 sugieren que el número de regiones de emparejamiento de bases, en lugar de la estructura primaria de la molécula, es el principal factor que determina la conformación espacial de la única cadena de ADN, ya que mutaciones puntuales pueden ser detectados mediante SSCP en fragmentos de >600 pares de base (**Kukita et al. 1997; Ruiz et al., 2004b**).

La existencia de variabilidad en proteinasas tipo cisteína entre distintos aislados geográficos del parásito también ha sido sugerida en otros trabajos (**Karanu et al., 1993; Knox et al., 1993; Karanu et al. 1997**). Estos últimos autores, al estudiar las proteinasas de productos de excreción-secreción de *H. contortus* en cepas del

---

parásito procedentes de Kenia y Estados Unidos, observaron que los aislados no sólo difieren de forma significativa en relación a su peso molecular sino también en cuanto a su actividad: mientras que las estadounidenses mostraron actividad tipo cisteína, la actividad observada en las de origen africano fue mayoritariamente del tipo de las metaloproteinasas y tipo serina. Es importante destacar de este trabajo que, aparte de las variaciones intergeográficas, también se encontró variabilidad entre los dos aislados de Kenia estudiados (KI y KII). Por otro lado, **Skuce et al. (1999a)**, tras realizar un panel de 5 cDNAs codificadores de cisteína proteinasas tipo catepsina B de *H. contortus*, observaron mediante Southern blot que algunas de esas enzimas estaban codificadas por una única copia de genes, mientras que otras lo estaban por múltiples copias. El posterior análisis secuencial de estas proteinasas mostró que existen claras diferencias a nivel molecular entre las proteinasas tipo cisteína procedentes de dos aislados del Reino Unido (UK) y los Estados Unidos de América (USA) (**Skuce et al., 1999a**). Similares evidencias de variabilidad genética habían sido ya descritas en proteinasas tipo cisteína del tipo catepsina B (CBL) en *H. contortus* por otros autores (**Cox et al., 1990; Pratt et al., 1990; Pratt et al., 1992; Rehman y Jasmer, 1998; Skuce et al., 1999a; Jasmer et al., 2001; Jasmer et al., 2004**), pero la magnitud de dicha diversidad genética sólo había sido medida previamente en un mismo grupo de genes dentro y entre diferentes cepas del parásito por **Ruiz et al. (2004b)**.

La variabilidad alélica también ha sido estudiada en otros genes de *H. contortus*, entre ellos genes codificadores de 2  $\beta$ -tubulinas del parásito (**Kwa et al., 1993; Beech et al., 1994; Eng et al., 2006; Höglund et al., 2009**), varias glicoproteínas P (Pgps) (**Blackhall et al., 1998a; Sangster et al., 1999; Blackhall et al., 2008**), 2 subunidades de canales de cloro ligados al glutamato, un receptor de N-acetilcolina y una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (**Blackhall et al., 1998b**). Por último, la diversidad genética en *H. contortus* también ha sido probada en galectinas de repetición tipo tándem (**Greenhalgh et al., 1999; Wang et al., 2007**), el elemento de transposición Tc1 y transposón de integración (**Hoekstra et al., 1999; Hoekstra et al., 2000**) y en análisis de microsatélites (**Hoekstra et al., 1997; Otsen et al., 2000; Redman et al., 2008**). La variabilidad genética no es por tanto un fenómeno exclusivo de las proteinasas tipo cisteína de *H. contortus*. Además, el polimorfismo en proteinasas tipo cisteína no sólo ha sido demostrado en *H. contortus*, también ha sido descrito en otros parásitos como *Leishmania donovani*, donde la variabilidad genética se vio asociada a distintos comportamientos patogénicos (**Hide y Bañuls, 2008**), o *Trypanosoma cruzi*, donde permitió diferenciar entre dos cepas del parásito (**Rojas et al., 2007**). Incluso se ha observado variabilidad en proteinasas tipo cisteína de plantas (**Bah et al., 2006**) y en otras proteinasas como la calpaína y su modulador, la calpastatína (**Palmer et al., 2000; Nassiry et al., 2007**).

---

Numerosos estudios han demostrado la influencia humana en la ecología, distribución geográfica y la diversidad genética entre diferentes organismos, incluyendo plantas (*Sarracenia leucophylla* o *Aegiceras corniculatum*) (Wang *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2009), animales (*Enhydra lutris*) (Larson *et al.*, 2002) y parásitos protozoos como *Plasmodium falciparum* o *Neospora caninum*, trematodos y diversos nematodos (Blouin *et al.*, 1992, 1995; Read y Taylor, 2001; Wootton *et al.*, 2002; Alasaad *et al.*, 2008; Gentile y Oliveira, 2008; Al-Qassab *et al.*, 2009; Stear *et al.*, 2009). El comercio internacional entre Europa y Norteamérica podría haber provocado el flujo genético entre animales de abasto y por consiguiente en los parásitos que albergan. Sin embargo, al igual que describieron Ruiz *et al.* (2004b), en este estudio se han encontrado importantes diferencias en algunos *loci* entre cepas de España y USA. Las frecuencias alélicas basadas en los resultados de SSCP fueron significativamente distintas entre las dos poblaciones para cada uno de los *loci* estudiados (G test), con algunos alelos encontrados sólo en la cepa SP (*M-D<sub>7</sub>*, *M-E<sub>7</sub>*, *M-F<sub>7</sub>*, *M-G<sub>7</sub>*, *M-D<sub>1</sub>*, *M-E<sub>1</sub>*, *M-G<sub>1</sub>*, *M-F<sub>3</sub>*, *M-G<sub>3</sub>*, *M-H<sub>3</sub>*, *M-D<sub>4</sub>*, *M-E<sub>4</sub>* y *M-F<sub>4</sub>*) y otros sólo en la cepa NA (*M-B<sub>3</sub>* y *M-D<sub>3</sub>*). En concordancia, la estimación de la variabilidad nucleotídica entre cepas se tradujo en una distancia media entre grupos que varió entre 0,0240 (0,0060) (locus AC-4) y 0,0830 (0,0090) (locus GCP-7), y en general fue mucho mayor que la variabilidad encontrada dentro de una misma cepa. En este mismo sentido, tras analizar mediante pirosecuenciación vermes de *H. contortus* de ovinos de Kenia y ovinos y caprinos de Suecia, Troell *et al.* (2003) demostraron una mayor variabilidad genética entre vermes geográficamente separados que entre vermes de distintas especies hospedadoras de la misma región. Posteriormente, se realizaron estudios de variabilidad genética en distintas poblaciones de *H. contortus*, en total en 19 cepas distintas procedentes de 14 países de todos los continentes habitados. Mediante análisis AFLP de secuencias nad4 del genoma mitocondrial se encontró que la variabilidad era alta, así como la estructura genética, lo que indicaría un flujo limitado de los genes entre las diferentes cepas y poblaciones de cada continente, la mayoría formando grupos monofiléticos en el análisis filogenético. Mucha de la variación genética fue debida a diferencias individuales dentro de una población, mientras que una menor variación se atribuyó a diferencias entre poblaciones dentro de áreas de un mismo continente (Troell *et al.*, 2006a). Por otro lado, utilizando la técnica SSCP para analizar el polimorfismo del ADN mitocondrial dentro y entre diferentes especies de *Capillaria sensu lato*, Zhu *et al.* (2000) encontraron mayor variación entre las morfoespecies originarias de diferentes hospedadores que dentro de morfoespecies de un mismo hospedador. Por tanto, aunque la variabilidad intergeográfica puede ser consecuencia de un cierto aislamiento geográfico, la influencia de las especies hospedadoras (los caprinos sobre la cepa SP y los ovinos sobre la cepa NA) en la divergencia genética debería también tenerse en cuenta, tal como se discutirá posteriormente.

Como se recogió en el capítulo de **Revisión Bibliográfica** dedicado al **Polimorfismo Genético**, diferentes estudios indican que la variación genética en los nematodos es de vital importancia desde el punto de vista morfológico, biológico, terapéutico e inmunológico (Goyal y Wakelin, 1993). La variabilidad genética descrita en los genes codificadores de proteinasas tipo cisteína supondría un abanico muy amplio de posibilidades cuya implicación funcional no es posible deducirla de los resultados del presente estudio. Se ha documentado, no obstante, que este tipo de proteinasas parece desarrollar importantes funciones, como la digestión de nutrientes (Cox *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 1990; Rhoads y Fetterer, 1995; Fetterer y Rhoads, 1997), degradación de la matriz (Rhoads y Fetterer, 1996) o la evasión de la respuesta inmune (Chapman y Mitchell, 1982; Wilson *et al.*, 1998). La variabilidad genética podría por tanto condicionar la relación parásito-hospedador y en consecuencia traducirse en alteraciones en el comportamiento epidemiológico del parásito, como han descrito previamente Wakelin *et al.* (2002), o en cambios en la interacción inmunológica con el hospedador (Wilson *et al.*, 1998).

### 5.3. Variabilidad genética y factor hospedador

Comparando entre sí las cepas de *H. contortus* usadas en el presente estudio en los respectivos ensayos homólogos, es decir, inoculaciones con NA en ovino y con SP en caprino, se apreciaron claras diferencias en el periodo prepatente, recuentos fecales y carga parasitaria, tal y como se ha discutido previamente. Con el objeto de estudiar si estas diferencias se mantenían al inocular la cepa a hospedadores no habituales se realizaron infecciones cruzadas infectando ovinos con la cepa SP y caprinos con la cepa NA. De esta forma se trató de evaluar más en profundidad la influencia del tipo hospedador rumiante en la relación parásito-huésped.

En este sentido, bien debido a una mayor resistencia del hospedador o a la falta de adaptación del parásito (Yazwinski *et al.*, 1980), en los caprinos infectados con la cepa NA se observó un aumento de una semana en el periodo de prepatencia (4 semanas frente a las 3 semanas observadas en ovino). Además, si bien la eliminación de huevos siguió el mismo perfil que en los ovinos, no pudo apreciarse un marcado pico en la dinámica de eliminación de huevos fecales. Por otro lado, los recuentos medios y máximos de HPG en ganado caprino infectado con la cepa NA fueron significativamente menores a los del ganado ovino, llegando la media a 1.200 y el máximo valor registrado a 2.000 HPG. Todo ello, junto con la menor carga parasitaria registrada (próxima a los 3.000 vermes), podría indicar que la raza caprina de la Agrupación Caprina Canaria en su variedad mayorera sería más resistente a la infección por la cepa NA de *H. contortus*.

El mismo fenómeno se observó al inocular la cepa caprina SP a hospedadores ovinos. A pesar que en el ensayo de infección cruzada el ganado ovino infectado con la cepa SP presentó un periodo de prepatencia y un patrón de evolución del HPG similar al caprino, los ovinos mostraron menores recuentos de HPG y menor carga parasitaria, siendo la media de los recuentos fecales de huevos de unos 1.500 con máximos de 3.000 a la 7ª semana p.i., lo que en su conjunto indicaría una mayor resistencia de los ovinos a dicha cepa.

La relativa resistencia que acontece cuando se inocula una cepa del parásito en un hospedador no habitual se ha observado en infecciones experimentales con *H. contortus* realizadas en nuestra unidad con posterioridad a las del presente estudio (**datos no publicados**), coincidiendo con lo descrito por otros autores (**Rahman y Collins, 1991; Pralomkarn et al., 1997**). **Pralomkarn et al. (1997)** al evaluar el comportamiento de 2 razas caprinas (raza originaria de Tailandia y Anglo Nubia) y del cruce de ambas tras inoculaciones experimentales con una cepa ovina de *H. contortus*, determinaron que la raza caprina rústica, en este caso la originaria de Tailandia, era más resistente a la enfermedad. Por otro lado, **Aumont et al. (2003)** realizaron un ensayo de infecciones cruzadas empleando dos razas ovinas, Black Belly (BB) (originaria de las Islas Guadalupe) e INRA 401 (Francia), y dos cepas de *H. contortus*, una cepa de las Islas Guadalupe (Hc Gua) y otra de Francia (Europa) (Hc Fra). Ambas cepas se obtuvieron originariamente de caprinos de cada región para posteriormente ser sometidas a 3 pases de inoculación en ovino antes del comienzo del estudio. También en este caso la raza autóctona BB fue más resistente a la infección por Hc Fra, en comparación con su cepa original, que presentó mayores recuentos de HPG y una mayor carga parasitaria. Este fenómeno no se observó en la raza INRA 401, que se mostró igualmente susceptible a ambas cepas, probablemente debido al intenso proceso de selección que ha sufrido esta raza ovina. En relación con esto último, se observó cómo la raza BB fue también más resistente a la cepa Hc Gua que la raza INRA 401, lo que confirmaría la mayor resistencia de las razas rústicas a la infección por *H. contortus*. Algo similar podría haber ocurrido al inocular la raza caprina Canaria con la cepa NA del parásito.

Otros autores defienden incluso que los caprinos en general podrían ofrecer más resistencia a la parasitación por nematodos. Así, **Nwosu et al. (2007)**, en un estudio llevado a cabo en Nigeria, observaron mayores cargas en ovino que en caprino, al igual que **Fritsche et al. (1993)** en trabajos realizados en Gambia, en los que se analizaron nematodos gastrointestinales y cestodos en ambos hospedadores. Las distintas susceptibilidades entre ganado ovino y caprino han sido descritas también en otros trabajos (**Pomroy et al., 1985; Hoste y Chartier, 1998**).

Sin embargo, no se debe dejar de lado la relación parásito-hospedador desde el punto de vista del parásito, y valorar la posibilidad de que una determinada cepa de *H. contortus* esté más adaptada a unos hospedadores que a otros en los que su desarrollo será más desfavorable. En este sentido, **Achi et al. (2003)** realizaron un estudio sobre la especificidad de hospedador que tienen 3 especies de *Haemonchus* spp. en una región de Costa de Marfil donde pastaban todo el año 4 posibles hospedadores rumiantes: el cebú (*Bos indicus*), la vaca (*Bos taurus*), la cabra y la oveja. Aunque se encontraron infecciones mixtas en los cuatro hospedadores, las infecciones más frecuentemente encontradas fueron las monoespecíficas. Así, en ganado ovino predominó la infección monoespecífica por *H. contortus*, al igual que en la cabra. Por el contrario, en ganado bovino las infecciones se produjeron fundamentalmente por *H. placei* y *H. similis*, y en rara ocasión se encontró *H. contortus*, siendo *H. placei* la más frecuente. *H. similis* fue la especie predominante en cebúes, aunque también se encontró en esta especie hospedadora *H. placei* con una frecuencia moderada. Teniendo en cuenta que todos los hospedadores estaban expuestos en igual proporción a la infección por cualquiera de las 3 especies del parásito, fue obvia la preferencia de cada una de las cepas por una determinada especie hospedadora, poniendo de manifiesto la dificultad que tendrían para desarrollarse en un hospedador distinto. También en infecciones naturales, **Amarante et al. (1997)** observaron una mayor adaptación de *H. contortus* al ganado ovino que al ganado vacuno. En el mismo sentido, **Jacquet et al. (1998)** encontraron que la infección experimental por *H. contortus* no se desarrolló en cebúes y sólo escasamente en dromedarios, siendo el ganado ovino y el caprino el principal hospedador del parásito. No obstante, a nivel de cepa, las diferencias en la adaptación del parásito al hospedador parecen ser menos evidentes, especialmente si consideramos infecciones homólogas, es decir, con cepas aisladas e inoculadas en el mismo hospedador. Así, en un ensayo experimental llevado a cabo en ovino en Suecia, **Troell et al. (2006b)** no encontraron diferencias entre dos aislados ovinos de *H. contortus* de distinta localización geográfica (Suecia y Kenia), al menos en cuanto a eliminación de huevos en las heces y carga parasitaria de los ovinos infectados, si bien es cierto que la cepa ovina original de Kenia se mantuvo en laboratorio en Suecia durante varios años, tras varios pases en inoculaciones experimentales en ovino.

También en relación con la dificultad de desarrollo de una cepa en hospedadores no habituales, diversas inoculaciones experimentales con *H. contortus* en roedores han demostrado repetidamente la dificultad para completar el ciclo biológico y, por tanto, una adaptación más deficiente que en cualquier hospedador rumiante (**Wagland et al., 1989, Hutchinson y Slocombe, 1976, Mapes y Gallie 1977, Conder et al., 1992**).

---

El hecho de que un parásito modifique su comportamiento epidemiológico o patogénico al cambiar de especie hospedadora habitual, también ha sido demostrado en otros nematodos como por ejemplo *Toxocara* spp. o *Dirofilaria immitis*, nematodos parásitos de cánidos y félidos que al infectar a humanos no completan su ciclo vital normal y desarrollan migraciones en localizaciones erráticas, provocando una patología clínica distinta a la que estos mismos parásitos ocasionan en sus hospedadores habituales. Este mismo fenómeno se ha observado también en el protozoo parásito *Tritrichomonas foetus*, agente etiológico de la trichomonosis genital bovina, cuya parasitación en gatos jóvenes se ha asociado con la aparición de diarreas crónicas (Stockdale *et al.*, 2009).

Las diferencias en el comportamiento biológico y epidemiológico de un determinado parásito serían por tanto el resultado de la interacción entre los componentes del binomio parásito-hospedador, bien por la mayor resistencia intrínseca del hospedador o bien por la inadaptación de la cepa a determinados hospedadores. Por cualquiera de las dos vías, los hospedadores rumiantes, ovinos o caprinos, podrían condicionar selectivamente la viabilidad de *H. contortus*. Esta posibilidad fue evaluada mediante análisis de polimorfismo genético en los cuatro genes codificadores de proteinasas tipo cisteína ya referidos anteriormente, comparando las frecuencias alélicas de vermes adultos del parásito procedentes de inoculaciones homólogas (ovino infectados con la cepa NA y caprinos con la cepa SP) y heterólogas (infecciones cruzadas entre cepas y hospedadores).

El factor hospedador parece influir de manera significativa en las frecuencias alélicas encontradas en este estudio para el gen AC-3. Así, en animales donde se ha simulado una infección natural con la cepa NA, es decir, no inmunizados e infectados con esta cepa ( $\emptyset$ /NA), se observó que las frecuencias de los alelos *M-A<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>* en ganado ovino estaban disminuidas con respecto a los caprinos ( $\emptyset$ /NA), al contrario de lo que ocurría con los alelos *M-C<sub>3</sub>* y *M-D<sub>3</sub>*. Esta característica se invirtió cuando se cambió de cepa ( $\emptyset$ /SP), observándose en este caso mayor frecuencia de los alelos *M-A<sub>3</sub>* y *M-E<sub>3</sub>* y menor frecuencia del alelo *M-C<sub>3</sub>* en el ganado ovino, a la inversa de lo que sucedía en los caprinos ( $\emptyset$ /SP). Por otro lado, en el gen AC-4 se observó que el ovino siempre presentaba mayor frecuencia del alelo *M-A<sub>4</sub>* independientemente de la cepa inoculada. Finalmente, los ovinos infectados con la cepa NA tuvieron un mayor porcentaje de alelos *M-C<sub>7</sub>* y menor porcentaje de alelo *M-D<sub>7</sub>* que cuando las inoculaciones se realizaron en el ganado caprino. Todas estas variaciones de frecuencias están principalmente referidas a alelos con importancia inmunoprotectora, tal y como se discutirá más adelante.

Aunque los cambios en las frecuencias alélicas no fueron tan manifiestos como los observados al comparar de forma intrínseca ambas cepas entre sí en los ensayos de inoculación homóloga, los resultados anteriores ponen de manifiesto que el hospedador podría influir efectivamente sobre el parásito, y esta influencia podría conducir a una selección génica. Estos cambios son por otro lado importantes, en tanto que las variaciones en las frecuencias alélicas se produjeron tras realizar un solo pase de la cepa por un hospedador no habitual. Probablemente dichas variaciones se verían acentuadas a medida que fueran realizándose sucesivos pases, de forma paralela a la adaptación de la cepa al nuevo hospedador.

#### **5.4. Niveles de inmunoprotección conferidos por las TBSP-PBS frente a la haemonchosis**

Al igual que en trabajos previos, el parámetro empleado para determinar si se produjo una respuesta a la inmunización por parte del hospedador fue el nivel sérico de IgG específicas. El aumento de este parámetro ha sido constatado previamente en rumiantes inmunizados frente a *H. contortus* mediante el empleo de diversos antígenos, como extractos de detergente procedentes de vermes adultos enriquecidos para proteínas tipo cisteína de membrana (TBSP) (Redmond y Knox, 2004; Knox *et al.*, 2005) o formas recombinantes de dicho antígeno (Redmond y Knox, 2006). Tal incremento también fue observado por Ruiz *et al.* (2004a) al utilizar como antígeno fracciones solubles en PBS y enriquecidas para proteínas tipo cisteína mediante columnas de Thiol-Sepharosa (PBS-TBSP). La respuesta sérica de IgG, aún siendo muy inferior a la que genera este tipo de inmunizaciones, también se produce de forma natural en parasitaciones por nematodos gastrointestinales tal y como se ha descrito previamente en numerosos trabajos, como los realizados por Schallig *et al.* (1995a) en ovinos infectados con *H. contortus*, y otros (Mansour *et al.*, 1990; Cuquerella *et al.*, 1991; Nansen *et al.*, 1993; Bambou *et al.*, 2008). Esta circunstancia ha sido empleada por diversos autores en encuestas sero-epidemiológicas con el fin de determinar la prevalencia de determinados helmintos (Kloosterman *et al.*, 1985; Frankena, 1987; Ploeger *et al.*, 1990; Balic *et al.*, 2000).

En concordancia con estos autores, en el presente trabajo se detectó un incremento significativo en los niveles de IgG en todos los animales inmunizados con respecto a los no inmunizados. La producción de IgG en los animales que no recibieron inmunización pero que fueron infectados con L3 del parásito (Ø/SP, Ø/NA) fue poco representativa, pero aun así mayor que la que presentaron los grupos experimentales que no estuvieron en contacto con el parásito (Ø/Ø), corroborando el incremento sérico de los niveles de IgG específicas frente a estos antígenos que tiene lugar en las infecciones naturales por nematodos gastrointestinales descrito

---

previamente (Mansour *et al.*, 1990; Nansen *et al.*, 1993; Bambou *et al.*, 2008). El perfil sérico de IgG anti- proteínas tipo cisteína en los animales inmunizados, tanto caprinos como ovinos, fue muy similar al observado en trabajos anteriores (Ruiz *et al.*, 2004a), y también como estos autores, se observó una relación entre los niveles de IgG y la inmunoprotección conferida. La correlación entre los niveles de IgG específicos frente a proteínas tipo cisteína y la resistencia frente a otras parasitosis también ha sido demostrada. Así, Authié *et al.* (1993) estudiaron la respuesta de IgG frente a una proteína tipo cisteína (congopaína) de 33 kDa de *Trypanosoma congolense* y su relación con la tripanotolerancia de vacunos frente a la enfermedad, observando un claro aumento de los niveles séricos de IgG específica para estas proteínas en animales resistentes. Con posterioridad, la congopaína se propondría como posible candidato antigénico en ensayos de inmunoprotección (Lalmanach *et al.*, 2002). La implicación de la IgG en la inmunoprotección frente a helmintos parásitos también fue abordada por Britton *et al.* (1992), en un ensayo de inmunización en ganado bovino con proteínas obtenidas a partir de homogenizados en PBS de vermes adultos de *Dictyocaulus viviparus*. En tal estudio demostraron la capacidad de la IgG sérica de inhibir *in vitro* la actividad proteínica del antígeno, tanto en animales inmunizados como en infectados de manera natural. La caracterización de dicho antígeno demostró la existencia de actividad serina, metalo y cisteína proteínica. A la implicación del sistema inmune humoral en el control inmunológico de la haemonchosis, habría que sumarle también la intervención de la respuesta inmune celular, tanto a nivel sistémico como local (Schallig, 2000; Amarante *et al.*, 2005; Miller y Horohov, 2006; Shakya *et al.*, 2009). Todas ellas son posibilidades que podrían explicar la relación entre la inmunoprotección observada en el presente estudio y la correspondiente respuesta inmune, pero el mecanismo intrínseco de inmunoprotección desarrollada por el antígeno utilizado (PBS-TBSP) no puede deducirse a partir de los análisis efectuados hasta el momento.

Tal y como se ha explicado en capítulos previos, para valorar la eficacia de la respuesta inmunoprotectora se estimaron los mismos parámetros considerados por otros autores que realizaron ensayos similares, entre ellos la reducción de los recuentos fecales y de la carga parasitaria (Schallig y van Leeuwen, 1997; Jacobs *et al.*, 1999; Knox *et al.*, 1999; Newton y Munn, 1999; Vervelde *et al.*, 2002; Domínguez-Toraño *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2004; Redmond y Knox, 2004; Ruiz *et al.*, 2004a; Redmond y Knox, 2006; Reszka *et al.*, 2007; Smith, 2007).

#### 5.4.1. *Inmunizaciones homólogas*

Según se describió en el capítulo de **Resultados**, los ovinos inmunizados con antígeno extraído de la cepa NA desarrollaron una respuesta protectora frente a dicha cepa, asociándose tal protección con una reducción significativa de los recuentos de HPG y del número de vermes adultos en abomaso. El descenso de los recuentos fecales se tradujo en diferencias estadísticamente significativas entre animales inmunizados (NA/NA) y no inmunizados (Ø/NA) a partir de la 1ª semana después de haberse completado el periodo de prepatencia. Esta tendencia se mantuvo hasta el final de la experiencia y resultó en una reducción del HPG de aproximadamente el 84%. En relación con estos niveles de eliminación de huevos, los ovinos inmunizados con la cepa NA (NA/NA) presentaron una reducción del 92% de la carga parasitaria en comparación con los ovinos no inmunizados. Se podría concluir, por tanto, que la inmunización con fracciones solubles en PBS y enriquecidas para proteínas tipo cisteína mediante columnas de Thiol-Sepharosa (PBS-TBSP) a partir de vermes adultos de *H. contortus* de la cepa NA es capaz de conferir una inmunoprotección eficaz en ganado ovino posteriormente infectado con la misma cepa.

Con un grado de protección variable según el protocolo de inmunización y tipo de antígeno utilizado, hasta el momento se ha realizado un importante número de ensayos de inmunización en ganado ovino frente a *H. contortus*. Los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo se podrían incluir entre los estudios que han empleado como inmunógeno antígenos solubles o productos de E/S. Dos de los antígenos de E/S ensayados previamente, denominados *ES15* y *ES24*, presentes tanto en L4 como en vermes adultos (Schallig y van Leeuwen, 1997; Vervelde *et al.*, 2002), fueron capaces de disminuir los recuentos fecales entre el 32-77%, y la media de vermes en abomaso entre el 64-85%, reducciones sensiblemente menores que las halladas en el presente trabajo. Otros autores emplearon con éxito proteínas de E/S con afinidad por grupos thiol para inmunizar al ganado ovino. Este antígeno se purificó siguiendo un protocolo similar al utilizado en nuestro estudio -a partir de eluciones de una columna de Thiol Sepharose, mediante el uso de cisteína, seguida de DL-dithiothreitol (DTT). Los resultados obtenidos también fueron menos efectivos que los encontrados en este trabajo, ya que los animales inmunizados (ovinos de aproximadamente 9 meses de edad) apenas lograron sobrepasar el 50% de reducción tanto del nivel de HPG como de la carga parasitaria en el abomaso (Bakker *et al.*, 2004). Tampoco las inmunizaciones en ganado ovino con otros antígenos naturales como el *Hc-sL3* mostraron mayor grado de inmunoprotección que el encontrado en el presente estudio (Jacobs *et al.*, 1999).

La protección que se registró en este trabajo en ganado ovino utilizando fracciones solubles en PBS y enriquecidas para proteinasas tipo cisteína fue equiparable a la descrita por otros autores que han llevado a cabo inmunizaciones usando antígenos ocultos. La inmunoprotección fue incluso mayor que la descrita por autores que emplearon como inmunógeno el antígeno oculto mejor caracterizado de *H. contortus*, una glicoproteína de la membrana del intestino de vermes adultos denominada H11 (Smith *et al.*, 1993b). Se ha observado que dicho antígeno provoca niveles muy altos de anticuerpos con protección inmunomediada y, de promedio, la reducción de huevos puede llegar a ser del 90% y más del 75% la carga de vermes en abomaso (Andrews *et al.*, 1995; Newton y Munn, 1999; Smith, 1999; Reszka *et al.*, 2007). Pese a los esfuerzos realizados al respecto, hasta el momento no se ha logrado inducir una respuesta inmune y provocar un descenso en la carga parasitaria con la forma recombinante del antígeno H11 (Reszka *et al.*, 2007).

Otros antígenos ocultos no han presentado mejores niveles de protección en ganado ovino, como el denominado H-gal-GP procedente de la membrana del intestino de *H. contortus*, que fue capaz de inducir reducciones en torno al 89% en los recuentos de huevos en heces, y del 60% en las cargas parasitarias (Smith y Smith, 1996; Newton y Munn, 1999; Smith, 2007). Tampoco se consiguieron unos niveles de inmunoprotección tan elevados como los del presente estudio en ovinos inmunizados con la cepa NA en trabajos donde se utilizaron otros antígenos ocultos como la *contortina* (Munn *et al.*, 1987). En esta misma línea de discusión se encuentran los trabajos de Smith *et al.* (1993a, 1993b), que detectaron un grupo de tres proteínas (*p45*, *p49* y *p53*) conocidas como complejo P1 capaces de reducir en ovino el HPG en un 69% y entre el 38 y 20% los recuentos de hembras y machos de *H. contortus*, respectivamente, así como los resultados obtenidos por Domínguez-Toraño *et al.* (2000, 2003) a partir de fracciones somáticas purificadas denominadas p26/23.

Cuando se empleó como antígeno extractos de detergente procedentes de vermes adultos enriquecidos para proteinasas tipo cisteína de membrana de intestino (TBSP), las reducciones medias del HPG y de la carga parasitaria fueron del 77% y 47%, respectivamente (Knox *et al.*, 1995a; 1999; Knox y Smith, 2001). Los porcentajes de reducción de huevos y vermes son comparables a los obtenidos por Knox *et al.* (1999) cuando se utilizaron proteinasas tipo cisteína purificadas a partir de proteínas asociadas a membrana solubles en Triton X-100 (S3), método que ha sido utilizado con el mismo éxito en otros estudios en los que se empleó el mismo tipo de antígeno (Redmond y Knox, 2004; Knox *et al.*, 2005). Por el contrario, Knox *et al.* (1999), usando la misma metodología, obtuvieron una menor reducción de los recuentos

fecales cuando emplearon una combinación de extractos de proteínas asociadas a membranas solubles en Tween 20 (S2) y solubles en PBS (S1). La disparidad de estos resultados en relación a los del presente estudio, donde se empleó como inmunógeno fracciones solubles en PBS (S1) enriquecidas para proteinasas tipo cisteína, puede deberse a la peculiaridad de cada ensayo. En realidad, aunque la cantidad de antígeno fue aproximadamente la misma en ambos estudios, el número de inmunizaciones, la dosis de antígeno utilizado en cada inmunización y el periodo entre inmunizaciones fueron diferentes. Además, en los ensayos con S1/S2 de **Knox et al. (1999)** se empleó adyuvante de Freund completo en las tres inmunizaciones, mientras que en este estudio se empleó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización e incompleto en las cuatro restantes, tal como se ha especificado en el apartado de **Material y Métodos**. Por otro lado, las proteinasas usadas en los ensayos de inmunoprotección con S1/S2 de **Knox et al. (1999)** tenían un peso molecular entre 50 y 55 kDa, mientras que las empleadas en este trabajo, idénticas a las descritas por **Ruíz et al. (2004a)**, eran fracciones de 35 kDa enriquecidas para proteinasas tipo cisteína, de similar peso molecular a las identificadas por **Cox et al. (1991)** en un complejo con capacidad de degradar el fibrinógeno.

Los diferentes ensayos de inmunización homóloga realizados en este estudio (utilizando extractos obtenidos a partir de la cepa de origen caprino SP), demostraron que el ganado caprino también resultaba protegido frente a la inoculación experimental con L3 de *H. contortus* de dicha cepa. La reducción de recuento fecal fue alrededor del 78% en comparación con el grupo de caprinos no inmunizados (Ø/SP), y se asoció a una disminución también significativa de la carga parasitaria, que estuvo en torno al 66%. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que emplearon el mismo método de obtención del antígeno y el mismo protocolo de inmunización también en ganado caprino (**Ruiz et al., 2004a**) y equiparables a los niveles de inmunoprotección obtenidos en la misma especie hospedadora cuando se emplearon diferentes proteínas intestinales (**Jasmer y McGuire, 1991**). Por otro lado, la inmunización con el complejo proteico GA1 (en el que se incluyen los antígenos denominados *p46* y *p52*) también fue capaz de proteger a cabras frente al parásito, pero sin conseguir los niveles de protección observados en este trabajo. La reducción de la carga de vermes adultos fue de un 60%, mientras que la reducción en el recuento de huevos en heces no superó el 50% (**Jasmer et al., 1993; Jasmer et al., 1996**). Recientemente, otros autores han llevado a cabo ensayos de inmunización en ganado caprino de 9 a 10 meses de edad frente a *H. contortus* empleando como antígeno galectinas recombinantes (*rHco-gal-m* y *rHco-gal-f*), con porcentajes de reducción del número de HPG en heces y de la carga parasitaria en torno al 40-50% (**Yanming et al., 2007**).

### 5.4.2. Inmunizaciones heterólogas o cruzadas

Los intentos de inmunoprotección cruzada han sido uno de los objetivos en ensayos de inmunización frente a diferentes helmintos, incluyendo *H. contortus*. En dichos trabajos se ha evaluado la eficacia de un mismo antígeno frente a diferentes hospedadores, así como la posibilidad de que la inmunización natural con una determinada cepa del parásito sea capaz de proteger frente a otras cepas, otras especies o, incluso, frente a otros parásitos con cierta proximidad filogenética.

Este objetivo fue abordado en el presente trabajo al valorar, en lo que se han venido a denominar “ensayos de inmunización heteróloga o cruzada” (grupos SP/NA ovinos y NA/SP caprinos), la capacidad inmunoprotectora de antígenos procedentes de distintas cepas del parásito *H. contortus* tras la posterior infección con una cepa diferente a la utilizada en las inmunizaciones. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente existe protección cruzada en ganado ovino frente a la cepa NA cuando se inmunizó con antígeno procedente de la cepa SP (SP/NA). Los recuentos fecales de huevos fueron similares a los del ensayo homólogo (NA/NA) y significativamente menores que los del grupo control (Ø/NA), y se asociaron a una importante disminución del número de vermes adultos en abomaso (83%), aunque en esta ocasión las diferencias con respecto a los controles Ø/NA no llegaron a ser significativas, probablemente debido a la elevada varianza que se asocia a este tipo de ensayos. Se podría concluir por tanto que la inmunización con fracciones solubles en PBS y enriquecidas para proteinasas tipo cisteína de vermes adultos de *H. contortus* (cepa SP) es capaz de conferir una inmunoprotección en el ganado ovino infectado con la cepa NA, con una eficacia similar a la observada en la inmunización homóloga, es decir, cuando se utilizan antígenos procedentes de esta misma cepa. En el ganado caprino también se observó que la inmunización cruzada con antígenos procedentes de la cepa NA estuvo asociada con una eficaz protección frente a infecciones con la cepa SP (NA/SP), lográndose una reducción significativa del HPG similar a la del ensayo homólogo (SP/SP). Sin embargo, como ocurrió en el ensayo de inmunización cruzada en ovino (SP/NA), la disminución de la carga parasitaria, aunque considerable (56%), no llegó a ser estadísticamente significativa. Por consiguiente, con independencia de la utilización de antígeno homólogo (SP) o heterólogo (NA) en las inmunizaciones, también el ganado caprino mostró protección frente a la cepa de referencia SP de *H. contortus*. No obstante, en ambos hospedadores (ovinos y caprinos), la inmunización homóloga siempre resultó ser más eficaz, en tanto que, además de la reducción significativa del HPG, hubo una menor carga parasitaria en aquellos animales inmunizados e infectados con la cepa homóloga de referencia (grupos NA/NA ovino y SP/SP caprino).

La mayor protección que confieren los ensayos de inmunización homóloga, es decir, aquellos en los que se utilizan antígenos procedentes de la misma cepa que posteriormente se inocula también se ha descrito en otros trabajos en diferentes grupos de helmintos. **Goyal y Wakelin (1993)** realizaron ensayos de inmunización cruzada con tres cepas de *Trichinella spiralis* de localizaciones geográficas distintas (Londres, Polonia y España) y demostraron una protección más eficaz en los ensayos homólogos que en los heterólogos. Por su parte, **Hackett et al. (1987)** demostraron igualmente la mayor eficacia de la inmunización homóloga en trematodos tras evaluar la capacidad inmunoprotectora de antígenos de superficie de dos aislados geográficos de *Schistosoma mansoni* (Puerto Rico y Egipto), tanto en humanos como en ratones. Por otro lado, **Martin et al. (1997)**, realizando inmunizaciones naturales con dos cepas de laboratorio y tres aislados geográficos distintos de *Eimeria maxima*, observaron niveles de protección variables entre las inmunizaciones homólogas y las heterólogas. Aunque dos cepas de laboratorio y una cepa aislada en Carolina del Norte fueron capaces de proteger frente a todas las cepas empleadas en el estudio, otras dos cepas aisladas de Maryland y Florida sólo fueron eficaces en los ensayos de inmunización homólogos.

Dada la reactividad cruzada existente entre los diversos nematodos, los ensayos de inmunoprotección cruzada se han realizado no sólo entre diversas cepas de una misma especie de parásito, sino incluso entre diferentes géneros. En este sentido, ciertos autores encontraron también mayor efectividad en los ensayos homólogos cuando se realizaron inmunizaciones cruzadas frente a diversos nematodos gastrointestinales utilizando glicoproteínas de membrana de *H. contortus* y *Teladorsagia circumcincta* (*T. circumcincta*) como inmunógeno. La inmunización de ovinos con el antígeno aislado de *H. contortus* tuvo efecto sólo en el ensayo homólogo, pero no frente a *T. circumcincta*, *Trichostrongylus axei* o *Cooperia oncophora*. Por el contrario, la inmunización de ovinos con antígeno de *T. circumcincta* no tuvo efecto en el ensayo homólogo, ni frente a *Trichostrongylus* o *Cooperia*, pero sí frente a *H. contortus* (**Smith et al., 2001**), una circunstancia que fue explicada por la capacidad hematófaga que únicamente *H. contortus* presenta y que le habilitaría para ingerir una mayor cantidad de inmunoglobulinas del hospedador, responsables de dicha inmunoprotección (**Smith et al., 2001**).

En contraste con lo anteriormente expuesto, **Bolas-Fernández y Wakelin (1992)** encontraron la misma efectividad tanto en inmunizaciones homólogas como en heterólogas tras realizar ensayos de inmunización con preparaciones antigénicas parcialmente purificadas de seis cepas de *Trichinella spiralis*. La efectividad de la inmunización cruzada frente a diferentes cepas de un mismo parásito también se ha

demostrado en protozoos, entre ellos *Theileria* sp. (Morrison, 1996) y *Babesia* sp. (Montenegro-James, 1989).

También entre diferentes géneros se ha descrito la eficacia de la inmunización cruzada. En este sentido, Stankiewicz *et al.* (2000) observaron una disminución de la carga parasitaria de *T. circumcincta* en ovinos sometidos a varias infecciones de *H. contortus* controladas con antihelmínticos. Por otro lado, ovejas inmunizadas de manera artificial con infecciones truncadas de *T. colubriformis* mostraron una ligera protección cruzada frente a *Nematodirus spathiger* (Harrison *et al.*, 2002). Se ha observado incluso protección cruzada en ensayos en los que se han empleado antígenos procedentes de géneros parásitos de distinto hospedador. De esta forma, se ha comprobado que ovinos inmunizados con glicoproteínas de membrana de *Ostertagia ostertagi* resultan eficazmente protegidos frente a *H. contortus*, con una reducción de HPG entre un 81% y 97% y del recuento de vermes adultos entre el 57% y 84% (Smith *et al.*, 2000a). Por último, la inmunización cruzada se ha demostrado también efectiva frente a especies de nematodos con localización diferente a la gastrointestinal, tal y como publicaron Achukwi *et al.* (2007) tras observar que la inmunización de bovinos con larvas de *Onchocerca volvulus* lograba reducir en un 83-87% el número de vermes adultos en animales posteriormente infectados con *Onchocerca ochengi*.

Existen igualmente numerosas evidencias sobre la eficacia de inmunizaciones cruzadas entre distintos géneros de diferentes clases de parásitos, entre ellos trematodos, cestodos y protozoos. Así, la proteína de unión de ácidos grasos (FABP) de *Fasciola hepatica* ha mostrado reacción y protección cruzada frente a otros trematodos como *Schistosoma mansoni* (Hillyer, 2005). Del mismo modo, mediante el empleo de antígenos procedentes de *Taenia ovis* se han obtenido niveles de protección considerables frente a otras especies de tenias (Lightowlers, 1989), al igual que la enzima esterol 24-c-methyltransferase (SMT) obtenida a partir *Leishmania infantum* se ha demostrado capaz de generar una protección cruzada y eficaz frente a diferentes formas de leishmaniasis (Goto *et al.*, 2009). Por último, también en vacunas comerciales frente a *Boophilus* spp., usando el antígeno recombinante Bm86 procedente del intestino de *Boophilus microplus* (*B. microplus*), se ha observado protección cruzada efectiva frente a *B. annulatus*, *B. decoloratus* e incluso frente a cepas resistentes a agentes químicos de *B. microplus* (De la Fuente *et al.*, 1999).

La eficacia de la protección cruzada ha sido descrita no sólo a nivel de cepa, especie o género, sino incluso a nivel de clase. En este sentido, se ha demostrado que la inmunización de conejos con un complejo antigénico compuesto con 6

polipéptidos del nematodo *Trichinella spiralis* es capaz de inducir una inmunoprotección eficaz frente al desafío con el trematodo *Fasciola gigantica* (Abdel Rahman y Abdel Megeed, 2005). Del mismo modo, diversos autores han descrito la capacidad inmunoprotectora de ciertos epítomos antigénicos imitadores de péptidos cortos de *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente por el trematodo *Schistosoma japonicum* (Zhou *et al.*, 2001). Por último, una fracción de 5 polipéptidos del nematodo *Toxocara vitulorum* se ha identificado como antígeno con capacidad para generar inmunoprotección cruzada frente a *F. gigantica*, estando asociada dicha inmunoprotección a un incremento de los niveles séricos específicos de IgG y a una reducción del 60% de la carga parasitaria (Abdel Megeed y Abdel Rahman, 2004).

En otro orden se encuentran los estudios de inmunoprotección cruzada donde un mismo antígeno se utiliza para inmunizar distintos hospedadores. En esta línea de investigación se encuentran los ensayos de inmunoprotección frente a coccidios en varias líneas de pollos usando antígenos extraídos de *Eimeria maxima*, en los que se ha demostrado que la protección en los ensayos homólogos fue 100% eficaz mientras que en los ensayos heterólogos la eficacia varió en un amplio rango (de 0 a 100%) dependiendo de las características genéticas del hospedador (Smith *et al.*, 2002). En concordancia con esta observación, la utilización de inmunógenos purificados a partir de una cepa de *H. contortus* de origen ovino (los anteriormente descritos antígenos *p46* y *p52*) indujo niveles de inmunoprotección diferentes según el hospedador (ovinos o caprinos) (Jasmer *et al.*, 1993; Jasmer *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000b).

De todo lo anterior se puede concluir que, del mismo modo que se observaron claras diferencias entre las inoculaciones homólogas y heterólogas de *H. contortus*, mediadas probablemente por la influencia tanto del tipo de cepa utilizada (NA o SP) como por el tipo de hospedador (ovino o caprino), también fueron diferentes los resultados de inmunoprotección. Se abordará a continuación la medida en que la inmunoprotección modificó la variabilidad genética en los diferentes ensayos y su relación con el tipo de cepa y tipo de hospedador empleados.

### 5.5. Inmunoprotección y variabilidad genética

Probablemente, el objetivo de mayor relevancia del presente estudio ha sido la valoración del efecto inmunoprotector de las proteinasas tipo cisteína (PBS-TBSP) en pequeños rumiantes y su relación con la variabilidad genética de algunos de los genes codificadores de dichas enzimas.

Desde el punto de vista práctico, el objetivo de investigar los mecanismos intrínsecos que correlacionan variabilidad genética e inmunoprotección no es otro que definir los alelos con mayor potencial inmunoprotector, en este caso alelos de genes codificadores de proteinasas tipo cisteína, para valorar su posterior aplicación al control inmunológico de las nematodosis. Al mismo tiempo, los ensayos llevados a cabo podrían aportarnos información sobre el efecto selectivo que produce sobre el parásito la inmunización con este tipo de antígenos. Para cualquiera de los cuatro genes analizados en el presente estudio, los alelos cuyas frecuencias resultaron disminuidas en animales inmunoprotegidos se consideraron alelos codificadores de posibles inmunógenos diana, esto es, proteinasas tipo cisteína susceptibles de ser reconocidas por el sistema inmune del hospedador, tras cuya destrucción o inactivación la viabilidad del verme adulto se compromete. Para referirse a ellos se ha convenido denominarlos “alelos inmunoprotectores”. Similares evidencias de variabilidad genética vinculada o asociada a la inmunización han sido descritas por otros autores en diversos organismos. Así, **Hoffmann et al. (2008)**, en ensayos de inmunización en personas infectadas con el virus VIH con la proteína viral Nef observaron importantes cambios en la secuencia genética en el gen codificador de dicha proteína. Así mismo, en ensayos de inmunización con la proteína Tat en monos infectados con el virus VIH del simio, se demostró que los animales inmunizados presentaban una respuesta antiviral amplia a pesar de no resultar totalmente protegidos y que tal respuesta se asociaba a una disminución de la capacidad del virus para desarrollar mutaciones (**Ridolfi et al., 2008**). También se ha demostrado la existencia de variabilidad genética en diferentes estudios de inmunización frente a *Plasmodium falciparum*. En inmunizaciones que incluyen el alelo 3D7 de la proteína 2 de superficie del merozoíto (MSP2) como una de las 3 subunidades de la vacuna Combination B, **Flück et al. (2007)** observaron que los parásitos de los animales inmunizados presentaban un menor porcentaje del alelo 3D7 inclinándose la selección a favor del alelo tipo FC-27. También frente a *Plasmodium falciparum*, **Takala et al. (2007)** realizaron un estudio de cohorte prospectivo en Mali (África) entre los años 1999 y 2001 tratando de correlacionar polimorfismo genético e inmunoprotección. En el estudio demostraron que el gen codificador de la proteína 1 de superficie del merozoíto MSP-1 (19) utilizada en las inmunizaciones varió genéticamente tras el proceso de inmunización, lo cual resultó en la aparición de 14 haplotipos.

En concordancia con lo anteriormente expuesto, la evaluación de los resultados de polimorfismo genético realizados en el presente estudio en los diferentes ensayos de inmunoprotección reveló que en todos los genes analizados se observaron diferencias alélicas estadísticamente significativas entre los vermes procedentes de ovinos inmunizados frente a la cepa NA (NA/NA y SP/NA) y el

---

grupo de ovinos no inmunizados ( $\emptyset$ /NA). En tres de los cuatro genes, las diferencias alélicas fueron más destacadas en el ensayo homólogo (NA/NA).

En el gen GCP-7, fue el  $M-C_7$  el que se presentó en menor proporción en los ovinos inmunizados (NA/NA y SP/NA), de la misma manera que lo fueron los alelos  $M-C_3$ ,  $M-D_3$  y  $M-E_3$  en el gen AC-3, especialmente el alelo  $M-E_3$ , y el alelo  $M-A_4$  en el gen AC-4. La disminución de la frecuencia de estos alelos tras la inmunización, que se han considerado como los principales alelos inmunoprotectores para dichos genes ( $M-C_7$ ,  $M-E_3$  y  $M-C_1$ ), se observó de forma más pronunciada en el grupo inmunizado homólogo. Contrastando con esta tendencia, el principal alelo inmunoprotector en el gen AC-1 (alelo  $M-A_1$ ) presentó una disminución mayor de la frecuencia alélica en los animales inmunizados con la cepa SP (SP/NA).

También en el ganado caprino inmunizado y posteriormente infectado con la cepa SP, todos los genes analizados mostraron diferencias alélicas estadísticamente significativas entre los caprinos inmunizados (SP/SP y NA/SP) y el grupo de caprinos control ( $\emptyset$ /SP). Coincidiendo con lo descrito en el ovino inmunizado e infectado experimentalmente con la cepa NA, en los mismos tres genes (GCP-7, AC-3 y AC-4) las diferencias alélicas fueron más destacadas en el ensayo homólogo (SP/SP). Los caprinos inmunizados experimentaron una reducción significativa del alelo  $M-D_7$  en el gen GCP-7, de los alelos  $M-C_3$  y  $M-H_3$  en el gen AC-3 y del alelo  $M-A_4$ , de los cuales, los alelos  $M-D_7$ ,  $M-H_3$  y  $M-A_4$ , considerados como los principales alelos inmunoprotectores para estos genes, presentaron menores frecuencias alélicas en los ensayos homólogos (SP/SP). De nuevo, los alelos del gen AC-1 que fueron considerados como inmunoprotectores y que, por tanto, presentaron frecuencias alélicas reducidas (alelos  $M-F_1$  y  $M-E_1$ ) tampoco estuvieron más disminuidos en los ensayos homólogos.

Además de los alelos considerados anteriormente como posibles codificadores de proteinasas con poder inmunógeno (alelos inmunoprotectores), se encontraron alelos cuya frecuencia también se vio considerablemente reducida en determinados grupos en los que se generó una protección eficaz, pero cuya baja frecuencia *per se* en la cepa hizo que su contribución al proceso general de inmunoprotección fuese probablemente escasa. En el gen GCP-7, uno de los alelos inmunoprotectores minoritarios que posiblemente estuvo involucrado en la inmunoprotección de los caprinos frente a la cepa SP fue el alelo  $M-F_7$ . Así mismo, las diferencias alélicas entre los caprinos inmunizados (SP/SP y NA/SP) y el grupo control ( $\emptyset$ /SP) en el gen AC-4 pudieran no ser debidas exclusivamente al alelo inmunoprotector mayoritario  $M-A_4$  sino también a otros de menores frecuencias como los alelos  $M-E_4$  y  $M-F_4$ . Estos alelos, que se ha convenido en denominarlos “alelos inmunoprotectores

---

## 5. Discusión

---

minoritarios” para diferenciarlos de los anteriores, estuvieron presentes sólo en la cepa SP, que fue en la que se encontró mayor variedad de alelos y por tanto alelos con más baja frecuencia.

La relación que en general se ha encontrado entre el grado de inmunoprotección y la variación de las frecuencias génicas sostendría la hipótesis de partida según la cual la población de vermes adultos con los denominados alelos inmunoprotectores se vio mermada en la misma medida que aumentó la eficacia de la inmunización. En este sentido, tal y como se ha demostrado tanto en ovino como en caprino para la mayoría de los genes estudiados, las reducciones más significativas de los alelos inmunoprotectores se produjeron en los ensayos homólogos (grupos NA/NA ovino y SP/SP caprino), donde precisamente se observaron mayores índices de protección, es decir, mayor descenso del HPG y de la carga parasitaria. En concordancia con esta teoría no se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de ninguno de los genes analizados en aquellos grupos experimentales que no resultaron eficazmente protegidos tras el protocolo de inmunización (grupos SP/SP y NA/SP ovinos y grupos NA/NA y SP/NA caprinos). Se entendería pues que al no haber inmunoprotección no hubo una selección que disminuyese la frecuencia de los machos con alelos inmunoprotectores.

La ausencia de protección en los grupos inmunizados con proteínas tipo cisteína de cualquiera de las dos cepas, y posteriormente infectados con la cepa heteróloga (grupos SP/SP y NA/SP ovinos y grupos NA/NA y SP/NA caprinos) no ha sido discutida hasta el momento. La primera hipótesis que cabría plantearse al explicar la falta de protección en estos grupos sería la incapacidad del inmunógeno para generar respuestas inmunoprotectoras, algo poco probable ya que tanto las proteínas purificadas de la cepa NA como las de la cepa SP fueron capaces de generar una protección eficaz en determinados ensayos realizados en ovino (NA/NA y SP/NA) y en caprino (SP/SP y NA/SP). De nuevo, la ausencia de protección se consideró más relacionada con la cepa y hospedador utilizados en las inoculaciones que con el inmunógeno en sí.

Se discutió anteriormente que la inoculación heteróloga, esto es, la infección con la cepa SP en ovino ( $\emptyset$ /SP) y con NA en caprino ( $\emptyset$ /NA), resultaba en un pobre desarrollo del parásito, valorado en términos de prepatencia, recuentos fecales de huevos y carga parasitaria. Se explicaba esta circunstancia por una deficiente adaptación parásito-hospedador atribuible, bien a la resistencia del hospedador rumiante a la cepa heteróloga o a la inadaptación de la cepa al hospedador. Los intentos fallidos de protección en los ensayos de inmunización cruzada (grupos SP/SP y NA/SP ovinos y grupos NA/NA y SP/NA caprinos) serían pues debidos, no a

la ineficacia del inmunógeno en sí, sino de la incapacidad del protocolo de inmunización para demostrar una posible reducción de los niveles de HPG y número de vermes más allá de los ya disminuidos valores que presentaron los correspondientes controles no inmunizados ( $\emptyset$ /SP en ovino y  $\emptyset$ /NA en caprino). Así pues, los ovinos infectados con la cepa heteróloga SP, independientemente de si estuvieron o no inmunizados, tuvieron niveles de HPG y carga parasitaria similares a los ovinos que resultaron inmunoprotegidos (NA/NA y SP/NA). Del mismo modo, todos los grupos caprinos infectados con la cepa NA presentaron valores de recuentos fecales y número de vermes adultos en abomaso similares a los caprinos que tuvieron niveles de protección eficaces (SP/SP y NA/SP).

A nivel genético también se encontraron evidencias que apoyarían la teoría según la cual los vermes obtenidos en animales infectados con una cepa no habitual, (infección heteróloga), tenderían a comportarse de forma similar a los vermes procedentes de los animales protegidos de la especie hospedadora a la que está adaptada la cepa del parásito. De esta forma, en los genes GCP-7, AC-1 y AC-3 las frecuencias alélicas de los adultos recogidos de ovinos controles no inmunizados e infectados con la cepa SP ( $\emptyset$ /SP) presentaron valores con tendencias similares a los vermes de los caprinos inmunizados que resultaron protegidos (SP/SP y NA/SP). Del mismo modo, en los vermes adultos aislados en caprinos infectados con la cepa ovina NA ( $\emptyset$ /NA) las frecuencias alélicas de los genes GCP-7 y AC-1 estuvieron muy próximas a las que se observaron en los vermes procedentes de los ovinos inmunoprotegidos (NA/NA y SP/NA). En concordancia con lo anterior, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre los tres grupos de ovinos infectados con la cepa heteróloga SP ( $\emptyset$ /SP, NA/SP y SP/SP), ni entre los correspondientes grupos caprinos infectados con la cepa ovina ( $\emptyset$ /NA, SP/NA y NA/NA).

Por otro lado, a pesar de las diferencias existentes entre las frecuencias alélicas entre cepas, la selección alélica entre los grupos sometidos a inmunización homóloga y heteróloga derivó en importantes coincidencias. Así, alelos que resultaron ser inmunoprotectores para la cepa SP en caprinos se vieron disminuidos en ovinos inmunizados y posteriormente infectados frente a esta misma cepa, y viceversa, alelos inmunoprotectores en ovinos para la cepa NA se vieron disminuidos en los mismos grupos caprinos. Esta circunstancia se observó en el gen GCP-7, donde la frecuencia del alelo  $M-F7$  fue similar tanto en los grupos ovinos infectados con la cepa heteróloga ( $\emptyset$ /NA, SP/SP y NA/SP) como en los caprinos inmunizados eficazmente frente a la cepa SP, y lo mismo se observó en el gen AC-1 con el alelo  $M-E1$ . Por su parte, en el análisis del gen AC-3, el alelo  $M-E3$  se encontró disminuido en todos los caprinos inmunizados e infectados con NA, al igual que en los

correspondientes grupos ovinos (NA/NA y SP/NA), en los que sí hubo inmunoprotección. Por último, también en el gen AC-4, el alelo *M-A<sub>4</sub>* estuvo disminuido en todos los ovinos inmunizados e infectados con SP (SP/SP y NA/SP) al igual que en los grupos caprinos protegidos frente a dicha cepa. Y viceversa, todos los caprinos inmunizados e infectados con NA (NA/NA, SP/NA, y Ø/NA) presentaron frecuencias de alelo *M-A<sub>4</sub>* similares a las de los ovinos inmunizados y protegidos frente a la cepa nortamericana (NA/NA y SP/NA). No es posible discernir en base a los resultados del presente estudio si los mecanismos por los cuales se produjo la selección alélica en los ensayos de inmunización homólogos, discutidos anteriormente, son los mismos que conducen a la selección alélica registrada en las inoculaciones heterólogas. Por un lado, la falta de adaptación de la cepa SP al ganado ovino podría ser debida a la capacidad *per se* del sistema inmune del ovino de interaccionar con las mismas proteinasas con las que interactúa el sistema defensivo inmunoestimulado del caprino. Y de la misma manera ocurriría en el ganado caprino, donde la capacidad para defenderse de la infección producida por la cepa NA se vería reflejada en la disminución de determinados alelos con importancia funcional, considerados inmunoprotectores para el ganado ovino.

La posibilidad de que la selección alélica también pudiese ser una consecuencia de las limitaciones que presenta una cepa para adaptarse a un hospedador al que no está habituado resulta aquí menos probable. Una vez fundamentada la disminución de los denominados “alelos inmunoprotectores”, bien por la inmunoestimulación, bien por la capacidad de respuesta inmune intrínseca del hospedador, es poco probable que sean los mismos alelos los que se vean disminuidos simplemente porque los adultos portadores de las proteinasas codificadas por ellos sean incapaces de digerir los nutrientes necesarios para su supervivencia en los nuevos hospedadores. Pese a todo, simplemente por las diferencias existentes a nivel de frecuencias alélicas, y en general de variabilidad genética, entre los aislados geográficos NA y SP de *H. contortus*, la influencia de la cepa en el proceso de inmunoprotección debería ser analizada en mayor profundidad. La cepa SP, mucho más variable, se ha demostrado que presenta un mayor número de alelos, y los comunes se encuentran en proporciones distintas a la cepa NA, posiblemente como consecuencia de la importancia funcional que pudiesen tener las proteínas expresadas para la supervivencia del parásito en los correspondientes hospedadores.

Se da la circunstancia de que los alelos considerados inmunoprotectores se presentaron en mayor proporción en el hospedador no inmunizado pero susceptible de ser protegido eficazmente, en comparación con la proporción encontrada en los hospedadores a los que no protege o protege en menor medida. La mayor expresión génica de las correspondientes proteinasas aseguraría el desarrollo de las funciones

---

vitales que pudiesen estar cumpliendo en el hospedador y, por el mismo motivo, explicaría por qué su inactivación inmunomediada comprometería la supervivencia del parásito, tal y como se ha comentado anteriormente. De esta forma el alelo *M-A<sub>1</sub>* (gen AC-1) de la cepa NA y el alelo *M-F<sub>1</sub>* de la cepa SP, considerados respectivamente los principales alelos inmunoprotectores en ovino y caprino, fueron los que se encontraron en mayor proporción en los vermes aislados de los animales no inmunizados (Ø/NA y Ø/SP). Lo mismo ocurrió en el gen GCP-7, donde se observó mayor proporción de los alelos considerados inmunoprotectores mayoritarios *M-D<sub>7</sub>* y *M-C<sub>7</sub>* en caprinos y ovinos no inmunizados, respectivamente. En cierta medida también se observó este mismo fenómeno en el gen AC-4, donde el alelo inmunoprotector *M-A<sub>4</sub>* fue el mismo para ambas cepas. En esta ocasión la frecuencia del alelo *M-A<sub>4</sub>* fue mayor en ovino (Ø/NA) que en caprino (Ø/SP) coincidiendo con la mayor inmunoprotección observada en los ovinos.

Los alelos inmunoprotectores mayoritarios de las dos cepas son por tanto coincidentes para algunos de los genes codificadores de proteinasas tipo cisteína, pero no para todos ellos, lo cual ha de tenerse en consideración si en el futuro se plantease la posibilidad de diseñar vacunas recombinantes con este tipo de inmunógenos. De hecho, predomina la diversidad. Así, mientras que los principales alelos inmunoprotectores identificados para la cepa NA ovina fueron los alelos *M-A<sub>1</sub>*, *M-E<sub>3</sub>*, *M-A<sub>4</sub>* y *M-C<sub>7</sub>*, para la cepa SP caprina lo fueron los alelos *M-F<sub>1</sub>*, *M-H<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>*, *M-A<sub>4</sub>* y *M-D<sub>7</sub>*. El alelo *M-A<sub>4</sub>* y algunos alelos inmunoprotectores secundarios en el gen AC-3 fueron las únicas coincidencias entre ambas cepas.

La elaboración y fabricación de una vacuna recombinante comercializable se considera como uno de los principales retos para el control inmunológico de muchas de las enfermedades animales producidas por parásitos. Hasta el momento se han obtenido resultados prometedores mediante la inmunización con proteínas recombinantes en el control de parásitos metazoos complejos como *Boophilus microplus* y *Taenia ovis* (Knox, 2000). De hecho, existe una vacuna recombinante comercializable en Australia usada frente a *Boophilus microplus* que utiliza una glicoproteína de 89 kDa, proteínas localizadas en el intestino del parásito (Willadsen *et al.*, 1995), y también se ha registrado en Nueva Zelanda una vacuna frente a *Taenia ovis* utilizando proteínas de fusión tipo β-galactosidasa (Rickard *et al.*, 1995). Otros autores han obtenido incluso buenos resultados a partir de vacunas recombinantes de proteinasas tipo cisteína del grupo de la catepsina-B en modelos animales a partir del parásito de humanos *Necator americanus* (Ranjit *et al.*, 2008).

Como en éstos y otros tantos parásitos animales, la obtención de vacunas recombinantes frente a la haemonchosis producida por *H. contortus* es una tarea

ardua (Knox *et al.*, 2003; Bethony *et al.*, 2006). Algunos autores han intentado sin éxito inducir una respuesta inmune y provocar un descenso en la carga parasitaria en *H. contortus* con la forma recombinante del antígeno H11 (Reszka *et al.*, 2007). Redmond y Knox (2004; 2006), por su parte, inmunizaron ovejas con una fracción de membrana (TSBP) con gran actividad proteasa tipo cisteína cuya forma recombinante no fue capaz de reducir la eliminación de huevos en las heces, aunque sí la carga parasitaria (38%). La dificultad en el correcto diseño de vacunas recombinantes, y por tanto de obtener resultados eficaces, podría tener numerosos orígenes. Posibles causas serían la inapropiada glicosilación (antígeno H11), la falta de información sobre el componente activo del complejo inmunoprotector (H-gal-GP) o por un fallo en la obtención de clones del cDNA (Newton y Meeusen, 2003). Si además se trabaja con antígenos variables como parece ser el caso de las proteinasas tipo cisteína, las complicaciones a la hora de encontrar el complejo recombinante más eficaz se multiplican. A priori, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, lo recomendable para el diseño de una futura vacuna recombinante sería elaborar una combinación de todos los alelos inmunoprotectores encontrados para cada uno de los genes analizados en el estudio. Se habrían de incluir por tanto alelos tanto de la cepa norteamericana como de la cepa española. Otra alternativa sería la elaboración de vacunas recombinantes autólogas, es decir, diseñadas exclusivamente para una cepa y su correspondiente hospedador, lo cual, a efectos de comercialización, resulta en general menos apropiado.

Tal y como se señaló, esta forma de proceder sería solamente necesaria cuando en la vacuna recombinante se pretende incluir inmunógenos variables genéticamente entre aislados geográficos o cepas. No tendrían tanta importancia en el desarrollo de vacunas obtenidas a partir de las proteínas integrales de membranas de adultos de *H. contortus* descritas por Redmond y Windham (2005), que demostraron presentar una relativamente limitada variación geográfica entre las diferentes cepas del parásito en función de su pH óptimo, tamaño molecular y especificidad del sustrato. Además, los autores demostraron un alto grado de similitud en el perfil peptídico de dichas cepas, las cuales reaccionaron con antisueros frente a antígenos aislados únicamente de la cepa Moredun de *H. contortus*.

En un intento de evitar este problema, De Vries *et al.* (2009) basándose en la ausencia de polimorfismo genético descrito en el gen AC-5 (Ruiz *et al.*, 2004b), inmunizaron ovinos con la proteinasa tipo cisteína codificada por el mismo, si bien sólo registraron una reducción de la carga parasitaria del 36% y de los recuentos fecales de huevos del 32%.

La variabilidad genética no ha de considerarse sin embargo como un proceso estable. El hecho de que la frecuencia de ciertos alelos haya disminuido debido a la intervención del sistema defensivo del hospedador, bien inmunoestimulado o de forma natural, llevó siempre paralelo un aumento de la frecuencia de otros alelos sin aparente importancia inmunógena con respecto a la frecuencia normal de las infecciones naturales, desarrollándose este proceso con relativa rapidez como refleja la circunstancia de que esos cambios son detectados con un solo proceso de inmunización. En este sentido, se podrían citar el incremento de la frecuencia del alelo  $M-G_7$  en caprinos protegidos frente a la cepa SP, del  $M-A_3$  en ovinos protegidos frente a la cepa NA, del alelo  $M-E_3$  en los caprinos protegidos frente a SP o del alelo  $M-B_4$ , y en menor medida del  $M-C_4$ , en todos los animales inmunizados.

Este fenómeno conllevaría un incremento de la baja o moderada expresión génica que tendrían inicialmente las proteinasas codificadas por dichos alelos, las cuales pasarían a ser decisivas a partir de ahora para la adaptación del parásito al nuevo hábitat. Esta hipótesis explica en parte la selección y evolución de las especies, una forma en que los organismos consiguen adaptarse a la evolución del entorno que necesitan para sobrevivir (**Webster *et al.*, 2007**). Si mayor variabilidad genética supone mayor capacidad de adaptación, se podría concluir que la cepa SP caprina dispondría de más recursos de adaptación que la cepa norteamericana utilizada en este estudio. En contraposición, según **Nuismer y Otto (2004)**, cuando un parásito debe evadir una respuesta inmune, la selección favorece a los individuos parásitos que expresan una estrecha gama de antígenos. Todo esto sin olvidar la capacidad de respuesta del hospedador, tanto mayor, según estos mismos autores, cuanto más amplio es su abanico para el reconocimiento de moléculas. Efectivamente, el binomio parásito-hospedador evoluciona a la par, pues el mecanismo de defensa de uno siempre será respondido de alguna manera por el otro y viceversa.

## *6. CONCLUSIONES*

**Primera.-** La infección experimental en ovinos y caprinos con una cepa de *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) aislada de un hospedador distinto al habitual resulta ser menos efectiva en términos de implantación de vermes adultos y producción total de huevos. No se ha podido determinar, en base al diseño de este estudio, si esta circunstancia estuvo relacionada con factores tales como la resistencia intrínseca de los hospedadores o las dificultades de adaptación de la cepa.

**Segunda.-** La inmunización con fracciones proteicas de vermes adultos de *H. contortus* solubles en PBS enriquecidas para proteinasas tipo cisteína con columnas de Thiol-Sepharosa induce niveles de inmunoprotección importantes frente a la haemonchosis experimental en pequeños rumiantes de 6 meses de edad, comparables o incluso superiores a los resultados obtenidos con otros antígenos naturales (ocultos o no). La protección se tradujo en reducciones tanto de los recuentos fecales de huevos como del número de vermes en abomaso y se asoció con un incremento de los niveles de IgG específicos.

**Tercera.-** El grado de inmunoprotección conferido no se vio afectado de forma importante en función del origen (cepa) de las enzimas utilizadas en la inmunización, si bien esta protección fue más significativa en los ensayos de inmunización homólogos llevados a cabo en los hospedadores habituales de cada cepa, es decir, ovinos inmunizados e infectados con la cepa NA y caprinos inmunizados e infectados con la cepa SP.

**Cuarta.-** La inmunización y posterior infección con cepas no habituales del parásito (SP en ovino, NA en caprino) no genera respuestas protectoras aparentes. Serían necesario estudios adicionales que evaluaran la relación parásito-hospedador en profundidad para determinar si esta circunstancia pudiera deberse a la escasa implantación de la cepa en el nuevo hospedador, tal y como se refirió en la primera conclusión.

**Quinta.-** Los análisis de polimorfismo genético mediante SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) confirman la existencia de una importante variabilidad genética en los genes codificadores de proteinasas tipo cisteína analizados en este estudio (GCP-7, AC-1, AC-3 y AC-4), tanto entre cepas como dentro de cada cepa (SP y NA).

**Sexta.-** A pesar de su supuesto aislamiento geográfico, la cepa SP obtenida de caprinos en Gran Canaria demostró ser más variable genéticamente que la cepa NA,

## 6. Conclusiones

---

especialmente en los *loci* GCP-7 y AC-3, lo que indicaría que existe un importante flujo genético en esta especie parásita en nuestro entorno.

**Séptima.-** El factor hospedador no parece jugar un papel muy relevante en la variabilidad genética de este tipo de proteínas, asociada o no al proceso de inmunización. No obstante, los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que el hospedador podría influir efectivamente sobre la selección génica del parásito, incluso tras un solo pase de la cepa por un hospedador no habitual.

**Octava.-** La existencia de reducciones significativas en las frecuencias de determinados alelos de vermes obtenidos en animales inmunizados frente a no inmunizados, indicaría que tales alelos estarían codificando proteínas (tipo cisteína) con poder inmunoprotector.

**Novena.-** Los “alelos inmunoprotectores” fueron los mismos para las dos cepas en el *locus* AC-4 (*M-A<sub>4</sub>*), pero difirieron en el resto de genes. Así, mientras que los principales alelos inmunoprotectores identificados para la cepa NA ovina fueron los alelos *M-A<sub>1</sub>*, *M-E<sub>3</sub>*, *M-A<sub>4</sub>* y *M-C<sub>7</sub>*, para la cepa SP caprina lo fueron los alelos *M-F<sub>1</sub>*, *M-H<sub>3</sub>*, *M-C<sub>3</sub>*, *M-A<sub>4</sub>* y *M-D<sub>7</sub>*. Esta información habría de tenerse en consideración si en el futuro se plantease la posibilidad de vacunas recombinantes con este tipo de inmunógenos.

**Décima.-** De forma simultánea a la reducción de frecuencias en los “alelos inmunoprotectores”, los ensayos de inmunización generan una selección génica que conlleva un aumento de la frecuencia en otros alelos diferentes. Esta circunstancia debería considerarse como un posible mecanismo de resistencia frente a la inmunización, por lo que la inmunoprofilaxis con éste y probablemente otros tipos de antígenos debería ser integrada con sistemas de control alternativos.

## *7. RESUMEN*

Los problemas asociados al uso de antihelmínticos en el control de las nematodosis gastrointestinales, tales como la presencia de residuos en alimentos de origen animal o la aparición de resistencias han estimulado el estudio del control inmunológico de numerosas parasitosis. En el caso de *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) se han realizado varios ensayos de vacunación usando antígenos naturales y recombinantes. Un grupo de antígenos con demostrado valor inmunoprolifáctico lo constituyen ciertas enzimas proteolíticas del tipo de la catepsina B conocidas como proteinasas tipo cisteína. Estas enzimas, que se han observado tanto en productos de excreción-secreción como en extractos somáticos de *H. contortus*, se ha sugerido que puedan ser diferentes según el hospedador y la distribución geográfica de una determinada cepa, según se ha constatado en algunos estudios comparativos de variabilidad genética. En el presente estudio se ha evaluado el efecto de este tipo de proteinasas como antígenos protectores atendiendo a distintos factores, dependientes tanto del parásito (tipo de cepa) como del hospedador (especie hospedadora); de forma paralela se analizó el comportamiento epidemiológico de las dos cepas de *H. contortus* utilizadas en el estudio tras inoculaciones en hospedadores habituales y no habituales. Se valoró asimismo la variabilidad genética de los vermes que completaron su ciclo endógeno en animales inmunizados con el fin de identificar los alelos con mayor efecto inmunoprotector. Con tales objetivos se inmunizaron ovinos y caprinos con proteinasas procedentes de una cepa aislada de ganado caprino en la isla de Gran Canaria (SP) y de otra aislada de ovinos procedente de Norteamérica (NA). Los dos grupos de hospedadores se infectaron posteriormente con la misma cepa utilizada en las inmunizaciones (ensayos homólogos) o con la cepa contraria (ensayos heterólogos). Como inmunógeno se utilizaron fracciones solubles en PBS enriquecidas para proteinasas tipo cisteína mediante cromatografía de afinidad con Thiol-Sepharose a partir de vermes adultos de *H. contortus*. Los resultados confirmaron el valor inmunoprolifáctico de este tipo de enzimas frente a la haemonchosis, tanto en ganado ovino como caprino, con independencia del origen (cepa) de los inmunógenos, observándose un mayor grado de inmunoprotección en los ensayos homólogos. La protección se tradujo en reducciones tanto de los recuentos fecales de huevos como del número de vermes en abomaso y se asoció con un incremento de los niveles de IgG específicos. Independientemente de la inmunización, la cepa ovina NA presentó un menor grado de adaptación (en términos de implantación de vermes y producción de huevos) en el ganado caprino, y lo inverso ocurrió con la cepa caprina SP cuando se inoculó en hospedadores ovinos. Por otro lado, en todos los genes analizados (GCP-7, AC-1, AC-3 y AC-4) se constató la existencia de variabilidad genética entre ambas cepas, así como dentro de cada una de ellas. Dicha diversidad se observó también asociada al proceso de inmunización. Los grupos de animales inmunizados, especialmente aquellos en los que hubo inmunoprotección, presentaron frecuencias alélicas estadísticamente

---

diferentes a las observadas en los animales no inmunizados o grupos control. Estas diferencias alélicas, que se apreciaron en los cuatro genes analizados, proporcionarían información sobre los alelos que podrían estar codificando proteínas con poder inmunógeno, una información que sería de utilidad en el diseño de vacunas recombinantes en la lucha y control de la haemonchosis de los pequeños rumiantes.

## *8. SUMMARY*

Problems associated with the use of anthelmintics in the control of gastrointestinal nematodosis, such as the presence of residues of animal origin in food or the emergence of resistance, has stimulated the study of the immunological control of many parasites. In the case of *Haemonchus contortus* (*H. contortus*), several vaccination trials using natural and recombinant antigens have been conducted. A group of antigens with demonstrated immunoprophylactic value are cathepsin B like proteolytic enzymes of the cysteine proteinase type. These enzymes, which have been observed in both excretory-secretory products and somatic extracts of *H. contortus*, has been suggested to be different depending on host and geographical distribution of a given strain, as it has been demonstrated in some comparative studies of genetic variability. In the present study the value of this kind of proteinases as protective antigens has been assessed taking into account different factors, including parasite-dependent (type of strain) and host (host species) factors; simultaneously, the epidemiological behavior of the two strains of *H. contortus* used in the study was assessed after inoculations to conventional and non-conventional hosts. The genetic variability of the worms that fully developed their endogenous cycle in immunized animals was also determined in order to identify the alleles of most immunoprotective value. To address these objectives, groups of sheep and goats were immunized with proteinases of a strain of *H. contortus* isolated from goats of Gran Canaria Island (SP) and a strain isolated from sheep of North America (NA). Both host groups were then infected with the same or different strain used for immunizations (homologous and heterologous assays, respectively). PBS soluble fractions enriched for cysteine proteinases from adult worms of *H. contortus* using affinity chromatography with Thiol Sepharose were used as immunogens. The results confirmed the immunoprophylactic value of this type of enzymes against haemonchosis in both sheep and goats, irrespectively of the source (strain) of antigens, with a greater degree of immunoprotection being

## *8. Summary*

---

observed in homologous trials. The protection resulted in reductions of both faecal egg counts and the total number of worms recovered from the abomasum, and was associated with increased levels of specific IgG. Regardless of immunization, ovine strain NA showed a lower degree of adaptation (in terms of adult worm development and egg production) in goats, and the reverse happened with the goat strain SP when inoculated into sheep hosts. In all the genes analyzed in the study (GCP-7, AC-1, AC-3 and AC-4) the presence of genetic variation between the two strains, as well as within each strain, was confirmed. The genetic diversity was also associated with the process of immunization. In all the immunized animals, particularly those in which there was immunoprotection, allele frequencies were statistically different from those observed in non-immunized control animals. The variation of the allelic frequencies following immunization was observed in the four genes analyzed in the study and would provide information on the alleles encoding proteinases of immunoprophylactic value. This information could be used in the design of recombinant vaccines to control haemonchosis in small ruminants.

## *9. AGRADECIMIENTOS*

Durante estos años muchas han sido las personas que han hecho posible este trabajo. Reflejar en unas líneas todas las que me han ayudado de una forma u otra es imposible, pero sin duda hay algunas a las que siempre estaré agradecido por su ánimo, apoyo, comprensión y ayuda en muchos momentos.

En primer lugar, a mis directores de tesis, gracias a los cuales he llegado a formar parte de este grupo de investigación donde no sólo me he formado como investigador sino como persona. Especialmente quiero agradecer a Antonio Ruiz por su esfuerzo y dedicación en todos y cada uno de los momentos por los que he pasado. Gracias por haber apostado por mí, por haberme transmitido tu experiencia y hacerlo siempre desde el cariño, la comprensión y la amistad. Sin duda lo más difícil de esta tesis es tener sólo un párrafo para darte las gracias. Un orgullo haber sido tu primer becario. Gracias José Manuel Molina por tu apoyo, orientación y consejo en todo momento, por haberme tratado como a uno más de esta familia, por tu empatía y amistad.

A Jorge González, gracias por tu amistad y comprensión, por transmitirme tu manera de trabajar, tu filosofía y calidad investigadora y sobre todo, tu forma de ser como persona. A Eligia Rodríguez, gracias por esa sonrisa y simpatía diaria que nunca te ha faltado conmigo.

A Yeray Hernández porque no ha habido ni un solo momento donde no haya tenido tu ayuda, amistad y compañía. Desde el primer McMaster hasta la última electroforesis, pasando por lágrimas y alegrías, muchas, muchísimas alegrías. Gracias por haber participado en todos los momentos de mi vida en este tiempo, pues terminé una tesis y me llevo un hermano.

A Álvaro Hernández, cuya compañía y amistad han hecho distintos los momentos del laboratorio. Gracias por tu enorme paciencia.

A todos los que están o han estado en el laboratorio: Esther Díaz, Estrella Gutiérrez, Irene Cabello, Bentejuí Hernández, Mayeya Suárez, Pedro Marrero, Manola Martel, Eduardo Araujo, Moisés Quevedo... Especialmente a Esther, por todas las veces que tuviste que preparar acrilamida, bromuro de etidio, fenol, entre otros miles de reactivos. Gracias a todos.

A los compañeros de Cría y Mejora: Ana Navarro, Davinia Negrín, Víctor, Silvia, Nico, Vicky, Mohamed, M<sup>a</sup> Jesús Zamorano, Juan Manuel Afonso,... gracias por el apoyo técnico en aspectos genéticos y de biología molecular y por la compañía en todas las horas pasadas en vuestro laboratorio.

## 9. Agradecimientos

---

Al personal de la Facultad de Veterinaria: Carmelo, Luis, Ricardo, Nuria, Luisa, Paco, Lita, Tata, Victoria, Paquito (Hospital), Yoli, Irma, Mari Carmen y Guillermo (biblioteca), Santiago, personal de seguridad... por hacer más fácil mi trabajo, pero más aún por esa sonrisa que encontraba a diario.

A los que me ayudaron en el muestreo, haciendo mi paso por la facultad mucho más alegre: Bea, Yure, Pitti, Tafi, Noé,...orgulloso de haberles transmitido mis conocimientos en la toma de muestras, análisis parasitológicos, etc.

A todas esas personas que han seguido mi proceso de formación y se han preocupado por el desarrollo de mi tesis. Gracias Félix Acosta, Cande Juste, Fernando González, Ani, Desiré, Oscar Quesada, Jimena Bravo, Judit Vega, Melani Santana, Cristina Mauricio, Felipe Martín,...También a Gilberto Navarro, que estoy segurísimo hubiese sido el primero en entrar a mi lectura de tesis y el último en dejar de aplaudir.

A la nueva generación de parasitólogas: Arántzazu Guedes, Davinia Pérez, Leire Ortega, Lorena Matos, Jessica Quesada, Julia Hernández, Adassa López... ¡Ánimo!

A personas muy importantes para mí estos años cuya amistad fue algo más: Idaira Vega, Lourdes Miranda, María Montesdeoca, Josué Talón, Crispi Molina, Nuzet Hernández, Antonio Mesa, Carmen Hernández, Ainhoa García, David Miguel, Zeneida Perdomo... no saben cuanto me han ayudado. Gracias por haber estado en muchos momentos, ya fuesen de risas o de lágrimas.

A Miguel Ángel Navarro y a Fran Sánchez, junto a los que empecé esta aventura de ser veterinario, por todos esos momentos inolvidables durante tantos años, que seguro darían para escribir muchas páginas.

A quien más sufrió mis frustraciones, quien más me animó y apoyó, quien más me felicitó, quien más cariño, compañía y amor me dio...quien más sufrió las consecuencias de una persona entregada a su tesis y a pesar de todo por seguir soportándome y consolándome en los momentos más difíciles. Gracias Noelia Fernández, por haber estado conmigo, sabes que sin tu ayuda, no estaríamos leyendo esto.

A mi padre Juan Martín y a mi madre María Martel, por haberme apoyado y animado, por haberme aguantado y hacer posible este momento. Pero sobre todo,

gracias por esperarme cada día siempre a mi vuelta a casa con los brazos abiertos, fuese cual fuese mi situación para darme todo el cariño del mundo. Esta tesis se la dedico a ustedes dos.

A mis hermanos: Mari Carmen, Juan, Inma y Loli Martín Martel, que han sido capaces de entender mi enclaustramiento durante tantos años, de preocuparse cada día por los avances de este trabajo y por mi futuro. Al resto de mi familia, que tanto ha respetado mi aislamiento en muchas ocasiones. En especial, gracias Basilio, que aunque no puedas leer esto, nunca te olvidaré.

A todo el C. D. Olirón, sobre todo a aquellos a los que tuve que dejar por culpa de este trabajo y más aún a los que derramaron lágrimas ese día. A ACIF (Asociación Canaria de Investigadores en Formación) por toda esa lucha que mantuvimos en su momento y que espero que algún día otros puedan ver los frutos.

También mostrar mi agradecimiento al Gobierno de Canarias, sin cuya financiación predoctoral no hubiera podido desarrollar este estudio, en especial a Cristo Mora, Aurora y Alberto Niebla, por su ayuda y paciencia. Por otro lado a Seaweed Canarias S.L., que durante estos últimos años no sólo ha comprendido mi situación, sino que además me han apoyado y brindado todas las facilidades para poder terminar este trabajo. Y también a veterinarios como Samuel Rodríguez o Alejandro Rodríguez, por todos los conocimientos que me han transmitido y por haberme ayudado en su momento en la obtención de los animales utilizados en esta experiencia. Así mismo, al Servicio de Genética Forense de la ULPGC, en especial a Nico y a Jessi, por la ayuda con las técnicas de secuenciación.

Finalmente, me gustaría agradecer al Prof. Prichard del Parasitology Institute (McGill University), por haber amablemente cedido la cepa NA utilizada en el presente estudio, y por haber permitido iniciar este tipo de análisis en su laboratorio. Así mismo, quisiera agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología, cuya financiación a través de los proyectos AGL-2002-03528, AGL-2007-62611 y AGL-2007-63415 ha hecho posible el desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral.

## *10. BIBLIOGRAFÍA*

- ABARCA, G. (1990):** Diagnóstico parasitológico gastrointestinal y pulmonar del hato caprino en la región del sureste del Valle Central de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Escuela de Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 120 p.
- ABBOTT, E. M., PARKINS, J. J. y HOLMES, P. H. (1986):** The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. *Vet. Parasitol.* 20: 275-289.
- ABBOTT, E. M., PARKINS, J. J. y HOLMES, P. H. (1988):** Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. *Res. Vet. Sci.* 45: 41-49.
- ABBOTT, E. M., PARKINS, J. J. y HOLMES, P. H. (2000):** Influence of dietary protein on the pathophysiology of ovine haemonchosis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection. *Res. Vet. Sci.* 38: 54-60.
- ABDEL-RAHMAN, E. H. y ABDEL-MEGEED, K. N. (2005):** Cross-protection induced by cross-reactive antigen against *Fasciola gigantica* and *Trichinella spiralis* infections. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 35: 281-294.
- ABDEL-MEGEED, K. N. y ABDEL-RAHMAN, E. H. (2004):** Induction of protective antibody response in rabbits against fascioliasis with *Toxocara/Fasciola* cross-reactive defined antigen. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 34: 1105-1118.
- ACHI, Y. L., ZINSSTAG, J., YAO, K., YEO, N., DORCHIES, P. y JACQUIET, P. (2003):** Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Vet. Parasitol.* 116: 151-158.
- ACHUKWI, M. D., HARNETT, W., ENYONG, P. y RENZ, A. (2007):** Successful vaccination against *Onchocerca ochengi* infestation in cattle using live *Onchocerca volvulus* infective larvae. *Parasite Immunol.* 29: 113-116.
- ADEMOLA, I. O. e IDOWU, S. O. (2006):** Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus*-infective larvae. *Vet. Rec.* 158: 485-486.
- ADEMOSUM, A. A. (1970):** Nutritive value of Nigerian Forages, I. Digestibility *Tenntsetuw purpureum* by sheep and goats. *Nigerian Agric. J.* 7: 19-26.
- 
-

AL-QASSAB, S., REICHEL, M.P., IVENS, A. y ELLIS, J.T. (2009): Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Mol. Cell. Probes*. 23: 132-139.

ALASAAD, S., LI, Q. Y., LIN, R. Q., MARTÍN-ATANCE, P., GRANADOS, J. E., DÍEZ-BAÑOS, P., PÉREZ, J. M. y ZHU, X. Q. (2008): Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitol. Res.* 103: 181-186.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1994): *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega, S.A.

ALONSO-DÍAZ, M. A., TORRES-ACOSTA, J. F., SANDOVAL-CASTRO, C. A., AGUILAR-CABALLERO, A. J. y HOSTE, H. (2008): *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* 153: 313-319.

ALTAŞ, M. G., SEVGILI, M., GÖKÇEN, A., AKSIN, N. y BAYBURS, H. C. (2009): The Prevalence of Gastro-intestinal Nematodes in Hair Goats of the Sanliurfa Region. *Turkiye Parazitol. Derg.* 33: 20-24.

ALUNDA, J. M., ANGULO-CUBILLÁN, F. y CUQUERELLA, M. (2003): Immunization against ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50: 70-74.

ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A., PÉREZ, J., VALCÁRCEL F., ROJO VÁZQUEZ, F. (2006): Control antihelmíntico mediante quimioterapia-quimioprofilaxis. *Ovis* 106: 16-31.

AMARANTE, A. F., BAGNOLA JÚNIOR, J., AMARANTE, M. R. y BARBOSA, M. A. (1997): Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 73: 89-104.

AMARANTE, A. F., BRICARELLO, P. A., HUNTLEY, J. F., MAZZOLIN, L. P. y GOMES, J. C. (2005): Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 128: 99-107.

AMBROSI, M. (1995): *Parassitologia Zootecnica*. Edagricole, Bologna: 151-154.

---

---

- 
- ANDERSON, D. V., DIXON, S. C., GRAHAM, R. B., SMITH, W. D. y TUCKER, E. M. (1989): Ovine monoclonal antibody to *Ostertagia circumcincta*. *Biochem. Soc. Transact.* 17: 736.
- ANDERSON, T. J. y JAENIKE, J. (1997): Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitol.* 115: 325-342.
- ANDERSON, R. C. (1992): Orden Strongylida (The Bursate Nematodes). 3.4 Superfamilia Trichostrongyloidea. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. C.A.B. International. Northampton. UK. pp: 35-191.
- ANDREWS, S. J., HOLE, N. J. K., MUNN, E. A. y ROLPH, T. P. (1995): Vaccination of sheep against haemonchosis with H11-prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. *Int. J. Parasitol.* 25: 839-846.
- AUMONT, G., GRUNER, L. y HOSTACHE G. (2003): Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Vet. Parasitol.* 116: 39-50.
- AUTHIÉ, E., DUVALLET, G., ROBERTSON, C. y WILLIAMS, D. J. (1993): Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to 'trypanotolerance' in cattle. *Parasite Immunol.* 15: 465-474.
- AYERS, S., ZINK, D. L., MOHN, K., POWELL, J. S., BROWN, C. M., MURPHY, T., GRUND, A., GENILLOU, O., SALAZAR, O., THOMPSON, D. y SINGH, S. B. (2007a): Anthelmintic macrolactams from *Nonomuraea turkmeniaca* MA7364. *J. Nat. Prod.* 70: 1371-1373.
- AYERS, S., ZINK, D. L., MOHN, K., POWELL, J. S., BROWN, C. M., MURPHY, T., BRAND, R., PRETORIUS, S., STEVENSON, D., THOMPSON, D. y SINGH, S. B. (2007b): Scutiaquinones A and B, perylenequinones from the roots of *Scutia myrtina* with anthelmintic activity. *J. Nat. Prod.* 70: 425-427.
- AYERS, S., ZINK, D. L., MOHN, K., POWELL, J. S., BROWN, C. M., MURPHY, T., BRAND, R., PRETORIUS, S., STEVENSON, D., THOMPSON, D. y SINGH, S. B. (2008): Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. *Phytochemistry* 69: 541-545.
-

**BACHAYA, H. A., IQBAL, Z., KHAN, M. N., SINDHU, Z. U. y JABBAR, A. (2009):** Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.* 123: 325-329.

**BAH, S., PAULSEN, B. S., DIALLO, D. y JOHANSEN, H. T. (2006):** Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 107: 189-198.

**BAHIRATHAN, M., MILLER, J. E., BARRAS, S. R. y KEARNEY, M. T. (2000):** Variation in susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infections. *Vet. Parasitol.* 65: 259-268.

**BAIN, R. K. (1999):** Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *Int. J. Parasitol.* 29: 185-191.

**BAKER, R. L., MWAMACHI, D. M., AUDHO, J. O., ADUDA, E. O. y THORPE, W. (1998):** Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in faecal egg counts. *Vet. Parasitol.* 79: 53-64.

**BAKKER, N., VERVELDE, L., KANOBANA, K., KNOX, D. P., CORNELISSEN, A. W., DE VRIES, E. y YATSUDA, A. P. (2004):** Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22: 618-628.

**BALIC, A., BOWLES, V. M. y MEEUSEN, E. N. (2000):** The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45: 181-241.

**BALLWEBER, L. R. (2006):** Diagnostic methods for parasitic infections in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22: 695-705.

**BAMBOU, J. C., DE LA CHEVROTIÈRE, C., VARO, H., ARQUET, R., KOOYMAN, F. N. y MANDONNET, N. (2008):** Serum antibody responses in Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 158: 311-318.

**BAMBOU, J. C., ARQUET, R., ARCHIMÈDE, H., ALEXANDRE, G., MANDONNET, N. y GONZÁLEZ-GARCÍA, E. (2009):** Intake and digestibility of naive kids differing in genetic resistance and experimentally parasitized (indoors) with *Haemonchus contortus* in two successive challenges. *J. Anim. Sci.* 87: 2367-2375.

- BARRAU, E., FABRE, N., FOURASTE, I. y HOSTE, H. (2005):** Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitol.* 131: 531-538.
- BARRETT, A. J. y RAWLINGS, N. D. (2007):** 'Species' of peptidases. *Biol. Chem.* 388: 1151-1157.
- BARRIO, A. B., VAN VOORHIS, W. C. y BASOMBRÍO, M. A. (2007):** *Trypanosoma cruzi*: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. *Exp. Parasitol.* 117: 382-389.
- BARTLEY, D. J., MCALLISTER, H., BARTLEY, Y., DUPUY, J., MÉNEZ, C., ALVINERIE, M., JACKSON, F., LESPINE, A. (2009):** P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 136: 1081-1088.
- BARTON, N. J., TRAINOR, B. L., URIE, J. S., ATKINS, W. J., PYMAN, M. F. S. y WOLSTENCROFT, I. T. (1985):** Anthelmintic resistance in nematode parasite of goats. *Australian Veterinary Journal* 62: 224-227.
- BAUER, C., FIEGE, N., KLATTE, D., ENNINGA, J. y BURGER, H. J. (1988):** Field studies on anthelmintic resistance of trichostrongylidae in sheep flock in Hessen. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 101: 185-189.
- BEECH, R. N., PRICHARD, R. K. y SCOTT, M. E. (1994):** Genetic variability of the  $\beta$ -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 138: 103-110.
- BEHNKE, J. M., CHIEJINA, S. N., MUSONGONG, G. A., FAKAE, B. B., EZEOKONKWO, R. C., NNADI, P. A., NGONGEH, L. A., JEAN, E. N. y WAKELIN, D. (2006):** Naturally occurring variability in some phenotypic markers and correlates of haemonchotolerance in West African Dwarf goats in a subhumid zone of Nigeria. *Vet. Parasitol.* 141: 107-121.
- BERASAIN, P., GONI, F., MCGONIGLE, S., DOWD, A., DALTON, J. P., FRANGIONE, B. y CARMONA, C. (1997):** Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J. Parasitol.* 83: 1-5.
- 
-

**BERDOWSKA, I (2004):** Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta.* 342: 41-69.

**BERGSTRÖM, F. C., REYNOLDS, S., JOHNSTONE, M., PIKE, R. N., BUCKLE, A. M., KEMP, D. J., FISCHER, K. y BLOM, A. M. (2009):** Scabies mite inactivated serine protease paralogs inhibit the human complement system. *J. Immunol.* 182: 7809-7817.

**BETHONY, J. M., LOUKAS, A., HOTEZ, P. J. y KNOX, D. P. (2006):** Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitol.* 133: S63-79.

**BHAUMIK, P., XIAO, H., PARR, C. L., KISO, Y., GUSTCHINA, A., YADA, R. Y., WLODAWER, A. (2009):** Crystal structures of the histo-aspartic protease (HAP) from *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 388: 520-540.

**BIFFA, D., JOBRE, Y. y CHAKKA, H. (2007):** Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Anim. Health Res. Rev.* 7: 107-118.

**BLACKHALL, W. J., LIU, H. Y., XU, M., PRICHARD, R. K. y BEECH, R. N. (1998a):** Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 95: 193-201.

**BLACKHALL, W. J., POULIOT, J. F., PRICHARD, R. K. y BEECH, R. N. (1998b):** *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin-selected strains. *Exp. Parasitol.* 90: 42-48.

**BLACKHALL, W. J., PRICHARD, R. K. y BEECH, R. N. (2008):** P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet. Parasitol.* 152: 101-107.

**BLOUIN, M. S., DAME, J. B., TARRANT, C. A. y COURTNEY, C. H. (1992):** Unusual population genetics of a parasitic nematode: mtDNA variation within and among populations. *Evolution* 46: 470-476.

**BLOUIN, M. S., YOWELL, C. A., COURTNEY, C. H. y DAME, J. B. (1995):** Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141: 1007-1014.

- BOISVENUE, R. J., SEIFF, M. I., TONKINSON, L. V., COX, G. N. y HAGEMAN, R. (1992): Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1263-1265.
- BOLAS-FERNANDEZ, F. y WAKELIN, D. (1992): Immunization against geographical isolates of *Trichinella spiralis* in mice. *Int. J. Parasitol.* 22: 773-781.
- BOERSEMA, J. H. y PANDEY, V. S. (1997): Anthelmintic resistance of trichostrongylids in sheep in the highveld of Zimbabwe. *Vet. Parasitol.* 68: 383-388.
- BORGSTEEDE, F. H. M., PEKELDER, J. J. H., DERCKSEN, D. P., SOL, J. y VELLEMA, P. (1997): A survey of anthelmintic resistance in nematodes of sheep in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 19: 167-172.
- BOTT, N. J., CAMPBELL, B. E., BEVERIDGE, I., CHILTON, N. B., REES, D., HUNT, P. W. y GASSER, R. B. (2009): A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. *Int. J. Parasitol.* 39: 1277-1287.
- BOWLES, V. M., BRANDON, M. R. y MEEUSEN, E. (1995): Characterisation of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunology* 84: 669-674.
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- BRADY, C. P., DOWD, A. J., BRINDLEY, P. J., RYAN, T., DAY, S. R. y DALTON, J. P. (1999): Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin. *Infect. Immun.* 67: 368-374.
- BRAISHER, T. L., GEMMELL, N. J., GRENFELL, B. T. y AMOS, W. (2004): Host isolation and patterns of genetic variability in three populations of *Teladorsagia* from sheep. *Int. J. Parasitol.* 34: 1197-1204.
- BRICARELLO, P. A., AMARANTE, A. F., ROCHA, R. A., CABRAL FILHO, S. L., HUNTLEY, J. F., HOUDIJK, J. G., ABDALLA, A. L. y GENNARI, S. M. (2005): Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet. Parasitol.* 134: 99-109.

BRINDLEY, P. J., GAM, A. A., MCKERROW, J. H. y NEVA, F. A. (1995): Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Exp. Parasitol.* 80: 1-7.

BRINDLEY, P. J., KALINNA, B. H., DALTON, J. P., DAY, S. R., WONG, J. Y., SMYTHE, M. L. y MCMANUS, D. P. (1997): Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 1-9.

BRINDLEY, P. J., KALINNA, B. H., WONG, J. Y., BOGITSH, B. J., KING, L. T., SMYTH, D. J., VERITY, C. K., ABBENANTE, G., BRINKWORTH, R. I., FAIRLIE, D. P., SMYTHE, M. L., MILBURN, P. J., BIELEFELDT-OHMANN, H., ZHENG, Y. y MCMANUS, D. P. (2001): Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112: 103-112.

BRITTON, C., KNOX, D. P., CANTO, G. J., URQUHART, G. M. y KENNEDY, M. W. (1992): The secreted and somatic proteinases of the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* and their inhibition by antibody from infected and vaccinated animals. *Parasitol.* 105: 325-333.

BRUNET, S., JACKSON, F. y HOSTE, H. (2008): Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38: 783-790.

BURKE, J. M., MILLER, J. E. y TERRILL, T. H. (2009): Impact of rotational grazing on management of gastrointestinal nematodes in weaned lambs. *Vet. Parasitol.* 163: 67-72.

CAFFREY, C. R. y RUPPEL, A. (1997): Affinity isolation and characterization of the cathepsin B-like proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* 83: 1112-1118.

CAMPO, E., MUÑOZ, J., MIQUEL, R., PALACÍN, A., CARDESA, A., SLOANE, B. F. y EMMERT-BUCK, M. R. (1994): Cathepsin B expression in colo-rectal carcinomas correlates with tumor progression and shorted patient survival. *Am. J. Pathol.* 145: 301-309.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L., BEVILAQUA, C. M., MORAIS, S. M., MACIEL, M. V., COSTA, C. T., MACEDO, I. T., OLIVEIRA, L. M., BRAGA, R. R., SILVA, R. A., VIEIRA, L. S. y NAVARRO, A. M. (2008): Anthelmintic activity of *Lippia sidoïdes* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 154: 167-170.

CARMONA, C., SMITH, A., DOWD, A. y DALTON, J. P. (1993): A *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase prevents the adherence of eosinophils to newly excysted juveniles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 9-17.

CARNEVALE, S., RODRÍGUEZ, M. I., GUARNERA, E. A., CARMONA, C., TANOS, T., ANGEL, S. O. (2001): Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41: 43-49.

CASILLAS AGUILAR, J. A., MENDOZA DE GIVES, P., LÓPEZ-ARELLANO, M. E. y LIÉBANO HERNÁNDEZ, E. (2008): Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149: 161-163.

CAZZULO, J. J. (2002): Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 1261-1271.

CHAGAS, A. C., VIEIRA, L. S., FREITAS, A. R., ARAÚJO, M. R., ARAÚJO-FILHO, J. A., ARAGUÃO, W. R. y NAVARRO, A. M. (2008): Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. *Vet. Parasitol.* 151: 68-73.

CHANDRAWATHANI, P., ADNAN, M., WALLER, P. J. (1999): Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 82: 305-310.

CHAPMAN, C. B. y MITCHELL, G. F. (1982): Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 11: 165-178.

CHEN, Y. X., WANG, L. X., TANG, L. F., ZHANG, S. K., ZHANG, J., ZENG, X. F. y YI, X. Y. (2005): Boost effect of recombinant IL-4 on protection of *Schistosoma japonicum* cathepsin B DNA vaccine in mice against the parasite. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* (Artículo en chino) 23: 65-68.

CHIEJINA, S. N., FAKAE, B. B., BEHNKE, J. M., NNADI, P. A., MUSONGONG, G. A. y WAKELIN, D. (2002): Expression of acquired immunity to a local isolate of *Haemonchus contortus* by the Nigerian West African Dwarf goat. *Vet. Parasitol.* 104: 229-242.

CHLICHLIA, K., BAHGAT, M., RUPPEL, A. y SCHIRRMACHER, V. (2001): DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: anti-fecundity effect induced in mice. *Vaccine* 20: 439-447.

CHOLLET, J. Y., JACQUIET, P., DIOP, C., THIAM, A. y CABARET, J. (1997): Strong adaptation to arid environment in Mauritania corresponds to limited genetic variability in the nematode *Haemonchus longistipes*, endoparasite of the dromedary. *Journal of camel practice and research* 4: 267-269.

CITTERIO, C. V., CASLINI, C., MILANI, F., SALA, M., FERRARI, N. y LANFRANCHI, P. (2006): Abomasal nematode community in an alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*) population before and after a die-off. *J. Parasitol.* 92: 918-927.

CLARK, C. H., KIESEL, G. K. y GOBY, C. H. (1962): Measurement of blood loss caused by *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 23: 977-980.

COLDITZ, I. G. y LE JAMBRE, L. F. (2008): Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 153: 93-99.

COLES, C. G. y ROUSH, R. T. (1992): Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the UK. *Vet. Rec.* 130: 505-510.

COLVILLE, J. (1991): Common Laboratory Procedures for Diagnosing Parasitism. En: *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. Ed. Paul W. Pratt. American Veterinary Publications, Inc. California. USA. pp: 7-50.

COLVIN, A. F., WALKDEN-BROWN, S. W., KNOX, M. R. y SCOTT, J. M. (2008): Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. *Vet. Parasitol.* 153: 108-120.

CONNAN, R. M. (1971): The seasonal incidence of inhibition of development in *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 12: 272-274.

CONDER, G. A., JOHNSON, S. S., HALL, A. D., FLEMING, M. W., MILLS, M. D. y GUIMOND, P. M. (1992): Growth and development of *Haemonchus contortus* in jirds, *Meriones unguiculatus*. *J. Parasitol.* 78: 492-497.

CONDI, G. K., SOUTELLO, R. G. y AMARANTE, A. F. (2009): Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.* 161: 213-217.

COOP, R. L., HUNTLEY, J. F. y SMITH, W. D. (1995): Effect of dietary-protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res. Vet. Sci.* 59: 24-29.

CORDERO DEL CAMPILLO, M., ROJO, F. A., MARTÍNEZ, A. R., SÁNCHEZ, M. C., HERNÁNDEZ, S., NAVARRETE, I., DÍEZ, P., QUIROZ, H. y CARVALHO, M. (2000): Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongiloidosis y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.

CORNELISSEN, J. B., GAASENBEEK, C. P., BOERSMA, W., BORGSTEEDE, F. H. y VAN MILLIGEN, F. J. (1999): Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 685-696.

CORNELISSEN, J. B., GAASENBEEK, C. P., BORGSTEEDE, F. H., HOLLAND, W. G., HARMSSEN, M. M. y BOERSMA, W. J. (2001): Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int. J. Parasitol.* 31: 728-737.

COX, G. N., PRATT, D., HAGEMAN, R. y BIOSVENUE, R.J. (1990): Molecular cloning and sequencing of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 25-34.

COX, G. N., MILHAUSSEN, M. y HAGEMAN, R. (1991): Anticoagulant and anthelmintic proteins and methods for the production of the same. *European Patent Application* 0434909 A2.

CRINGOLI, G., RINALDI, L., VENEZIANO, V. y CAPELLI, G. (2003): Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 112: 203-209.

CRISCIONE, C. D., ANDERSON, J. D., SUDIMACK, D., PENG, W., JHA, B., WILLIAMS-BLANGERO, S. y ANDERSON, T. J. (2007): Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc. Biol. Sci.* 274: 2669-2677.

CUQUERELLA, M., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T. y ALUNDA, J. M. (1991): Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. *Vet. Parasitol.* 38: 131-43.

CUQUERELLA, M., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., CARRERA, L., DE LA FUENTE, C. y ALUNDA, J. M. (1994): Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. *Vet. Parasitol.* 53: 243-251.

CWIKLINSKI, K., MESKILL, D., ROBINSON, M. W., POZIO, E., APPLETON, J. A. y CONNOLLY, B. (2009): Cloning and analysis of a *Trichinella pseudospiralis* muscle larva secreted serine protease gene. *Vet. Parasitol.* 159: 268-271.

DABROWSKA, M., KALINIAK, M. y WEDRYCHOWICZ, H. (2006): Influence of vaccination of calves with recombinant cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* on development and infectivity of miracidia. *Wiad Parazytol.* (Artículo en polaco) 52: 305-309.

DAKKAK, A., FIORAMONTI, J. y BUENO, L. (1981): *Haemonchus contortus* third stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformation during rumino-omasal transit. *Res. Vet. Sci.* 31: 384-385.

DALTON, J. P., MCGONIGLE, S., ROLPH, T. P. y ANDREWS, S. J. (1996a): Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun.* 64: 5066-5074.

DALTON, J. P., CLOUGH, K. A., JONES, M. K. y BRINDLEY, P. J. (1996b): Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64: 1328-1334.

DALTON, J. P. y MULCAHY, G. (2001): Parasite vaccines - a reality? *Vet. Parasitol.* 98: 149-167.

DALTON, J. P., BRINDLEY, P. J., KNOX, D. P., BRADY, C. P., HOTEZ, P. J., DONNELLY, S., O'NEILL, S. M., MULCAHY, G. y LOUKAS, A. (2003): Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int. J. Parasitol.* 33:621-640.

DAME, J. B., BLOUIN, M. S. y COURTNEY, C.H. (1993): Genetic structure of populations of *Ostertagia ostertagi*. *Vet. Parasitol.* 46: 55-62.

DARGIE, J. D. (1975): A Pathophysiology Application of radioisotopes techniques to the study of red cell and plasma protein metabolism in helminth diseases of sheep. *Symp. Br. Soc. Parasit.* 13: 1-26

DARGIE, J. D. y ALLONBY, E. W. (1975): Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *Int. J. Parasitol.* 5: 147-157.

DAY, T. A. y CHEN, G. Z. (1998): The metalloprotease inhibitor 1, 10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability. *Parasitol.* 116: 319-325.

DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCÍA-GARCÍA, J. C., MÉNDEZ, L., SERRANO, E., VALDÉS, M., ENRÍQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUÉ, O., MACHADO, H. y LLEONART, R. (1999): Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet. Anal.* 15: 143-148.

DE LEON, M. P., YANAGI, T., KIKUCHI, M., MU, J., AYAU, O., MATTA, V., PAZ, M., JUÁREZ, S., KANBARA, H., TADA, I. y HIRAYAMA, K. (1998): Characterisation of *Trypanosoma cruzi* by DNA polymorphism of the cruzipain gene detected by single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) and direct sequencing. *Int. J. Parasitol.* 28: 1867-1874.

DE LOURDES MOTTIER, M. y PRICHARD, R. K. (2008): Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics.* 18: 129-140.

DE VRIES, E., BAKKER, N., KRIJGSVELD, J., KNOX, D. P., HECK, A. J. y YATSUDA, A. P. (2009): An AC-5 cathepsin B-like protease purified from *Haemonchus contortus* excretory secretory products shows protective antigen potential for lambs. *Vet Res.* 40: 41.

DENG, S. L., HUANG, Y. L., HE, H. H., TAN, F. X., NI, X. W., JAYATISSA, L. P., HETTIARACHI, S. y SH, S. H. (2009): Genetic diversity of *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Aquatic botany* 90: 275-281.

DERBALA, A. E. y EL-RAHMAN, E. H. (2001): Potency of three *Haemonchus contortus* antigens in the diagnosis of ovine haemonchosis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31: 701-710.

DIXIT, A. K., YADAV, S. C. y SHARMA, R. L. (2002): 28 kDa *Fasciola gigantica* cysteine proteinase in the diagnosis of prepatent ovine fasciolosis. *Vet. Parasitol.* 109: 233-347.

DIXIT, A. K., DIXIT, P. y SHARMA, R. L. (2008): Immunodiagnostic/protective role of cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Vet. Parasitol.* 154: 177-184.

DOMÍNGUEZ-TORANO I. A., CUQUERELLA, M., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., MÉNDEZ, S., FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J. y ALUNDA, J. M. (2000): Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunol.* 22: 131-138.

DOMÍNGUEZ-TORAÑO, I. A., FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., ALUNDA, J. M. y CUQUERELLA, M. (2003): Humoral and cellular response in lambs vaccinated against *Haemonchus contortus* with p26/23. *Vet. Parasitol.* 50: 29-37.

DONALD, A. D., MORLEY, F. H. W., WALLER, P. J., AXELSEN, A., DOBSON, R. J. y DONNELLY, J. R. (1982): Effects of reproduction, genotype and anthelmintic treatment of ewes on *Ostertagia* spp. populations. *Int. J. Parasitol.* 12: 403-411.

DORCHIES, P., JACQUIET, P., BERGEAUD, J. P., DURANTON, C., PRÉVOT, F., ALZIEU, J. P. y GOSSELLIN, J. (2001): Efficacy of doramectin injectable against *Oestrus ovis* and gastrointestinal nematodes in sheep in the southwestern region of France. *Vet. Parasitol.* 96: 147-154.

DORNY, P., VERCRUYSE, J., COLES, G. C., BROGSTEDE, F. H. M. y GEERTS, S. (1993): Monitoring of anthelmintic resistance in nematode of farm animals. *A Seminar Organized for the European Commission, Held in Brussels.* Belgium. 8-9: 133-139.

DORNY, P., CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J., SANI, R. y JALILA, A., (1994): Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 55: 327-342.

DURETTE-DESSET, M. C. (1983): Keys to the genera of the superfamily Trichostrongyloidea, volume 10. In *CIH keys to the nematode parasites of vertebrates*, Anderson, R. C. and Chabaud, A. G. CAB International, Wallingford, UK, pp: 1-68.

DURETTE-DESSET, M. C. y CHABAUD, A. G. (1977): Essai de classification des Nématodes Trichostrongyloidea. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée.* 52: 539-558.

DURETTE-DESSET, M. C. y CHABAUD, A. G. (1981): Nouvel essai de classification des Nématodes Trichostrongyloidea. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée.* 56: 297-312.

EDWARDS, J. R., WROTH, R., DE CHANEET, G. C., BESIER, R. B., KARLSSON, J., MORCOMBE, P. W., DALTON-MORGAN, G. y ROBERTS, D. (1986): Survey of anthelmintic resistance in Western Australian sheep flocks. 2. Relationship with sheep management and parasite control practices. *Australian Veterinary Journal* 63: 139-144.

EGUALE, T., TILAHUN, G., DEBELLA, A., FELEKE, A. y MAKONNEN, E. (2007a): *Haemonchus contortus*. *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Exp. Parasitol.* 116: 340-345.

EGUALE, T., TILAHUN, G., DEBELLA, A., FELEKE, A., MAKONNEN, E. (2007b): *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.* 110: 428-433.

ELARD, L., COMES, A. M. y HUMBERT, J. F. (1996): Sequences of  $\beta$ -tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and-resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79: 249-253.

EMERY, D.L. (1996): Vaccination against worm parasites of animals. *Vet. Parasitol.* 64: 31-45.

ENG, J. K., BLACKHALL, W. J., OSEI-ATWENEBOANA, M. Y., BOURGUINAT, C., GALAZZO, D., BEECH, R. N., UNNASCH, T. R., AWADZI, K., LUBEGA, G. W. y PRICHARD, R. K. (2006): Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150: 229-235.

ESPINOZA, JR., TIMOTEO, O. y HERRERA-VELIT, P. (2005): Fas2-ELISA in the detection of human infection by *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol.* 79: 235-240.

ESPINOZA, JR., MACO, V., MARCOS, L., SAEZ, S., NEYRA, V., TERASHIMA, A., SAMALVIDES, F., GOTUZZO, E., CHAVARRY, E., HUAMAN, M. C., BARGUES, M. D., VALERO, M. A. y MAS-COMA, S. (2007): Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 977-982.

FAGBEMI, B. O. y GUOBADIA, E. E. (1995): Immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using a 28-kDa cysteine protease of *Fasciola gigantica* adult worms. *Vet. Parasitol.* 57: 309-318.

FALCONE, F. H., TETTEH, K. K., HUNT, P., BLAXTER, M. L., LOUKAS, A. y MAIZELS, R. M. (2000): The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes Tc-cpz-1, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective stage larvae. *Exp. Parasitol.* 94: 201-207.

FETTERER, R. H. y RHOADS, M. L. (1997): The *in vitro* uptake and incorporation of hemoglobin by adult *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 69: 77-87.

FLECK, S. L. y MOODY, A. H. (1988): Faecal parasites. En: *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*. Ed. Wright. Cambridge. Reino Unido; pp: 8-52.

FLÜCK, C., SCHÖPFLIN, S., SMITH, T., GENTON, B., ALPERS, M. P., BECK, H. P. y FELGER, I. (2007): Effect of the malaria vaccine Combination B on merozoite surface antigen 2 diversity. *Infect. Genet. Evol.* 7: 44-51.

FOEKENS, J. A., KOS, J., PETERS, H. A., KRASOVEC, M., LOOK, M. P., CIMERMAN, N., MEIJER-VAN GELDER, M. E., HENZEN-LOGMANS, S. C., VAN PUTTEN, W. L. y KLIJN, J. G. (1998): Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 16: 1013-1021

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2004):** Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Roma.

**FRANKENA, K. (1987):** The interactions between *Cooperia* spp and *Ostertagia* spp (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle. *PhD thesis*, Agriculture University Wageningen, The Netherlands. P: 101.

**FREITAS, M. A., FERNANDES, H. C., CALIXTO, V. C., MARTINS, A. S., SILVA, E. F., PESQUERO, J. L. y GOMES, M. A. (2009):** *Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. *Exp. Parasitol.* 122: 306-309.

**FRITSCHÉ, T., KAUFMANN, J. y PFISTER, K. (1993):** Parasite spectrum and seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes of small ruminants in The Gambia. *Vet. Parasitol.* 49: 271-283.

**GAMBLE, H. R. y ZAJAC, A. M. (1992):** Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet. Parasitol.* 41: 211-225.

**GARCÍA-COIRADAS, L., ANGULO-CUBILLÁN, F., MÉNDEZ, S., LARRAGA, V., DE LA FUENTE, C., CUQUERELLA, M. y ALUNDA, J. M. (2009):** Isolation and immunolocalization of a putative protective antigen (p26/23) from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 104: 363-369.

**GASBARRE, L. C. (1997):** Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. *Vet. Parasitol.* 72: 327-343.

**GASNIER, N. y CABARET, J. (1996):** Evidence for the existence of a sheep and a goat line of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda). *Parasitol Res.* 82: 546-550.

**GASSER, R. B., MONTI, J. R., ZHU, X., CHILTON, N. B., HUNG, G. C. y GULDBERG, P. (1997):** Polymerase chain reaction-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA to fingerprint parasites. *Electrophoresis* 18: 1564-1566.

GATONGI, P. M., PRICHARD, R. K., RANJAN, S., GATHUMA, J. M., MUNYUA, W. K., CHERUIYOT, H. y SCOTT, M. E. (1998): Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet. Parasitol.* 77: 49-61.

GELDHOF, P., CLAEREBOU, E., KNOX, D., VERCAUTEREN, I., LOOSZOVA, A. y VERCRUYSE, J. (2002): Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Parasite Immunol.* 24: 263-270.

GELDHOF, P., MEYVIS, Y., VERCRUYSE, J. y CLAEREBOU, E. (2008): Vaccine testing of a recombinant activation-associated secreted protein (ASP1) from *Ostertagia ostertagi*. *Parasite Immunol.* 30: 57-60.

GENTILE, R. y OLIVEIRA, G. (2008): Brazilian studies on the genetics of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 108: 175-178.

GHADIRIAN, E. y ARFAA, F. (1973): First report of human infection with *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, and *Marshallagia marshalli* (family Trichostrongylidae) in Iran. *J. Parasitol.* 59: 1144-1145.

GHONEIM, H. y KLINKERT, M. Q. (1995): Biochemical properties of purified cathepsin B from *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 25: 1515-1519.

GIAGLIS, S., PAPADOPOULOS, V., KAMBAS, K., DOUMAS, M., TSIRONIDOU, V., RAFAIL, S., KARTALIS, G., SPELETAS, M. y RITIS, K. (2007): MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet.* 71: 458-467.

GIBBONS, L. M. (1986): Sem Guide to the Morphology of Nematode Parasites of Vertebrates. Commonwealth Institute Of Parasitology. *C.A.B. International*. England.

GILL, B. S. (1996): Anthelmintic resistance in India. *Vet. Parasitol.* 63: 173-176.

GILL, H. S. (1991): Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunol.* 13: 617-628.

GIUDICI, C. J., CABARET, J. y DURETTE-DESSET, M. C. (1999): Description of *Haemonchus placei* (Place, 1893) (Nematoda, Trichostrongylidae, Haemonchinae), identification and intra-specific morphologic variability. *Parasite* 6: 333-342.

GOLDE, T. E., ESTUS, S., YOUNKIN, L. H., SELKOE, D. J. y YOUNKIN, S. G. (1992): Procession of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255: 728-730.

GOMEZ-MUÑOZ, M. T., CUQUERELLA, M. y ALUNDA, J. M. (1996): Identification and partial purification of a 26 kilodalton antigen of adult *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 26: 311-318.

GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., DOMÍNGUEZ, I. A., GÓMEZ-IGLESIAS, L. A., FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J., MÉNDEZ, S., DE LA FUENTE, C., ALUNDA, J. M. y CUQUERELLA, M. (2000): Serodiagnosis of haemonchosis with a somatic antigen (Hc26) in several breeds of sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 354-360.

GONZÁLEZ, J. F., HERNÁNDEZ, A., MOLINA, J. M., FERNÁNDEZ, A., RAADSMA, H. W., MEEUSEN, E. N. y PIEDRAFITA, D. (2008a): Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. *Vet. Parasitol.* 153: 374-378.

GONZALEZ, J. L., LÓPEZ-ARELLANO, M. E., OLAZARAN-JENKINS, S., LIÉBANO-HERNANDEZ, E., DE GIVES, P. M., VÁZQUEZ-PRATS, V., VEGA-MURILLO, V. y CALDERON, R. (2008b): Phenotype characterization of Pelibuey native lambs resistant to *Haemonchus contortus*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1149: 177-179.

GOTO, Y., BHATIA, A., RAMAN, V. S., VIDAL, S. E., BERTHOLET, S., COLER, R. N., HOWARD, R. F. y REED, S. G. (2009): *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. *Vaccine* 27: 2884-2890.

GOYAL, P. K. y WAKELIN, D. (1993): Vaccination against *Trichinella spiralis* in mice using antigens from different isolates. *Parasitol.* 107: 311-317.

GRADÉ, J. T., ARBLE, B. L., WELADJI, R. B. y VAN DAMME, P. (2008): Anthelmintic efficacy and dose determination of *Albizia anthelmintica* against gastrointestinal nematodes in naturally infected Ugandan sheep. *Vet. Parasitol.* 157: 267-274.

**GRAHAM, M., SMITH, T. S., MUNN, E. A., KNOX, D. P., OLIVER, J. J. y NEWTON, S. E. (1993):** Recombinant DNA molecules encoding aminopeptidase enzymes and their use in the preparation of vaccines against helminth infections. *Patent no* WO 93/23542.

**GRANT, W. N. (1994):** Genetic variation in parasitic nematodes and its implications. *Int. J. Parasitol.* 24: 820-830.

**GRAY, G. D., PRESSON, B. L., ALBERS, G. A. A., LE JAMBRE, L. F., PIPER, L. R. y BARKER, J. S. F. (1987):** Comparison of within- and between-breed variation in resistance to haemonchosis in sheep. *In Merino Improvement Programmes in Australia* (ed. MCGuirk, B. J.) Australian Wool Corporation, Melbourne, Australia: 365-369.

**GREEN, P. E., FORSYTH, B. A., ROWAN, K. J. y PAYNE, G. (1981):** The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. *Australian Veterinary Journal* 57: 79-84.

**GREENHALGH, C. J., BECKHAM, S. A. y NEWTON, S. E. (1999):** Galectins from sheep gastrointestinal nematode parasites are highly conserved. *Molecular and Biochemical Parasitology* 98: 285-289.

**GREGORY, W. F. y MAIZELS, R. M. (2007):** Cystatins from filarial parasites: Evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1389-1398.

**GRENCIS, R. K. (1996):** T cell and cytokine basis of host variability in response to intestinal nematode infections. *Parasitol.* 112: S31-S37.

**GUDEWAR, J., PAN, D., BERA, A. K., DAS, S. K., KONAR, A., RAO, J. R., TIWARI, A. K. y BHATTACHARYA, D. (2009):** Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* of Indian animal isolates on the basis of nuclear and mitochondrial genotype. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1381-1385.

**GUNETTE, R. S., MOOIBROOEK, M., WONG, K., WONG, P. y TENNISWOOD, M. (1994):** Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur. J. Biochem.* 226: 311-321.

---

HACKETT, F., SIMPSON, A. J., OMER-ALI, P. y SMITHERS, S. R. (1987): Surface antigens of and cross-protection between two geographical isolates of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* 94: 301-312.

HARRISON, G. B., PULFORD, H. D., GATEHOUSE, T. K., HEIN, W. R. y SHOEMAKER, C. B. (2002): Intestinal infusion of soluble larval antigen stimulates rejection of heterologous nematode larvae by immune sheep. *Parasitol Res.* 88: 463-467.

HENNESSY, D. R. (1994): The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. *Acta Tropica.* 56: 125-141.

HERSZÉNYI, L., PLEBANI, M., CARRARO, P., DE PAOLI, M., ROVERONI, G., CARDIN, R., FOSCHIA, F., TULASSAY, Z., NACCARATO, R. y FARINATI, F. (2000): Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases. *Clin. Chim. Acta.* 15: 171-187.

HERVE, M., MCANULTY, R. W., LOGAN, C. M. y SYKES, A. R. (2003): Regional variations in the nematode worm populations of breeding ewes in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 51: 159-164.

HIDE, M. y BAÑULS, A. L. (2008): Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 105-106.

HIELSCHER, A., BRANDT, H., ERHARDT, G. y GAULY, M. (2006): Heterosis analysis of *Haemonchus contortus* resistance and production traits in Rhoen sheep, Merino Land sheep and crossbred lambs. *Vet. Parasitol.* 141: 279-284.

HIGO, H., MIURA, S., HORIO, M., MIMORI, T., HAMANO, S., AGATSUMA, T., YANAGI, T., CRUZ-REYES, A., UYEMA, N., ROJAS DE ARIAS, A., MATTA, V., AKAHANE, H., HIRAYAMA, K., TAKEUCHI, T., TADA, I. y HIMENO, K. (2004): Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.* 53: 337-344.

HIGO, H., MIURA, S., AGATSUMA, T., MIMORI, T., YANAGI, T., IWAGAMI, M., DE ARIAS, A. R., MATTA, V., HIRAYAMA, K., TAKEUCHI, T., TADA, I. y HIMENO, K. (2007): Identification of *Trypanosoma cruzi* sublineages by the simple method of single-stranded conformation DNA polymorphism (SSCP). *Parasitol. Res.* 100: 1023-1031.

---

HILLYER, G. V. (2005): Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J. Helminthol.* 79: 241-247.

HOEKSTRA, R., CRIADO-FORNELIO, A., FAKKELDIJ, J., BERGMAN, J. y ROOS, M. H. (1997): Microsatellites of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: polymorphism and linkage with a direct repeat. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89: 97-107.

HOEKSTRA, R., OTSEN, M., LENSTRA, J. A. y ROOS, M. H. (1999): Characterisation of a polymorphic Tc1-like transposable element of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102: 157-166.

HOEKSTRA, R., OTSEN, M., TIBBEN, J., LENSTRA, J. A. y ROOS, M. H. (2000): Transposon associated markers for the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105: 127-135.

HOFFMANN, D., SEEBACH, J., COSMA, A., GOEBEL, F. D., STRIMMER, K., SCHÄTZL, H.M. y ERFLE, V. (2008): Therapeutic vaccination reduces HIV sequence variability. *The FASEB Journal* 22: 437-444.

HÖGLUND, J., GUSTAFSSON, K., LJUNGSTRÖM, B. L., ENGSTRÖM, A., DONNAN, A. y SKUCE, P. (2009): Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet. Parasitol.* 161: 60-68.

HOSKING, B. C., DOBSON, D. P., STEIN, P. A., KAMINSKY, R., BAPST, B., MOSIMANN, D., MASON, P. C., SEEWALD, W., STREHLAU, G. y SAGER, H. (2009): Dose confirmation studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Vet. Parasitol.* 160: 251-257.

HOSTE, H. y CHARTIER, C. (1998): Goat resistance to trichostrongyle infections of the gastrointestinal tract. *Point Vét.* (artículo en francés) 29: 161-166.

HOSTE, H., LESPINE, A., LEMERCIER, P., ALVINERIE, M., JACQUIET, P. y DORCHIES, P. (2004): Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*) in sheep. *Vet. Rec.* 154: 782-785.

---

HOTEZ, P. J., TRANG, N. L., MCKERROW, J. H. y CERAMI, A. (1985): Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Biol. Chem.* 260: 7343-7348.

HOTEZ, P. J., ASHCOM, J., BIN, Z., BETHONY, J., WILLIAMSON, A., HAWDON, J. M., JIANJUNM, F., DOBARDZIC, A., RIZOM, I., BOLDENM, J., QUN, J., WANG, Y., DOBARDZIC, R., CHUNG-DEBOSE, S., CROWELL, M., DATU, B., DELANEY, A., DRAGONOVSKI, D., YANG, J., LIU, Y., GHOSH, K., LOUKAS, A., BRANDT, W., RUSSELL, P. K. y ZOOK, B. C. (2002): Effects of vaccinations with recombinant fusion proteins on the *Ancylostoma caninum* habitat selection in the canine intestine. *J. Parasitol.* 88: 684-690.

HOWELL, S. B., BURKE, J. M., MILLER, J. E., TERRILL, T. H., VALENCIA, E., WILLIAMS, M. J., WILLIAMSON, L. H., ZAJAC, A. M. y KAPLAN, R. M. (2008): Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233: 1913-1919.

HUMBERT, J. F. y CABARET, J. (1995): Use of random amplified polymorphic DNA for identification of ruminant trichotrongylid nematodes. *Parasitol. Res.* 81: 1-5.

HUNT, P. W., KNOX, M. R., LE JAMBRE, L. F., MCNALLY, J. y ANDERSON, L. J. (2008): Genetic and phenotypic differences between isolates of *Haemonchus contortus* in Australia. *Int. J. Parasitol.* 38: 885-900.

HUTCHINSON, G. W. y SLOCOMBE, J. O. (1976): Experimentally induced *Haemonchus contortus* infections in the rabbit. *J. Helminthol.* 50: 143-152.

IQBAL, Z., LATEEF, M., JABBAR, A., MUHAMMAD, G. y KHAN, M. N. (2005): Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *J. Ethnopharmacol.* 102: 256-261.

IQBAL, Z., LATEEF, M., KHAN, M. N., JABBAR, A. y AKHTAR, M. S. (2006a): Anthelmintic activity of *Swertia chirata* against gastrointestinal nematodes of sheep. *Fitoterapia* 77: 463-465.

IQBAL, Z., LATEEF, M., JABBAR, A., GHAYUR, M. N. y GILANI, A. H. (2006b): *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. *Phytother. Res.* 20: 46-48.

JABBAR, A., IQBAL, Z., KERBOEUF, D., MUHAMMAD, G., KHAN, M. N. y AFAQ, M. (2006): Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci.* 79: 2413-2431.

JABBAR, A., ZAMAN, M. A., IQBAL, Z., YASEEN, M. y SHAMIM, A. (2007): Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L) and *Caesalpinia crista* (L) against trichostrongylid nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.* 114: 86-91.

JABBAR, A., IQBAL, Z., SADDIQI, H. A., BABAR, W. y SAEED, M. (2008): Prevalence of multiple anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in dairy goats in a desolated tract (Pakistan). *Parasitol Res.* 103: 29-35.

JACKSON, F. (1993): Anthelmintic resistance—the state of play. *British Veterinary Journal* 149: 123-138.

JACOBS, H. J., WILTSHIRE, C., ASHMAN, K. y MEEUSEN, E. (1999): Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17: 362-368.

JACQUIET, P., HUMBERT, J. F., COMES, A. M., CABARET, J., THIAM, A. y CHEIKH, D. (1995): Ecological, morphological and genetic characterization of sympatric *Haemonchus* spp. parasites of domestic ruminants in Mauritania. *Parasitol.* 110: 483-492.

JACQUIET, P., CABARET, J., THIAM, E. y CHEIKH, D. (1998): Host range and the maintenance of *Haemonchus* spp. in an adverse arid climate. *Int. J. Parasitol.* 28: 253-261.

JAFFE, C. L. y DWYER, D. M. (2003): Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol. Res.* 91: 229-237.

JASMER, D. P. y McGUIRE, T. C. (1991): Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. *Infect. Immun.* 59: 4412-4417.

JASMER, D. P., PERRYMAN, L. E., CONDER, G. A., CROW, S. y McGUIRE, T. (1993): Protective immunity to *Haemonchus contortus* induced by immunoaffinity isolated antigens that share a phylogenetically conserved carbohydrate gut surface epitope. *J. Immunol.* 151: 5450-5460.

- JASMER, D. P., PERRYMAN, L. P. y McGUIRE, T. C. (1996): *Haemonchus contortus* GA1 antigens: related phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein and released from the nematode during infection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 8642-8647.
- JASMER, D. P., ROTH, J. y MYLER, P. J. (2001): Cathepsin B-like cysteine proteases and *Caenorhabditis elegans* homologues dominate gene products expressed in adult *Haemonchus contortus* intestine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 159-169.
- JASMER, D. P., MITREVA, M. D. y McCARTER, J. P. (2004): mRNA sequences for *Haemonchus contortus* intestinal cathepsin B-like cysteine proteases display an extreme in abundance and diversity compared with other adult mammalian parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137: 297-305.
- JARRETT, W. F., JENNINGS, F. W., McINTYRE, W. I., MULLIGAN, W. y SHARP, N. C. (1959): Studies on immunity to *Haemonchus contortus* infection – vaccination of sheep using a single dose of Xirradiated larvae. *Am. J. Vet. Res.* 20: 527-531.
- JARRETT, W. F. y SHARP, N. C. (1963): Vaccination against parasitic disease: reactions in vaccinated and immune host in *Dictovacaulus viviparus* infection. *J. Parasitol.* 49: 177-189.
- JAYARAJ, R., PIEDRAFITA, D., DYNON, K., GRAMS, R., SPITHILL, T. W. y SMOOKER, P. M. (2009): Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet. Parasitol.* 160: 230-236.
- JEZEK, J., RIDI, R. E., SALAH, M., WAGIH, A., AZIZ, H. W., TALLIMA, H., SHAFIE, M. H., KHALEK, T. A., AMMOU, F. F., STRONGYLIS, C., MOUSSIS, V. y TSIKARIS, V. (2007): *Fasciola gigantica* cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Biopolymers* 90: 349-357.
- JIMÉNEZ, J. N., MUSKUS, C. E. y VÉLEZ, I. D. (2005): Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its implications in the epidemiology of malaria. *Biomedica* 25: 588-602.
- JOHNSON, M., LABES, R. E., TAYLOR, M. J. y MACKINTOSH, C. G. (2003): Efficacy trial of an irradiated cattle lungworm vaccine in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Parasitol.* 117: 131-137.
- 
-

JONES, B. F. y HOTEZ, P. J. (2002): Molecular cloning and characterization of Ac-mep-1, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119: 107-116.

JOSHI, P. y SINGH, B. P. (2000): Purification and characterization of a cholinesterase from the parasite nematode, *Haemonchus contortus*. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 37: 192-197.

KAHN, L. P., KNOX, M. R. y GRAY, G. D. (1999): Enhancing immunity to nematode parasites in pregnant and lactating sheep through nutrition and genetic selection. *Rec. Adv. Anim. Nutr. Aust.* 12: 15-22.

KAMINSKY, R., MOSIMANN, D., SAGER, H., STEIN, P. y HOSKING, B. (2009): Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *Int. J. Parasitol.* 39: 443-446.

KANE, S. E. y GOTTESMAN, M. M. (1990): The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 1: 127-136.

KARANU, F. N., RURANGIRWA, F. R., MCGUIRE, T. C. y JASMER, D. P. (1993): *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Exp. Parasitol.* 77: 362-371.

KARANU, F. N., RURANGIRWA, F. R., MCGUIRE, T. C. y JASMER, D. P. (1997): *Haemonchus contortus*: inter- and intrageographic isolate heterogeneity of proteases in adult worm excretory-secretory products. *Exp. Parasitol.* 86: 89-91.

KERBOEUF, D., BEAUMONT-SCHWARTZ, C., HUBERT, J. y MAILLON, M. (1988): Résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques chez les petits ruminants. *Résultats d'une enquête dans le Val de Loire. Recueil de Médecine Vétérinaire* 164: 1001-1006.

KHALIL, A. I., BURNS, A. R. y WHITE, A.C. JR. (1998): Demonstration of *Taenia crassiceps* cysteine proteinase activity in tegumentary lysosome-like vesicles. *J. Parasitol.* 84: 513-515.

KLOOSTERMAN, A., ALBERS, G. A. A. y VAN DEN BRINK, R. (1978): Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. *Vet. Parasitol.* 4: 353-368.

KLOOSTERMAN, A., BORGSTEEDE, F. H. M. y EYSKER, M. (1985): The effect of experimental *Ostertagia ostertagi* infection in stabled milking cows on egg output, serum pepsinogen levels, antibody titres and milk production. *Vet. Parasitol.* 17: 299-308.

KNOX, D. P., REDMOND, D. L. y JONES, D. G. (1993): Characterization of proteinases in extract of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal parasite. *Parasitol.* 106: 395-404.

KNOX, D. P., SMITH, S. K., SMITH, W. D., REDMOND, D. L. y MURRAY, J. M. (1995a): Thiol binding proteins. *International Patent Application* PCT/GB95/00665.

KNOX, D. P., SMITH, S. K., SMITH, W. D., MURRAY, J. M. y REDMOND, D. L. (1995b): Vaccines against helminthic parasites. *International Patent Application* No WO 95; /26402, 1995.

KNOX, D. P., SMITH, S. K. y SMITH, W. D. (1999): Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Immunol.* 21: 201-210.

KNOX, D. P. (2000): Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitol.* 120: S43-61.

KNOX, D. P. y SMITH, W. D. (2001): Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet. Parasitol.* 100: 21-32.

KNOX, D. P., REDMOND, D. L., NEWLANDS, G. F., SKUCE, P. J., PETTIT, D. y SMITH, W. D. (2003): The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int. J. Parasitol.* 33. 1129-1137.

KNOX, D. P., SMITH, S. K., REDMOND, D. L. y SMITH, W. D. (2005): Protection induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. *Parasite Immunol.* 27: 121-126.

KNOX, M. R., JOSH, P. F. y ANDERSON, L. J. (2002): Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. *Biological Control.* 24: 176-182.

KOSKI, K. G. y SCOTT, M. E. (2003): Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 16: 237-251.

KOUSSIS, K., WITHERS-MARTINEZ, C., YEOH, S., CHILD, M., HACKETT, F., KNUEPFER, E., JULIANO, L., WOHLBIER, U., BUJARD, H. y BLACKMAN, M. J. (2009): A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J*. 28: 725-735.

KUKITA, Y., TAHIRA, T., SOMMER, S. S. y HAYASHI, K. (1997): SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Human Mutation* 10: 400-407.

KWA, M. S., KOOYMAN, F. N., BOERSEMA, J. H. & ROOS, M. H. (1993): Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on beta-tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 191: 413-419.

KWA, M. S., VEENSTRA, J. G. y ROOS, M. H. (1994): Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 63: 299-303.

LALMANACH, G., BOULANGÉ, A., SERVEAU, C., LECAILLE, F., SCHARFSTEIN, J., GAUTHIER, F. y AUTHIÉ, E. (2002): Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. *Biol. Chem.* 383: 739-749.

LANGE, K. C., OLCOTT, D. D., MILLER, J. E., MOSJIDIS, J. A., TERRILL, T. H., BURKE, J. M. y KEARNEY, M. T. (2006): Effect of *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 141: 273-278.

LARMINIE, C. G. y JOHNSTONE, I. L. (1996): Isolation and characterization of four developmentally regulated cathepsin B-like cysteine protease genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *DNA Cell Biology* 15: 75-82.

LARSON, S., JAMESON, R., ETNIER, M., FLEMING, M. y BENTZEN, P. (2002): Loss of genetic diversity in sea otters (*Enhydra lutris*) associated with the fur trade of the 18th and 19th centuries. *Molecular Ecology* 11: 1899-1903.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. y COX, M. M (1993): Principios de bioquímica. Ediciones Omega, S.A.: 146-147.

LEID, R. W. (1987): Parasite defence mechanisms for evasion of host attack, a review. *Vet. Parasitol.* 25: 147-162.

LEJAMBRE, L. F., WINDON, R. G. y SMITH, W. D. (2008): Vaccination against *Haemonchus contortus*. Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet. Parasitol.* 153: 302-312.

LI, X., DU, A., CAI, W., HOU, Y., PANG, L. y GAO, X. (2007): Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp. Parasitol.* 115: 242-246.

LICHTENFELS, J. R., WERGIN, W. P., MURPHY, C. y PILITT, P. A. (1995): Bilateral, perivulval cuticular pores in trichostrongylid nematodes. *J. Parasitol.* 81:633-6.

LICHTENFELS, J. R. y PILITT, P. A. (2000): Synlophe patterns of the Haemonchinae of ruminants (Nematoda: Trichostrongyloidea). *J. Parasitol.* 86: 1093-1098.

LICHTENFELS, J. R., PILITT, P. A., GIBBONS, L. M. y BOOMKER, J. D. (2001): *Haemonchus horaki* n. sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) from the grey rhebuck *Pelea capreolus* in South Africa. *J. Parasitol.* 87: 1095-1103.

LICHTENFELS, J. R., PILITT, P. A., GIBBONS, L. M. y HOBERG, E. P. (2002): Redescriptions of *Haemonchus mitchelli* and *Haemonchus okapiae* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and description of a unique synlophe for the haemonchinae. *J. Parasitol.* 88: 947-960.

LIGHTOWLERS, M. W. (1989): Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leiden.* 57: 135-142.

LINDQVIST, A., LJUNGSTRÖM, B. L., NILSSON, O. y WALLER, P. J. (2001): The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 42: 377-389.

LLOYD, J. B., FITZGIBBON, C. C. y BARCHIA, I. (2000): Evaluation of a laboratory test to detect resistance to closantel in *Haemonchus contortus*. *Aust. Vet. J.* 78: 710-714.

LONGBOTTOM, D., REDMOND, D. L., RUSSELL, M., LIDDELL, S., SMITH, W. D. y KNOX, D. P. (1997): Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88: 63-72.

LOVE, S. C., JOHNS, W. J. y COVERDALE, O. R. (1992): Anthelmintic resistance in sheep nematodes in New England region of New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 69: 196-197.

LOZANO, J. A., GALINDO, J. D., GARCÍA-BORRÓN, J. C., MARTÍNEZ-LIARTE, J. H., PEÑAFIEL, R. y SOLANO, F. (2005): Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España: 338-341.

LUSTIGMAN, S., MCKERROW, J. H., SHAH, K., LUI, J., HUIMA, T., HOUGH, M. y BROTMAN, B. (1996): Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J. Biol. Chem.* 271: 30181-30189.

LYONS, E. T., DRUDGE, J. H., TOLLIVER, S. C. y STAMPER, S. (1993): Controlled tests of activity of several antiparasitic compounds against natural infections of *Haemonchus contortus* and other helminths in lambs from a flock established in 1962. *Am. J. Vet. Res.* 54: 406-410.

MACIEL, M. V., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L., COSTA, C. T. y CASTRO, C. M. (2006): Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 140: 98-104.

MACIEWICZ, R. A., WARDALE, R. J., ETHERINGTON, D. J. y PARASKEVA, C. (1989): Immunodetection of cathepsin B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colo-rectal tumour cell lines. *Int. J. Cancer.* 43: 478-486.

MACKINNON, K. M., BURTON, J. L., ZAJAC, A. M. y NOTTER, D. R. (2009): Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130: 210-220.

MAFF (1989): Helminthology. London: Her Majesty's Stationery Office. Reino Unido: 1-68.

MAIZELS, R. M. y KURNIAWAN-ATMADJA, A. (2002): Variation and polymorphism in helminth parasites. *Parasitol.* 125: S25-37.

MANDONNET, N., AUMONT, G., FLEURY, J., ARQUET, R., VARO, H., GRUNER, L., BOUIX, J. y KHANG, J. V. (2001): Assessment of genetic variability of resistance to gastrointestinal nematode parasites in Creole goats in the humid tropics. *J. Anim. Sci.* 79: 1706-1712.

MANDONNET, N., BACHAND, M., MAHIEU, M., ARQUET, R., BAUDRON, F., ABINNE-MOLZA, L., VARO, H. y AUMONT, G. (2005): Impact on productivity of peri-parturient rise in fecal egg counts in Creole goats in the humid tropics. *Vet. Parasitol.* 134: 249-259.

MANSOUR, M. M., DIXON, J. B., CLARKSON, M. J., CARTER, S. D., ROWAN, T. G. y HAMMET, N. C. (1990): Bovine immune recognition of *Ostertagia ostertagi* larval antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 24: 361-371.

MAPES, C. J. y GALLIE, G. J. (1977): The development of *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of the ovine abomasum, in the laboratory rabbit. *Parasitol.* 74: 235-242.

MARIE-MAGDELEINE, C., HOSTE, H., MAHIEU, M., VARO, H. y ARCHIMEDE, H. (2009): *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 161: 99-105.

MARLEY, C. L., COOK, R., BARRETT, J., KEATINGE, R., LAMPKIN, N. H. y MCBRIDE, S. D. (2003): The effect of dietary forage on the development and survival of helminth parasites in ovine faeces. *Vet. Parasitol.* 118: 93-107.

MARTIN, A. G., DANFORTH, H. D., BARTA, J. R. y FERNANDO M. A. (1997): Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *Int. J. Parasitol.* 27: 527-533.

MARTIN, R. J. y ROBERTSON, A. P. (2007): Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitol.* 134: 1093-1104.

MCGUIRE, T. M., SHERING, S. G., DUGGAN, C. M., MCDERMOTT, E. W., HIGGINS, N. J. O. y DUFFY, M. J. (1998): High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*. 13: 139-144.

MCKERROW, J. H., PINO-HEISS, S., LINDQUIST, R. y WERB, Z. (1985a): Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 260: 3703-3707.

MCKERROW, J. H., JONES, P., SAGE, H. y PINO-HEISS, S. (1985b): Proteinases from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement-membrane macromolecules. *Biochem. J.* 231: 47-51.

MEEUSEN, E. N. T. y PIEDRAFITA, D. (2003): Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33: 1285-1290.

MENDOZA-LEON, A., LUIS, L. y MARTINEZ, C. (2001): The beta-tubulin gene region as a molecular marker to distinguish *Leishmania* parasites. *Methods in Molecular Biology* 79: 61-83.

MEYVIS, Y., GELDHOFF, P., GEVAERT, K., TIMMERMAN, E., VERCRUYSSSE, J. y CLAEREBOU, E. (2007): Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction. *Vet Parasitol.* 149: 239-45.

MILLER, J. E. y HOROHOV, D. W. (2006): Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science* 84 (E. Suppl.): 124-132.

MOLINA, J. M., GUTIÉRREZ, A. C., RODRÍGUEZ-PONCE, E., VIERA, J. A. y HERNÁNDEZ, S. (1997): Abomasal nematodes in goats from the subtropical island of Grand Canary (Spain). *Vet. Res.* 28: 259-270.

MOLINA, J. M., RUIZ, A., RODRÍGUEZ-PONCE, E., GUTIÉRREZ, A. C., GONZÁLEZ, J. y HERNÁNDEZ, S. (1999): Cross-reactive antigens of *Haemonchus contortus* adult worms in *Teladorsagia circumcincta* infected goats. *Vet. Res.* 30: 393-399.

MOLINA, J. M., RUIZ, A., FUENTES, P., GONZÁLEZ, J. F., MARTÍN, S. y HERNÁNDEZ, Y. I. (2005): Persistent efficacy of doramectin against *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Rec.* 156: 448-450.

- MOLINA, J. M., RUIZ, A., HERNÁNDEZ, B., GONZÁLEZ, J. F., MARTÍN, S. y HERNÁNDEZ, Y. I. (2008): Eprinomectin 'pour-on' and the shedding of *Haemonchus contortus* eggs in experimentally infected goats. *Aust. Vet. J.* 86: 444-445.
- MONTENEGRO-JAMES, S. (1989): Immunoprophylactic control of bovine babesiosis: role of exoantigens of *Babesia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 85-94.
- MORETTO, A. (1998): Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol Lett.* 28: 102-103: 509-513.
- MORRISON, W. I. (1996): Influence of host and parasite genotypes on immunological control of *Theileria* parasites. *Parasitol.* 112: S53-66.
- MUGAMBI, J. M., AUDHO, J. O., NJOMO, S. y BAKER, R. L. (2005): Evaluation of the phenotypic performance of a Red Maasai and Dorper double backcross resource population: indoor trickle challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 127: 263-275.
- MULCAHY, G., O'CONNOR, F., MCGONIGLE, S., DOWD, A., CLERY, D. G., ANDREWS, S.J. y DALTON, J. P. (1998): Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
- MULEKE, C. I., RUOFENG, Y., LIXIN, X., YANMING, S. y XIANGRUI, L. (2006): Characterization of HC58cDNA, a putative cysteine protease from the parasite *Haemonchus contortus*. *Journal of Veterinary Science* 7: 249-255.
- MUNN, E. A., GREENWOOD, C. A. y COADWELL, W. J. (1987): Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 94: 385-397.
- MUNN, E. A. (1997): Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. *Int. J. Parasitol.* 27: 359-366.
- MUNN, E. A. y MUNN, P. D. (2002): In *The Biology of Nematodes*, ed. Lee DL. London: Taylor & Francis: 211-232.

MURNANE, M. J., SHEAHAN, K., OZDEMIRLI, M. y SHUJA, S. (1991): Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colo-rectal carcinoma. *Cancer Res.* 51: 1137-1142.

MURRAY, L., GELDHOF, P., CLARK, D., KNOX, D. P. y BRITTON, C. (2007): Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 37: 1117-1125.

MUZULIN, P. M., KAMENETZKY, L., GUTIERREZ, A. M., GUARNERA, E. A., ROSENZVIT, M. C. (2008): *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Exp. Parasitol.* 118: 156-164.

NANSEN, P., STEFFAN, P. E., CHRISTENSEN, C. M., GASBARRE, L. C., MONRAD, J., GRONVOLD, J. y HENRIKSEN, S. A. (1993): The effect of experimental trichostrongyle infections of housed young calves on the subsequent course of natural infection on pasture. *Int. J. Parasitol.* 23: 627-638.

NASSIRY, M. R., SHAHROUDI, F. E., TAHMOORESPUR, M. y JAVADMANESH, A. (2007): Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastain and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pak. J. Biol. Sci.* 10: 1062-1067.

NETTLES, V. F., QUIST, C. F., LOPEZ, R. R., WILMERS, T. J., FRANK, P., ROBERTS, W., CHITWOOD, S. y DAVIDSON, W. R. (2002): Morbidity and mortality factors in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). *J. Wildl. Dis.* 38: 685-692.

NEWLANDS, G. F. J., SKUCE, P. J., KNOX, D. P., SMITH, S. K. y SMITH, W. D. (1999): Cloning and characterization of a  $\beta$ -galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 119: 483-490.

NEWLANDS, G. F. J., SKUCE, P. J., KNOX, D. P. y SMITH, W. D. (2001): Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 122: 371-378.

NEWLANDS, G. F., SKUCE, P. J., NISBET, A. J., REDMOND, D. L., SMITH, S. K., PETTIT, D. y SMITH, W. D. (2006): Molecular characterization of a family of metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 133: 357-368.

---

---

- NEWTON, S. E. y MUNN, E. A. (1999): The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today*. 15: 116-122.
- NEWTON, S. E. Y MEEUSEN, E. N. (2003): Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol.* 25: 283-296.
- NEYRA, V., CHAVARRY, E. y ESPINOZA, JR. (2002): Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Vet. Parasitol.* 105: 21-32.
- NGARMAMONPIRAT, C., WAIKAGUL, J., PETMITR, S., DEKUMYOY, P., ROJEKITTIKHUN, W. y ANANTAPRUTI, M. T. (2005): Analysis of sequence variation in *Gnathostoma spinigerum* mitochondrial DNA by single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequence. *Parasitol. Int.* 54: 65-68.
- NGINYI, J. M., DUNCAN, J. L., MELLOR, D. J., STEAR, M. J., WANYANGU, S. W., BAIN, R. K. y GATONGI, P. M. (2001): Epidemiology of parasitic gastrointestinal nematode infections of ruminants on smallholder farms in central Kenya. *Res. Vet. Sci.* 70: 33-39.
- NGUTI, R., JANSSEN, P., ROWLANDS, G. J., AUDHO, J. O. y BAKER, R. L. (2003): Survival of Red Maasai, Dorper and crossbred lambs in the sub-humid tropics. *Animal Science* 76: 3-17.
- NIEZEN, J. H., CHARLESTON, W. A. G., HODGSON, J., MACKAY, A. D. y LEATHWICK, D. M. (1996): Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *Int. J. Parasitol.* 26: 983-992.
- NIEZEN, J. H., CHARLESTON, W. A. G., HODGSON, J., MILLER, C. M., WAGHORN, T. S. y ROBERTSON, H. A. (1998): Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasitise sheep. *Int. J. Parasitol.* 28: 791-803.
- NIMBKAR C., GHALSASI P. M., SWAN A. A., WALKDEN-BROWN S. W. y KAHN L. P. (2003): Evaluation of growth rates and resistance to nematodes of Deccani and Bannur lambs and their crosses with Garole. *Animal Science.* 76: 503-515.

- NJUE, A. I. y PRICHARD, R. K. (2004):** Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. *Parasitol.* 129: 741-751.
- NNADI, P. A., KAMALU, T. N. y ONAH, D. N. (2007):** The effect of dietary protein supplementation on the pathophysiology of *Haemonchus contortus* infection in West African Dwarf goats. *Vet. Parasitol.* 148: 256-261.
- NOLAN, M. J. y CRIBB, T. H. (2005):** The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv. Parasitol.* 60:101-163.
- NUISMER, S. L. y OTTO, S. P. (2004):** Host-parasite interactions and the evolution of ploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:11036-11039.
- NWOSU, C. O., MADU, P. P. y RICHARDS, W. S. (2007):** Prevalence and seasonal changes in the population of gastrointestinal nematodes of small ruminants in the semi-arid zone of north-eastern Nigeria. *Vet. Parasitol.* 144: 118-124.
- O'CONNOR, L. J., WALKDEN-BROWN, S. W. y KAHN, L. P. (2006):** Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* 142: 1-15.
- O'CONNOR, L. J., KAHN, L. P., WALKDEN-BROWN, S. W. (2007):** Moisture requirements for the free-living development of *Haemonchus contortus*: quantitative and temporal effects under conditions of low evaporation. *Vet. Parasitol.* 150: 128-38.
- OHTA, N., KUMAGAI, T., MARUYAMA, H., YOSHIDA, A., HE, Y. y ZHANG, R. (2004):** Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate. *Parasitol. Int.* 53: 175-181.
- OLIVEIRA, A. L., COSTA, C., RODELLA, R. A., SILVA, B. F. y AMARANTE, A. F. (2009):** Effect of plant trichomes on the vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on five tropical forages. *Trop. Anim. Health Prod.* 41: 775-782.
- O'NEILL, S. M., MILLS, K. H. G. y DALTON, J. P. (2001):** *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific IFN-g production *in vivo*. *Parasite Immunol.* 23: 541-547.

OSTLIND, D. A., CIFELLI, S., MICKLE, W. G., SMITH, S. K., EWANCIW, D. V., RAFALKO, B., FELCETTO, T. y MISURA, A. (2006): Evaluation of broad-spectrum anthelmintic activity in a novel assay against *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *T. sigmodontis* in the gerbil *Meriones unguiculatus*. *J. Helminthol.* 80: 393-396.

OTSEN, M., PLAS, M. E., LENSTRA, J. A., ROOS, M. H. y HOEKSTRA, R. (2000): Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110: 69-77.

PALMER, B. R., SU, H. Y., ROBERTS, N., HICKFORD, J. G. y BICKERSTAFFE, R. (2000): Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. *Anim. Biotechnol.* 11: 63-67.

PALMER, D. G. y McCOMBE, I. L. (1996): Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *Int. J. Parasitol.* 26: 447-450.

PANDEY, K. C., BARKAN, D. T., SALI, A. y ROSENTHAL, P. J. (2009): Regulatory elements within the prodomain of Falcipain-2, a cysteine protease of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS. One* 4: e5694.

PANDEY, V. S., NDAO, M. y KUMAR, V. (1994): Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes in communal land goats from the highveld of Zimbabwe. *Vet. Parasitol.* 51: 241-248.

PARK, H., KIM, S. I., HONG, K. M., KIM, M. J., SHIN, C. H., RYU, J. S., MIN, D. Y., LEE, J. B. y HWANG, U. W. (2002): Characterization and classification of five cysteine proteinases expressed by *Paragonimus westermani* adult worm. *Exp. Parasitol.* 102: 143-149.

PEARSON, M. S., BETHONY, J. M., PICKERING, D. A., DE OLIVEIRA, L. M., JARIWALA, A., SANTIAGO, H., MILES, A. P., ZHAN, B., JIANG, D., RANJIT, N., MULVENNA, J., TRIBOLET, L., PLIESKATT, J., SMITH, T., BOTTAZZI, M. E., JONES, K., KEEGAN, B., HOTEZ, P. J. y LOUKAS, A. (2009): An enzymatically inactivated hemoglobinase from necator americanus induces neutralizing antibodies against multiple hookworm species and protects dogs against heterologous hookworm infection. *FASEB J.* 23: 3007-3019.

PEDREIRA, J., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J. L., ARIAS, M., LOMBA, C., DÍAZ, P., LÓPEZ, C., DÍEZ-BAÑOS, P. y MORRONDO, P. (2006): Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Prev. Vet. Med.* 75: 56-62.

PETTIT, A., PERY, P. y LUFFAU, G. (1981): Circulating antigens in ovine haemonchosis. *Ann. Rech. Vet.* 12: 1-9.

PIACENZA, L., ACOSTA, D., BASMADJIAN, I., DALTON, J. P. y CARMONA, C. (1999): Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidasa induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67: 1954-1961.

PINHO, R. T., BELTRAMINI, L. M., ALVES, C. R. y DE-SIMONE, S. G. (2009): *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol.* 122: 128-133.

PLANCHART, S., INCANI, R. N. y CESARI, I. M. (2007): Preliminary characterization of an adult worm "vomit" preparation of *Schistosoma mansoni* and its potential use as antigen for diagnosis. *Parasitol. Res.* 101: 301-309.

PLOEGER, H. W., KLOOSTERMAN, A., BORGSTEEDE, F. H. y EYSKER, M. (1990): Effect of naturally occurring nematode infections in the first and second grazing season on the growth performance of second-year cattle. *Vet. Parasitol.* 36: 57-70.

POMROY, W. E., LAMBERT, M. G. y BETTERIDGE, L. (1985): Comparison of faecal strongylate egg counts of goats and sheep on the same pasture. *N. Z. Vet. J.* 34: 36-37.

PRALOMKARN, W., PANDEY, V. S., NGAMPONGSAI, W., CHOLDUMRONGKUL, S., SAITHANOO, S., RATTANACHON, L. y VERHULST, A. (1997): Genetic resistance of three genotypes of goats to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 68: 79-90.

PRASAD, A., NASIR, A. y SINGH, N. (2008): Detection of anti-*Haemonchus contortus* antibodies in sheep by dot-ELISA with immunoaffinity purified fraction of ES antigen during prepatency. *Indian J. Exp. Biol.* 46: 94-99.

- 
- PRATT, D., COX, G. N., MILHAUSEN, M. J. y BOISVENUE, R. J. (1990): A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 181-191.
- PRATT, D., ARMES, L. G., HAGEMAN, R., REYNOLDS, V., BOISVENUE, R. J. y COX, G. N. (1992): Cloning and sequence comparisons of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 209-218.
- PROWSE, R. K., CHAPLIN, P., ROBINSON, H. C. y SPITHILL, T. W. (2002): *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation *in vitro* and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol.* 24: 57-66.
- PRZEMECK, S., HUBER, A., BROWN, S., PEDLEY, K. C. y SIMPSON, H. V. (2005): Excretory/secretory products of sheep abomasal nematode parasites cause vacuolation and increased neutral red uptake by HeLa cells. *Parasitol. Res.* 95: 213-217.
- PŁOCIŃSKI, P., DZITKO, K. y DŁUGOŃSKA, H. (2007): Prolactin as a modulator of antiparasitic immunity. *Wiad Parazytol.* 53: 263-270.
- QUE, X., BRINEN, L. S., PERKINS, P., HERDMAN, S., HIRATA, K., TORIAN, B. E., RUBIN, H., MCKERROW, J. H. y REED, S. L. (2002): Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119: 23-32.
- RAHMAN, W. A. y COLLINS, G. H. (1991): Changes in liveweight gain and blood constituents in experimental infection of goats with a goat-derived compared with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 38: 145-153.
- RAINA, O. K., YADAV, S. C., SRIVENY, D. y GUPTA, S. C. (2006): Immuno diagnosis of bubaline fasciolosis with *Fasciola gigantica* cathepsin-L and recombinant cathepsin L 1-D proteases. *Acta Tropica.* 98: 145-151.
- RAINBIRD, M. A., MACMILLAN, D. y MEEUSEN, E. (1998): Eosinophilmediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* 20: 93-103.
- RALEIGH, J. R. y MEEUSEN, E. (1996): Developmentally regulated expression of a *Haemonchus contortus* surface antigen. *Int. J. Parasitol.* 26: 673-675.
-

- RALEIGH, J. R., BRANDON, M. R. y MEEUSEN, E. (1996): Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 18: 125-132.
- RAM, H., RASOOL, T. J., SHARMA, A. K., MEENA, H. R. y SINGH, S. K. (2007): Comparative efficacy of different anthelmintics against fenbendazole-resistant nematodes of pashmina goats. *Vet. Res. Commun.* 31: 719-723.
- RANJIT, N., ZHAN, B., STENZEL, D. J., MULVENNA, J., FUJIWARA, R., HOTEZ, P. J. y LOUKAS, A. (2008): A family of cathepsin B cysteine proteases expressed in the gut of the human hookworm, *Necator americanus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160: 90-99.
- RANJIT, N., ZHAN, B., HAMILTON, B., STENZEL, D., LOWTHER, J., PEARSON, M., GORMAN, J., HOTEZ, P. y LOUKAS, A. (2009): Proteolytic degradation of hemoglobin in the intestine of the human hookworm *Necator americanus*. *J Infect Dis.* 199: 904-912.
- RATHORE, D. K., SUCHITRA, S., SAINI, M., SINGH, B. P. y JOSHI, P. (2006): Identification of a 66 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory antigen that inhibits host monocytes. *Vet. Parasitol.* 138: 291-300.
- RAWLINGS, N. D., MORTON, F. R., KOK, C. Y., KONG, J. y BARRETT, A. J. (2008): MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36: D320-D325.
- READ, A. F. y TAYLOR, L. H. (2001): The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099-1102.
- REDMAN, E., PACKARD, E., GRILLO, V., SMITH, J., JACKSON, F. y GILLEARD, J. S. (2008): Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. *Int. J. Parasitol.* 38: 111-122.
- REDMOND, D. L., KNOX, D. P., NEWLANDS, G. y SMITH, W. D. (1997): Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 77-87.

- REDMOND, D. L. y KNOX, D. P. (2004): Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22: 4252-4261.
- REDMOND, D. L., GELDHOF, P. y KNOX, D. P. (2004): Evaluation of *Caenorhabditis elegans* glycoproteins as protective immunogens against *Haemonchus contortus* challenge in sheep. *Int. J. Parasitol.* 34: 1347-1353.
- REDMOND, D. L. y WINDHAM, R. (2005): Characterization of proteinases in different isolates of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 130: 429-435.
- REDMOND, D. L. y KNOX, D. P. (2006): Further protection studies using recombinant forms of *Haemonchus contortus* cysteine proteinases. *Parasite Immunol.* 28: 213-219.
- REDMOND, D. L., SMITH, S. K., HALLIDAY, A., SMITH, W. D., JACKSON, F., KNOX, D. P. y MATTHEWS, J. B. (2006): An immunogenic cathepsin F secreted by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.* 36: 277-286.
- REHMAN, A. y JASMER, D. P. (1998): A tissue specific approach for analysis of membrane and secreted protein antigens from *Haemonchus contortus* gut and its application to diverse nematode species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97: 55-68.
- REHMAN, A. y JASMER, D. P. (1999): Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 297-310.
- REID, R. L., JUNG, G. A., COX-GANSER, J. M., RYBECK, B. F. y TOWNSEND, E. C. (1990): Comparative utilization of warm- and cool-season forages by cattle, sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 68: 2986-2994.
- RESZKA, N., RIJSEWIJK, F. A., ZELNIK, V., MOSKWA, B. y BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K. (2007): *Haemonchus contortus*: characterization of the baculovirus expressed form of aminopeptidase H11. *Exp. Parasitol.* 117: 208-213.
- RHOADS, M. L. y FETTERER, R. H. (1995): Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 81: 505-512.

- RHOADS M. L. y FETTERER R. H. (1996): Extracellular matrix degradation by *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 82: 376-383.
- RICKARD, M. D., HARRISON, G. B., HEATH, D. D. y LIGHTOWLERS, M. W. (1995): *Taenia ovis* recombinant vaccine--'quo vadit'. *Parasitol.* 110: S5-9.
- RIDOLFI, B., GENOVESE, D., ARGENTINI, C., MAGGIORELLA, M. T., SERNICOLA, L., BUTTÒ, S., TITTI, F., BORSETTI, A. y ENSOLI, B. (2008): Tat protein vaccination of cynomolgus macaques influences SHIV-89.6P cy243 epitope variability. *Virus Genes* 36: 105-115.
- ROJAS, W., CARO, M. A., LOPERA, J. G., TRIANA, O., DIB, J. C. y BEDOYA, G. (2007): Analysis of polymorphisms in the trypanothione reductase and cruzipain genes in Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biomedica* 27: 50-63.
- ROKNI, M. B., MASSOUD, J. y HANILO, A. (2003): Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Acta Trop.* 88: 69-75.
- ROOS, M. H., KWA, M. S. G. y GRANT, W. N. (1995): New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Today* 11: 148-150.
- ROHRER, S. P., BIRZIN, E. T., EARY, C. H., SCHAEFFER, J. M., SHOOP, W. L. (1994): Ivermectin binding sites in sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 80: 493-497.
- ROSENTHAL, P. J. (2004): Cysteine proteases of malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 34: 1489-1499.
- RUFENER, L., KAMINSKY, R. y MÄSER, P. (2009): *In vitro* selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of  $\alpha$ -tubulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168: 120-122.
- RUIZ, A., MOLINA, J. M., GONZÁLEZ, J., MARTÍNEZ-MORENO, F. J., GUTIÉRREZ, P. N. y MARTÍNEZ-MORENO, A. (2003): Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases of adult fluke. *Vet. Res.* 34: 435-443.

- RUIZ, A., MOLINA, J. M., GONZÁLEZ, J. F., CONDE, M. M., MARTÍN, S. y HERNÁNDEZ, Y. I. (2004a): Immunoprotection in goats against *Haemonchus contortus* after immunization with cysteine protease enriched protein fractions. *Vet. Res.* 35: 565-572.
- RUIZ, A., MOLINA, J. M., NJUE, A. y PRICHARD, R. K. (2004b): Genetic variability in cysteine protease genes of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 128: 549-559.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T. (1989): Molecular Cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- SAMIE, A., OBI, C. L., BESSONG, P. O., HOUP, E., STROUP, S., NJAYOU, M., SABETA, C., MDULUZA, T. y GUERRANT, R. L. (2008): *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of African strains based on the polymorphism of the serine-rich protein gene. *Exp. Parasitol.* 118: 354-361.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- SANGSTER, N. (1996): Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol.* 113: 201-216 (Suppl).
- SANGSTER, N. C. (1999): Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* 29: 115-124.
- SARGISON, N. D., WILSON, D. J., BARTLEY, D. J., PENNY, C. D. y JACKSON, F. (2007): Haemonchosis and teladorsagiosis in a Scottish sheep flock putatively associated with the overwintering of hypobiotic fourth stage larvae. *Vet. Parasitol.* 147: 326-331.
- SCALA, A. (2006): Physiopathological mechanisms of abomasal Trichostrongylidae infections in small ruminants. *Parassitologia* 48: 403-408.
- SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A. y HENDRIKX, W. M. (1994): Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 108: 351-357.

SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A. y HENDRIKX, W.M. (1995a): Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet. Parasitol.* 56: 149-162

SCHALLIG, H. D., HORNOK, S. y CORNELISSEN, J. B. (1995b): Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 57: 329-338.

SCHALLIG, H. D. y VAN LEEUWEN, M. A. (1997): Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitol.* 114: 293-299.

SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A. y CORNELISSEN, A. W. (1997): Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol.* 19: 447-453.

SCHALLIG, H. D. (2000): Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 120 Suppl: S63-72.

SCOTT, I., STEAR, M. J., IRVINE, J., DICK, A., WALLACE, D. S. y MCKELLAR, Q. A. (1998): Changes in the zymogenic cell populations of the abomasa of sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 116: 569-577.

SHAKYA, K. P., MILLER, J. E. y HOROHOV, D. W. (2009): A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163: 57-66.

SHARP, P. J. y WAGLAND, B. M. (1996): *Haemonchus contortus* vaccine. US Patent 5525508.

SHOMPOLE, S. y JASMER, D. P. (2001): Cathepsin-like cystein proteases confer intestinal cystein protease activity in *Haemonchus contortus*. *J. Biol. Chem.* 276: 2928-2934.

SHOOP, W. L. (1993): Ivermectin resistance. *Parasitology Today* 9: 154-159.

SIEDEK, E. M., BURDEN, D. y VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. (2006): Feasibility of genus-specific real-time PCR for the differentiation of larvae from gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 119: 303-307.

**SIMPSON, H. V. (2000):** Pathophysiology of abomasal parasitism: is the host or parasite responsible? *Vet. J.* 160: 177-191.

**SIMPSON, H. V., LAWTON, D. E., SIMCOCK, D. C., REYNOLDS, G. W. y POMROY, W. E. (1997):** Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *Int. J. Parasitol.* 27: 825-831.

**SINGH, S. y YADAV, C. L. (1997):** A survey of anthelmintic resistance by nematodes on three sheep and two goat farms in Hisar (India). *Vet. Res. Comm.* 21: 447-451.

**SINHA, A. A., GLEASON, D. F., STALEY, N. A., WILSON, M. J., SAMENI, M. y SLOANE, B. F. (1995a):** Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: An immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. *Anat. Rec.* 241: 353-362.

**SINHA, A. A., WILSON, M. J., GLEASON, D. F., REDDY, P. K., SAMENI, M. y SLOANE, B. F. (1995b):** Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate* 26: 171-178.

**SISSAY, M. M., UGGLA, A. y WALLER, P. J. (2007):** Epidemiology and seasonal dynamics of gastrointestinal nematode infections of sheep in a semi-arid region of eastern Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 143: 311-321.

**SIVARAJ, S., DORNY, P., VERCRUYSSSE, J. y PANDEY, V. S. (1994):** Multiple and multigeneric anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Vet. Parasitol.* 55: 159-165.

**SKUCE, P. J., REDMOND, D. L., LIDDELL, S., STEWART, E. M., NEWLANDS, G. F., SMITH, W. D. y KNOX, D. P. (1999a):** Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 119: 405-412.

**SKUCE, P. J., STEWART, E. M., SMITH, W. D. y KNOX, D. P. (1999b):** Cloning and characterization of glutamate dehydrogenase (GDH) from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 118: 297-304.

SKUCE, P. J., NEWLANDS, G. F. J., STEWART, M. y SMITH, W. D. (2001): Cloning and characterisation of thrombospondin, novel multidomain glycoprotein found in association with a host protective gut extract from *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117: 241-244.

SLOANE, B. F., MOIN, K. y ROZHIN, J. (1990): Cathepsin B and its endogenous inhibitors: role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 1: 153-160.

SLOSS, M. W., KEMP, R. L. y ZAJAC, A. M. (1994): Veterinary Clinical Parasitology. Editado por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L. *American Association of Veterinary Parasitologists*. Iowa. USA.

SMITH, A. L., HESKETH, P., ARCHER, A. y SHIRLEY, M. W. (2002): Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infect Immun.* 70: 2472-2479.

SMITH, A. M., DOWD, A. J., HEFFERNAN, M., ROBERTSON, C. D. y DALTON, J. P. (1993a): *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int. J. Parasitol.* 23: 977-983.

SMITH, A. M., DALTON, J. P., CLOUGH, K. A., KILBANE, C. L., HARROP, S. A., HOLE, N. y BRINDLEY, P. J. (1994): Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 11-19.

SMITH, G. (1990): Chemotherapy: future problems. In: Schad, G.A., Warren, K.S. (Eds.), Hookworm Disease: Current Status and New Directions. Taylor & Francis, London, U.K.: 291-303.

SMITH, S. K. y SMITH, W. D. (1996): Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. *Res. Vet. Sci.* 60: 1-6.

SMITH, S. K., PETTIT, D., NEWLANDS, G. F. J., REDMOND, D. L., SKUCE, P. J., KNOX, D. P. y SMITH, W. D. (1999): Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 21: 187-199.

SMITH, T. S., MUNN, E. A., GRAHAM, M., TAVERNOR, A. S. y GREENWOOD, C. A. (1993b): Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 23: 271-280.

SMITH, T. S., GRAHAM, M., MUNN, E. A., NEWTON, S. E., KNOX, D. P., COADWELL, W. J., MCMICHAEL-PHILLIPS, D., SMITH, H., SMITH, W. D. y OLIVER, J. J. (1997): Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochim Biophys Acta* 1338: 295-306.

SMITH, W. D. y CHRISTIE, M. G. (1979): *Haemonchus contortus*: Some factors influencing the degree of resistance of sheep immunized with attenuated larvae. *J. Comp. Pathol.* 89: 141-150.

SMITH, W. D., JACKSON, E. y JACKSON, F. (1982): Attempts to immunise sheep against *Ostertagia circumcincta* with irradiated larvae. *Res. Vet. Sci.* 32: 101-105.

SMITH, W. D. (1999): Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int. J. Parasitol.* 29: 17-24.

SMITH, W. D., SMITH, S. K. y PETTIT, D. (2000a): Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasite Immunol.* 22: 239-247.

SMITH, W. D., SMITH, S. K., PETTIT, D., NEWLANDS, G. F. y SKUCE, P. J. (2000b): Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 22: 63-71.

SMITH, W. D., PETTIT, D. y SMITH, S. K. (2001): Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 23: 203-211.

SMITH, W. D., SKUCE, P. J., NEWLANDS, G. F., SMITH, S. K. y PETTIT, D. (2003): Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunol.* 25: 521-530.

SMITH, W. D. (2007): Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 148: 356-359.

SOULSBY, E. J. L. (1988): *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*. 7ª edición. Interamericana, México, D. F. México.

SOUTELLO, R. G., SENO, M. C. y AMARANTE, A. F. (2007): Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 148: 360-364.

SOUZA, M. M., BEVILAQUA, C. M., MORAIS, S. M., COSTA, C. T., SILVA, A. R. y BRAZ-FILHO, R. (2008): Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80: 271-277.

STANKIEWICZ, M., HADAS, E., SHAW, R. y GREEN, R. (2000): Immunisation of lambs with drug-abbreviated *Haemonchus contortus* infections: protection against homologous and heterologous challenge. *Parasitol Res.* 86: 758-761.

STEAR, M. J., DOLIGALSKA, M. y DONSKOW-SCHMELTER, K. (2007): Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitol.* 134: 139-151.

STEAR, M. J., BOAG, B., CATTADORI, I. y MURPHY, L. (2009): Genetic variation in resistance to mixed, predominantly *Teladorsagia circumcincta* nematode infections of sheep: from heritabilities to gene identification. *Parasite Immunol.* 31: 274-282.

STEVENSON, L. A., CHILTON, N. B. y GASSER, R. B (1995): Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA second internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* 25: 483-488.

STOCKDALE, H. D., GIVENS, M. D., DYKSTRA, C. C. y BLAGBURN, B. L. (2009): *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Vet. Parasitol.* 160: 13-17.

STRAIN, S. A. J. y STEAR, M. J. (2001): The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 23: 523-531.

STROMBERG, B. E. (1997): Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72: 247-256.

SUAREZ, V. H. y BUSETTI, M. R. (1995): The epidemiology of helminth infections of growing sheep in Argentina's western pampas. *Int. J. Parasitol.* 25: 489-494.

SUCHITRA, S. y JOSHI, P. (2005): Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochim. Acta* 1722: 293-303.

TADESSE, D., EGUALE, T., GIDAY, M. y MUSSA, A. (2009): Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.* 122: 240-244.

TAKALA, S. L., COULIBALY, D., THERA, M. A., DICKO, A., SMITH, D. L., GUINDO, A. B., KONE, A. K., TRAORE, K., OUATTARA, A., DJIMDE, A. A., SEHDEV, P. S., LYKE, K. E., DIALLO, D. A., DOUMBO, O. K. y PLOWE, C. V. (2007): Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali. *PLoS Med.* 4: e93.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. y KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

TANTRAWATPAN, C., MALEEWONG, W., WONGKHAM, C., WONGKHAM, S., INTAPAN, P. M. y NAKASHIMA, K. (2005): Serodiagnosis of human fascioliasis by a cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72: 82-86.

TARIQ, K. A., CHISHTI, M. Z., AHMAD, F. y SHAWL, A. S. (2008a): Epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep managed under traditional husbandry system in Kashmir valley. *Vet. Parasitol.* 158: 138-143.

TARIQ, K. A., CHISHTI, M. Z., AHMAD, F. y SHAWL, A. S. (2008b): Anthelmintic efficacy of *Achillea millifolium* against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Helminthol.* 82: 227-233.

TARIQ, K. A., CHISHTI, M. Z., AHMAD, F. y SHAWL, A. S. (2009): Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet. Parasitol.* 160: 83-88.

TAYLOR, W. A., BOOMKER, J., KRECEK, R. C., SKINNER, J. D. y WATERMEYER, R. (2005): Helminths in sympatric populations of mountain reedbuck (*Redunca fulvorufula*) and gray rhebok (*Pelea capreolus*) in South Africa. *J. Parasitol.* 91: 863-870.

TERRILL, T. H., MOSJIDIS, J. A., MOORE, D. A., SHAIK, S. A., MILLER, J. E., BURKE, J. M., MUIR, J. P. y WOLFE, R. (2007): Effect of pelleting on efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146: 117-122.

THOMAS, M. D. (2004): BIOQUÍMICA. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ª edición. Editorial Reverté, S.A. España.

TIMOTEO, O., MACO, V. JR., MACO, V., NEYRA, V., YI, P. J., LEGUÍA, G., ESPINOZA, JR. (2005): Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 77-86.

TIWARI, J., KUMAR, S., KOLTE, A. P., SWARNKAR, C. P., SINGH, D. y PATHAK, K. M. (2006): Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet. Parasitol.* 138: 301-307.

TORRES-ACOSTA, J. F. y JACOBS, D. E. (1999): Duration of activity of oral moxidectin against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Vet. Rec.* 144: 648-649.

TORRES-ACOSTA, J. F., JACOBS, D. E., AGUILAR-CABALLERO A. J., SANDOVAL-CASTRO, C., COB-GALERA, L. y MAY-MARTÍNEZ, M. (2006): Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* 135: 163-173.

TORT, J., BRINDLEY, P. J., KNOX, D., WOLFE, K. H. y DALTON, J. P. (1999): Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv. Parasitol.* 43: 161-266.

TRAP, C. y BOIREAU, P. (2000): Proteases in helminthic parasites. *Vet. Res.* 31: 461-471.

TROELL, K., MATTSSON, J. G., ALDERBORN, A. y HÖGLUND, J. (2003): Pyrosequencing analysis identifies discrete populations of *Haemonchus contortus* from small ruminants. *Int. J. Parasitol.* 33: 765-771.

TROELL, K., ENGSTRÖM, A., MORRISON, D. A., MATTSSON, J. G. y HÖGLUND, J. (2006a): Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *Int. J. Parasitol.* 36: 1305-1316.

TROELL, K., TINGSTEDT, C. y HÖGLUND, J. (2006b): Phenotypic characterization of *Haemonchus contortus*: a study of isolates from Sweden and Kenya in experimentally infected sheep. *Parasitol.* 132: 403-409.

- TYRRELL, K. L., DOBSON, R. J., STEIN, P. A. y WALKDEN-BROWN, S. W. (2002): The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 107: 85-93.
- UHLINGER, C., FLERNING, S. y MONCOL, D. (1992): Survey for drug resistant gastrointestinal nematodes in 13 commercial sheep flocks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201: 77-80.
- UPPAL, R. P., YADAV, C. L., BODARA, P. y RANA, Z. S. (1992): Multiple anthelmintic resistance in a field strain of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Res. Comm.* 16: 195-198.
- URIARTE, J., LLORENTE, M. M. y VALDERRÁBANO, J. (2003): Seasonal changes of gastrointestinal nematode burden in sheep under an intensive grazing system. *Vet. Parasitol.* 118: 79-92.
- URQUHART, G. M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L., DUNN, A. M. y JENNINGS, F. W. (2001): *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia.
- VALDERRÁBANO, J., GOMEZ-RINCÓN, C. y URIARTE, J. (2006): Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 141: 122-131.
- VAN DIJK, J., DE LOUW, M. D., KALIS, L. P. y MORGAN, E. R. (2009): Ultraviolet light increases mortality of nematode larvae and can explain patterns of larval availability at pasture. *Int. J. Parasitol.* 39: 1151-1156.
- VAN WYK, J. A., MALAN, F. S., GERBER, H. M. y ALVES, R. M. R. (1989): The problem of escalating resistance to *H. contortus* to the modern anthelmintics in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 56: 41-49.
- VAN WYK, J. A. y BATH, G. F. (2002): The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res.* 33: 509-529.
- VANIMISETTI, H. B., GREINER, S. P., ZAJAC, A. M. y NOTTER, D. R. (2004): Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to *Haemonchus contortus*. *J. Anim. Sci.* 82: 595-604.

VÁRADY, M., PARASLICKA, J. y ČORBA, J. (1994): Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int. J. Parasitol.* 24: 335-340.

VEGLIA, F. (1915): *The Anatomy and Life History of Haemonchus contortus (Rud.)*, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> reports of the director of Veterinary Research, pp: 347-500. South Africa: Departament of Agriculture.

VELASCO, G., FERRANDO, A. A., PUENTE, X. S., SÁNCHEZ, L. M. y LÓPEZ-OTÍN, C. (1994): Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J. Biol. Chem.* 269: 27136-27142.

VERITY, C. K., MCMANUS, D. P. y BRINDLEY, P. J. (2001): Vaccine efficacy of recombinant cathepsin D aspartic protease from *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol.* 23: 153-162.

VERVELDE, L., VAN LEEUWEN, M. A. W., KRUIDENIER, M., KOOYMAN, F. N., HUNTLEY, J. F., VAN DIE, I. y CORNELISSEN, A. W. (2002): Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 24: 189-201.

VIEIRA, L. S., BERNE, M. E., CAVALCANTE, A. C. y COSTA, C. A. (1992): *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. *Vet. Parasitol.* 45: 111-116.

VIZOSO, F. J., MARTÍNEZ, A., VÁZQUEZ, J., LAMELAS, M. L., RODIL, A. y GARCÍA, J. L. (2000): Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos. *Cirugía Española.* 68: 471-485.

VLASSOFF, A., LEATHWICK, D. M. y HEATH, A. C. (2001): The epidemiology of nematode infections of sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 49: 213-221.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., HARDER, A. y SCHNIEDER, T. (2002): Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *Int. J. Parasitol.* 32: 1529-1535.

WAGHORN, T. S., LEATHWICK, D. M., CHEN, L.-Y., GRAY, R. A. J. AND SKIPP, R. A. (2002): Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* in New Zealand. *Vet. Parasitol.* 104: 119-129.

WAGLAND, B. M., ABEYDEERA, L. R., ROTHWELL, T. L. y OUWERKERK, D. (1989): Experimental *Haemonchus contortus* infections in guinea pigs. *Int. J. Parasitol.* 19: 301-305.

WAHAB, A. R. y SUHAILA ABD, H. (2007): Morphological characterization of *Haemonchus contortus* in goats (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) in Penang, Malaysia. *Trop. Biomed.* 24: 23-27.

WAKELIN, D., FARIAS, S. E. y BRADLEY, J. E. (2002): Variation and immunity to intestinal worms. *Parasitol.* 125: S39-S50.

WALLACE, D. S., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., FISHWICK, G., GILL, M., HOLMES, P. H., MCKELLAR, Q. A., MURRAY, M., PARKINS, J. J. y STEAR, M. J. (1995): Influence of supplementation with dietary soyabean meal on resistance to haemonchosis in Hampshire down lambs. *Research in Veterinary Science* 58: 232-237.

WALLACE, D. S., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., FISHWICK, G., HOLMES, P. H., MCKELLAR, Q. A., MURRAY, M., PARKINS, J. J. y STEAR, M. J. (1996): Influence of soyabean meal supplementation on the resistance of Scottish Blackface lambs to haemonchosis. *Research in Veterinary Science* 60: 138-143.

WALLACE, D. S., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., ECKERSALL, P. D., FISHWICK, G., GILL, M., HOLMES, P. H., MCKELLAR, Q. A., MURRAY, M., PARKINS, J. J. y STEAR, M. J. (1998): The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 116: 67-72.

WALLACE, D. S., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., ECKERSALL, P. D., FISHWICK, G., HOLMES, P. H., MCKELLAR, Q. A., MITCHELL, S., MURRAY, M., PARKINS, J. J. y STEAR, M. J. (1999): The influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. *Animal Science* 69: 457-463.

WALLER, P. J., RUDBY-MARTIN, L., LJUNGSTRÖM, B. L. y RYDZIK, A. (2004a): The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Vet. Parasitol.* 122: 207-220.

WALLER, P. J., SCHWAN, O., LJUNGSTRÖM, B. L., RYDZIK, A. y YEATES, G.W. (2004b): Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Vet. Parasitol.* 126: 299-315.

WALLER, P. J. y CHANDRAWATHANI, P. (2005): *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine* 22: 131-137.

WALLER, P. J. y THAMSBORG, S. M. (2005): Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology* 20: 493-497.

WALLER, P. J., RYDZIK, A., LJUNGSTRÖM, B. L. y TÖRNQUIST, M. (2006): Towards the eradication of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Sweden. *Vet. Parasitol.* 136: 367-372.

WANG, C. R., QIU, J. H., ZHU, X. Q., HAN, X. H., NI, H. B., ZHAO, J. P., ZHOU, Q. M., ZHANG, H. W. y LUN, Z. R. (2006): Survey of helminths in adult sheep in Heilongjiang Province, People's Republic of China. *Vet. Parasitol.* 140: 378-382.

WANG, J., YAN, R., XU, L. y LI, X. (2007): The second glutamic acid in the C-terminal CRD affects the carbohydrate-binding properties of recombinant galectins of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 148: 247-255.

WANG, Z. F., HAMRICK, J. L. y GODT, M. J. (2004): High genetic diversity in *Sarracenia leucophylla* (Sarraceniaceae), a carnivorous wetland herb. *J. Hered.* 95: 234-243.

WARUIRU, R. M., NGOTHO, J. W. y MUKIRI, J. G. (1997): Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* on a sheep farm in Kenya. *Vet. Res. Com.* 21: 483-491.

WASILEWSKI, M. M., LIM, K. C., PHILLIPS, J. y MCKERROW, J. H. (1996): Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81: 179-189.

- 
- WATKINS, A. R. y FERNANDO, M. A. (1984): Arrested development of the rabbit stomach worm *Obeliscoides cuniculi*: manipulations of the ability to arrest through processes of selection. *Int. J. Parasitol.* 14: 559-570.
- WEBB, R. F., MCCULLY, C. H. y ADAMS, B. S. (1979): The efficiency of oxfendazole against four field populations of benzimidazole resistant *Haemonchus contortus*. *Australian Veterinary Journal* 55: 249-250.
- WEBSTER, J. P., SHRIVASTAVA, J., JOHNSON, P. J. y BLAIR, L. (2007): Is host-schistosome coevolution going anywhere? *BMC Evol Biol.* 13: 7: 91.
- WEDRYCHOWICZ, H., KESIK, M., KALINIAK, M., KOZAK-CIESZCZYK, M., JEDLINA-PANASIUK, L., JAROS, S. y PLUCIENNICZAK, A. (2007): Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet. Parasitol.* 147: 77-88.
- WESTON, D., PATEL, B. y VAN VOORHIS, W. C. (1999): Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98: 105-116.
- WHARTON, D. A. (1982): The survival of desiccation by the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Parasitol.* 84: 455-462.
- WHITE, A. C. JR., MOLINARI, J. L., PILLAI, A. V. y REGE, A. A. (1992): Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J. Parasitol.* 78: 281-287.
- WHITE, A. C. JR., BAIG, S. y ROBINSON, P. (1996): *Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases. *J. Parasitol.* 82: 7-10.
- WHITE A. C. JR., BAIG, S. y CHAPPELL, C. L. (1997): Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 243-253.
- WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G. S. y HUNGERFORD, J. (1995): Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitol.* 110: S43-50.
-

WILLIAMS, B. y WARREN, J. (2004): Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103: 237-243.

WILLIAMSON, A. L., ABBENANTE, G., BRINDLEY, P. J., PROCIV, P., GIRDWOOD, K., BERRY, C., PRITCHARD, D. I., FAIRLIE, D., HOTEZ, P. J., DALTON, J. P. y LOUKAS, A. (2002): Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its contribution to host-specificity. *FASEB J.* 16: 1458-1460.

WILLIAMSON, A. L., BRINDLEY, P. J., ABBENANTE, G., DATU, B. J., PROCIV, P., BERRY, C., GIRDWOOD, K., PRITCHARD, D. I., FAIRLIE, D. P., HOTEZ, P. J., ZHAN, B. y LOUKAS, A. (2003): Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *J. Infect. Dis.* 187: 484-494.

WILSON, L. R., GOOD, R. T., PANACCIO, M., WIJFFELS, G. L., SANDEMAN, R. M. y SPITHILL, T. W. (1998): *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 88: 85-94.

WINDOND, R. G. (1991): Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep. *Rev. Sci. Tech.* 9: 555-576.

WOLSTENHOLME, A. J. y ROGERS, A. T. (2005): Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitol.* 131 Suppl: S85-95.

WONG, J. Y. y OPDEBEECK, J. P. (1993): Immunity in vaccinated cattle exposed to experimental and natural infestations with *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.* 23: 689-692.

WONG, J. Y., HARROP, S. A., DAY, S. R. y BRINDLEY, P. J. (1997): Schistosomes express two forms of cathepsin D. *Biochim. Biophys. Acta* 1338: 156-160.

WONGKHAM, C., TANTRAWATPAN, C., INTAPAN, P. M., MALEEWONG, W., WONGKHAM, S. y NAKASHIMA, K. (2005): Evaluation of immunoglobulin G subclass antibodies against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1152-1156.

- 
- WOOTTON, J. C., FENG, X., FERDIG, M. T., COOPER, R. A., MU, J., BARUCH, D. I., MAGILL, A. J. y SU, X. Z. (2002): Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature, London* 418: 320-323.
- XU, M., MOLENTO, M., BLACKHALL, W., RIBEIRO, P., BEECH, R., PRICHARD, R. (1998): Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 327-335.
- YADAV, C. L., UPPAL, R. D. y KALRA, S. (1993): An outbreak of haemonchosis associated with anthelmintic resistance in sheep. *Int. J. Parasitol.* 23: 411-413.
- YADAV, S. C., SAINI, M., RAINA, O. K., NAMBI, P. A., JADAV, K. y SRIVENY, D. (2005): *Fasciola gigantica* cathepsin-L cysteine proteinase in the detection of early experimental fasciolosis in ruminants. *Parasitol. Res.* 97: 527-534.
- YAMASAKI, H., KOMINAMI, E. y AOKI, T. (1992): Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke *Fasciola* spp. *Parasitol. Res.* 78: 574-580.
- YANG, S. H., PARK, J. O., LEE, J. H., JEON, B. H., KIM, W. S., KIM, S. I., YUN, K. J., JEONG, E. T., LEE, K. W., KIM, Y. M., LEE, M. H. y PARK, H. (2004): Cloning and characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 87-92.
- YANG, Y., WEI, H., QIN, W. y ZHENG, J. (2009): Expression and characterization of aspartic protease gene in eggs and larvae stage of *Ancylostoma caninum*. *Parasitol. Res.* 104: 1327-1333.
- YANMING, S., RUOFENG, Y., MULEKE, C. I., GUANGWEI, Z., LIXIN, X. y XIANGRUI, L. (2007): Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 29: 319-326.
- YATSUDA, A. P., KRIJGSVELD, J., CORNELISSEN, A. W., HECK, A.J.R. y DE VRIES, E. (2003): Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J. Biol. Chem.* 278: 16941-16951.
-

YAZWINSKI, T. A., GOODE, L., MONCOL, D. J., MORGAN, G. W. y LINNERUD, A. C. (1980): *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. *J. Anim. Sci.* 51: 279-284.

YUN, D. H., CHUNG, J. Y., CHUNG, Y. B., BAHK, Y. Y., KANG, S. Y., KONG, Y. y CHO, S. Y. (2000): Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of *Paragonimus westermani* expressed in the definitive host stage. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7: 932-939.

ZAGO, M. P., BARRIO, A. B., CARDOZO, R. M., DUFFY, T., SCHIJMAN, A. G. y BASOMBRÍO, M. A. (2008): Impairment of infectivity and immunoprotective effect of a LYT1 null mutant of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 76: 443-451.

ZAJAC, A. M. (2006): Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 22: 529-541.

ZHAN, B., HOTEZ, P. J., WANG, Y. y HAWDON, J. M. (2002): A developmentally regulated metalloprotease secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae is a member of the astacin family of proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120: 291-296.

ZHOU, D. M., YI, X. Y., ZENG, X. F., WANG, M. y MCREYNOLDS, L. (2001): Immunity against *Schistosoma japonicum* induced by phage display peptides mimicking antigenic epitopes of *Trichinella spiralis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 19: 268-271.

ZHU, X., SPRATT, D. M., BEVERIDGE, I., HAYCOCK, P. y GASSER, R. B. (2000): Mitochondrial DNA polymorphism within and among species of *Capillaria* sensu lato from Australian marsupials and rodents. *Int. J. Parasitol.* 30: 933-938.



## 11.1. FIGURAS

**Fig. 58.** Secuencias alineadas de los diferentes alelos encontrados en el gen GCP-7. Número de secuencias=7; número de posiciones alineadas=670; posiciones homólogas= (.); posiciones ausentes= (-)

<b>M-A<sub>7</sub></b>	TGC	GGA	TAT	GGG	TAT	GTT	TCA	TCT	TGA	ATA	TGT	GTT	TAG	ACG	CTT	GCC	[ 48]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	...	...	..C	...	..G	...	...	...	A.G	C..	..C	T..	C..	G..	..C	...	[ 48]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	...	...	..C	...	...	...	...	...	C.G	...	...	...	...	...	...	...	[ 48]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	...	...	..C	...	..G	...	...	...	C.G	C..	..C	T..	C..	G..	..C	...	[ 48]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	...	...	..C	...	..G	...	...	...	..G	C..	..C	T..	C..	G..	..G	A..	[ 48]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	...	...	...	...	..G	...	...	...	A.G	C..	..C	T.C	C..	G..	..C	...	[ 48]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	...	...	..C	...	..G	...	..GC	...	A..	..-	A..	T..	...	..C	..C	..T	[ 48]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	AAT	TTA	CCT	---	CCT	TTA	CGG	TAG	-TC	TAG	AAA	GCC	TCA	TGA	GCA	TAG	[ 96]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	...	...	...	---	.G.	...	T..	...	GC.	...	...	..TT	.A.	...	.T.	...	[ 96]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	...	...	...	TTA	...	...	...	...	-.	...	...	..T	...	...	...	...	[ 96]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	...	...	...	---	.G.	...	T..	...	GC.	...	...	..TT	...	...	.T.	...	[ 96]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	...	...	...	---	.G.	...	T..	...	GC.	...	...	..TT	.T.	...	.T.	...	[ 96]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	...	...	...	---	.G.	...	T..	...	GC.	...	...	..TT	.A.	...	.T.	...	[ 96]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	..A	...	...	---	.T.	...	T..	...	-T	...	...	TTA	A..	...	.T.	...	[ 96]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	CAG	TAG	CTG	TCA	CAA	GGA	AAA	AAT	GGG	TTA	GGA	TTT	CTG	CTA	-AT	---	[144]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	...	...	...	...	T..	A.G	...	..-	...	...	...	...	..G	T..	---	[144]	
<b>M-C<sub>7</sub></b>	...	...	...	...	...	A..	...	---	---	---	---	...	T.G	T..	---	[144]	
<b>M-D<sub>7</sub></b>	...	...	...	...	T..	A.G	...	C..	...	...	...	...	..G	T..	---	[144]	
<b>M-E<sub>7</sub></b>	...	...	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[144]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	...	...	...	C..	T..	A.G	...	...	...	...	...	...	..G	T..	---	[144]	
<b>M-G<sub>7</sub></b>	...	..A	...	A..	...	AA.	..G	GG.	---	..G	..G	...	G..	T.G	T..	TTA	[144]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	-AA	GTG	AGA	CTT	TCG	ACA	AAT	TGA	GAC	CTG	TAC	AAA	TAC	AAA	CTA	T-G	[192]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	..	...	.T.	...	C..	..C	---	---	---	---	..	...	...	...	..T.	[192]	
<b>M-C<sub>7</sub></b>	-G.	.G.	T.G	..C	C..	G..	...	..C	...	...	C..	..T	...	GT.	...	.T.	[192]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	..	...	.T.	...	C..	..C	...	...	...	...	C..	...	...	...	..T.	[192]	
<b>M-E<sub>7</sub></b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[192]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	..	...	.T.	...	C..	..C	---	---	---	---	---	...	...	...	..T.	[192]	
<b>M-G<sub>7</sub></b>	G..	..AA	G..	...	...	T..	...	A.C	...	..C.	C..	..G	...	GT.	...	CT.	[192]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	TAT	AAC	ATA	ATA	---	GGT	TAG	GCG	GTC	TAC	TAC	TTA	CTG	CTT	GTC	AAT	[240]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	.G.	..T	...	..ATA	..A.	..T	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	...	GCT	...	..C.	---	..A.	..TA	T.T	...	C..	...	...	...	...	...	...	[240]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	...	G.T	...	..ATA	..A.	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	---	---	---	---	---	---	..T	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	[240]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	.G.	..T	...	..ATA	..A.	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	...	---	---	---	---	..A	..T	..A	...	...	...	..G	...	C..	...	...	[240]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	ATA	---	---	---	---	---	CAA	GTT	CT-	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	...	---	---	---	---	---	..AC.	..-	---	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	...	---	---	---	---	---	..A.	..-	---	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	...	---	---	---	---	---	..AC.	..-	---	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	..T	---	---	---	---	---	..AC.	..-	---	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	...	---	---	---	---	---	..AC.	..-	---	---	---	---	---	---	---	---	[288]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	...	ACT	CTC	TAA	CTC	TAT	.G.	AC.	..A	TAA	CTC	TCT	ATA	ACT	CTA	ATA	[288]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	---	--C	TAT	CGA	AAT	CTC	TCA	CTA	AAA	TCA	TAG	GGT	TAG	GG-	---	---	[336]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	---	..-	...	...	..T.	G..	...	...	...	..A.	C..	...	...	..-	---	---	[336]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	---	---	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	..-	---	---	[336]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	---	---	...	...	..G.	...	...	...	...	..A.	C..	...	..A.	..G	TTT	TTA	[336]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	---	--T	...	..A.	..G.	...	...	...	...	..A.	C..	...	..A.	..G	TTT	TCG	[336]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	---	---	C..	...	..T.	G..	...	...	...	..A.	C..	...	..-	---	---	---	[336]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	ACT	CT.	...	...	..A.	..T	T..	...	..A.T	C.T	TA.	...	..-	TTT	TTG	...	[336]

11. Anexos

<b>M-A<sub>7</sub></b>	-AA	CCT	AGA	CAG	TTT	GGG	ATA	TAT	GTA	CAT	GTA	GGT	GCA	CTG	AGC	GCA	[384]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	-. .	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	. . .	A.-	----	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	-G.	. . .	. . .	. . .	. . .	.A	. . .	.- -	----	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	G..	.T.	. . .	. . .	.- .	G..	. . .	.- -	----	T..	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	G..	.T.	. . .	. . .	C..	. . .	G..	.- -	----	T..	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	-.G	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	. . .	A.-	----	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	G..	.A.	. . .	.A	A..	. . .	. . .	.- -	----	. . .	. . .	. . .	.T.	. . .	. . .	. . .	[384]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	TGT	AGT	CTT	GAT	TTG	CTT	TTA	GAT	GCG	ATG	GAG	GAT	ACA	ATG	CTC	GAG	[432]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	. .G	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[432]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	. .G	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[432]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	. .A	. . .	. . .	. . .	. . .	G..	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.T.	[432]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	. .A	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[432]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	. .G	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[432]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	. .G	. . .	.C.	.G.	. . .	. . .	. . .	. . .	.T.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[432]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	CGT	GGA	AAT	GGG	CAA	CAA	TTG	CCG	GTG	TAG	TCA	CGG	GTG	GAG	CAT	ATA	[480]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.C.	. . .	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	.A.	. . .	. . .	. . .	[480]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	.A.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.A.	. . .	. . .	. . .	[480]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	.A.	. . .	. . .	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	.A.	. . .	.A	. . .	[480]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	.A.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.A.	. . .	. . .	. . .	[480]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.C.	. . .	. . .	. . .	.G.	. . .	. . .	.A.	. . .	. . .	. . .	[480]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	.A.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.G.	.T.	. . .	.A.	. . .	.G.	. . .	[480]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	AGG	AGA	AGG	TAA	GTA	AAA	GGA	AAG	TTA	AAC	AAC	GTT	AGA	ACC	AGA	CAA	[528]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	G..	.G	.A	.C.	. . .	.TT	. . .	. . .	.T	. . .	. . .	[528]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	T..	G..	.G	.A	.C.	.CT	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[528]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	G..	.G	.A	.C.	.CT	. . .	.C	. . .	. . .	. . .	. . .	[528]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	. . .	.A.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.T	. . .	.C	. . .	. . .	. . .	T..	[528]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	.G	.A	.C.	. . .	.TT	. . .	. . .	.T	. . .	. . .	[528]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	G..	.G	.A	.C.	.CT	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[528]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	CC-	----	----	--A	C--	GGT	TTT	A--	----	----	----	----	----	----	----	----	[576]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	. .-	----	----	-. .	.TG	A..	. .C	.GG	GCT	ATT	TTT	CTC	GTG	GAA	AGG	CCT	[576]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	. .-	----	----	-. .	.TA	A..	. .C	.GG	GCT	ATT	TTT	CT-	----	----	----	----	[576]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	. .-	----	----	-. .	.TG	A..	. .C	.GG	GCT	ATT	TTT	CTC	GTG	AAA	AGG	CCT	[576]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	. .T	TGT	TGA	GA.	.AC	A..	. .G	.GG	GCT	ATT	TCT	CTC	GTA	GAA	ATG	--T	[576]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	. .-	----	----	-. .	.TG	A..	G..	.GG	GCT	ATT	TTT	TT-	GTG	AAA	ACG	CTT	[576]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	. .-	----	----	-. .	.TG	A..	. .C	.GG	GCT	ATT	TTT	CTG	GTG	GAA	AGG	CCT	[576]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	--T	GTA	AAA	AGG	ACT	CTT	TTA	GGG	TAA	CTG	TAA	ACC	TTA	CGT	TTT	CCC	[624]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	TA.	. .G	G..	-.A	.GC	. . .	.C.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	--C	. .G	. . .	. . .	.G.	. . .	AC.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	TA.	. .G	. . .	. . .	.G.	. . .	C..	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	AA.	T.G	. . .	.A	.GC	. . .	.C.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	TA.	. .G	. . .	.A	.AC	T..	.C.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	TA.	. .G	.G.	.A	.GC	. . .	.C.	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[624]
<b>M-A<sub>7</sub></b>	TCA	ATG	TGG	AGC	CCA	CAA	AGG	GAA	GGC	ATT	CAA	CAA	TTG	TCC	GTC	A	[670]
<b>M-B<sub>7</sub></b>	A..	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]
<b>M-C<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]
<b>M-D<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]
<b>M-E<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]
<b>M-F<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]
<b>M-G<sub>7</sub></b>	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	[670]

**Fig. 59.** Secuencias alineadas de los diferentes alelos encontrados en el gen AC-1. Número de secuencias=7; número de posiciones alineadas=325; posiciones homólogas= (.); posiciones ausentes=(-).

<b>M-A<sub>1</sub></b>	TGA	CGT	GCT	GCA	GGC	CAC	AGT	GCG	GTG	ACG	GGT	AAA	ATT	TCG	TAG	TA	[ 48]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	..	[ 48]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T.C	...	...	.G	[ 48]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T.C	...	...	.G.	[ 48]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	...	.T.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T.C	...	...	.G.	[ 48]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T.C	...	...	CG.	[ 48]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 48]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	TGA	CTC	TCA	GAG	CAC	GGA	AAT	AAG	TAT	ATA	GCC	CCA	TTT	GTC	TTA	ATA	[ 96]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	..G	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	AA.	.A.	...	[ 96]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	A..	...	...	...	..C	...	...	...	..T	...	T..	...	AA.	.G.	...	[ 96]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	A..	...	...	...	..C	...	...	...	..T	...	T..	...	AA.	.G.	...	[ 96]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	A..	...	...	...	..C	...	...	...	..T	...	T..	...	AA.	.G.	...	[ 96]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	..C	...	T..	A..	AA.	...	...	[ 96]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	ATT	CAT	TGT	TTC	AGG	TGT	GAA	GGA	GGA	TGG	CCT	ATC	GAA	GCT	TGG	AAA	[144]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	..C	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	..C	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	..C	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	G..	T.C	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	TAC	TTC	ATA	TAT	GAC	GGC	GTT	GTT	TCT	GGA	GGA	GAA	TAC	CTC	ACT	AAA	[192]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	..A	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	GTG	AGA	TAA	CTA	TTC	CTA	ATA	TTA	TTT	GCC	GAA	ATG	TTC	TAG	CAG	TCT	[240]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	..T.	...	...	..A	T..	A..	[240]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	..T.	...	...	..T.	A..	...	[240]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	..T.	...	...	..T.	A..	...	[240]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	..T.	...	...	..T.	A..	...	[240]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	..G	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	..T.	...	...	[240]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	..T.	...	...	..T.	A..A	...	[240]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	TGA	CAT	TAG	GAT	GTA	TGC	CGC	CCT	TAT	CCA	ATT	CAC	CCA	TGT	GGA	CAT	[288]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	..C	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	[288]
<b>M-A<sub>1</sub></b>	CAC	GGA	AAC	GAC	ACC	TAC	TAC	GGG	GAA	TGC	CGT	GGA	A				[325]
<b>M-B<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]
<b>M-C<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]
<b>M-D<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]
<b>M-E<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]
<b>M-F<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]
<b>M-G<sub>1</sub></b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...				[325]

11. Anexos

**Fig. 60.** Secuencias alineadas de los diferentes alelos encontrados en el gen AC-3. Número de secuencias=8; número de posiciones alineadas=308; posiciones homólogas=(.); posiciones ausentes=(-).

<i>M-A<sub>3</sub></i>	ATG	CGG	TTT	TGG	GTG	AGA	TTT	CAT	GGC	TTG	ATT	TCA	CAT	AAC	ATT	AGC	[ 48 ]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C.	...	...	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..AA	.CA	.C.	...	..A	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C.	...	...	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C.	...	...	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C.	...	...	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	.C.	...	..A	...	...	...	[ 48 ]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	..A	.C.	.T.	..-	---	---	---	[ 48 ]
<i>M-A<sub>3</sub></i>	AAT	GAC	GAG	ACA	CTC	TTT	ATC	TAT	AAG	CAT	CAT	TTC	TTG	GTT	TAG	ATG	[ 96 ]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	.C.	...	...	...	.AT	...	...	..C	...	T..	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	.C.	...	T.T	...	.T	C..	...	..A	T..	T.C	.G	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	.C.	...	...	...	.AT	...	...	..C	...	T..	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	.C.	...	...	...	.AT	...	...	..C	...	T..	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	.C.	...	...	...	.AT	...	...	..C	...	T..	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	.C.	...	T..	...	.T	.C.	.C.	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	---	---	...	...	.CT	...	...	G.-	T..	...	...	...	...	...	...	...	[ 96 ]
<i>M-A<sub>3</sub></i>	TGA	CGG	AGG	CTG	GTC	TAT	CAA	AGC	GTG	GGA	ATA	CTT	CAC	ATA	CGC	AGG	[144]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	G..	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-A<sub>3</sub></i>	ACT	CGT	TTC	TGG	AGG	AGA	GTA	CCG	TAG	TAA	AGT	GAG	ATC	-TT	ACG	ACT	[192]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G..	G..	..-	[192]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	[192]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	G..	G..	..-	[192]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G..	G..	..-	[192]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.G	G..	...	[192]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	..A	G..	...	.A.	[192]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	[192]
<i>M-A<sub>3</sub></i>	TCA	GTA	ATG	AAT	AAT	CGT	GTC	TTA	CTG	GTT	CAA	CAT	TTT	TGA	CAA	TAG	[240]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	--	A.T	...	...	...	...	...	..G	TCA	.C.	...	...	...	C..	...	...	[240]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	.C.	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	--	A.T	...	...	...	...	...	..G	TCA	.C.	...	...	...	C..	...	...	[240]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	--	A.T	...	...	...	...	...	..G	TCA	.C.	...	...	...	C..	...	...	[240]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	...	A..	...	...	..A	...	..G	...	...	.C.	...	...	...	C..	...	...	[240]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	...	.C.	...	...	...	...	...	...	...	.C.	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	...	A..	...	...	...	...	..G	..A	.C.	...	..G.	.C.	.C.	...	...	...	[240]
<i>M-A<sub>3</sub></i>	AGG	TGT	TGC	CGT	CCT	TAT	CCG	ATC	CAT	CCT	TGT	GGA	CAT	CAC	GGA	AAT	[288]
<i>M-B<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-C<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-D<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-E<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-F<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-G<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-H<sub>3</sub></i>	...	.C	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[288]

---

---

<b>M-A<sub>3</sub></b>	GAT	ACC	TAC	TAC	GGA	GAA	TG	[308]
<b>M-B<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]
<b>M-C<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]
<b>M-D<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]
<b>M-E<sub>3</sub></b>	...	...	A..	...	...	T..	..	[308]
<b>M-F<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]
<b>M-G<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]
<b>M-H<sub>3</sub></b>	...	...	...	...	...	...	..	[308]

11. Anexos

**Fig. 61.** Secuencias alineadas de los diferentes alelos encontrados en el gen AC-4. Número de secuencias=6; número de posiciones alineadas=312; posiciones homólogas= (.); posiciones ausentes=(-).

<i>M-A<sub>4</sub></i>	CCA	CAG	TGT	GGT	TTT	GGG	TAA	GAT	CTT	GAG	ATT	ACG	ACT	CCC	GAA	ACC	[ 48]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	..T	[ 48]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	..-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 48]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	..T	[ 48]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 48]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	A..	..G	...	...	...	...	...	...	...	..T	[ 48]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	ATT	CCC	AAC	TAA	ATA	GTC	TAC	TGA	TTA	AGG	TGC	GGA	GGA	GGC	TGG	TCT	[ 96]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	T..	.G.	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 96]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	ATT	AGA	GCT	TGG	GAG	TAC	TTC	GTT	TAC	GAA	GGA	GTT	GTT	TCT	GGC	GGA	[144]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	[144]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	[144]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[144]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	[144]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	GAA	TAT	CTC	TCG	AAA	GTA	AAT	AGT	TAC	CAG	TTC	CCA	ATA	TAA	CTG	TCT	[192]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	...	...	A.A	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	[192]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	...	...	A.A	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...	...	...	[192]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[192]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	...	...	A.A	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	[192]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	AGA	TAT	TTA	CAC	ATG	TGG	TTT	TGA	CAC	CAG	GGT	GTC	TGC	CGT	CCC	TAT	[240]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	CCG	ATT	CAT	CCA	TGT	GGA	CGC	CAT	GAA	ATC	GAT	ACC	TAC	TAT	GGA	GAA	[288]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	..A	...	...	...	...	...	..A.	...	..G.	..A.	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	..A.	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	..A	...	...	...	...	...	..A.	...	..G.	..A.	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	..A.	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	..A	...	...	...	...	...	..A.	...	..G.	..A.	...	...	...	...	...	...	[288]
<i>M-A<sub>4</sub></i>	TGC	TCT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]
<i>M-B<sub>4</sub></i>	...	C..	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]
<i>M-C<sub>4</sub></i>	...	...	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]
<i>M-D<sub>4</sub></i>	...	C..	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]
<i>M-E<sub>4</sub></i>	...	...	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]
<i>M-F<sub>4</sub></i>	...	C..	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	[312]

**Fig. 62.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los alelos del gen GCP-7 deducida a partir de BlastX.

	1	10																		20
<b>M-A7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-B7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-C7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-D7</b>	G	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-E7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-F7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V
<b>M-G7</b>	--	--	C	D	G	G	Y	N	A	R	A	W	K	W	A	T	I	A	G	V

	21	30																		40
<b>M-A7</b>	V	G	N	T	G	G	A	Y	K	E	K	--	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-B7</b>	V	--	--	T	G	G	A	Y	K	E	K	--	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-C7</b>	V	--	--	T	G	G	A	Y	K	E	K	--	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-D7</b>	V	--	--	T	G	G	A	N	K	E	K	--	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-E7</b>	V	--	--	T	G	G	A	Y	K	E	--	--	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-F7</b>	V	--	--	T	G	G	A	Y	K	E	K	V	G	N	C	K	P	Y	V	F
<b>M-G7</b>	V	--	--	T	G	G	A	Y	K	E	K	--	G	N	C	K	P	Y	V	F

	41	50																		56
<b>M-A7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-B7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-C7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-D7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-E7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-F7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				
<b>M-G7</b>	P	Q	C	G	A	H	K	G	K	A	F	N	N	C	P	S				

## 11. Anexos

**Fig. 63.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los alelos del gen AC-1 deducida a partir de BlastX.

	1	10	20																	
<i>M-A<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-B<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-C<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-D<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-E<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-F<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G
<i>M-G<sub>1</sub></i>	S	A	T	D	I	M	T	C	C	R	P	Q	C	G	D	G	C	E	G	G

	21	30	40																	
<i>M-A<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-B<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-C<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-D<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-E<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-F<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y
<i>M-G<sub>1</sub></i>	W	P	I	E	A	W	K	Y	F	I	Y	D	G	V	V	S	G	G	E	Y

	41	50	60																	
<i>M-A<sub>1</sub></i>	L	T	K	D	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-B<sub>1</sub></i>	L	T	K	G	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-C<sub>1</sub></i>	L	T	K	G	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-D<sub>1</sub></i>	L	T	K	D	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-E<sub>1</sub></i>	L	T	K	D	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-F<sub>1</sub></i>	L	T	K	G	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D
<i>M-G<sub>1</sub></i>	L	T	K	G	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D

	61	68						
<i>M-A<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-B<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-C<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-D<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-E<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-F<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G
<i>M-G<sub>1</sub></i>	T	Y	Y	G	E	C	R	G

Fig. 64. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los alelos del gen AC-3 deducida a partir de BlastX.

	1	10																		20									
<i>M-A<sub>3</sub></i>	T	--	C	T	P	T	C	G	F	G	C	D	G	G	W	S	I	K	A	W									
<i>M-B<sub>3</sub></i>	T	--	C	--	P	--	C	G	F	G	C	--	G	G	W	S	I	+	A	W									
<i>M-C<sub>3</sub></i>	T	--	C	T	P	T	C	G	F	G	C	D	G	G	W	S	I	K	A	W									
<i>M-D<sub>3</sub></i>	T	--	C	--	P	--	C	G	F	G	C	--	G	G	W	S	I	+	A	W									
<i>M-E<sub>3</sub></i>	T	--	C	--	P	--	C	G	F	G	C	--	G	G	W	S	I	+	A	W									
<i>M-F<sub>3</sub></i>	T	--	C	T	P	T	C	G	F	G	C	D	G	G	W	S	I	K	A	W									
<i>M-G<sub>3</sub></i>	T	--	C	T	P	T	C	G	F	G	C	D	G	G	W	S	I	K	A	W									
<i>M-H<sub>3</sub></i>	T	--	C	T	P	T	C	G	F	G	C	D	G	G	W	S	I	K	A	W									

	21	30																		40									
<i>M-A<sub>3</sub></i>	E	Y	F	T	Y	A	G	L	V	S	G	G	E	Y	R	S	K	--	--	--									
<i>M-B<sub>3</sub></i>	E	Y	F	--	Y	--	G	+	V	S	G	G	E	Y	--	+	K	--	--	--									
<i>M-C<sub>3</sub></i>	E	Y	F	T	Y	A	G	L	V	S	G	G	E	Y	R	S	K	--	--	--									
<i>M-D<sub>3</sub></i>	E	Y	F	--	Y	--	G	+	V	S	G	G	E	Y	--	+	K	--	--	--									
<i>M-E<sub>3</sub></i>	E	Y	F	--	Y	--	G	+	V	S	G	G	E	Y	--	+	K	--	--	--									
<i>M-F<sub>3</sub></i>	E	Y	F	T	Y	A	G	L	V	S	G	G	E	Y	R	S	K	+	R	--									
<i>M-G<sub>3</sub></i>	E	Y	F	T	Y	A	G	L	V	S	G	G	E	Y	R	S	K	--	--	--									
<i>M-H<sub>3</sub></i>	E	Y	F	T	Y	A	G	L	V	S	G	G	E	Y	R	S	K	--	--	--									

	41	50																		60										63
<i>M-A<sub>3</sub></i>	--	R	C	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-B<sub>3</sub></i>	--	--	--	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-C<sub>3</sub></i>	--	R	C	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-D<sub>3</sub></i>	--	--	--	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-E<sub>3</sub></i>	--	--	--	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	--	Y	G	--							
<i>M-F<sub>3</sub></i>	--	R	C	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-G<sub>3</sub></i>	--	R	C	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							
<i>M-H<sub>3</sub></i>	--	R	C	C	R	P	Y	P	-	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G	E							

11. Anexos

**Fig. 65.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los alelos del gen AC-4 deducida a partir de BlastX.

	1	10	20																	
<i>M-A4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	C	G	F	G	C	G	G	G	W	S	I	R
<i>M-B4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	C	G	F	G	C	G	G	G	W	S	I	R
<i>M-C4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	--	--	--	G	--	--	--	--	W	S	I	R
<i>M-D4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	C	G	F	G	C	G	G	G	W	S	I	R
<i>M-E4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	C	G	F	G	C	G	G	G	W	S	I	R
<i>M-F4</i>	I	L	T	C	C	N	P	Q	C	G	F	G	C	G	G	G	W	S	I	R

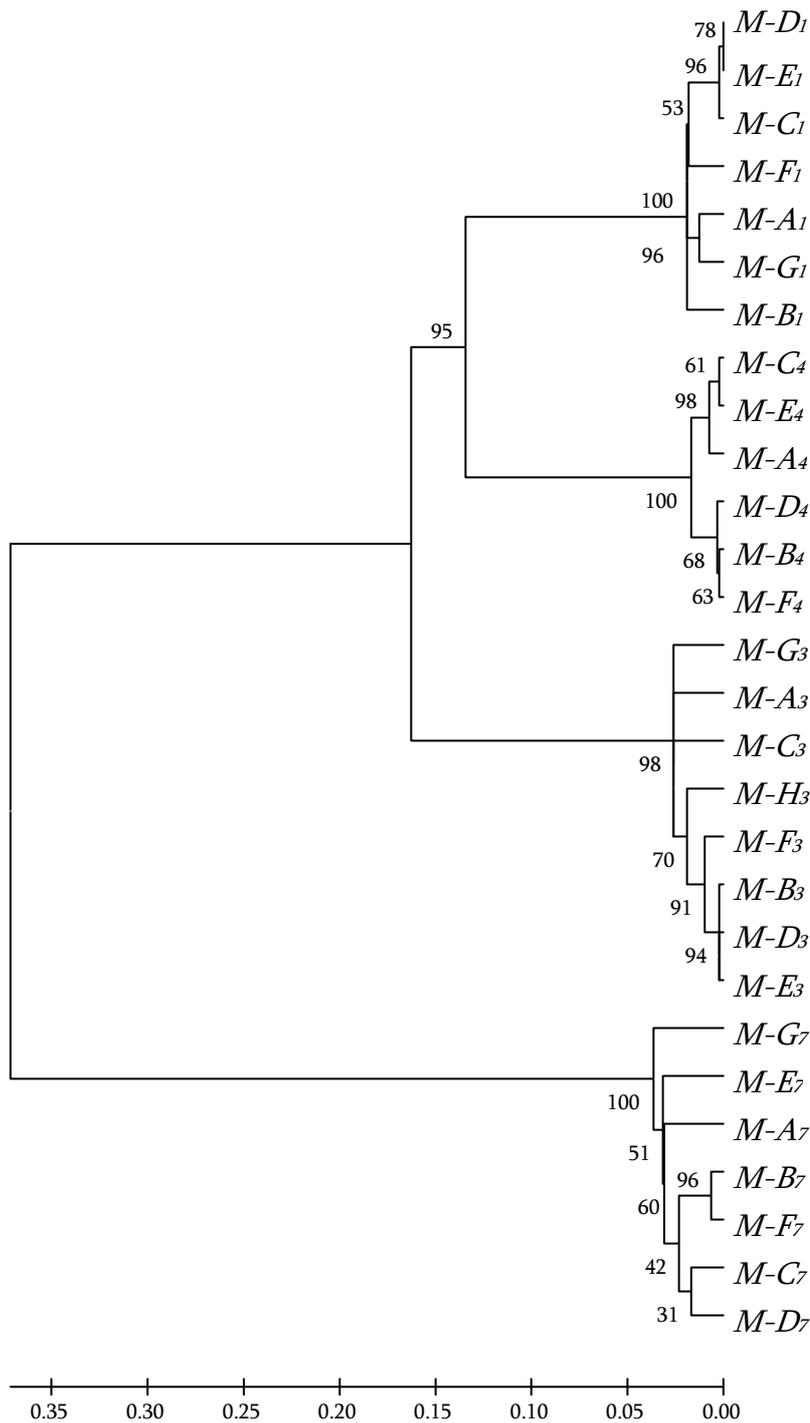
	21	30	40																	
<i>M-A4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	+	K	G
<i>M-B4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	T	K	G
<i>M-C4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	+	K	G
<i>M-D4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	T	K	G
<i>M-E4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	+	K	G
<i>M-F4</i>	A	W	E	Y	F	V	Y	E	G	V	V	S	G	G	E	Y	L	T	K	G

	41	50	60																	
<i>M-A4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	--	H	--	--	D	T	Y	Y	G
<i>M-B4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G
<i>M-C4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	--	H	G	N	D	T	Y	Y	G
<i>M-D4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G
<i>M-E4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	--	H	G	N	D	T	Y	Y	G
<i>M-F4</i>	V	C	R	P	Y	P	I	H	P	C	G	H	H	G	N	D	T	Y	Y	G

	61	62
<i>M-A4</i>	E	C
<i>M-B4</i>	E	C
<i>M-C4</i>	E	C
<i>M-D4</i>	E	C
<i>M-E4</i>	E	C
<i>M-F4</i>	E	C



**Fig. 66.** Dendrograma de todas las secuencias de los genes GCP-7, AC-1, AC-3 y AC-4 de proteasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* de España y Norte América. El árbol se obtuvo mediante 500 réplicas usando los métodos Jukes Cantor y Neighbour-Joining en MEGA versión 4.0. Los números junto a las ramas son los porcentajes de probabilidad en base a los 500 muestreos aleatorios. La escala representa las distancias Jukes Cantor entre los alelos de los diferentes *loci* analizados.

## 11.2. TABLAS

**Tabla 15:** Lista de comparaciones realizadas objeto de estudio.

<b>FACTOR VACUNA</b>		
OV (NA/NA)	<i>vs</i>	OV (Ø/NA)
OV (SP/NA)	<i>vs</i>	OV (Ø/NA)
OV (NA/NA)	<i>vs</i>	OV (SP/NA)
OV (NA/SP)	<i>vs</i>	OV (Ø/SP)
OV (SP/SP)	<i>vs</i>	OV (Ø/SP)
OV (NA/SP)	<i>vs</i>	OV (SP/SP)
CA (NA/NA)	<i>vs</i>	CA (Ø/NA)
CA (SP/NA)	<i>vs</i>	CA (Ø/NA)
CA (NA/NA)	<i>vs</i>	CA (SP/NA)
CA (NA/SP)	<i>vs</i>	CA (Ø/SP)
CA (SP/SP)	<i>vs</i>	CA (Ø/SP)
CA (NA/SP)	<i>vs</i>	CA (SP/SP)
[OV (NA/NA) + OV (NA/SP)]	<i>vs</i>	[OV (Ø/NA) + OV (Ø/SP)]
[OV (SP/SP) + OV (SP/NA)]	<i>vs</i>	[OV (Ø/NA) + OV (Ø/SP)]
[CA (NA/NA) + CA (NA/SP)]	<i>vs</i>	[CA (Ø/NA) + CA (Ø/SP)]
[CA (SP/SP) + CA (SP/NA)]	<i>vs</i>	[CA (Ø/NA) + CA (Ø/SP)]
[OV (NA/NA) + OV (SP/SP)]	<i>vs</i>	[OV (Ø/NA) + OV (Ø/SP)]
[CA (NA/NA) + CA (SP/SP)]	<i>vs</i>	[CA (Ø/NA) + CA (Ø/SP)]
[OV (NA/NA) + OV (NA/SP) + OV (SP/SP) + OV (SP/NA)]	<i>vs</i>	[OV (Ø/NA) + OV (Ø/SP)]
[CA (NA/NA) + CA (NA/SP) + CA (SP/SP) + CA (SP/NA)]	<i>vs</i>	[CA (Ø/NA) + CA (Ø/SP)]
TODOS LOS VACUNADOS	<i>vs</i>	TODOS LOS NO VACUNADOS
<b>FACTOR CEPA</b>		
OV (SP/SP)	<i>vs</i>	OV (NA/NA)
OV (NA/SP)	<i>vs</i>	OV (NA/NA)
OV (SP/SP)	<i>vs</i>	OV (SP/NA)
OV (Ø/NA)	<i>vs</i>	OV (Ø/SP)
CA (SP/SP)	<i>vs</i>	CA (NA/NA)
CA (NA/SP)	<i>vs</i>	CA (NA/NA)
CA (SP/SP)	<i>vs</i>	CA (SP/NA)

CA (Ø/NA)	<i>vs</i>	CA (Ø/SP)
[OV (NA/SP) + OV (SP/SP) + OV (Ø/SP)]	<i>vs</i>	[OV (NA/NA) + OV (SP/NA) + OV (Ø/NA)]
[CA (NA/SP) + CA (SP/SP) + CA (Ø/SP)]	<i>vs</i>	[CA (NA/NA) + CA (SP/NA) + CA (Ø/NA)]
TODOS LOS INOCULADOS CEPA SP	<i>vs</i>	TODOS LOS INOCULADOS CEPA NA
<b>FACTOR HOSPEDADOR</b>		
OV (NA/NA)	<i>vs</i>	CA (NA/NA)
OV (Ø/NA)	<i>vs</i>	CA (Ø/NA)
OV (SP/SP)	<i>vs</i>	CA (SP/SP)
OV (Ø/SP)	<i>vs</i>	CA (Ø/SP)
OV (NA/SP)	<i>vs</i>	CA (NA/SP)
OV (SP/NA)	<i>vs</i>	CA (SP/NA)
[OV (NA/NA) + OV (NA/SP)]	<i>vs</i>	[CA (NA/NA) + CA (NA/SP)]
[OV (SP/SP) + OV (SP/NA)]	<i>vs</i>	[CA (SP/SP) + CA (SP/NA)]
[OV (Ø/NA) + OV (Ø/SP)]	<i>vs</i>	[CA (Ø/NA) + CA (Ø/SP)]
[OV (NA/NA) + OV (SP/NA) + OV (Ø/NA)]	<i>vs</i>	[CA (NA/NA) + CA (SP/NA) + CA (Ø/NA)]
[OV (NA/SP) + OV (SP/SP) + OV (Ø/SP)]	<i>vs</i>	[CA (NA/SP) + CA (SP/SP) + CA (Ø/SP)]
OVINOS VACUNADOS	<i>vs</i>	CAPRINOS VACUNADOS
TODOS OVINOS	<i>vs</i>	TODOS CAPRINOS

## 11. Anexos

**Tabla 16.** Frecuencias de patrones SSCP del gen GCP-7 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>SP</i> )
<i>M-A7A7</i>	0,6400	0,5400	0,4200	0,4900	0,2400	0,3700
<i>M-B7B7</i>	0,0100	0,0300	0,0100	0,0600	0,0400	0,0300
<i>M-C7C7</i>	0,0300	0,0700	0,0600	0,0150	0,0500	0,0900
<i>M-D7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1100	0,0500	0,1100
<i>M-E7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0150	0,0000	0,0000
<i>M-F7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-G7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0400	0,0100
<i>M-A7B7</i>	0,1300	0,1200	0,1500	0,0900	0,1200	0,1500
<i>M-A7C7</i>	0,1600	0,2300	0,3300	0,0600	0,1600	0,0100
<i>M-A7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1100	0,0800	0,1300
<i>M-A7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0150	0,0000	0,0000
<i>M-A7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0150	0,1000	0,0100
<i>M-B7C7</i>	0,0100	0,0000	0,0200	0,0150	0,0100	0,0100
<i>M-B7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0000
<i>M-B7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-B7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0500	0,0000
<i>M-C7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000
<i>M-C7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-D7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-D7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N</i> = 82	<i>N</i> = 68	<i>N</i> = 85	<i>N</i> = 65	<i>N</i> = 74	<i>N</i> = 54

**Tabla 17.** Frecuencias alélicas del gen GCP-7 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>SP</i> )
<i>M-A7</i>	0,7900	0,7200	0,6600	0,6400	0,4700	0,5400
<i>M-B7</i>	0,0800	0,0900	0,1000	0,1100	0,1200	0,1200
<i>M-C7</i>	0,1200	0,1900	0,2300	0,0500	0,1700	0,1000
<i>M-D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1600	0,1300	0,1700
<i>M-E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0150	0,0000	0,0100
<i>M-F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0070	0,0060	0,0300
<i>M-G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0070	0,0800	0,0300
	<i>N</i> = 164	<i>N</i> = 136	<i>N</i> = 170	<i>N</i> = 130	<i>N</i> = 148	<i>N</i> = 108

**Tabla 18.** Frecuencias de patrones SSCP del gen GCP-7 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A7A7</i>	0,5300	0,5500	0,6400	0,3800	0,3000	0,2600
<i>M-B7B7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0400	0,0400
<i>M-C7C7</i>	0,0300	0,0100	0,0700	0,0100	0,0700	0,0500
<i>M-D7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0600	0,0900
<i>M-E7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-F7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-G7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0400	0,0200	0,0100
<i>M-A7B7</i>	0,1300	0,1100	0,0700	0,0800	0,1400	0,1200
<i>M-A7C7</i>	0,3100	0,2900	0,1900	0,0500	0,0700	0,0600
<i>M-A7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1300	0,1100	0,1600
<i>M-A7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0200	0,0000
<i>M-A7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0400
<i>M-A7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,0400	0,0100
<i>M-B7C7</i>	0,0000	0,0000	0,0200	0,0400	0,0200	0,0100
<i>M-B7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0200	0,0000
<i>M-B7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-B7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0200	0,0000
<i>M-C7D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0200	0,0500
<i>M-C7F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000	0,0100
<i>M-D7E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0000
<i>M-D7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0100
<i>M-E7G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
	<i>N = 68</i>	<i>N = 69</i>	<i>N = 42</i>	<i>N = 71</i>	<i>N = 69</i>	<i>N = 75</i>

**Tabla 19.** Frecuencias alélicas del gen GCP-7 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A7</i>	0,7500	0,7500	0,7700	0,5700	0,5100	0,4600
<i>M-B7</i>	0,0600	0,0700	0,0400	0,1000	0,1400	0,1100
<i>M-C7</i>	0,1800	0,1700	0,1600	0,0800	0,1200	0,1000
<i>M-D7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1200	0,1400	0,2100
<i>M-E7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0070	0,0140	0,0200
<i>M-F7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0070	0,0140	0,0400
<i>M-G7</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,0500	0,0300
	<i>N = 136</i>	<i>N = 138</i>	<i>N = 84</i>	<i>N = 142</i>	<i>N = 138</i>	<i>N = 150</i>

## 11. Anexos

**Tabla 20.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-1 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>Ø/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>Ø/SP</i> )
<i>M-A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	0,3300	0,3600	0,5300	0,4300	0,4100	0,4400
<i>M-B<sub>1</sub>B<sub>1</sub></i>	0,1600	0,2800	0,1300	0,0000	0,0100	0,0200
<i>M-C<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-D<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200
<i>M-E<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0000
<i>M-F<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000	0,0200
<i>M-A<sub>1</sub>B<sub>1</sub></i>	0,4900	0,3000	0,3100	0,0380	0,0600	0,0300
<i>M-A<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0300	0,0300	0,0500	0,0500
<i>M-A<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,2400	0,0900	0,0600
<i>M-A<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0400	0,0800
<i>M-A<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0100	0,0000	0,1600	0,2500	0,1600
<i>M-B<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0130	0,0300	0,0000	0,0100	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100	0,0200
<i>M-B<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0300
<i>M-B<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0200
<i>M-C<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200
<i>M-C<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0380	0,0000	0,0000
<i>M-D<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0200
<i>M-D<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200
<i>M-E<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>1</sub>G<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200
	<i>N=75</i>	<i>N=72</i>	<i>N=95</i>	<i>N=80</i>	<i>N=76</i>	<i>N=63</i>

**Tabla 21.** Frecuencias alélicas del gen AC-1 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>Ø/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>Ø/SP</i> )
<i>M-A<sub>1</sub></i>	0,5800	0,5200	0,7000	0,6600	0,6500	0,6300
<i>M-B<sub>1</sub></i>	0,4100	0,4400	0,2800	0,0400	0,0700	0,0600
<i>M-C<sub>1</sub></i>	0,0060	0,0300	0,0160	0,0400	0,0300	0,0300
<i>M-D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1300	0,0600	0,0800
<i>M-E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0600	0,0700
<i>M-F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0070	0,0000	0,1200	0,1300	0,1100
<i>M-G<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080
	<i>N=150</i>	<i>N=144</i>	<i>N=190</i>	<i>N=160</i>	<i>N=152</i>	<i>N=126</i>

**Tabla 22.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-1 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	0,4500	0,4100	0,4500	0,3900	0,5000	0,3500
<i>M-B<sub>1</sub>B<sub>1</sub></i>	0,1700	0,1800	0,2200	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-D<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100
<i>M-F<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000	0,0500
<i>M-A<sub>1</sub>B<sub>1</sub></i>	0,3300	0,3600	0,2700	0,0900	0,0500	0,0500
<i>M-A<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0500	0,0000	0,0340	0,0300	0,0700	0,0400
<i>M-A<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1300	0,1300	0,1200
<i>M-A<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1300	0,0700	0,1600
<i>M-A<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1800	0,1000	0,1100
<i>M-B<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0300	0,0170	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-B<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-B<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100
<i>M-C<sub>1</sub>D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100	0,0000
<i>M-C<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-D<sub>1</sub>E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100	0,0100
<i>M-D<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0100
<i>M-E<sub>1</sub>F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0400
<i>M-E<sub>1</sub>G<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N=82</i>	<i>N=61</i>	<i>N=58</i>	<i>N=75</i>	<i>N=72</i>	<i>N=74</i>

**Tabla 23.** Frecuencias alélicas del gen AC-1 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>1</sub></i>	0,6400	0,5900	0,6000	0,6700	0,7100	0,5900
<i>M-B<sub>1</sub></i>	0,3300	0,3700	0,3700	0,0500	0,0300	0,0400
<i>M-C<sub>1</sub></i>	0,0240	0,0300	0,0260	0,0200	0,0400	0,0200
<i>M-D<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0800	0,0800	0,0800
<i>M-E<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0700	0,0600	0,1200
<i>M-F<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,0700	0,1400
<i>M-G<sub>1</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N=164</i>	<i>N=122</i>	<i>N=116</i>	<i>N=150</i>	<i>N=144</i>	<i>N=150</i>

## 11. Anexos

**Tabla 24.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-3 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (N): número vermes machos de *H. contortus*.

	OV (NA/NA)	OV (SP/NA)	OV (Ø/NA)	OV (SP/SP)	OV (NA/SP)	OV (Ø/SP)
<i>M-A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	0,7200	0,7700	0,5300	0,0800	0,0900	0,1300
<i>M-B<sub>3</sub>B<sub>3</sub></i>	0,0500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0300	0,0900	0,0000	0,1100	0,0200
<i>M-D<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0300	0,0700	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0500	0,0500	0,1000	0,6200	0,4700	0,5200
<i>M-F<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0100	0,2600	0,1500	0,1300
<i>M-G<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>B<sub>3</sub></i>	0,0500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0900	0,0000	0,0400	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0200	0,0800	0,0600	0,0400	0,0100	0,0400
<i>M-A<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000
<i>M-B<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>H<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1500	0,0000
<i>M-D<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1300
<i>M-F<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N = 58</i>	<i>N = 58</i>	<i>N = 59</i>	<i>N = 50</i>	<i>N = 75</i>	<i>N = 44</i>

**Tabla 25.** Frecuencias alélicas del gen AC-3 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (N): número de alelos analizados en cada grupo.

	OV (NA/NA)	OV (SP/NA)	OV (Ø/NA)	OV (SP/SP)	OV (NA/SP)	OV (Ø/SP)
<i>M-A<sub>3</sub></i>	0,8000	0,8200	0,5800	0,1000	0,1000	0,1600
<i>M-B<sub>3</sub></i>	0,0800	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub></i>	0,0010	0,0300	0,1300	0,0000	0,1800	0,0200
<i>M-D<sub>3</sub></i>	0,0400	0,0400	0,1100	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub></i>	0,0600	0,1000	0,1400	0,6400	0,4800	0,6100
<i>M-F<sub>3</sub></i>	0,0010	0,0000	0,0400	0,2600	0,1500	0,2000
<i>M-G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0060	0,0000
<i>M-H<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0700	0,0000
	<i>N = 116</i>	<i>N = 116</i>	<i>N = 132</i>	<i>N = 100</i>	<i>N = 149</i>	<i>N = 88</i>

**Tabla 26.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-3 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	0,6800	0,6700	0,6700	0,0700	0,0600	0,0600
<i>M-B<sub>3</sub>B<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,1400	0,0200	0,0500	0,0300	0,2500
<i>M-D<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0600	0,0300	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,1500	0,0200	0,1600	0,4800	0,6700	0,3600
<i>M-F<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1700	0,1500	0,1400
<i>M-G<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0400
<i>M-A<sub>3</sub>B<sub>3</sub></i>	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0300	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0200	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0600	0,0500	0,1100	0,0500	0,0200	0,0300
<i>M-A<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>D<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-C<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300
<i>M-C<sub>3</sub>H<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0500	0,0000
<i>M-D<sub>3</sub>E<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub>F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,1200	0,0200	0,0100
<i>M-F<sub>3</sub>G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
	<i>N</i> = 47	<i>N</i> = 58	<i>N</i> = 43	<i>N</i> = 58	<i>N</i> = 61	<i>N</i> = 69

**Tabla 27.** Frecuencias alélicas del gen AC-3 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>3</sub></i>	0,7300	0,7200	0,7600	0,1100	0,0700	0,0700
<i>M-B<sub>3</sub></i>	0,0100	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-C<sub>3</sub></i>	0,0000	0,1600	0,0200	0,0700	0,0600	0,2800
<i>M-D<sub>3</sub></i>	0,0700	0,0500	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>3</sub></i>	0,1800	0,0400	0,2300	0,5700	0,6900	0,3900
<i>M-F<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,1500	0,1500
<i>M-G<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>M-H<sub>3</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100	0,0200	0,0700
	<i>N</i> = 94	<i>N</i> = 116	<i>N</i> = 86	<i>N</i> = 116	<i>N</i> = 122	<i>N</i> = 138

## 11. Anexos

**Tabla 28.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-4 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>SP</i> )
<i>M-A<sub>4</sub>A<sub>4</sub></i>	0,1875	0,1600	0,2500	0,1800	0,1800	0,3000
<i>M-B<sub>4</sub>B<sub>4</sub></i>	0,1750	0,0660	0,1150	0,2900	0,3400	0,2300
<i>M-C<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,0250	0,0260	0,0200	0,0250	0,0000	0,0000
<i>M-D<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-F<sub>4</sub>F<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>4</sub>B<sub>4</sub></i>	0,3000	0,4200	0,4500	0,3900	0,4000	0,3600
<i>M-A<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,1500	0,2000	0,1150	0,0400	0,0800	0,0160
<i>M-A<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0160
<i>M-A<sub>4</sub>E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,1625	0,1300	0,0400	0,0500	0,0800	0,0160
<i>M-B<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0250	0,0000	0,0470
<i>M-B<sub>4</sub>E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0160
	<i>N</i> = 80	<i>N</i> = 76	<i>N</i> = 95	<i>N</i> = 80	<i>N</i> = 79	<i>N</i> = 64

**Tabla 29.** Frecuencias alélicas del gen AC-4 en los distintos grupos experimentales de ovinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	<i>OV</i> ( <i>NA/NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/NA</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>NA</i> )	<i>OV</i> ( <i>SP/SP</i> )	<i>OV</i> ( <i>NA/SP</i> )	<i>OV</i> ( $\emptyset$ / <i>SP</i> )
<i>M-A<sub>4</sub></i>	0,4100	0,4700	0,5400	0,4000	0,4000	0,4900
<i>M-B<sub>4</sub></i>	0,4000	0,3400	0,3600	0,5200	0,5600	0,4500
<i>M-C<sub>4</sub></i>	0,1800	0,2000	0,1000	0,0700	0,0400	0,0160
<i>M-D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0130	0,0000	0,0080
<i>M-E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080
<i>M-F<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N</i> = 160	<i>N</i> = 152	<i>N</i> = 190	<i>N</i> = 160	<i>N</i> = 158	<i>N</i> = 128

**Tabla 30.** Frecuencias de patrones SSCP del gen AC-4 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número vermes machos de *H. contortus*.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>4</sub>A<sub>4</sub></i>	0,2100	0,3000	0,2500	0,2500	0,2700	0,2500
<i>M-B<sub>4</sub>B<sub>4</sub></i>	0,1300	0,1000	0,1400	0,3100	0,2700	0,1800
<i>M-C<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,0100	0,0120	0,0300	0,0130	0,0000	0,0120
<i>M-D<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000
<i>M-F<sub>4</sub>F<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0370
<i>M-A<sub>4</sub>B<sub>4</sub></i>	0,3600	0,3300	0,3600	0,3200	0,4100	0,4400
<i>M-A<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,1900	0,1700	0,1100	0,0260	0,0140	0,0250
<i>M-A<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000
<i>M-A<sub>4</sub>E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0120
<i>M-B<sub>4</sub>C<sub>4</sub></i>	0,1000	0,0800	0,1100	0,0400	0,0280	0,0370
<i>M-B<sub>4</sub>D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000
<i>M-B<sub>4</sub>E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>N = 86</i>	<i>N = 84</i>	<i>N = 64</i>	<i>N = 77</i>	<i>N = 70</i>	<i>N = 81</i>

**Tabla 31.** Frecuencias alélicas del gen AC-4 en los distintos grupos experimentales de caprinos. (*N*): número de alelos analizados en cada grupo.

	CA (NA/NA)	CA (SP/NA)	CA (Ø/NA)	CA (SP/SP)	CA (NA/SP)	CA (Ø/SP)
<i>M-A<sub>4</sub></i>	0,4800	0,5600	0,4800	0,4300	0,4800	0,4900
<i>M-B<sub>4</sub></i>	0,3600	0,3200	0,3700	0,5000	0,4900	0,4200
<i>M-C<sub>4</sub></i>	0,1500	0,1400	0,1400	0,0400	0,0200	0,0430
<i>M-D<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300	0,0000	0,0000
<i>M-E<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0430
<i>M-F<sub>4</sub></i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300
	<i>N = 172</i>	<i>N = 164</i>	<i>N = 128</i>	<i>N = 154</i>	<i>N = 140</i>	<i>N = 162</i>



Anexo I

**D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento toma el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación a la tesis doctoral titulada "ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN EN PEQUEÑOS RUMIANTES CON PROTEINASAS TIPO CISTEÍNA DE VERMES ADULTOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*: IMPLICACIONES EN LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO" presentada por el doctorando D. Sergio Martín Martel y dirigida por los Dres. D. Antonio Ruiz Reyes y D. José Manuel Molina Caballero.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Arucas, a dieciocho de marzo de dos mil diez.

